



TESIS DOCTORAL

**BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS
DE METABOLITOS BIOACTIVOS:
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL EN EL
EJE MICROBIOTA-INTESTINO-CEREBRO**

Lic. Gabriela Agustina Bulacios
Año 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L.



**BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE METABOLITOS
BIOACTIVOS: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL EN EL EJE
MICROBIOTA-INTESTINO-CEREBRO**

TESIS DOCTORAL

Lic. Gabriela Agustina Bulacios

2025



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INSITUTO
MIGUEL LILLO

Miguel Lillo 205 - T. E. +54 381 4239456
CP: 4000 - San Miguel de Tucumán – República Argentina



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dr. Eduardo Domínguez

Dra. Mirna Hilal

Dra. María Verónica Manzo

Dr. Marcelo Sebastián Moyano

Dra. Nurit Oliszewski

Dra. Elisa Fanjul

Sr. José Luis Roldán

Dra. María Soledad Bustos

Srta. Agostina Belén Romano

Srta. Florencia Luján Rodríguez

Srta. Rocío Agostina González

DECANA

Dra. Virginia Sara Luz Abdala

VICEDECANO

Mag. Pablo Sesma

SECRETARIA ACADÉMICA

Dra. María Elena Puchulu

SECRETARIA DE POSGRADO

Dra. Fabiana del Carmen Cuezco



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INSITUTO
MIGUEL LILLO

Miguel Lillo 205 - T. E. +54 381 4239456
CP: 4000 - San Miguel de Tucumán – República Argentina



**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO
ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución No 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución No 750/13

Director:

Dra. María Pía Taranto

Co-Director:

Dr. Carlos Javier Minhak

Comité Académico:

Dra. Silvana Andrea Apichela

Dr. Martin Eduardo Argañaraz

Dra. María Inés Isla

Dra. Roxana Beatriz Medina

Dra. María Gabriela Murúa

Dra. María Lucila Saavedra

Suplentes:

Dr. Sergio Antonio Cuozzo

Dra. María Alejandra Polti



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INSITUTO
MIGUEL LILLO

Miguel Lillo 205 - T. E. +54 381 4239456
CP: 4000 - San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO

**Bacterias lácticas productoras de metabolitos bioactivos:
caracterización funcional en el eje microbiota-intestino-cerebro**

TESISTA

Lic. Gabriela Agustina Bulacios

DIRECTORA

Dra. Lucila Saavedra

CO-DIRECTORA

Dra. Elena Posse de Chaves

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN

Dr. Diego Ploper
Dra. Guadalupe Vizoso Pinto

Año 2025



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INSITUTO
MIGUEL LILLO

Miguel Lillo 205 - T. E. +54 381 4239456
CP: 4000 - San Miguel de Tucumán – República Argentina



Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Fundación Miguel Lillo (FML) y de la Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC) y en “Pharmacology Department of the Faculty of Medicine and Dentistry at the University of Alberta (Edmonton, Canada)”.



UNIVERSITY
OF ALBERTA

C E R E L A

Este trabajo de Tesis Doctoral se financió a través de becas y subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) de Argentina y del programa “Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP) - EduCanada, Canada”.





UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INSITUTO
MIGUEL LILLO

Miguel Lillo 205 - T. E. +54 381 4239456
CP: 4000 - San Miguel de Tucumán – República Argentina



Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones científicas:

PUBLICACIÓN EN REVISTAS CIENTÍFICAS CON REFERATO INTERNACIONAL

Bulacios GA, Cataldo PG, Naja JR, de Chaves EP, Taranto MP, Minahk CJ, Hebert EM, Saavedra ML (2023). "Improvement of key molecular events linked to Alzheimer's disease pathology using postbiotics". ACS Omega. DOI: 10.1021/acsomega.3c06805

COMUNICACIONES CIENTIFICAS

Bulacios GA; Naja J; Cataldo PG; Martínez Urquiza P; Elean MD; Posse de Chaves E; Taranto MP; Beauquis J; Hebert EM and Saavedra L. "In vivo mitigation of scopolamine-induced cholinergic dysfunction and oxidative stress by selected *Lactobacillus* strains". LIX Congreso de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB 2023).

Cataldo P*; **Bulacios G***; Naja J; Elean M, Posse de Chaves E; Taranto MP, Beauquis J, Hebert EM and Saavedra L. "Healthy aging. Molecular bases for the development of a bioinnovative food prototype with psychobiotics". - ISAPP 2023 Annual Meeting – Denver, Colorado, USA.

Acosta LP, **Bulacios GA**, Saavedra L, Farfán F, Cataldo PG, Elean MD, Naja JR, Hebert EM, Goroso DG. "Herramienta video gravimétrica basada en software libre para monitoreo de ratones en la Prueba de Campo Abierto". - IV Jornadas Científicas - Salud y Tecnología: anticipando el futuro - Academia de Ciencias de la Salud Tucumán (2022).

Bulacios GA, Cataldo PG, Elean MD, Posse de Chaves E, Dupuy F, Minahk C, Hebert EM, Saavedra L. "Lactic Acid Bacteria reduced pro-inflammatory cytokines expression and oxidative stress on bv-2 microglia cells stimulated with amyloid beta oligomers". LVII Congreso de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB 2021).

Bulacios GA, Salazar PB, Posse de Chaves E, Hebert EM, Minahk C, Saavedra L. "Selection of Lactic Acid Bacterial strains able to modulate the host central nervous system". – LV Congreso de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB 2019).

Cataldo PG, Elean MD, **Bulacios GA**, Saavedra L, Hebert EM. "Proteomic analysis of gamma aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* CRL 2013 in a chemically defined medium". LV Congreso de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB 2019).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora, Lucila Saavedra, por brindarme la confianza para iniciar este camino, por su acompañamiento y guía constante, y por impulsar ideas y proyectos que hoy se reflejan en este trabajo. Pero, en especial, por su calidez humana y por haberme acompañado con mucho cariño. *Gracias Lulú por ser un ejemplo de fortaleza y por sostenerme en los momentos más difíciles.*

A Elvira Hebert, quien fue como una directora de cariño, por sus valiosos aportes científicos y su constante colaboración en el desarrollo de esta tesis. *Gracias Billy por tu generosidad al compartir tus conocimientos, por tu valiosa capacidad crítica y por preocuparte por mi bienestar.*

A mi co-directora, Elena Posse de Chaves, por sus invaluable aportes en el ámbito de la Neurociencia. Gracias por recibirme con tanta amabilidad en tu laboratorio de la Universidad de Alberta, por brindarme la oportunidad de experimentar nuevas formas de trabajo y por permitirme conocer culturas diversas, experiencias que enriquecieron profundamente mi desarrollo profesional y personal.

A la dirección de CERELA, por brindarme la oportunidad de realizar mi doctorado en esta institución.

A Pía Taranto, por sus charlas y consejos, tanto profesionales como personales, y por el cariño y acompañamiento constante.

A Carlos Minhak por sus invaluable aportes y colaboración en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Raúl Raya y a María Inés Torino, por compartir sus experiencias y consejos con tanto entusiasmo y generosidad.

A mis queridos amigos de Gene II y Tecno IV: Pablo, Jo, Marian, Pauli, Caro, Anita y Nati Ríos. Este camino no hubiera sido igual sin ustedes. Desde aquellos primeros días en que me recibieron en el hermoso grupo de Tecno IV hasta estos últimos años, en los que compartimos no solo un gran equipo de trabajo sino, sobre todo, un valioso grupo humano que me sostuvo y me ayudó a seguir adelante. Gracias por su amistad!

A los chicos del SUM, *el núcleo duro*: Mari, Flor G., Rami, Sofi, Cony, Hernán, Nati, Emi, Fran, Lau, Bren, Maxi, Fer y Flor M. Gracias por las charlas, los cafecitos, los amigos invisibles que se volvieron un clásico para compartir y divertirnos, por los consejos y por hacer más lindo el día a día.

A todos los becarios de CERELA, gracias a los que brindaron su ayuda desinteresadamente y por acompañarme de diferentes maneras a lo largo de todo este proceso.

A todos los miembros de CERELA, en especial a Edu, Vero, Majo, Lourdes, José Luis, Pablo, Richard, Nadia, Josefina, Julito, Caro Paz, Mirta, Facu, Sebas y Rocio, por estar presentes de una u otra forma, y por su gentileza y amabilidad, que siempre hicieron que me sintiera bienvenida y cómoda en el lugar de trabajo.

A mis amigas de siempre y de hockey, por su apoyo y los momentos de felicidad compartidos.

A toda mi familia, por enseñarme que lo que nos sostiene es el amor y los recuerdos compartidos, y por mantenernos unidos a pesar de los momentos difíciles.

A mis padres, Carlos y Beatriz, mis mayores referentes. Gracias por enseñarme, con su esfuerzo, trabajo y perseverancia, que todo tiene sus frutos. Gracias por su amor infinito y por transmitirme valores que me acompañan en cada decisión. Gracias, sobre todo, por darme la confianza y la libertad para crecer con plenitud.

A mi hermana Andrea, por ser desde siempre mi compañera de vida. Gracias por tu apoyo y cariño que nunca faltan.

A Nico, a quien elijo cada día para transitar esta vida juntos. Gracias por tu apoyo incondicional, por soportar mis frustraciones y algunos meses de ausencia. En especial, gracias por tu amor, tu compañía en los momentos buenos y malos, y por ser siempre mi sostén. Lo que compartimos y lo que proyectamos juntos es lo más valioso que tengo.

ÍNDICE



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	5
INTRODUCCIÓN	7
Microbiota.....	7
Definición.....	7
Microbiota intestinal	10
Eje microbiota intestino cerebro	12
Bacterias lácticas y su impacto en el eje intestino-cerebro	14
Bacterias lácticas como psicobióticos y la producción de metabolitos neuroactivos	16
Microbiota y su impacto en enfermedades neurodegenerativas.....	19
Enfermedad de Alzheimer	19
Potencial intervención de bacterias lácticas	24
Antecedentes de nuestro grupo de investigación sobre BL con potencial efecto neuroprotector	25
Objetivo General	28
Objetivos Específicos	28
Capítulo 1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa derivados de microorganismos	30
Introducción	30
Materiales y métodos	33
1. Microorganismos	33
2. Medios de cultivo	33

2.1 Medio protector LEL-glicerol.....	33
2.2 Medio caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS)	33
2.3 Medio caldo LAPTg.....	33
2.4 Medio químicamente definido (CDM).....	34
3. Condiciones de crecimiento y preparación de los medios condicionados	35
4. Determinación de la actividad anti acetilcolinesterasa (AChE) de los medios condicionados bacterianos	35
4.1 Obtención de la enzima acetilcolinesterasa	35
4.2 Inhibición de AChE.....	36
4.3 Evaluación de la actividad proteolítica del medio condicionado de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CRL 581.....	37
4.4 Evaluación de fracciones del medio condicionado de CRL 581 en la inhibición de AChE	37
5. Análisis estadístico.....	37
Resultados y discusión	38
Crecimiento de las bacterias lácticas en medio CDM sin cisteína	38
Análisis del efecto inhibidor de los medios condicionados bacterianos sobre actividad de AChE.....	40
Influencia de la actividad proteolítica sobre la inhibición de AChE	45
Evaluación de la actividad inhibitoria de AChE en fracciones del C-MCB de CRL 581 según tamaño molecular.....	46
Conclusiones parciales	48
Capítulo 2. Evaluación del efecto protector de los postbióticos frente a la toxicidad de oligómeros beta amiloides en modelos celulares del sistema nervioso	50
Introducción	50
Materiales y métodos	53
1. Microorganismos.....	53

2. Medios de cultivos.....	53
2.1 Medio protector LEL-glicerol.....	53
2.2 Medio caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS)	53
2.1 Medio caldo LAPTg.....	53
3. Condiciones de crecimiento y preparación de los postbióticos	53
4. Modelos <i>in vitro</i>	54
4.1 Oligomerización del péptido beta-amiloide A β ₁₋₄₂	54
4.2 Ensayo de citotoxicidad	55
4.3 Evaluación de la actividad antioxidante y la respuesta anti-inflamatoria de los medios condicionados en células BV2.....	55
4.3.1 Capacidad Antioxidante Total	55
4.3.2 Expresión de genes marcadores de inflamación mediante RT-qPCR.....	56
5. Análisis estadístico.....	57
Resultados y discusión	58
Efecto de los medios condicionados de las BL sobre la viabilidad de las células N2a y BV2 frente a la toxicidad de los oA β ₁₋₄₂	58
Efecto de los MCB sobre el estrés oxidativo generado por oA β ₁₋₄₂ en células de la microglía	61
Efecto antiinflamatorio de los medios condicionados bacterianos en células de microglía BV2.....	63
Conclusiones parciales	66
Capítulo 3. Estudio <i>in vivo</i> del efecto de las BL seleccionadas en un modelo murino	68
Introducción	68
Materiales y métodos	70
1. Animales de experimentación	70
1.1 Protocolo de alimentación	70
2. Modelo de deterioro cognitivo agudo inducido por escopolamina	70

3. Ensayo conductual.....	71
3.1 Prueba de Reconocimiento de Objetos en Campo Abierto.....	71
3.2 Análisis de videos con el software STUART (Ing. en Sistemas – UTN)	72
3.3 Exploración de objetos en campo abierto.....	74
4. Parámetros bioquímicos en suero.....	76
5. Evaluación de translocación bacteriana	76
6. Análisis estadístico.....	76
7. Preparación y análisis de homogenatos cerebrales	76
7.1 Disección de cerebro.....	76
7.2 Preparación de homogenatos de cerebro.....	77
7.3 Determinación de concentración de proteínas	77
7.4 Ensayos neurobioquímicos.....	77
7.4.1 Actividad de enzima acetilcolinesterasa (AChE)	77
7.4.2 Actividad catalasa (CAT).....	77
7.4.3 Determinación del contenido de peroxidación lipídica	78
7.4.4 Estimación del contenido de glutatión reducido (GSH)	79
7.5 Análisis de expresión de citoquinas en córtex e hipocampo por RT-qPCR.....	79
7.6 Análisis proteómico del homogenato de cerebro	80
7.6.1 Preparación, separación y espectrometría de masa de los péptidos	80
7.6.2 Identificación y cuantificación de proteínas	81
7.6.3 Procesamiento de datos y análisis estadístico	82
Resultados y discusión	84
Efecto de los probióticos y la escopolamina sobre los procesos de memoria en la prueba de reconocimiento de objetos en campo abierto.....	84
Efecto de la administración de las BL y el tratamiento con escopolamina sobre el peso corporal e ingesta alimentaria de los ratones	91
Parámetros bioquímicos en suero y translocación bacteriana	91
Efecto de las cepas lácticas seleccionadas sobre la actividad acetilcolinesterasa y el estrés	

oxidativo inducido por escopolamina	93
Expresión de genes marcadores de inflamación mediante RT-qPCR en córtex e hipocampo	96
Análisis proteómico del homogenato cerebral.....	99
Análisis de proteínas expresadas diferencialmente	101
PROTEÓMICA DE RATONES MACHOS	101
Efecto de la escopolamina sobre el cerebro de ratones C57BL/6	103
Efecto del tratamiento con donepecilo y las bacterias lácticas en el modelo de escopolamina	105
Análisis de enriquecimiento categórico.....	111
PROTEÓMICA DE RATONES HEMBRAS.....	112
Efecto de la escopolamina sobre el cerebro de ratones C57BL/6	113
Efecto del tratamiento con donepecilo y las bacterias lácticas en el modelo de escopolamina	115
Análisis de enriquecimiento categórico.....	121
Efecto diferencial del proteoma cerebral según el sexo frente al tratamiento con los probióticos en el modelo de deterioro cognitivo inducido por escopolamina.....	122
Conclusiones parciales	125
CONCLUSIONES FINALES	128
PROYECCIONES	131
ANEXOS.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....	135

RESUMEN

En las últimas décadas, el interés científico por comprender cómo la microbiota intestinal influye en la salud, la homeostasis y el funcionamiento de los principales sistemas del organismo, incluido el sistema nervioso central (SNC), ha aumentado notablemente. En este contexto, el estudio del eje microbiota-intestino-cerebro ha evidenciado que ciertos microorganismos y sus metabolitos son capaces de modular funciones neurológicas y cognitivas, abriendo nuevas perspectivas para el abordaje de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (EA).

Entre las estrategias emergentes, el uso de cepas de bacterias lácticas (BL) con potencial para mejorar la salud del huésped resulta especialmente atractivo por su capacidad de producir metabolitos bioactivos y por su amplio historial de consumo seguro. Debido a la gran diversidad de compuestos y beneficios que ofrecen, las BL se perfilan como candidatas prometedoras en el campo de la salud mental. El tratamiento convencional de la EA combina inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) con fármacos antidepresivos, ansiolíticos y antiinflamatorios; sin embargo, persiste la necesidad de terapias complementarias.

En este marco, se evaluó el potencial terapéutico de siete cepas BL autóctonas, conocidas por su capacidad de producir compuestos metabólicos de interés, analizando su efecto sobre la actividad de AChE, la neuroinflamación y el estrés oxidativo.

Inicialmente, se identificó a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 como capaz de reducir la actividad específica de AChE *in vitro*. A partir de este hallazgo y de antecedentes previos, se continuó trabajando con *Levilactobacillus* CRL 2013, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 y *Enterococcus mundtii* CRL 35. En cultivos de microglía estimulados con oligómeros del péptido beta amiloide ($A\beta_{1-42}$), las tres cepas mostraron propiedades antioxidantes y redujeron la expresión de IL-1 β , mientras que únicamente CRL 581 y CRL 2013 disminuyeron además IL-6 y TNF- α .

Considerando estos resultados, CRL 581 y CRL 2013 fueron seleccionadas para su evaluación en un modelo murino de deterioro cognitivo inducido por escopolamina. En este modelo, ambas cepas mejoraron parámetros conductuales asociados con la ansiedad y la memoria, redujeron la actividad de AChE y atenuaron el daño oxidativo. El

análisis proteómico de muestras de cerebro reveló que, en machos, la administración de las BL se relacionó principalmente con la regulación del tráfico vesicular, la remodelación del citoesqueleto y la restauración neuronal, mientras que en hembras predominó la modulación de funciones nucleares, regulación transcripcional y procesamiento de ARN.

En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial de *L. brevis* CRL 2013 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 como bacterias psicobióticas capaces de modular funciones del SNC a través de su consumo, constituyendo alternativas prometedoras como terapias adyuvantes en salud mental.

PALABRAS CLAVE: BACTERIAS LÁCTICAS, EJE MICROBIOTA-INTESTINO-CEREBRO, PSICOBÍOTICOS, ACETILCOLINESTERASA, ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

ABSTRACT

In recent decades, scientific interest in understanding how the gut microbiota influences health, homeostasis, and the functioning of major body systems, including the central nervous system (CNS), has grown substantially. In this context, research on the gut–brain axis has revealed that certain microorganisms and their metabolites can modulate neurological and cognitive functions, opening new perspectives for addressing neurodegenerative disorders such as Alzheimer’s disease (AD).

Among emerging strategies, the use of lactic acid bacteria (LAB) strains with potential to improve host health is particularly attractive, both for their ability to produce bioactive metabolites and for their long history of safe consumption. Due to the wide variety of compounds and benefits they offer, LAB stand out as promising candidates in the field of mental health. Conventional AD treatment combines acetylcholinesterase (AChE) inhibitors with antidepressant, anxiolytic, and anti-inflammatory drugs; however, the need for complementary therapies remains.

In this context, the therapeutic potential of seven native LAB strains, known for their ability to produce bioactive metabolites, was evaluated by analyzing their effects on AChE activity, neuroinflammation, and oxidative stress. Initially, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 was identified as capable of reducing specific AChE activity *in vitro*. Based on this finding and previous evidence, further studies were carried out with *Levilactobacillus brevis* CRL 2013, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581, and *Enterococcus mundtii* CRL 35. In microglial cultures stimulated with β -amyloid oligomers ($A\beta_{1-42}$), all three strains showed antioxidant properties and reduced IL-1 β expression, while only CRL 581 and CRL 2013 also decreased IL-6 and TNF- α .

Considering these results, CRL 581 and CRL 2013 were selected for evaluation in a scopolamine-induced cognitive impairment mouse model. In this model, both strains improved behavioral parameters associated with anxiety and memory, reduced AChE activity, and attenuated oxidative damage. Proteomic analysis of brain samples revealed that, in males, LAB administration was mainly associated with the regulation of vesicular trafficking, cytoskeletal remodeling, and neuronal restoration, whereas in females,

modulation of nuclear functions, transcriptional regulation, and RNA processing predominated.

Taken together, these findings support the potential of *L. brevis* CRL 2013 and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 as psychobiotic bacteria capable of modulating CNS functions through their consumption, representing promising adjuvant therapeutic alternatives in mental health.

KEYWORDS: LACTIC ACID BACTERIA, MICROBIOTA-GUT-BRAIN-AXIS, PSYCHOBOTICS, ACETYLCHOLINESTERASE, ALZHEIMER'S DISEASE

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

°C	Temperatura en grados centígrados
x g	Aceleración de la gravedad
μL	Microlitros
μM	Micromolar
Aβ	Péptido beta amiloide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidores de la AChE
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
APP	Proteína precursora del péptido amiloide, del inglés Amyloid precursor protein
BL	Bacterias lácticas
ChAT	Colina acetiltransferasa
CDM	Medio químicamente definido, del inglés Chemically defined medium
CEP	Proteinasa asociada a envoltura celular del inglés cell-envelope associated proteinase
c. s. p.	Cantidad suficiente para
Da	Daltons
DEPs	Proteínas expresadas diferencialmente, del inglés Differentially expressed proteins
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DO	Densidad óptica
DPZ	Donepecilo
E.	<i>Enterococcus</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
g	Gramos
g/l	Gramos por litro
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
h	Hora
IL	Interleuquina
KDa	Kilo Daltons

L.	<i>Lactobacillus</i>
LDR	Leche descremada reconstituida
M	Metros
M	Molar
mg/kg	Miligramos por kilo
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MRS	Medio de cultivo De Man-Rogosa-Sharpe
MCB	Medio condicionado bacteriano
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nmol	Nanomoles
p/v	Peso por volumen
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPMI	<i>Medio Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Segundos
S-Ala	Succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanina p-nitroanilida
SCO	Escopolamina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SF	Solución fisiológica
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
subsp.	Subespecie
TGI	Tracto gastrointestinal
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
U	Unidades enzimáticas

INTRODUCCIÓN GENERAL



INTRODUCCIÓN

Microbiota

Definición

La microbiota se define como el conjunto de microorganismos vivos que conviven en un entorno común e incluye bacterias, arqueas, hongos, virus, protozoos (Hou et al., 2022). A principios del siglo XX, se descubrió que hay una gran variedad de microorganismos que coexisten en diferentes sistemas del cuerpo humano. Actualmente, se sabe que cada ser humano alberga entre 10 y 100 billones de células microbianas que viven en una relación simbiótica, superando en número a las células humanas (Sender et al., 2016). En los últimos años ha surgido el concepto microbioma, que hace referencia a una comunidad compleja de microorganismos, sus genes y metabolitos que habitan en un entorno, como el cuerpo humano, y que influyen de manera fundamental en la salud del hospedador (Hoffmann et al., 2016). Si bien su definición es compleja y está en constante evolución, el microbioma abarca tanto la composición como la función de estas comunidades microbianas. Las tecnologías de secuenciación masiva han revolucionado la capacidad de estudiar y entender el microbioma, permitiendo identificar microorganismos no cultivables y realizar análisis detallados de las comunidades microbianas y sus funciones (Ursell et al., 2012). Se estima que el material genético del microbioma es 100 veces mayor que el del genoma humano completo (Berg et al., 2020).

Estas comunidades microbianas están ampliamente distribuidas en todo el cuerpo humano, incluyendo la piel, boca, vías aéreas, tracto genitourinario y, especialmente, el tracto gastrointestinal (Figura 1) (Kennedy & Chang, 2020; Reynoso-García et al., 2022).

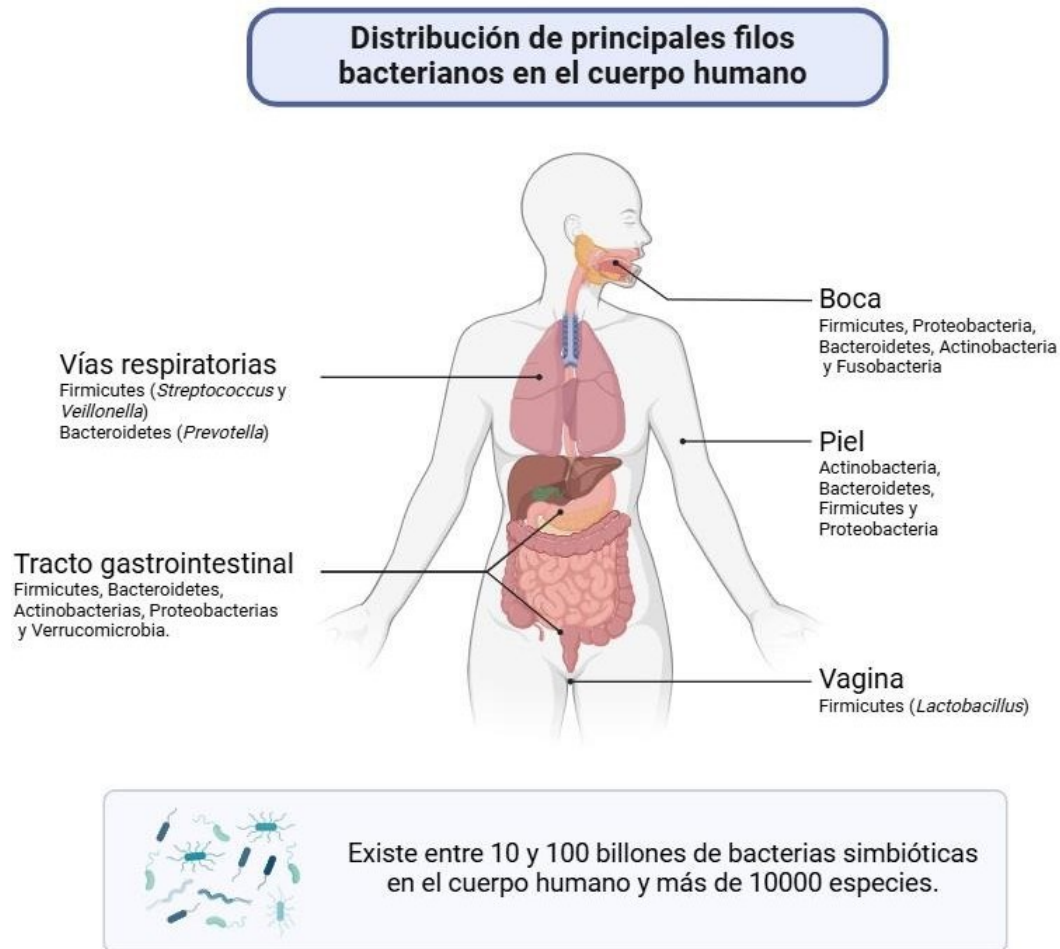


Figura 1. Distribución diferencial de las comunidades microbianas de acuerdo al sitio anatómico.

La mayor colonización de microorganismos en la piel se encuentra en las glándulas, pliegues y folículos, en donde la humedad y nutrientes favorecen su crecimiento. Dentro de la microbiota de la piel encontramos bacterias pertenecientes a los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria, mientras que los hongos que habitan generalmente este nicho pertenecen principalmente al género *Malassezia* (Byrd et al., 2018; Hou et al., 2022).

Durante mucho tiempo se consideró al pulmón como un órgano estéril, actualmente se sabe que existe una comunidad microbiana compleja formada por bacterias, virus y hongos que constituyen la microbiota respiratoria (Nguyen et al., 2015; Wypych et al., 2019). Estos microorganismos desempeñan un papel esencial en la salud respiratoria y en la patogénesis de diversas enfermedades pulmonares, interactuando con el sistema inmunológico del huésped (Ramírez-Labrada et al., 2020). En pacientes sanos, los principales microorganismos que habitan este nicho pertenecen a los filos Firmicutes

(incluyendo *Streptococcus* spp. y *Veillonella* spp.) y Bacteroidetes (incluyendo *Prevotella* spp.) (Man et al., 2017; Whiteside et al., 2021).

De forma análoga, el sistema nervioso central fue considerado históricamente un entorno estéril. Sin embargo, estudios recientes han detectado ADN y estructuras bacterianas en cerebros post mortem, tanto de individuos con enfermedad de Alzheimer (EA) como de controles sanos (Hu et al., 2023; Ko et al., 2024; Moné et al., 2023). En algunos casos, se han observado diferencias en la abundancia relativa de ciertos taxones en la EA; no obstante, las limitaciones metodológicas y el riesgo de contaminación impiden establecer una relación causal en la actualidad (Senejani et al., 2022).

La microbiota oral constituye una de las comunidades microbianas más complejas del organismo, integrada por bacterias, hongos, virus, arqueas y protozoos que colonizan diversos nichos de la cavidad bucal (Baker et al., 2024). Esta comunidad mantiene un equilibrio dinámico con el sistema inmune, pero su alteración (disbiosis) se asocia al desarrollo de enfermedades periodontales, y recientemente ha cobrado relevancia estudiar la relación de la periodontitis con el desarrollo de enfermedades sistémicas como la EA (Dioguardi et al., 2020). De hecho, se han detectado en tejido cerebral bacterias orales como *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* y *Alloprevotella*, lo que sugiere una posible contribución de esta microbiota a la patogénesis de la EA (Emery et al., 2022).

En hombres, la microbiota del tracto genitourinario es escasa, mientras que en mujeres sanas cumple una función clave como barrera contra patógenos. Esta microbiota uro-vaginal está dominada por lactobacilos, que reducen el pH vaginal mediante la producción de ácido láctico y compuestos antimicrobianos, lo que ayuda a prevenir infecciones (Boskey et al., 1999; Hou et al., 2022; Ma et al., 2012).

Además, esta microbiota tiene un rol esencial en la colonización inicial del intestino del recién nacido, fuertemente determinada por el tipo de parto. Durante el parto vaginal, los neonatos adquieren principalmente bacterias como *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium*. En cambio, en partos por cesárea, predomina la colonización por bacterias cutáneas y hospitalarias, con menor diversidad y retraso en

la aparición de géneros beneficiosos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Rodríguez et al., 2015; Rutayisire et al., 2016). Con el tiempo, la microbiota intestinal del lactante se diversifica y se estabiliza hacia un perfil adulto, con influencia clave de la dieta: los bebés alimentados con leche materna presentan mayor presencia de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* que aquellos alimentados con fórmula (Reynoso-García et al., 2022). Este proceso de maduración, especialmente en los primeros tres años, es crítico para la salud y el neurodesarrollo (Vandenplas et al., 2020).

Microbiota intestinal

Los microorganismos presentes en el intestino juegan un papel fundamental en la protección contra patógenos, el desarrollo del sistema inmunológico y la salud general del huésped. Como se describió anteriormente, el inicio de la colonización de esta microbiota tiene lugar al momento del nacimiento y se considera que su madurez se produce entre los 2-5 años de edad, permaneciendo relativamente estable durante toda la vida adulta (Rodríguez et al., 2015; Vandenplas et al., 2020).

A pesar de que no existe una definición de microbiota “normal” y teniendo en cuenta la gran variabilidad interindividual, se sabe que los individuos sanos comparten un núcleo de grupos bacterianos formado por dos filos principales, Firmicutes y Bacteroidetes y en menor medida por otros como Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Tenericutes y Verrucomicrobia (Álvarez et al., 2021; Rosenberg, 2024). Sus porcentajes pueden variar a causa de distintos factores que incluyen la edad, genética, dieta, el estilo de vida y el consumo de fármacos, especialmente antibióticos (Rodríguez et al., 2015).

Función de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal cumple con diferentes funciones en el huésped incluyendo nutrición, protección y funciones estructurales.

Los microorganismos intestinales descomponen carbohidratos complejos como fibras que las enzimas humanas no pueden digerir. De esta forma, facilitan la absorción de nutrientes esenciales y producen ácidos grasos de cadena corta como el butirato y el propionato, beneficiosos para la salud intestinal y general del huésped (Nicholson et al., 2012; Sonnenburg & Bäckhed, 2016). Algunas bacterias de la microbiota intestinal pueden sintetizar vitaminas, como la vitamina K y algunas del complejo B (Molina et al.,

2009; Torres et al., 2016, 2020), y producir compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud (Brown et al., 2017; Elean et al., 2020).

Por otro lado, la microbiota intestinal desempeña un papel crucial en el desarrollo y la regulación del sistema inmunológico. Ayuda a entrenar a este sistema para reconocer y combatir patógenos, al tiempo que evita reacciones inmunitarias excesivas contra diferentes compuestos (Elean et al., 2021; Honda & Littman, 2012). En cuanto a las funciones estructurales, el biofilm bacteriano que recubre las mucosas contribuye a preservar la integridad de la barrera epitelial y además actúa como barrera protectora frente a la invasión de patógenos, compitiendo por recursos y produciendo compuestos antimicrobianos que ayudan a prevenir y combatir infecciones (Kamada et al., 2013; Pickard et al., 2017).

Disbiosis

Aunque la microbiota tiende a ser relativamente estable en un individuo y puede recuperar su estado original tras una perturbación, cuando la exposición a factores negativos es prolongada o recurrente, los cambios pueden volverse difíciles de revertir. Esto resalta la importancia de evitar alteraciones constantes que puedan comprometer su equilibrio y funcionalidad.

Cuando se produce un desequilibrio o alteración en la composición y función de la microbiota intestinal hablamos de disbiosis. Esta se manifiesta con un sobrecrecimiento de especies patógenas y una disminución de bacterias “beneficiosas”, y estos cambios pueden estar asociados a enfermedades y trastornos del sistema gastrointestinal y de otros sistemas del cuerpo humano (Cho & Blaser, 2012; GEM Project Research Consortium et al., 2016). Dentro de las enfermedades intestinales asociadas a la disbiosis se encuentran el síndrome de intestino irritable, la enfermedad celíaca y la enfermedad inflamatoria intestinal (Buttó & Haller, 2016). Además, existe evidencia que relaciona a este desequilibrio con el desarrollo de otras patologías como la obesidad, síndrome metabólico, alergias, enfermedades autoinmunes e incluso neurológicas (Haran & McCormick, 2021; Kriss et al., 2018; Levy et al., 2017). Concomitantemente, la disbiosis intestinal puede provocar cambios en la respuesta inmune, aumentando la permeabilidad epitelial y favoreciendo la translocación bacteriana, lo que lleva a un

aumento en el riesgo a desarrollar infecciones (Biedermann & Rogler, 2015; Carding et al., 2015).

Todo esto resalta la importancia de mantener una microbiota equilibrada para la salud integral del organismo y actualmente existen diversas estrategias para contrarrestar la disbiosis mediante intervenciones terapéuticas dirigidas a restaurar el equilibrio microbiano que se detallarán más adelante.

Eje microbiota intestino cerebro

La salud del cuerpo humano, la homeostasis y el funcionamiento de los principales sistemas, incluido el sistema nervioso central (SNC), están significativamente influenciados por la microbiota intestinal. En la última década, ha crecido el interés por estudiar el impacto de estos microorganismos en la salud mental a través del eje microbiota-intestino-cerebro. Este es un sistema de comunicación bidireccional complejo que se establece entre la microbiota intestinal y el cerebro (Cryan & Dinan, 2012). Se ha observado que un desequilibrio en estos microorganismos está asociado con trastornos del estado de ánimo, como la ansiedad y la depresión, y puede afectar el comportamiento y la cognición (Carabotti et al., 2015; Meyer-Luehmann et al., 2008). Por otro lado, existe evidencia que demuestra que la microbiota intestinal influye en el desarrollo y progresión de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson (Fung et al., 2017; Pang et al., 2026; Sampson et al., 2016; Scheperjans et al., 2015; Vogt et al., 2017). Esto se debe, en parte, al efecto que tienen los microorganismos presentes en el intestino sobre la inflamación, la función de la barrera hematoencefálica y a la capacidad que tienen de producir metabolitos neuroactivos.

La comunicación entre la microbiota y el SNC se produce a través de tres vías principales que incluyen mecanismos de señalización nerviosa, inmunitaria y circulatoria (Figura 2).

El sistema nervioso entérico (SNE) está formado por una compleja red neuronal que controla la función gastrointestinal de forma autónoma, regulando la secreción de fluidos, la absorción de nutrientes y la contracción muscular intestinal. Además, las neuronas que conforman el SNE participan en el intercambio de información entre el intestino y el cerebro a través del nervio vago, una de las principales vías de comunicación estudiadas en este eje. Se ha demostrado que las señales aferentes del

intestino, transmitidas a través del nervio vago, pueden influir en la actividad cerebral (Forsythe et al., 2014).

Otra forma importante de comunicación en este eje se produce a través del sistema circulatorio, donde participan neurohormonas intestinales como la serotonina, dopamina y ácido gamma-aminobutírico (GABA). Las células neuroendócrinas del tracto gastrointestinal, conocidas como células enterocromafines (CE), tienen la capacidad de secretar diversas sustancias, donde podemos destacar la producción de serotonina (Strandwitz, 2018). Este neurotransmisor afecta la motilidad intestinal y la función inmune local. Además, diversos estudios han demostrado que los niveles de serotonina en el intestino se correlacionan con los niveles en el cerebro, influyendo en el estado de ánimo y la ansiedad (O'Mahony et al., 2015; Yano et al., 2015).

Por otro lado, se ha descrito que las bacterias intestinales también producen una variedad de metabolitos que influyen en el SNC incluyendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el acetato, propionato y butirato, los cuales pueden atravesar la barrera hematoencefálica y actuar sobre el cerebro (Dalile et al., 2019).

La tercera vía fundamental de comunicación es a través del sistema inmune. Las células inmunes, como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, producen compuestos que intervienen en la inflamación y el sistema mientérico. La neuroinflamación, mediada en gran parte por la composición de la microbiota intestinal, es uno de los ejes centrales de las enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas. Las células inmunes del intestino pueden liberar citoquinas, como la interleucina-1 β y el factor de necrosis tumoral α , que actúan a través del eje intestino-cerebro en la corteza prefrontal y el hipocampo, influyendo en el estado de ánimo y la cognición (Carabotti et al., 2015; Fung et al., 2017).

En conclusión, el eje microbiota-intestino-cerebro es un sistema de comunicación complejo que tiene un impacto significativo en la salud mental y en la progresión de ciertos signos de las enfermedades neurodegenerativas. La microbiota intestinal influye en la función cerebral a través de vías nerviosas, endocrinas e inmunitarias, demostrando su papel esencial en la regulación del estado de ánimo, el comportamiento y la cognición. En consecuencia, entender este eje puede ofrecer nuevas perspectivas

para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades neurológicas y psiquiátricas.

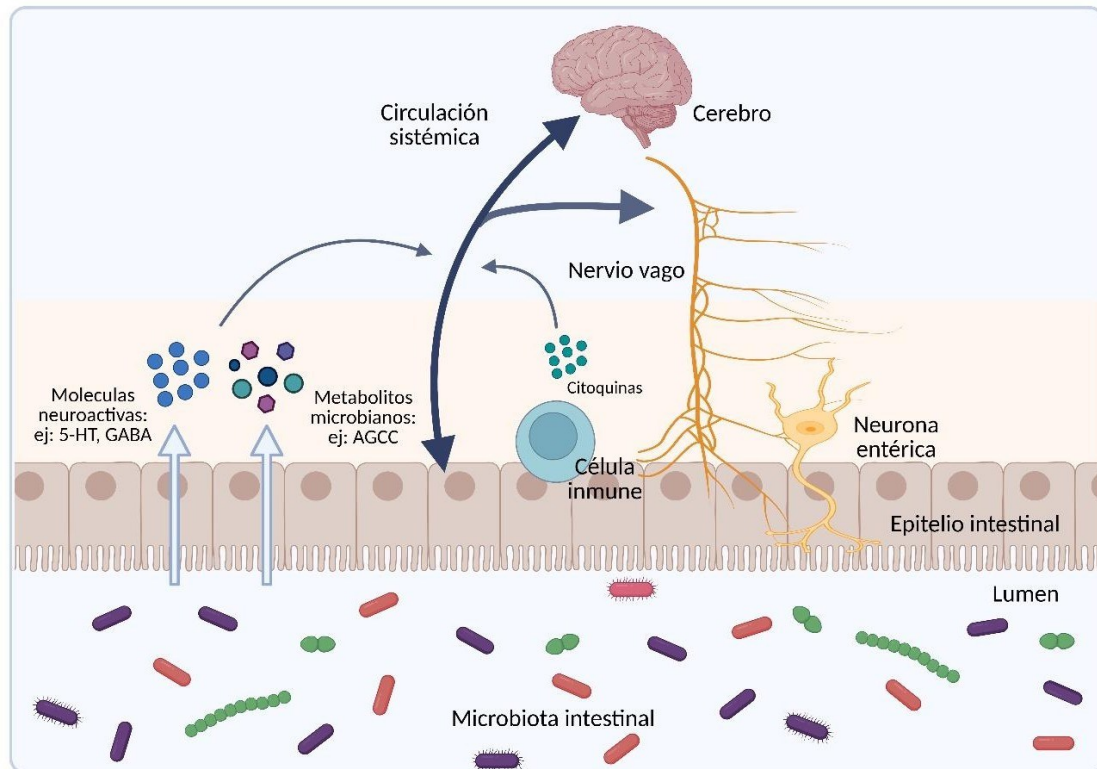


Figura 2. Eje microbiota-intestino-cerebro. El cerebro, el intestino y la microbiota constituyen tres nodos de comunicación bidireccional. El sistema inmune, el nervio vago, el sistema circulatorio y el sistema nervioso entérico son las principales vías de comunicación.

Bacterias lácticas y su impacto en el eje intestino-cerebro

El eje intestino-cerebro proporciona a las bacterias intestinales y sus metabolitos una vía de acceso al cerebro, regulando así la expresión de factores clave (Collins et al., 2012). Estudios metagenómicos han revelado que el microbioma humano tiene el potencial de generar numerosas moléculas bioactivas, incluidas histamina, serotonina y ácido γ -aminobutírico (GABA) (Wall et al., 2014). Dentro de este grupo de microorganismos se encuentran las bacterias lácticas (BL), siendo los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* los más abundantes.

Las BL han surgido en las últimas décadas como actores clave en la interacción del eje microbiota-intestino-cerebro (Aguirre-Garcia et al., 2025) y pertenecen a un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, que se caracterizan por ser cocos o bacilos, catalasa negativos, generalmente inmóviles, no esporulados y anaerobios o

aerotolerantes. Producen ácido láctico como principal producto durante la fermentación de azúcares (Börner et al., 2019) y ciertas cepas de BL tienen la capacidad de producir y liberar compuestos beneficiosos en los alimentos, denominados nutraceuticos. Estos ingredientes pueden ser macronutrientes (ácidos grasos insaturados), micronutrientes (vitaminas y polioles) o compuestos no nutritivos (enzimas hidrolíticas y flavonoides), que pueden estar naturalmente presentes en los alimentos, ser añadidos como ingredientes alimentarios o ser producidos *in situ* por ciertas BL (Abedin et al., 2024).

Algunas especies de BL son consumidas como probióticos ya que pueden sobrevivir a un pH bajo y permanecen transitoriamente en el intestino (Khushboo et al., 2023). Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un efecto beneficioso para la salud del hospedador (Hill et al., 2014). Es importante destacar que, si bien algunos mecanismos de acción son comunes en una amplia variedad de microorganismos probióticos, como la regulación del tránsito intestinal o la exclusión competitiva de patógenos (Sanders et al., 2018) otros, como los efectos inmunomoduladores, neurológicos o la producción de compuestos bioactivos de interés, suelen ser específicos de cada cepa. Esto resalta la importancia de realizar estudios que permitan probar el efecto probiótico de una cepa bacteriana en particular, ya que este beneficio no puede extrapolarse automáticamente a otro microorganismo, incluso dentro de una misma especie (Hill et al., 2014) . Independientemente si el mecanismo de acción es específico o general, es fundamental contar con evidencia científica que respalde el beneficio del probiótico para la salud, ya sea a nivel específico de cepa o de grupo.

Tradicionalmente se enfatizó en el uso de microorganismos vivos para obtener un efecto beneficioso en la salud del hospedador. Sin embargo, en los últimos años, muchos investigadores se han centrado en estudiar directamente los productos del metabolismo microbiano y sus beneficios. Si bien su definición sigue siendo objeto de debate, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP por sus siglas en inglés) hace referencia a los “postbióticos” como microorganismos inactivados y/o sus componentes que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto benéfico para la salud (Salminen et al., 2021).

En este contexto, el uso de ciertas cepas de BL con potencial para mejorar la salud del huésped es especialmente prometedor, no solo por su capacidad de producir metabolitos bioactivos de interés, sino también por su larga trayectoria de aplicación segura y consumo en alimentos.

Bacterias lácticas como psicobióticos y la producción de metabolitos neuroactivos

El grupo del Dr. John Cryan (University College Cork, Irlanda) acuñó el término "psicobiótico" para referirse a aquellos probióticos que, al ser ingeridos en cantidades adecuadas, brindan un beneficio a la salud mental (Dinan et al., 2013; O'Riordan et al., 2025). Algunos de estos microorganismos son capaces de producir sustancias neuroactivas, como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la serotonina, que actúan directamente sobre el eje intestino-cerebro.

Como se mencionó anteriormente, el sistema nervioso entérico juega un papel muy importante como intermediario en este eje. Una vez que las moléculas son secretadas por los microorganismos en el tracto gastrointestinal (TGI), estas translocan la pared intestinal y pueden interactuar con diferentes receptores clave, como los receptores tipo Toll y los receptores acoplados a proteínas G, los cuales a su vez inducen las correspondientes cascadas de señalización (Foster & Zhou, 2015; Torres-Fuentes et al., 2019).

Entre los psicobióticos, muchos lactobacilos poseen efectos beneficiosos en la salud mental mediante la liberación de péptidos bioactivos que pueden llegar a la circulación, atravesar la barrera hematoencefálica y finalmente alcanzar el sistema nervioso central (SNC). Estos péptidos pueden ser generados por el sistema proteolítico de las bacterias que actúa sobre las proteínas de la dieta. Un ejemplo interesante lo constituyen los péptidos opioides que pueden originarse a partir de la caseína (Pessione & Cirrincione, 2016).

Por otro lado, múltiples estudios han identificado BL de diversos géneros y especies, como *Lactococcus lactis*, *Levilactobacillus brevis*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactilactobacillus sakei*, *Limosilactobacillus reuteri* y *Streptococcus thermophilus*, con la

capacidad de sintetizar GABA. Entre ellas, algunas cepas de *L. brevis* aisladas de productos fermentados destacan por su elevada productividad de GABA, lo que las convierte en un foco de interés para aplicaciones biotecnológicas y funcionales (H. Li et al., 2010; Wu & Shah, 2017). Este compuesto bioactivo es de gran relevancia debido a sus efectos antihipertensivos, antidepresivos y antidiabéticos, y contribuye a la señalización del eje intestino-cerebro a través de diferentes vías que incluyen neuronas entéricas, células enteroendócrinas y células inmunitarias (Carabotti et al., 2015; Hebert et al., 2015). Por otro lado, Bravo et al., 2011 demostraron que una cepa de *L. rhamnosus* era capaz de regular la expresión de diferentes receptores de GABA en el sistema nervioso central a través del nervio vago. Estos hallazgos son claves, ya que sugieren que las BL pueden ser importantes en el tratamiento de los trastornos relacionados con la salud mental, como la inflamación, la ansiedad y las enfermedades neurodegenerativas.

Otro metabolito de interés es el neurotransmisor acetilcolina (ACh). En humanos, la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) es la encargada de la síntesis de ACh dentro del citosol de las neuronas, utilizando dos moléculas precursoras: colina y acetil-CoA. La enzima ChAT es considerada un componente celular básico, ya que se expresa en la mayoría de las células humanas (Wessler et al., 2003).

Diversos estudios han destacado que la acetilcolina es sintetizada también por plantas, algas y bacterias, lo que la posiciona como una molécula de señalización extremadamente antigua en la escala evolutiva. En 1914, se describió una de las primeras evidencias de producción de ACh a partir de un microorganismo, el hongo *Claviceps purpurea* (Ewins, 1914). Posteriormente, en 1947, Stephenson y Rowatt demostraron que una cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* era capaz de sintetizar este neurotransmisor (Rowatt, 1948; Villageliú et al., 2018). En un modelo de Alzheimer utilizando ratas albinas se vio que el tratamiento con el probiótico *L. plantarum* MTCC 1325 mejoraba el desempeño de los animales en pruebas de memoria y aprendizaje, y a su vez, se vio un aumento en los niveles de acetilcolina en el cerebro en comparación a los animales del grupo control (Nimgampalle, 2017). Estos resultados son de gran importancia ya que la acetilcolina es crucial para la memoria y la cognición. Sin embargo,

la función de este neurotransmisor en estos microorganismos y las enzimas responsables de su síntesis siguen siendo desconocidas.

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es otro neurotransmisor esencial, sintetizado tanto en el SNC como el SNE del tracto gastrointestinal. La producción en el SNC representa solo el 5% de la síntesis total de serotonina en el cuerpo (O'Mahony et al., 2015). Esta producción se origina a partir del aminoácido esencial triptófano, que debe atravesar la barrera hematoencefálica y en el cerebro es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por la enzima triptófano hidroxilasa tipo 2. Luego, el 5-HTP es descarboxilado para formar serotonina (Jenkins et al., 2016).

En la periferia, la mayor parte de la serotonina es producida en el epitelio gastrointestinal, donde las células enterocromafines generan aproximadamente el 90% de la serotonina total del cuerpo (Margoob et al., 2024). Esta producción es crucial para regular diversas funciones, como la secreción de líquidos, la motilidad intestinal y la percepción del dolor visceral.

La microbiota intestinal también juega un papel crucial en la interacción de la serotonina gastrointestinal y el SNC, especialmente a través del metabolismo del triptófano. En una vía indirecta, la microbiota intestinal influye en la disponibilidad de triptófano y la síntesis de serotonina a través de enzimas responsables de la degradación de este aminoácido en la vía de la quinureína (Correia & Vale, 2022). En un estudio realizado en ratones libres de gérmenes, se observó un aumento en las concentraciones plasmáticas de triptófano, lo que resultó en niveles elevados de serotonina en el hipocampo (Clarke et al., 2013).

Algunas cepas bacterianas utilizan el triptófano, limitando así su disponibilidad para el huésped y para la posterior síntesis de serotonina (Milligan et al., 1978). Además de utilizar este aminoácido para su crecimiento, ciertas bacterias albergan enzimas como la triptofanasa, que convierte el triptófano en indol (J.-H. Lee & Lee, 2010). Un equilibrio adecuado entre la utilización bacteriana del triptófano y su disponibilidad para la síntesis de serotonina es esencial para mantener la homeostasis y la salud general del huésped. Por otro lado, algunos investigadores señalaron que ciertas bacterias pueden sintetizar triptófano a través de enzimas como la triptófano sintasa, favoreciendo indirectamente

la biosíntesis de serotonina (Raboni et al., 2009; Yanofsky, 2007). Además, se describió que sorpresivamente ciertas cepas bacterianas pueden producir serotonina a partir del triptófano, al menos *in vitro* (O'Mahony et al., 2015). En un estudio realizado en cerdos, se observó que el uso de antibióticos provocó un aumento en la cantidad de *Lactobacillus amylovorus*, lo que se correlacionó positivamente con un incremento en las concentraciones de serotonina en el colon. Posteriormente, utilizando células epiteliales intestinales porcinas, se encontró que el metabolito microbiano acetato generaba un aumento en la expresión de la enzima triptófano hidroxilasa tipo 1 (TPH1), regulando así la síntesis de serotonina en células IPEC-J2 (Z. Liu et al., 2023).

Microbiota y su impacto en enfermedades neurodegenerativas

Enfermedad de Alzheimer

Teniendo en cuenta la importancia y el rol de la microbiota intestinal en la modulación de la salud mental, en los últimos 10 años han aumentado las investigaciones enfocadas en dilucidar el efecto de estos microorganismos y sus metabolitos en los cerebros adultos y en los trastornos neurodegenerativos, que usualmente ocurren en personas de edad avanzada.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno que provoca la degeneración de las células en el cerebro y es la principal causa de demencia en ancianos, se caracteriza por un deterioro cognitivo y la pérdida de independencia en las actividades diarias personales. En Argentina, se estima que el número de pacientes con EA es alrededor de 300.000 (Allegri et al., 2007; Calandri et al., 2024; Rojas et al., 2011), mientras que a nivel mundial afecta a casi 50 millones de personas. La EA puede clasificarse en dos tipos principales: formas familiares (que representan entre el 1-5% de los casos) y formas esporádicas (más del 95% de los casos). La EA familiar se caracteriza predominantemente por mutaciones genéticas autosómicas dominantes en los genes de la proteína precursora de amiloide (APP), presenilina 1 (PS1) y presenilina 2 (PS2), que suelen manifestarse entre los 30 y 65 años y progresan de manera rápida. En contraste, la EA esporádica, también conocida como EA de inicio tardío, generalmente aparece después de los 65 años y está influenciada por una combinación de riesgos genéticos, factores ambientales y diversas comorbilidades. Los estudios de asociación

de genoma completo (GWAS) y los metaanálisis de genomas completos han identificado numerosos loci genéticos de riesgo asociados con la EA esporádica, implicando vías relacionadas con la respuesta inmune, el metabolismo lipídico, las placas de A β , los ovillos neurofibrilares y la endocitosis. Factores no genéticos como los estilos de vida, factores psicosociales, ambiente y enfermedades relacionadas con la EA (comorbilidades y complicaciones) pueden aumentar el riesgo de desarrollarla, al modificar vías biológicas y la susceptibilidad genética, lo que dificulta identificar una causa directa de la patología clínica en la EA (J. Zhang et al., 2024).

Diversas hipótesis han sido planteadas para explicar la etiología de la enfermedad de Alzheimer (EA) esporádica. Entre las más reconocidas se encuentra la hipótesis amiloide, que propone que la alteración en la producción y el procesamiento del péptido β -amiloide constituye el principal desencadenante, y la hipótesis colinérgica, que plantea que la disfunción colinérgica desempeña un papel central en el desarrollo de la enfermedad. No obstante, hasta el momento no existe un modelo único y completamente aceptado que explique de manera integral la patogénesis de la EA (P.-P. Liu et al., 2019).

La hipótesis amiloide plantea que la producción descontrolada de oligómeros tóxicos del péptido A β 42 y la consiguiente formación de ovillos de tau inducen la muerte neuronal. Se propone que con la edad o en condiciones patológicas, la proteína precursora del péptido amiloide (APP) es escindida de manera anómala por las enzimas β - y γ -secretasa, lo que resulta en un desequilibrio entre la producción y eliminación de los péptidos A β (A β 40 y A β 42), generando su acumulación. Un aumento en la proporción de A β 42/A β 40 promueve su agrupación en oligómeros que inducen neurotoxicidad, daño oxidativo y fomentan la hiperfosforilización de la proteína tau, llevando finalmente a la muerte de células neuronales y a la neurodegeneración (Breijyeh & Karaman, 2020; Kumar et al., 2015; Paroni et al., 2019).

Otra característica predominante en estos pacientes se atribuye a niveles elevados de marcadores inflamatorios y la liberación continua de moléculas proinflamatorias que pueden alterar la función sináptica y llevar a la muerte neuronal e inhibir la neurogénesis (Leng & Edison, 2021a). En el cerebro, el proceso de neuroinflamación está mediado por las células de la glía, que cumplen funciones importantes en el metabolismo y el sistema

inmune, actuando sobre la regeneración, nutrición y protección neuronal (Andronie-Cioara et al., 2023). Las células de la glía incluyen astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Los astrocitos proporcionan soporte estructural a las neuronas, participan en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica y controlan el paso de sustancias entre la sangre y el cerebro. Además, contribuyen a la reparación del tejido cerebral y juegan un papel crucial en la regulación de la actividad y plasticidad neuronal (Santello et al., 2019; Siracusa et al., 2019). Los oligodendrocitos son células gliales especializadas en la formación de mielina, esencial para la transmisión eficiente de señales nerviosas en el sistema nervioso central. Cada oligodendrocito puede envolver múltiples segmentos de los axones, formando la vaina de mielina, lo que permite que los impulsos nerviosos se transmitan de manera rápida y eficiente a lo largo de las neuronas (Kuhn et al., 2019; Mrak et al., 1995).

La microglía actúa como la principal célula inmunitaria del SNC y desempeña un papel clave en la respuesta inmune y la defensa contra patógenos y lesiones en el cerebro. Es responsable de la eliminación de desechos celulares, proteínas mal plegadas y otros materiales extracelulares del SNC (Colonna & Butovsky, 2017; Nordengen et al., 2019). La microglía presenta dos tipos de fenotipo: el proinflamatorio (M1) y el antiinflamatorio (M2) (Figura 3) (Y. Tang & Le, 2016). La activación de la microglía hacia un estado M1 produce la liberación de factores inflamatorios en respuesta a un agente externo. Un periodo agudo de inflamación forma parte de un mecanismo fisiológico normal. Sin embargo, en el contexto de ciertas enfermedades neurodegenerativas, donde este estado inflamatorio es crónico, la microglía se mantiene activa en un fenotipo M1, produciendo un exceso de citoquinas proinflamatorias y neurotoxicidad (Heneka et al., 2015). Algunas señales que pueden llevar a la microglía hacia el estado M1 están relacionadas con el estilo de vida, como la falta de sueño, el estrés, la exposición a agentes tóxicos como el alcohol y el tabaco, las infecciones crónicas, la disbiosis y la inflamación sistémica, como la obesidad y la resistencia a la insulina. En la EA, se cree que la activación de la microglía, ocurre en respuesta a la acumulación de $\text{oA}\beta$ y tau (Busche & Hyman, 2020). Estudios longitudinales en humanos muestran que la inflamación cerebral sigue una trayectoria bifásica: primero, la microglía se activa para eliminar $\text{A}\beta$, pero posteriormente, a medida que aumentan los depósitos de tau, la

inflamación se intensifica y contribuye al daño neuronal (Ismail et al., 2020). Sin embargo, aún existen controversias sobre el papel causal exacto de la neuroinflamación y la secuencia de eventos entre A β , tau y la respuesta inmune.

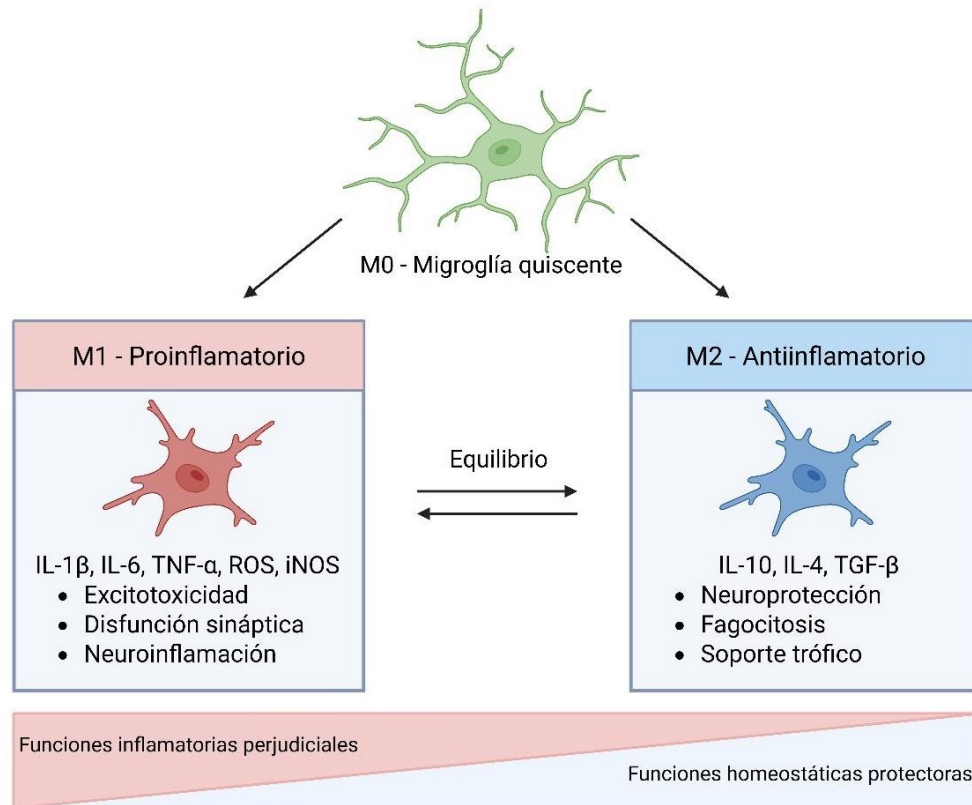


Figura 3. Activación y polarización de la microglía. En estado quiescente (M0) la microglía censa el microambiente del SNC para iniciar la respuesta requerida. Dependiendo del estímulo puede adquirir diferentes tipos de activación con diversas funciones. El perfil M1-proinflamatorio es el principal responsable del daño ocasionado por su activación crónica en enfermedades neurodegenerativas. La microglía del fenotipo M2 desempeña funciones antiinflamatorias y reparadoras.

Otra de la hipótesis más estudiada para comprender la patogenia de esta enfermedad, es la teoría colinérgica. En el cerebro, la acetilcolina (ACh) desempeña un papel crucial en procesos como la memoria, la atención, el procesamiento de información sensorial, el aprendizaje y otras funciones vitales. La enzima colina acetiltransferasa (ChAT) es la responsable de la síntesis de ACh en el citoplasma de las neuronas colinérgicas a partir de colina y acetil-coenzima A y luego es transportada a las vesículas sinápticas por el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Una vez en la hendidura sináptica, la ACh se une a los receptores muscarínicos y nicotínicos. Finalmente, la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se encarga de su hidrólisis produciendo acetato y colina que

se reciclan nuevamente en la terminal presináptica (H. Ferreira-Vieira et al., 2016; Hampel et al., 2018). En pacientes con EA se ha observado una degeneración de las neuronas colinérgicas ubicadas en la base del cerebro, en el núcleo basal de Meynert (Geula et al., 2021).

Además de este déficit colinérgico, la EA presenta otras alteraciones tempranas en la neurotransmisión que contribuyen al daño sináptico. Entre ellas destaca la hiperexcitabilidad neuronal, asociada a un desequilibrio entre excitación e inhibición, caracterizado por un aumento de la señalización glutamatérgica y una reducción de la inhibición GABAérgica. Este desbalance favorece la excitotoxicidad, la disfunción sináptica y el deterioro cognitivo (Targa Dias Anastacio et al., 2022). Los oligómeros de A β interfieren con la recaptación de glutamato, provocando su acumulación y la sobreactivación de receptores NMDA, mientras que la proteína tau altera la función de los transportadores de glutamato, incrementando su liberación y reduciendo su eliminación (Toniolo et al., 2020).

Por otro lado, la teoría infecciosa de la EA, junto con estudios sobre la microbiota, plantea que infecciones y disbiosis microbiana podrían desempeñar un papel clave en su patogénesis. En pacientes con EA se han descrito alteraciones en la microbiota intestinal, con un incremento de bacterias patógenas como *Escherichia* y *Shigella*, asociadas a inflamación sistémica y neuroinflamación (Cattaneo et al., 2017). Evidencias recientes indican que el A β podría actuar como péptido antimicrobiano (AMP) actuando como una molécula de defensa inmune innata para proteger al huésped frente a una amplia variedad de agentes infecciosos. Aunque esta acumulación de A β podría representar una respuesta defensiva inicial, su exceso y persistencia en el tiempo favorecen procesos patológicos y contribuyen a la neurodegeneración característica de la EA (Gosztyla et al., 2018). De hecho, como se mencionó previamente, se han detectado bacterias orales en tejido cerebral, lo que refuerza la hipótesis infecciosa. Estudios epidemiológicos han identificado una asociación entre la periodontitis y la EA; sin embargo, la naturaleza de esta asociación no se conoce con certeza. Trabajos recientes sugieren que la colonización del cerebro por el patógeno periodontal *Porphyromonas (P.) gingivalis* puede vincular la condición inflamatoria y degenerativa ya que la infección oral por *P. gingivalis* en ratones provocó la colonización del cerebro

y aumentó la producción de $A\beta_{1-42}$ (Singhrao & Olsen, 2019). Además, se ha detectado evidencia de infiltración de *P. gingivalis* en especímenes de autopsias de cerebros de personas con EA y en líquido cefalorraquídeo de personas diagnosticadas con EA (Dominy et al., 2019).

Potencial intervención de bacterias lácticas

Actualmente, los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa y los agentes que bloquean los receptores NMDA de glutamato, como la memantina, son los pilares del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Breijyeh & Karaman, 2020). Estos tratamientos están dirigidos, respectivamente, a la desregulación colinérgica y glutamatérgica que subyace o deriva de su fisiopatología. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos solo son efectivos para tratar los síntomas de la EA, pero no curan ni previenen la enfermedad en sí misma.

Dado el limitado arsenal terapéutico disponible y el conocido impacto de la microbiota intestinal en el SNC, ha surgido un creciente interés en los últimos años por dilucidar cómo los cambios en la composición microbiana podrían ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas para atenuar, al menos parcialmente, algunos de los signos distintivos de las enfermedades neurodegenerativas, como la neuroinflamación y el estrés oxidativo.

Entre estos cambios o terapias microbianas, destacan el uso de bacterias lácticas y/o los metabolitos que estas producen, con el fin de emplearlos como herramientas en el tratamiento de patologías relacionadas con el envejecimiento, como la enfermedad de Alzheimer (J. Lee et al., 2016). Aunque existe una amplia evidencia del efecto beneficioso de las bacterias lácticas en la salud del hospedador, es importante destacar que incluso cepas de la misma especie de bacterias probióticas pueden afectar de manera diferente la fisiología del hospedador (G. Reid, 2016). Esto subraya aún más la importancia de estudiar específicamente cada cepa bacteriana y evaluar su efecto teniendo en cuenta su especificidad de acción, para aprovechar al máximo su eficacia.

Antecedentes de nuestro grupo de investigación sobre BL con potencial efecto neuroprotector

Considerando el potencial terapéutico de las BL y sus metabolitos en la salud mental, la presente tesis doctoral propone investigar los mecanismos mediante los cuales cepas benéficas productoras de compuestos bioactivos podrían influir en patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA). Estas bacterias no solo son capaces de generar metabolitos claves, sino que también pueden modular la respuesta inflamatoria e inducir vías de señalización involucradas en el eje microbiota-intestino-cerebro, lo que sugiere un rol beneficioso en el contexto de la EA. Para abordar este objetivo general se seleccionaron y evaluaron distintas cepas de BL con propiedades previamente demostradas y documentadas, que podrían impactar en diferentes aspectos de la fisiopatología de la enfermedad.

En nuestro laboratorio, se demostró que la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 posee un sistema proteolítico capaz de generar péptidos bioactivos con efectos anti-hipertensivos y anti-inflamatorios (Espeche Turbay et al., 2012; Villegas et al., 2015). A su vez, esta cepa mostró actividad inmunomoduladora *per se* en un modelo de activación del receptor tipo toll 3 activado por Poly:C tanto *in vitro* como en un modelo murino (Elean et al., 2020, 2021).

Por otro lado, se optimizaron los parámetros fermentativos para la producción de GABA en *Levilactobacillus brevis* CRL 2013, una cepa con potencial para su uso como fábrica microbiana para la producción de GABA a partir de glutamato monosódico con porcentajes de conversión superiores al 95 % en medios complejos (Cataldo, Villegas, et al., 2020). GABA un neurotransmisor clave que regula la excitabilidad neuronal, tiene efectos ansiolíticos y calmantes, y su presencia podría ayudar a contrarrestar la disfunción del sistema GABAérgico observada en pacientes con Alzheimer. Además, esta cepa se utilizó para fermentar un jugo de frutilla bioenriquecido en GABA y mostró propiedades inmunomoduladoras tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo de activación del Receptor Tipo Toll 4 (Cataldo, Villena, et al., 2020).

Dado que la inflamación crónica y la neuroinflamación son factores críticos en la patogénesis del Alzheimer y de otras enfermedades neurodegenerativas, estas cepas de

BL podrían contribuir a mitigar estos procesos mediante la reducción de la inflamación sistémica y local, y modular la respuesta inmune.

También se estudió a *Enterococcus mundtii* CRL 35 y *Enterococcus faecium* CRL 1879, dos cepas seleccionadas por su capacidad para producir compuestos antimicrobianos llamados bacteriocinas (Bonacina et al., 2014; Salvucci et al., 2007, 2012; Suárez et al., 2013). Considerando la teoría infecciosa de la EA y la evidencia que vincula a la microbiota con su patogénesis, se plantea que las infecciones y la disbiosis microbiana podrían desempeñar un papel relevante en el desarrollo de la enfermedad. Así, las estrategias orientadas a modular la microbiota, junto con los enfoques antibacterianos, podrían resultar beneficiosas.

Limosilactobacillus reuteri CRL 1098 y *Lactobacillus coryniformis* CRL 1001 se destacan por su capacidad de producir vitamina B12 (Molina et al., 2009; Torres et al., 2016), un compuesto esencial para el buen funcionamiento del sistema nervioso y la formación de glóbulos rojos. Estudiar estas BL en el contexto de la EA es interesante, ya que la deficiencia de vitamina B12 se ha vinculado con un mayor riesgo de desarrollar diversas patologías neuropsiquiátricas (Green et al., 2017). Además, la suplementación de vitamina B12 a través de probióticos podría no solo corregir deficiencias, sino también tener un impacto positivo en la salud mental y la función cognitiva (Calvaresi & Bryan, 2001; Moore et al., 2012).

Teniendo en cuenta la enorme diversidad de beneficios y compuestos producidos por las BL, es que surgen como una alternativa prometedora para ser utilizadas en la salud mental. El tratamiento de los pacientes con Alzheimer incluye, además de los inhibidores de la acetilcolinesterasa, antidepresivos, ansiolíticos, neurolépticos y antiinflamatorios. La búsqueda de tratamientos más simples es importante para aliviar la carga de los esquemas actuales. Esta investigación busca explorar la capacidad de BL aisladas de alimentos fermentados autóctonos como potenciales nuevas vías terapéuticas para el tratamiento adyuvante de la enfermedad de Alzheimer, centrándose en el efecto de metabolitos producidos por las BL sobre la actividad de la AChE, la neuroinflamación y el estrés oxidativo lo que podría ofrecer nuevas perspectivas en el desarrollo de terapias innovadoras contra esta enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Avanzar en el conocimiento global sobre la producción de metabolitos bioactivos por bacterias lácticas (BL) y su impacto en el eje microbiota-intestino-cerebro. En particular, evaluar aquellos con potencial relevancia en enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la enfermedad de Alzheimer (EA).

Objetivos Específicos

OE1. Evaluar si BL autóctonas seleccionadas, son productoras de compuestos neuroactivos capaces de inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa *in vitro*.

OE2. Seleccionar BL y/o sus metabolitos que sean capaces de: i) modular la supervivencia celular (neuronas/glia) frente a la toxicidad de oligómeros del péptido amiloide A β ₁₋₄₂; ii) modular la actividad antioxidante y la respuesta anti-inflamatoria *in vitro*.

OE3. Evaluar el efecto benéfico de las BL seleccionadas en un modelo murino de deterioro cognitivo.



CAPÍTULO 1

Inhibidores de la acetilcolinesterasa derivados de microorganismos

Capítulo 1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa derivados de microorganismos

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta al sistema nervioso central (SNC) y se caracteriza por la pérdida gradual de funciones cognitivas y cambios severos en la personalidad y el comportamiento. La degeneración neuronal en el núcleo basal de Meynert, principal fuente de proyecciones colinérgicas hacia el neocórtex, es una de las primeras alteraciones observadas en esta enfermedad (A. K. L. Liu et al., 2015). Estudios *post mortem* han revelado hallazgos característicos como la pérdida de neuronas y sinapsis, la acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, y deficiencias en la neurotransmisión colinérgica, asociadas con un descenso significativo de los niveles de acetilcolina (ACh). Estas alteraciones contribuyen al deterioro cognitivo y funcional de los pacientes que padecen esta enfermedad (Coyle et al., 1983; Hampel et al., 2018).

Entre las estrategias terapéuticas disponibles, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) han sido ampliamente utilizados para compensar la disminución de ACh, un neurotransmisor clave para la memoria y el aprendizaje. Estos compuestos, la mayoría obtenidos a partir de síntesis química como el donepecilo y la rivastigmina, o los alcaloides naturales derivados de plantas como la galantamina o la huperizina A, han mostrado cierta eficacia paliativa, sin embargo, presentan importantes limitaciones, como efectos secundarios adversos (náuseas, vómitos y hepatotoxicidad) y baja biodisponibilidad (Breijyeh & Karaman, 2020; Sharma, 2019).

Si bien ha surgido un creciente interés por los compuestos naturales derivados de plantas y estos han sido la principal fuente de inhibidores naturales de la AChE, su explotación excesiva plantea problemas de sostenibilidad (Xiao et al., 2022). Los microorganismos, en cambio, ofrecen una fuente prometedora, ecológica y más rentable para la obtención de estos compuestos.

Aunque hasta el momento existen pocos estudios publicados sobre la producción de inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) en microorganismos, se ha identificado una notable diversidad que incluye hongos, bacterias marinas y actinobacterias, lo que

sugiere un vasto potencial aún por explorar (Zaki et al., 2020a). Desde la década de 1980, se han estudiado inhibidores de AChE (AChEI) en diversas especies microbianas, destacándose los hongos como una fuente rica en compuestos bioactivos. Hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium* y *Paecilomyces* han producido metabolitos como la huperzina A, un alcaloide con efectos farmacológicos relevantes, que incluyen la inhibición selectiva de AChE, protección contra el estrés oxidativo y posibles aplicaciones en enfermedades neurodegenerativas (Su et al., 2017; Su & Yang, 2015; Y. Wang et al., 2011). Además, otros alcaloides como las quinolactacinas A y B de *Penicillium sp.* han demostrado actividad inhibidora de AChE y propiedades antiinflamatorias (W.-G. Kim et al., 2001). Asimismo, terpenoides derivados de hongos han mostrado potentes actividades inhibitorias (Deng et al., 2013). Por otra parte, las actinobacterias y bacterias del género *Bacillus* también destacan en la producción de inhibidores de AChE. Por ejemplo, *Streptomyces sp.* AH-14 fue pionero en la producción de fisostigmina (Murao & Hayashi, 1986), mientras que otras cepas, como *Streptomyces lavendulae*, generaron *cyclophostin*, un inhibidor con un IC₅₀ de 7.6 µM (Kurokawa et al., 1993). En el ámbito marino, se identificaron metabolitos como el *geranylphenazinediol* de una cepa de *Streptomyces*, con un IC₅₀ de 2.62 µM (Ohlendorf et al., 2012). En cuanto a *Bacillus subtilis*, estudios recientes han demostrado que la cepa M18SP4P, aislada de esponjas marinas, inhibió un 54% de la actividad de la AChE, identificándose dos componentes activos en sus metabolitos (Pandey et al., 2014). Ese mismo año, Wang y colaboradores demostraron que otra cepa de *Bacillus subtilis* era capaz de inhibir la actividad de la AChE, aunque el compuesto responsable no pudo ser identificado. Estos avances subrayan la importancia de los microorganismos como fuentes prometedoras de nuevos AChEI, ofreciendo un potencial terapéutico significativo frente a enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos (Zaki et al., 2020).

En particular, las bacterias lácticas (BL) han demostrado ser una herramienta versátil en la producción de metabolitos bioactivos, como vitaminas del complejo B, ácidos grasos de cadena corta, péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) y neurotransmisores como el ácido γ-aminobutírico (GABA) (Bonacina et al., 2014; Cataldo, Villena, et al., 2020; Torres et al., 2016). Estos metabolitos no solo ejercen efectos beneficiosos en el organismo, sino que también podrían desempeñar un papel clave en la modulación de la

comunicación intestino-cerebro, lo que sugiere un posible impacto positivo en enfermedades neurológicas.

Los estudios recientes destacan el potencial de las BL como fuentes de postbióticos, definidos como preparaciones de microorganismos no viables y/o sus componentes que, en cantidades adecuadas, benefician la salud (Salminen et al., 2021). Además de sus propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes, estos metabolitos podrían contribuir al manejo de la EA al reducir la inflamación y el estrés oxidativo, así como paliar la depleción de acetilcolina al inhibir la actividad de la AChE, una hipótesis que hasta ahora ha sido poco explorada (Akbari et al., 2016).

En este trabajo se busca evaluar la capacidad de BL benéficas, aisladas de alimentos fermentados autóctonos, para producir metabolitos con actividad inhibitoria sobre la AChE, mediante el análisis *in vitro* de sus medios condicionados. Este enfoque no solo amplía el conocimiento sobre las propiedades funcionales de estas bacterias, sino que también podría proporcionar nuevas perspectivas en el desarrollo de terapias adyuvantes innovadoras para la EA.

Materiales y métodos

1. Microorganismos

Se utilizaron siete cepas de BL, pertenecientes a la Colección de Cultivos CRL (CERELA-CONICET-FML-FECIC), las cuales fueron seleccionadas debido a sus propiedades beneficiosas previamente descritas. Las BL utilizadas son: *Limosilactobacillus reuteri* CRL 1098, *Lactobacillus coryniformis* CRL 1001, *Lacticaseibacillus rhamnosus* CRL 2156, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581, *Levilactobacillus brevis* CRL 2013, *Enterococcus mundtii* CRL 35 y *Enterococcus faecium* CRL 1879.

Las bacterias del género *Lactobacillus* fueron mantenidas en medio MRS durante 16 horas a 37°C sin agitación, mientras que aquellas pertenecientes al género *Enterococcus* se activaron rutinariamente en caldo LAPTg bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

2. Medios de cultivo

2.1 Medio protector LEL-glicerol

El medio LEL utilizado para la preservación de las BL consiste en leche descremada en polvo (10 g), extracto de levadura (0,5 g), glucosa (1 g) y agua destilada en c.s.p. 100 mL. Este medio se esterilizó a 115 °C (0,6-0,7 atm de presión) durante 20 min. Luego, se agregó glicerol, esterilizado previamente (121 °C, 20 min), con una concentración final del 10% (v/v).

2.2 Medio caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS)

Peptona de carne 10 g/L; extracto de carne 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, glucosa 20 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, acetato de sodio 5 g/L, citrato triamónico 2 g/L, MgSO₄·7H₂O 0,2 g/L, MnSO₄·H₂O 0,05 g/L y Tween 80 1 g/L; pH 6,4. Se esterilizó a 121°C durante 20 min. Para el crecimiento de *L. brevis* CRL 2013 se preparó un medio MRS modificado conteniendo glucosa y fructosa como fuente de carbono; ambos azúcares al 1 % (p/v) (MRS-GF).

2.3 Medio caldo LAPTg

Peptona de carne 15 g/L; tripteína 10g/L; extracto de levadura 10 g/L; glucosa 10 g/L y Tween 80 1g/L; pH 6,5. El medio se esterilizó a 121°C durante 20 min.

2.4 Medio químicamente definido (CDM)

Se preparó un medio químicamente definido (CDM de sus siglas en inglés) de acuerdo a lo descrito por Hebert et al., 2001. Inicialmente, se utilizó un medio CDM completo como se detalla en la Tabla 1 para evaluar el comportamiento de las cepas de BL en este medio químicamente definido. El medio se preparó a partir de soluciones individuales concentradas de cada componente, previamente esterilizadas (121 °C, 20 min).

Tabla 1- Composición del medio químicamente definido (CDM)

Componente	Concentración solución stock (g/L)	Concentración final (g/L)	Componente	Concentración solución stock (g/L)	Concentración final (g/L)
Glucosa	200	20	Aminoácidos		
Acetato de sodio	250	5	L-alanina	10	0,10
Citrato de amonio	100	1	L-arginina	10	0,10
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	300	6	L-asparagina	20	0,20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40	0,2	L-ácido aspártico	20	0,20
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5	0,025	L-cisteína	20	0,20
Tween 80	50	1	L-glutamina	20	0,20
Mezcla de vitaminas RPMI 1640			L-ácido glutámico	20	0,20
			Glicina	10	0,10
			L-histidina	10	0,10
D- Biotina		0,02	L-isoleucina	10	0,10
Cloruro de colina		0,3	L-leucina	10	0,10
Ácido fólico		0,1	L-lisina	10	0,10
Mioinositol		3,5	L-metionina	10	0,10
Niacinamida		0,1	L-fenilalanina	10	0,10
p-aminobenzoato		0,1	L-prolina	10	0,10
Ca-pantotenato		0,025	L-serina	10	0,10
Piridoxina HCl		0,1	L-treonina	10	0,10
Riboflavina		0,02	L-triptófano	2,5	0,10
Tiamina HCl		0,1	L-tirosina	10	0,10
Vitamina B12		0,0005	L-valina	10	0,10
KCl		0,2	Bases nitrogenadas		
NaCl		8	Guanina	2	0,01
Na ₂ HPO ₄		1,15	Adenina	2	0,01
KH ₂ PO ₄		0,2	Uracilo	2	0,01
			Xantina	2	0,01

Luego, para llevar a cabo los ensayos de inhibición de AChE, se utilizó un medio CDM sin cisteína con la finalidad de evitar reacciones cruzadas resultantes de la unión del grupo tiol de la cisteína presente con el medio, con el cromóforo DTNB utilizado en el método de Ellman que se describirá más adelante.

3. Condiciones de crecimiento y preparación de los medios condicionados

Cada cepa de BL fue cultivada en medio CDM y luego de 24 h de incubación se registró el pH final y la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}). Los cultivos fueron centrifugados, se ajustó el pH de los sobrenadantes a un pH de 7 utilizando NaOH 1 M y se filtraron a través de un filtro de 0,22 μm . Estos medios condicionados conteniendo los postbióticos y crecidos en medio CDM se denominaron medios condicionados bacterianos (C-MCB).

4. Determinación de la actividad anti acetilcolinesterasa (AChE) de los medios condicionados bacterianos

4.1 Obtención de la enzima acetilcolinesterasa

Se utilizó AChE de eritrocitos humanos (AChE-E) y de cerebro de ratón (AChE-C), obteniendo estas isoformas según se describe en Salazar *et al.* (2017) con algunas modificaciones.

Brevemente, AChE-E se obtuvo de sangre humana de voluntarios sanos mediante venopunción utilizando Na_2EDTA como anticoagulante. La sangre se centrifugó (3.500 x g, 20 min), se descartó el plasma y los glóbulos blancos, y los eritrocitos se lavaron tres veces con 10 volúmenes de NaCl al 0,9 %. Posteriormente, los eritrocitos fueron hemolizados con 30 volúmenes de buffer de hemólisis (5 mM de buffer de fosfato pH 7,4 conteniendo 1 mM de Na_2EDTA). Las muestras fueron sometidas a ciclos repetidos de centrifugación (13.000 x g, 20 min) para obtener membranas libres de hemoglobina. Todos los pasos se realizaron a 4 °C. Finalmente, el pellet con las membranas libres de hemoglobina se resuspendieron en buffer de hemólisis.

La acetilcolinesterasa de cerebro (AChE-C) fue obtenida de ratones C57BL/6 adultos pertenecientes al bioterio de CERELA. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg). El cerebro completo se removió cuidadosamente y se colocó en una placa de Petri estéril con PBS frío. Se diseccionó el cerebelo y se realizó un corte del plano sagital medio del cerebro. Cada hemisferio fue colocado en un tubo de 2 mL conteniendo 3 perlas de vidrio (5 mm) previamente pesadas. Luego de colocar el cerebro, el tubo se pesó inmediatamente para calcular el peso del tejido por diferencia. Se añadió buffer de homogenización al 10 % (p/v) y se realizaron 4 ciclos de agitación vigorosa para disgregar el tejido. La mezcla fue

centrifugada a 10.000 x *g*, 10 min a 4 °C y el sobrenadante se colocó en un nuevo tubo. El homogenizado resultante se mantuvo a 4 °C hasta su uso posterior.

El contenido total de proteínas de las muestras conteniendo la AChE-E y la AChE-C se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina sérica para construir la curva estándar.

4.2 Inhibición de AChE

Como control de inhibición de AChE se utilizó donepecilo (Donepes, Laboratorio Richmond) a diferentes concentraciones y se determinó la actividad de AChE por el método de Ellman. La inhibición de la enzima se graficó en función de las diferentes concentraciones de donepecilo, se obtuvo una curva sigmoideal y los datos se ajustaron utilizando un modelo logístico de cuatro parámetros, empleando el algoritmo de Marquardt-Levenberg (SigmaPlot 12.0) para el análisis e interpretación.

El efecto de los medios condicionados bacterianos (C-MCB) sobre la actividad de AChE se determinó mediante el método de Ellman, utilizando acetiltiocolina (ATC) como sustrato (Ellman et al., 1961). En resumen, AChE-E y AChE-C se diluyeron en PBS conteniendo 0,33 mM de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB). Luego, se añadió 20 µL de cada C-MCB y se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Las reacciones se iniciaron al agregar ATC a una concentración final de 0,5 mM y se midió la absorbancia del 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) generado a 412 nm a 37 °C en un lector de microplacas Infinite 200 PRO (Tecan Trading AG, Suiza). Como control se reemplazaron los MCB por el medio CDM sin inocular. La cinética fue seguida a 37°C durante 5 minutos con intervalos de 30 segundos.

Los resultados se expresaron como actividad específica de la enzima considerando el tiempo de reacción (5 min) y el coeficiente de extinción molar del producto formado (TNB) a 37 °C ($13,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), lo que proporcionó valores de actividad expresados en nanomoles de TNB producidos/minuto. Finalmente, el valor se normalizó en función del contenido proteico, expresándose los resultados como nanomoles por minuto por miligramo de proteína (actividad específica).

Luego, se evaluaron cantidades crecientes del medio condicionado inhibidor. Para ello, se añadieron distintos volúmenes del C-MCB de la cepa CRL 581 a una mezcla de reacción que contenía AChE-E y 0,33 mM de DTNB y las muestras se pre-incubaron

durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió ATC a la mezcla, y la formación de TNB se monitoreó a 412 nm durante 5 minutos a 37 °C. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición enzimática, considerando las reacciones control sin inhibidor como referencia de 0 % de inhibición.

4.3 Evaluación de la actividad proteolítica del medio condicionado de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581

Se determinó la actividad proteolítica del C-MCB de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 siguiendo el protocolo de Espeche Turbay et al., 2012. Brevemente, se preparó una mezcla de reacción conteniendo 50 mM de tampón fosfato de sodio (pH 7,0), 1,5 M de cloruro de sodio, 2 mM del sustrato cromogénico N-succinil-AlaAla-Pro-Phe-pNa (S-Ala, Sigma-Aldrich), y 15 µL del C-MCB de CRL 581. La mezcla de reacción fue incubada a 40 °C durante 10 min y se detuvo la reacción mediante la adición de ácido acético al 25 %. La actividad enzimática fue medida siguiendo a 410 nm la liberación de p-nitroanilina (pNA) a partir del sustrato cromogénico S-Ala, utilizando un lector de placas VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.4 Evaluación de fracciones del medio condicionado de CRL 581 en la inhibición de AChE

El C-MCB de la cepa CRL 581 fue fraccionado en dos partes utilizando una membrana Amicon Ultra-2 de 3 kDa (Merck). Posteriormente, ambas fracciones resultantes fueron evaluadas para su capacidad de inhibir la actividad de AChE utilizando el protocolo descrito en el punto 4.2.

5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, Inc., CA, EE. UU.). Se determinaron diferencias significativas mediante la aplicación de ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Tukey. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. A menos que se indique lo contrario, todos los valores fueron las medias de tres ensayos independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

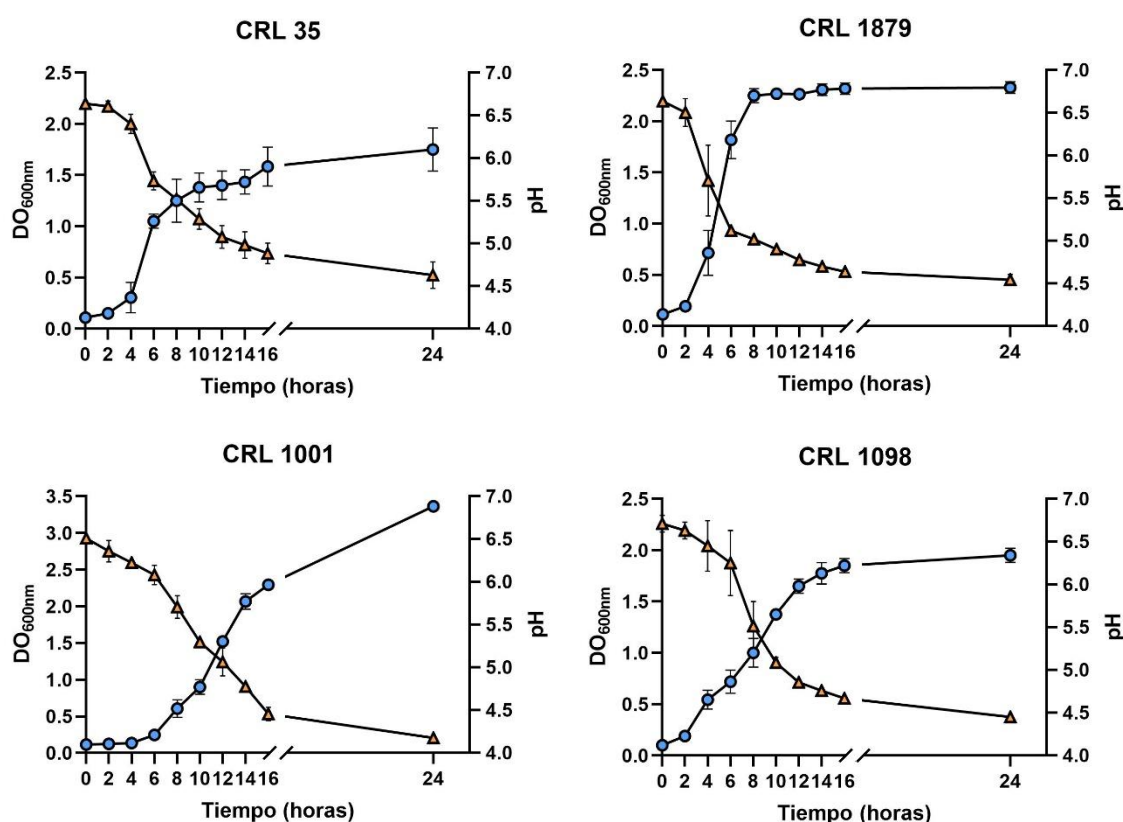
Resultados y discusión

Crecimiento de las bacterias lácticas en medio CDM sin cisteína

Teniendo en cuenta la enorme diversidad de compuestos bioactivos producidos por las bacterias lácticas, en primer lugar, se utilizaron los medios condicionados conteniendo los metabolitos producidos por las bacterias seleccionadas.

Las bacterias lácticas (BL) son microorganismos con altos requerimientos nutricionales, lo que hace necesario su cultivo en medios complejos como MRS y LAPTg, que contienen fuentes de carbono y energía, además de aminoácidos, nucleótidos y vitaminas. Estos medios incluyen compuestos como peptona, extracto de carne y levadura, los cuales pueden interferir en la evaluación de los metabolitos producidos por las BL. Para evitar este problema, en los estudios bioquímicos y fisiológicos se utilizó un medio de cultivo químicamente definido (CDM).

Las BL fueron incubadas por un período de 24 h en el medio CDM completo, y el pH y la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) se registraron durante ese periodo cada 2 horas como medidas de crecimiento bacteriano (Figura 4).



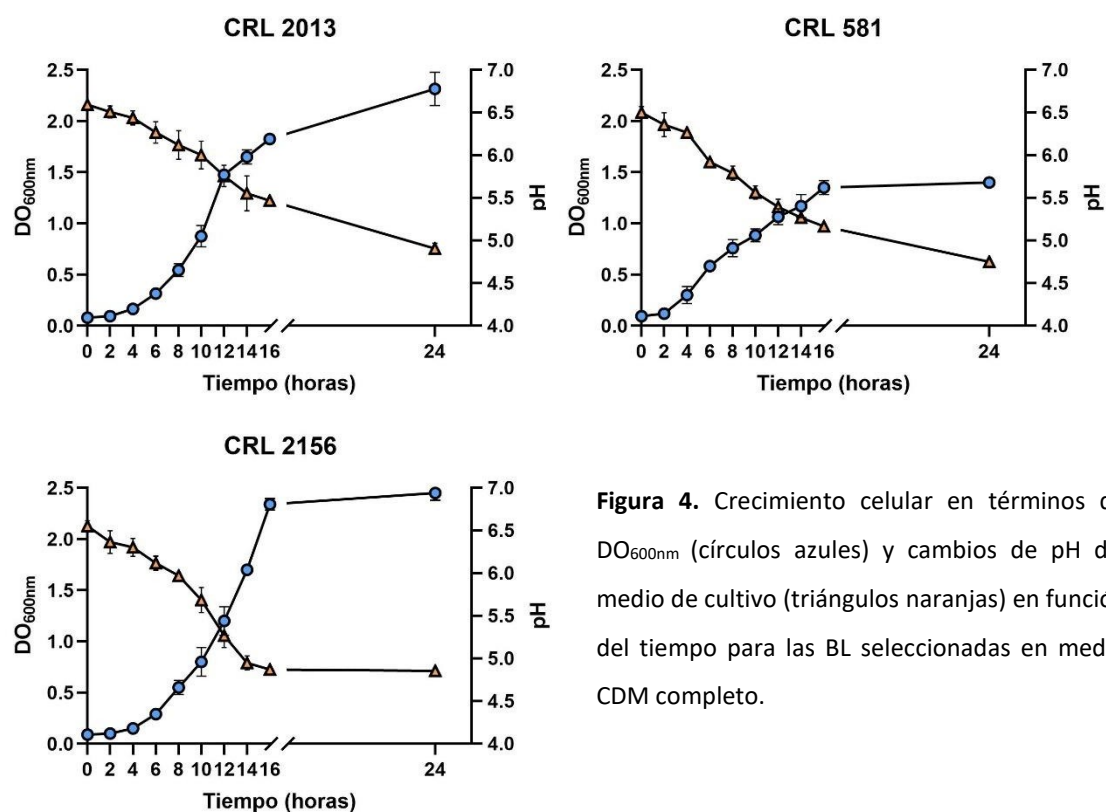


Figura 4. Crecimiento celular en términos de DO_{600nm} (círculos azules) y cambios de pH del medio de cultivo (triángulos naranjas) en función del tiempo para las BL seleccionadas en medio CDM completo.

Luego, con la finalidad de desarrollar un medio condicionado bacteriano apropiado para poder evaluar el efecto de los metabolitos sobre la actividad de la enzima AChE, se utilizó un CDM modificado (Hebert et al., 2001) optimizado para el crecimiento de las BL seleccionadas y de manera que además no interfiera en la determinación de la actividad acetilcolinesterasa. Para ello, se utilizó un medio CDM libre de cisteína y se incubaron las BL durante 24h a 37°C. Se determinó pH y densidad óptica (DO_{600nm}) finales para evaluar y comparar el crecimiento bacteriano en este medio modificado con el CDM completo.

Los resultados muestran que todas las cepas lácticas evaluadas crecieron en el medio CDM libre de cisteína (Tabla 2).

Tabla 2. Crecimiento de BL en CDM libre de cisteína. DO_i: densidad óptica a 600 nm tiempo inicial, DO_f: densidad óptica a 600 nm a las 24 horas; pH_i: pH del medio de cultivo inicial; pH_f: pH del medio de cultivo a las 24 horas.

BACTERIA LÁCTICA	DO _i	DO _f	pH _i	pH _f
<i>Enterococcus faecium</i> CRL 1879	0,19 ± 0,11	1,30 ± 0,13	6,5 ± 0,15	4,75 ± 0,20
<i>Enterococcus mundtii</i> CRL 35	0,22 ± 0,09	0,95 ± 0,17	6,5 ± 0,15	4,69 ± 0,12
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CRL 581	0,24 ± 0,11	0,7 ± 0,09	6,5 ± 0,15	4,93 ± 0,23
<i>Levilactobacillus brevis</i> CRL 2013	0,23 ± 0,08	0,73 ± 0,11	6,5 ± 0,15	5,60 ± 0,31
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> CRL 1098	0,21 ± 0,10	0,61 ± 0,10	6,5 ± 0,15	5,45 ± 0,18
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> CRL 1001	0,20 ± 0,09	0,72 ± 0,17	6,5 ± 0,15	5,19 ± 0,42
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> CRL 2156	0,22 ± 0,08	0,83 ± 0,13	6,5 ± 0,15	4,86 ± 0,35

Análisis del efecto inhibitor de los medios condicionados bacterianos sobre actividad de AChE

La disminución de los niveles de acetilcolina en pacientes con Alzheimer, producto del daño que existe en la neurotransmisión colinérgica, representa uno de los puntos claves y principales del tratamiento para esta patología. Los inhibidores de la colinesterasa juegan un papel crucial en mejorar la función colinérgica central al bloquear las enzimas responsables de descomponer ACh. Donepecilo, galantamina y rivastigmina, así como la huperzina A, son los únicos inhibidores de AChE aprobados para el tratamiento del Alzheimer, lo que destaca la importancia del sistema colinérgico como un objetivo terapéutico vital en esta patología. A pesar de esto, existen informes limitados sobre metabolitos bacterianos que inhiben AChE, y las BL no han sido estudiadas en este contexto.

En base a estos antecedentes se evaluó el efecto de los postbióticos obtenidos de cada cepa de BL sobre la actividad específica de la enzima acetilcolinesterasa.

Previamente, para validar el ensayo se utilizó donepecilo como control positivo de la inhibición de AChE a diferentes concentraciones. Este compuesto, un inhibidor reversible y específico de la acetilcolinesterasa, es ampliamente utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La inhibición de la enzima se representó gráficamente (Figura 5) en función del logaritmo de las concentraciones crecientes de donepecilo, obteniéndose una curva sigmoidea, que refleja una inhibición dependiente de la concentración. A bajas concentraciones del inhibidor, la enzima mantiene su

actividad, pero a medida que aumenta la concentración de donepecilo, la actividad enzimática disminuye de manera progresiva hasta alcanzar una meseta, donde se observa el máximo nivel de inhibición.

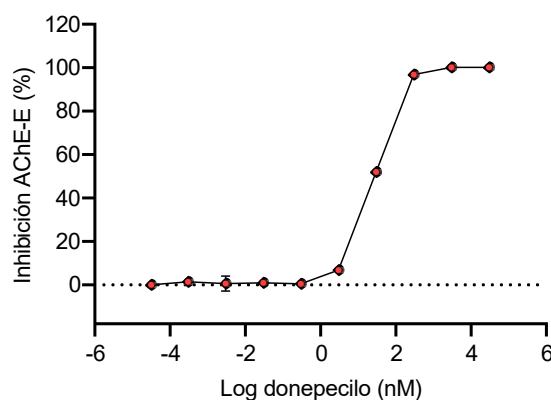


Figura 5. Curva dosis-respuesta de la inhibición de donepecilo sobre la actividad acetilcolinesterasa de eritrocitos humanos (AChE-E). La inhibición de AChE (%) se representa gráficamente frente a la concentración logarítmica de donepecilo (0 nM a 30.000 nM). Los datos fueron ajustados mediante un modelo logístico de cuatro parámetros.

Posteriormente, se prepararon los medios condicionados bacterianos (C-MCB) de cada una de las cepas seleccionadas de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Para determinar la actividad inhibitoria de los C-MCB sobre la enzima AChE se utilizaron membranas de eritrocitos solubilizadas (AChE-E) y los homogenatos de cerebro (AChE-C) obtenidos como se describió en la sección 4.1. Las variantes de AChE de relevancia fisiopatológica están asociadas a membranas celulares, es por ello que los inhibidores se testearon empleando estas dos fuentes de la enzima. Inicialmente, se utilizó como modelo de estudio la isoforma humana AChE-E debido a que el protocolo para la obtención de membranas de eritrocitos es sencillo y de fácil acceso. Además, esta isoforma, presenta una alta actividad específica, lo que la convierte en un modelo funcionalmente robusto para los estudios iniciales (Salazar et al., 2017). Posteriormente, se incluyó la isoforma proveniente del cerebro de ratones, AChE-C, con el objetivo de evaluar la eficacia de posibles inhibidores en un modelo que refleje de manera más precisa el entorno biológico afectado en patologías neurodegenerativas. Aunque el protocolo para la obtención de homogenatos cerebrales es relativamente simple, su uso está regulado y restringido por los comités de bioética y cuidado de animales, lo que limita su implementación en algunos contextos experimentales.

En la Figura 6 se muestran las diferencias obtenidas en la actividad específica basal entre ambas isoformas. Mientras que AChE-E presentó una actividad específica de 85 nmol/min/mg de proteína, AChE-C mostró una actividad considerablemente menor, de solo 35 nmol/min/mg de proteína. Esta diferencia podría explicarse por factores inherentes a la naturaleza de las isoformas y su grado de pureza en las muestras analizadas. La isoforma AChE-E, presente en eritrocitos, se encuentra mayormente en forma de dímero y está esencialmente asociada a las membranas plasmáticas, lo que permite obtener una preparación más pura y, en consecuencia, una mayor actividad específica. En contraste, AChE-C, la isoforma cerebral, se presenta como tetrámero y se obtiene de un homogenato total del tejido nervioso, lo que implica la presencia de una mayor cantidad de proteínas contaminantes que pueden reducir su actividad específica. Por lo tanto, la diferencia observada en la actividad podría deberse a la pureza relativa de cada muestra (Lotti, 1995).

Luego, se determinó la actividad específica de AChE en presencia de cada uno de los C-MCB. Como se muestra en la Figura 6A, la actividad específica de AChE-E disminuyó a 66 nmol/min/mg de proteína en presencia del MCB de la cepa CRL 581, mientras que los demás medios condicionados bacterianos evaluados no afectaron la actividad de la enzima. En los homogenatos cerebrales, la actividad específica de AChE-C también mostró una disminución significativa en presencia del MCB de la cepa CRL 581 (Figura 6B).

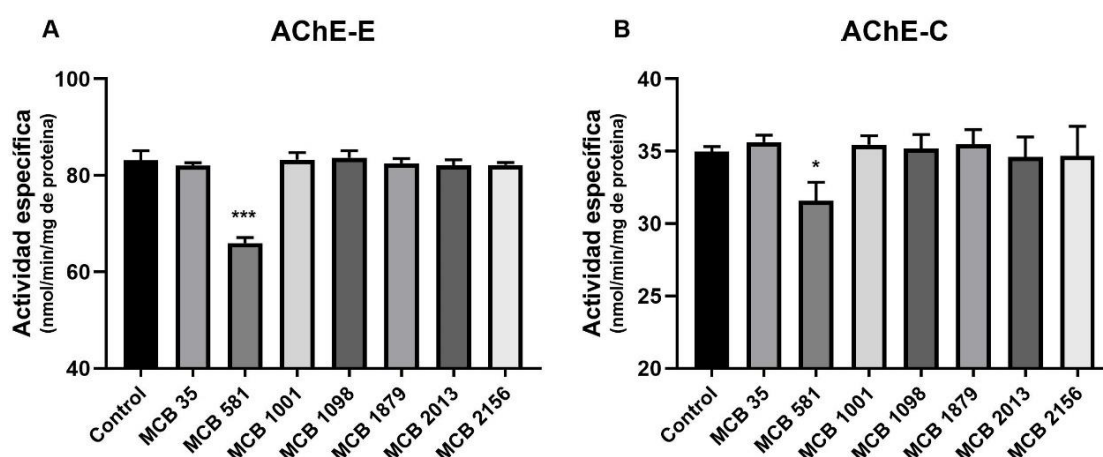


Figura 6. Actividad específica de acetilcolinesterasa de eritrocitos (A) y de cerebro de ratón (B) en presencia de los medios condicionados bacterianos (C-MCB). Los resultados representan datos de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el grupo control (* $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$).

El análisis del efecto de los C-MCB de las diferentes cepas sobre la actividad de AChE demostró que solo el medio correspondiente a la cepa CRL 581 fue capaz de inhibir a la enzima *in vitro*. Como puede observarse en la figura 7, el porcentaje de inhibición ejercida por el MCB 581 sobre la AChE-E (22%) fue mayor que la inhibición producida sobre AChE-C (13%).

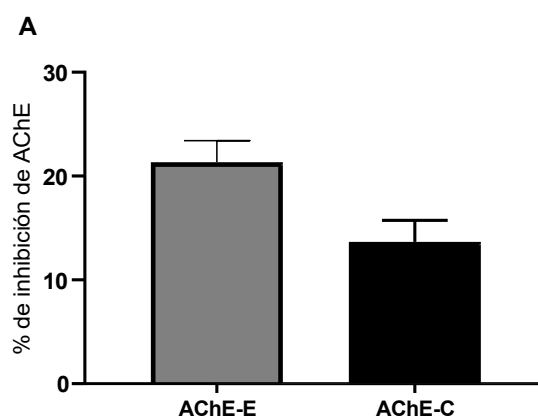


Figura 7. Actividad inhibitoria del medio condicionado de la cepa CRL 581 sobre la actividad de enzima acetilcolinesterasa (AChE). El % de inhibición sobre AChE se evaluó empleando AChE-E asociada a membrana de eritrocitos y AChE-C de cerebro de ratón. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes.

La curva de inhibición realizada con diferentes concentraciones de donepecilo permitió establecer un rango de referencia para comparar la eficacia de los MCB evaluados. Los resultados muestran que el MCB de la cepa CRL 581 produce una inhibición sobre AChE-E equivalente a 12 nM de donepecilo, mientras que sobre AChE-C equivale a 8 nM del inhibidor comercial (Figura 8). Según bibliografía, el donepecilo tiene un IC₅₀ de 6,7 nM para la inhibición de AChE (Ogura, H. et al., 2000). Aunque la inhibición generada por el MCB 581 sería menos eficaz que el inhibidor estándar, esta actividad es significativa y destaca la capacidad del MCB para ejercer una acción moduladora notable sobre la enzima. Dicha eficiencia podría ser mejorada si se identifica el metabolito responsable de la inhibición.

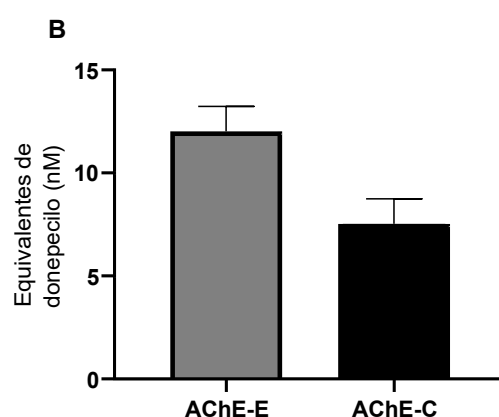


Figura 8. Equivalentes de donepecilo estimados a partir de la actividad de AChE en presencia del medio condicionado bacteriano (MCB) de la cepa CRL 581. La comparación se realizó con una curva de inhibición utilizando distintas concentraciones de donepecilo. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes.

Luego, al evaluar cantidades crecientes del medio condicionado de CRL 581 se pudo observar que la capacidad inhibitoria sobre AChE-E fue aumentando hasta llegar a un punto de saturación cercano al 36% de inhibición (Figura 9). El punto de saturación, identificado alrededor de los 60 μ L de medio condicionado, indica que, a partir de esta cantidad, la adición de más MCB no incrementa significativamente la inhibición. Este fenómeno puede deberse a que todos los sitios activos de la enzima están ocupados por los compuestos inhibidores presentes en el medio condicionado, o a la presencia de un equilibrio entre las tasas de inhibición y las limitaciones en la disponibilidad de los inhibidores activos.

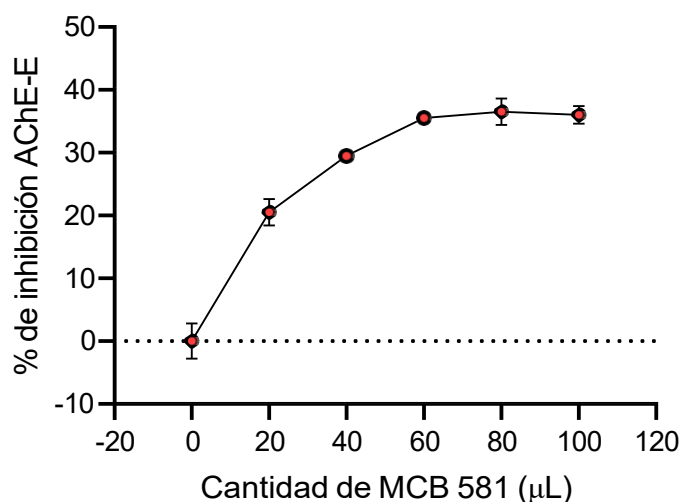


Figura 9. Curva de inhibición de AChE-E en presencia de cantidades crecientes de MCB 581. A partir de 60 μL de MCB agregado a la mezcla de reacción se observa una saturación de la inhibición producida sobre AChE-E. Todos los valores son medias $\pm$ desviaciones estándar de al menos 3 experimentos independientes.

Estos resultados permiten inferir que el medio condicionado de CRL 581 contiene moléculas bioactivas con potencial como inhibidores de AChE, lo que abre posibilidades para su caracterización y aplicación en estudios futuros sobre la regulación de esta enzima en contextos terapéuticos.

Influencia de la actividad proteolítica sobre la inhibición de AChE

En estudios previos realizados por Hebert et al. (2008), se describió que la cepa *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 posee una proteinasa asociada a la envoltura celular (CEP) responsable de la hidrólisis inicial de las proteínas como la caseína a oligopéptidos cuando el microorganismo crece en medios de cultivos como leche, rico en proteínas con escasa concentración de aminoácidos libres. Si bien esta enzima CEP se encuentra asociada a la célula, bajo ciertas condiciones puede ser liberada al medio extracelular (Villegas et al., 2015). Con el objetivo de determinar si el efecto inhibitorio observado en el ensayo anterior podría estar relacionado con la presencia de proteasas que degraden la AChE, se evaluó la actividad proteinasa en el medio condicionado de CRL 581.

Los resultados obtenidos mostraron que no hay actividad proteolítica en los C-MCB evaluados de la cepa CRL 581. Esto sugiere que, en estas condiciones experimentales,

no hay enzimas proteolíticas presentes o activas en el medio extracelular que estén degradando la AChE. Este resultado puede ser relevante para entender el efecto inhibitorio observado, ya que descarta que la inhibición sea causada por la acción de proteasas en el medio.

Evaluación de la actividad inhibitoria de AChE en fracciones del C-MCB de CRL 581 según tamaño molecular

En la búsqueda del metabolito responsable de la inhibición observada sobre AChE se procedió a separar el C-MCB obtenido de la cepa CRL 581 en dos fracciones utilizando una membrana de corte de 3 kDa de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Luego de la separación, se examinó cada fracción en su capacidad para inhibir a la enzima. Como se muestra en la Figura 10, la actividad inhibidora sobre la enzima se detecta en la fracción del medio condicionado con un peso molecular inferior a 3 kDa.

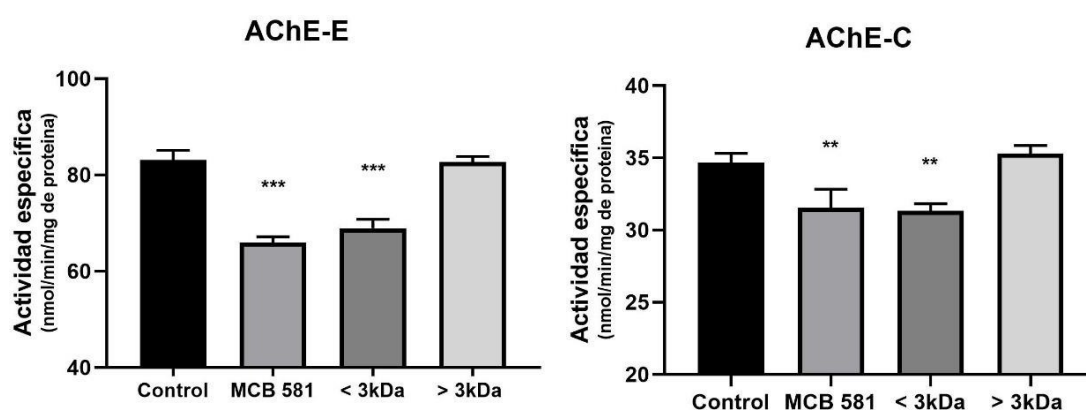


Figura 10. Actividad específica de AChE-E y AChE-C en presencia de C-MCB fraccionado de CRL 581 (<3 y >3 kDa). Los resultados representan datos de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el grupo control (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

Este resultado demuestra que los compuestos responsables de la inhibición son moléculas pequeñas, como péptidos cortos, aminoácidos o metabolitos secundarios. Estas moléculas pequeñas serían interesantes debido a su posible capacidad para atravesar membranas biológicas y su acción multifuncional (Mondal et al. 2018). La actividad inhibidora de AChE detectada en la fracción <3 kDa del MCB-581 confirma que el efecto no se atribuye a la proteasa asociada a la envoltura celular, cuya masa molecular es de aproximadamente 188 kDa (Villegas et al., 2015). Además, este

resultado concuerda con trabajos que han demostrado una mayor bioactividad en compuestos de menor tamaño molecular. Estudios realizados con hidrolizados proteicos fraccionados por peso molecular (1–3 kDa) evidencian que estas fracciones presentan una actividad inhibitoria de AChE mejorada entre un 40% y un 50% en comparación con los hidrolizados no fraccionados (Asen & Aluko, 2022). Según estos autores, este efecto se debería a que los péptidos más pequeños poseen mayor accesibilidad al sitio activo de la enzima, lo que incrementa su eficacia inhibitoria. Por otro lado, las características del compuesto presente en el medio condicionado de CRL 581 son compatibles con la naturaleza de los inhibidores de AChE disponibles comercialmente, como donepecilo, galantamina y rivastigmina, los cuales también presentan pesos moleculares inferiores a 3 kDa, generalmente entre 200 y 400 Da, y son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Banks, 2012).

Los resultados obtenidos durante este capítulo de la tesis demuestran que el medio condicionado proveniente de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 es capaz de inhibir la actividad de las dos isoformas de AChE utilizadas. C-MCB 581 fue más efectivo sobre la actividad de AChE-E que sobre AChE-C, produciendo una inhibición del 22% y del 14%, respectivamente. Aunque estos resultados fueron obtenidos *in vitro*, la inhibición parcial observada podría ser beneficiosa, ya que permitiría mantener un equilibrio entre preservar niveles adecuados de acetilcolina en el SNC y minimizar efectos secundarios adversos. De hecho, estudios recientes sugieren que concentraciones que inhiban más del 35% de la actividad enzimática pueden aumentar el riesgo de toxicidad asociado a los inhibidores actualmente disponibles (Moss, 2020).

Al realizar una equivalencia entre la inhibición producida por el medio condicionado y el inhibidor comercial donepecilo, se observó que MCB 581 ejerce una inhibición equivalente a 12 nM de donepecilo. Estos hallazgos sugieren que los postbióticos producidos por CRL 581 podrían servir como un complemento prometedor al tratamiento tradicional de la EA.

Conclusiones parciales

- A partir del análisis *in vitro* de las siete cepas lácticas, se observó que únicamente el medio condicionado (MCB) de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 logró inhibir de manera significativa la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, tanto en extractos eritrocitarios (AChE-E) como cerebrales (AChE-C).
- El MCB 581 mostró una inhibición significativamente más marcada sobre la acetilcolinesterasa eritrocitaria (22%) en comparación con la cerebral (14%). Esta acción diferencial se traduce en una eficacia comparable a la alcanzada por concentraciones de 12 nM y 8 nM de donepecilo, respectivamente, lo que subraya el notable potencial funcional del MCB 581 como agente con efecto anticolinesterásico.
- El efecto inhibitorio sobre la AChE se vinculó de manera específica con la fracción del MCB 581 que contiene compuestos de peso molecular inferior a 3 kDa. Este resultado indica que los metabolitos de bajo peso molecular son los principales responsables de la actividad anticolinesterásica observada, lo que refuerza su valor funcional y potencial terapéutico.
- Estos resultados posicionan al MCB de CRL 581 como una prometedora fuente de compuestos con potencial actividad anticolinesterásica, abriendo nuevas perspectivas para su aplicación en el abordaje de trastornos neurodegenerativos.



CAPÍTULO 2

Evaluación del efecto protector de los postbióticos frente a la toxicidad de oligómeros beta amiloides en modelos celulares del sistema nervioso



Capítulo 2. Evaluación del efecto protector de los postbióticos frente a la toxicidad de oligómeros beta amiloides en modelos celulares del sistema nervioso

Introducción

Según la teoría amiloide, la enfermedad de Alzheimer (EA) resulta de un desbalance entre la formación de péptidos amiloides ($A\beta$) y la eliminación de éstos (Mohamed et al., 2012; Selkoe & Hardy, 2016). La acumulación de $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42 ha sido considerada durante mucho tiempo como un evento central e inicial en la patogénesis de la EA. La proteína precursora del péptido amiloide (APP) es normalmente procesada mediante la vía “no amiloidogénica”, esto se produce cuando APP es escindida por la enzima α -secretasa generando péptidos que no se agregan en oligómeros y que luego son metabolizados correctamente por las neuronas. En cambio, cuando sobre la proteína APP actúa el complejo β -secretasa (BACE1), los péptidos que se generan son hidrosolubles y tienden a agregarse en oligómeros que luego precipitan formando las placas amiloides insolubles (Paroni et al., 2019). Debido a esta capacidad de agregación, se piensa que los oligómeros de $A\beta$ tienen la mayor toxicidad para las neuronas. Estos oligómeros inducen una compleja cascada neurodegenerativa, la cual resulta en un deterioro cognitivo progresivo y demencia (Figura 11). Otros signos distintivos de esta patología son la hiperfosforilación de Tau y la formación de ovillos neurofibrilares. Sin embargo, se cree que estos eventos son defectos tardíos de la cascada neurodegenerativa inducida por los oligómeros beta amiloides (Bloom, 2014; P.-P. Liu et al., 2019).

Evidencia reciente sugiere que las alteraciones patológicas vasculares y la ruptura de la barrera hematoencefálica pueden ser fundamentales en el proceso neurodegenerativo, con la neuroinflamación asociada como un actor clave en el inicio y desarrollo de la enfermedad. De hecho, la vasculatura cerebral de pacientes con Alzheimer producen mayores cantidades de citoquinas, lo que sin duda contribuye al daño neuronal. La neuroinflamación se caracteriza por estrés oxidativo y la activación de la microglía que libera compuestos neurotóxicos y citoquinas proinflamatorias, lo que perpetúa el estado

inflamatorio y luego eventualmente conduce al daño neuronal (Heneka et al., 2015; Leng & Edison, 2021b).

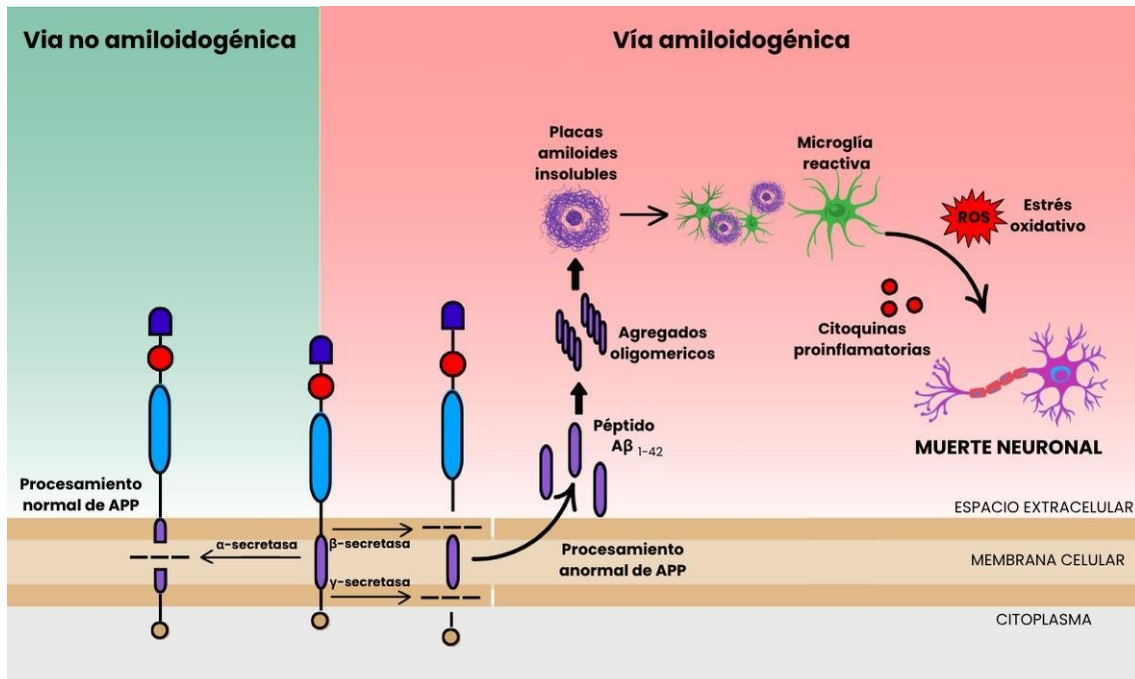


Figura 11. Esquema de las vías de procesamiento del precursor de la proteína amiloide. APP es una proteína transmembrana que puede ser procesada por enzimas secretasas a través de dos vías principales: la no amiloidogénica (izquierda) y la amiloidogénica (derecha). En la vía no amiloidogénica (normal), APP es escindida por la α -secretasa en el centro del dominio β -amiloide ($A\beta$), impidiendo así la formación de amiloide. En cambio, en la vía amiloidogénica, APP es procesada por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa, liberando péptidos neurotóxicos $A\beta_{1-42}$, los cuales pueden agregarse en oligómeros y eventualmente formar placas amiloides insolubles. Estas acumulaciones son capaces de desencadenar una respuesta inflamatoria local y, con el tiempo, el estrés oxidativo y los cambios bioquímicos resultantes conducen al daño neuronal progresivo asociado a la enfermedad de Alzheimer.

Además de los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) y la memantina, el tratamiento médico actual para pacientes con Alzheimer incluye antidepresivos, ansiolíticos, neurolépticos y fármacos antiinflamatorios (Breijyeh & Karaman, 2020). Existe evidencia científica sobre la búsqueda de tratamientos más simples o adyuvantes que puedan aliviar la carga de los esquemas actuales (X. Li et al., 2023). Una alternativa prometedora lo constituyen el uso de las bacterias lácticas con características probióticas. Como se describió anteriormente el término probiótico hace referencia a microorganismos vivos, mientras que los postbióticos consisten en preparaciones de microorganismos no viables, incluidos sus metabolitos y componentes celulares. Se han

observado efectos positivos del consumo de probióticos y sus metabolitos en la mejora de ciertos marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en pacientes con Alzheimer (Akbari et al., 2016; C.-S. Kim et al., 2021). Entre los metabolitos postbióticos producidos por BL, algunos de los más conocidos incluyen vitaminas del complejo B, ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), péptidos antimicrobianos como bacteriocinas y neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico (GABA). Por lo tanto, los metabolitos postbióticos poseen diversas funciones reguladoras de la salud humana, incluida la absorción de nutrientes, la desintoxicación, la regulación del sistema inmunológico y la comunicación microbiota-intestino-cerebro. La administración de postbióticos podría contribuir al descenso de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, reduciendo así la inflamación y el estrés oxidativo lo que redundaría positivamente en ralentizar la progresión de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. En base a estudios previos, que incluyen la inhibición de AChE por *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581, la capacidad antimicrobiana de *E. mundtii* CRL 35 y la síntesis de GABA por *L. brevis* CRL 2013, se decidió continuar el trabajo con estas tres cepas de bacterias lácticas. En este capítulo, con la finalidad de evaluar el efecto benéfico de los postbióticos producidos por BL seleccionadas, se utilizaron los medios condicionados bacterianos sobre una línea celular de neuroblastoma (N2a) y microglía de ratón (BV2) estimuladas con oligómeros $A\beta_{1-42}$. El uso de estas líneas celulares y el tratamiento con $oA\beta_{1-42}$ permite simular las condiciones neuroinflamatorias y neurodegenerativas observadas en la enfermedad de Alzheimer, proporcionando así un modelo experimental relevante para evaluar el potencial terapéutico de los postbióticos producidos por las BL.

Materiales y métodos

1. Microorganismos

Para llevar a cabo esta etapa experimental, las cepas lácticas utilizadas fueron *Enterococcus mundtii* CRL 35, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581, *Levilactobacillus brevis* CRL 2013.

2. Medios de cultivo

2.1 Medio protector LEL-glicerol

El medio LEL usado para la preservación de las BL se describió en la sección 2.1 de materiales y métodos del Capítulo 1.

2.2 Medio caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS)

L. delbrueckii subsp. *lactis* CRL 581 y *Lv. brevis* CRL 2013 fueron activadas en medio MRS como se describió en la sección 2.2 de materiales y métodos del Capítulo 1.

2.3 Medio caldo LAPTg

E. mundtii CRL 35 fue mantenida rutinariamente en caldo LAPTg como se describió en la sección 2.3 de materiales y métodos del Capítulo 1.

3. Condiciones de crecimiento y preparación de los postbióticos

Luego de las activaciones mediante transferencias sucesivas en caldo MRS o LAPTg según corresponda a 37°C durante 16 h, los pellets bacterianos se colectaron por centrifugación y luego de 2 lavados con solución salina 0,9%, fueron inoculados en medio DMEM y RPMI 1640 (Gibco, ThermoFisher) libre de suero y sin antibióticos. Luego de 24 horas de incubación, todos los cultivos fueron centrifugados, los sobrenadantes se ajustaron a un pH de 7 utilizando NaOH 1 M y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm para obtener los medios condicionados bacterianos (MCB) del DMEM (D-MCB) y del RPMI (R-MCB) de cada cepa bacteriana. Se registraron el pH final y la absorbancia a 600 nm en ambos medios de cultivo.

4. Modelos *in vitro*

Se utilizaron dos líneas celulares, una procedente de un neuroblastoma (N2a) y otra de microglía de ratón (BV2). Las células N2a se mantuvieron de manera rutinaria en un medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina,

penicilina G (100 U/mL, Biological Industries), estreptomicina (0,1 µg/mL, Biological Industries) y anfotericina B (25 µg/mL, Biological Industries). Mientras que la línea BV2 se mantuvo en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, penicilina G (100 U/mL, Biological Industries), estreptomicina (0,1 µg/mL, Biological Industries) y anfotericina B (25 µg/mL, Biological Industries). Ambas líneas celulares se incubaron a 37 °C en una incubadora de aire humidificada conteniendo 5% CO₂- 95% de aire (condiciones estándar).

4.1 Oligomerización del péptido beta-amiloide Aβ₁₋₄₂

Para preparar los oligómeros Aβ₁₋₄₂ (oAβ) se siguió el protocolo de Saavedra et al. (2007) con algunas modificaciones. El péptido Aβ₁₋₄₂ (rPeptide, Cat# A-1163-2) se disolvió en hexafluoroisopropanol (Sigma-Aldrich) para preparar una solución stock de concentración 1 mM, la cual se distribuyó en tubos de microcentrífuga estériles. Se realizó el secado del hexafluoroisopropanol utilizando un concentrador de vacío rápido (Biotron Inc., Corea) durante 5 minutos a 30 °C y los péptidos obtenidos se almacenaron a -80°C.

Para formar los oligómeros, se disolvió el péptido seco en DMSO (Sigma-Aldrich) para obtener una solución stock de 5 mM. Se utilizó medio Leibovitz L15-CO₂ (Gibco, ThermoFisher) para llevar el péptido a una concentración final de 100 µM. Esta solución se incubó a 4 °C durante 24 h para formar los oligómeros antes de llevar a cabo los experimentos.

4.2 Ensayo de citotoxicidad

Se realizaron dos pruebas de citotoxicidad mediante el ensayo de bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazolio (MTT). Este método tiene como principio que las células vivas y metabólicamente activas reducen el MTT en formazán, un producto de color púrpura, y esta coloración formada puede ser medida mediante espectrofotómetro.

En una primera instancia y de acuerdo a lo descrito en bibliografía se utilizaron diferentes dosis y tiempos de exposición de las células a los oligómeros beta amiloides (Dahlgren et al., 2002; Fu & Jia, 2021). Brevemente, las células N2a y BV2 se sembraron en 5 x 10⁴ células por pocillo con sus correspondientes medios de crecimiento en placas de 96 pocillos y se cultivaron a 37 °C en un ambiente humidificado. A las 24 h y una vez

alcanzado el 85% de confluencia, se retiró el medio y las células se incubaron en presencia de oA $\beta_{(1-42)}$ a distintas concentraciones; durante 8, 16 y 24 h.

Por otro lado, se determinó la influencia de los medios condicionados bacterianos sobre la proliferación de células N2a y BV2. Para ello las líneas celulares fueron sembradas en 5×10^4 células por pocillo e incubadas a 37°C en ambiente humidificado. Al llegar al 85% de confluencia se descartó el medio y las células fueron cultivadas con los diferentes MCB en presencia y ausencia de oA β_{1-42} durante 8 h para realizar el ensayo de MTT.

Luego de los tratamientos, en todos los casos, el medio se descartó, se agregó 50 μ L de solución de MTT (0,5 mg/mL) en cada pocillo y se incubó a 37°C durante 2 h. Se eliminó el MTT de las placas y se añadieron 100 μ L de isopropanol por pocillo para disolver los cristales de formazán. Se realizó la lectura de absorbancia de la placa utilizando una longitud de onda de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm en un lector de microplacas Infinite 200 PRO (Tecan Trading AG, Switzerland). La absorbancia específica se obtuvo restando la lectura a 630 nm de la lectura a 570 nm y se calculó la viabilidad celular como el porcentaje de absorbancia de la muestra respecto al control sin tratar (100 % viabilidad).

4.3 Evaluación de la actividad antioxidante y la respuesta anti-inflamatoria de los medios condicionados en células BV2

Las células BV2 se sembraron en placas de 6 pocillos (8×10^5 células/mL) y se incubaron durante 24 horas para su adherencia. Posteriormente, el medio fue reemplazado por los R-MCB de cada cepa bacteriana y se añadieron 5 μ M de oA β_{1-42} a cada pocillo. Tras 8 horas de incubación, se colectaron las células en Trizol para analizar la expresión génica mediante RT-qPCR y los sobrenadantes para determinar la actividad antioxidante total. Como control, se utilizaron pocillos con medio de cultivo completo RPMI.

4.3.1 Capacidad Antioxidante Total

La capacidad antioxidante presente en los sobrenadantes libres de células de la línea celular BV2 tratada con los medios condicionados se estudió mediante dos métodos: el ensayo de decoloración con 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y el ensayo de capacidad antioxidante reductora cúprica (CUPRAC).

Para el ensayo de ABTS se preparó una mezcla de 7 mM de ABTS y 2,45 mM de persulfato de amonio como agente oxidante, y la solución se mantuvo en la oscuridad a

temperatura ambiente durante 16 h para producir el catión radical ABTS (ABTS^{•+}) que tiene una absorbancia máxima a 734 nm. Los compuestos antioxidantes reducen el ABTS^{•+}, lo que lleva a la decoloración de la solución, cuya magnitud depende de la concentración del antioxidante. Las muestras se mezclaron con ABTS^{•+} con una absorbancia inicial de 0,7 a 734 nm (DO_{734nm}), y la absorbancia final se leyó después de la incubación de 10 minutos en oscuridad.

El ensayo de CUPRAC se basa en la reducción del reactivo CUPRAC en presencia de compuestos antioxidantes. Este reactivo consiste en una mezcla de 10 mM de CuSO₄, 7,5 mM de neocuproína y un tampón de acetato de amonio de 1 M a pH 7. La presencia de un agente reductor induce la formación del complejo cobre (I)-neocuproína, que tiene un pico de absorbancia distintivo a 450 nm. El reactivo CUPRAC se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con los sobrenadantes libres de células, y la formación del complejo cobre(I)-neocuproína se estimó midiendo la absorbancia a 450 nm. Como patrón de referencia se utilizó ácido ascórbico (AA) ya que es un compuesto antioxidante conocido. Se realizó una curva de calibración con concentraciones crecientes de este compuesto, lo que permitió cuantificar la capacidad antioxidante de las muestras ensayadas en términos de equivalentes de ácido ascórbico. Además, tanto para el ensayo de ABTS como el de CUPRAC, se utilizó como control las células BV2 tratadas con ácido ascórbico 125 µM.

4.3.2 Expresión de genes marcadores de inflamación mediante RT-qPCR

Las células adherentes BV2 tratadas con 5 µM de oAβ₁₋₄₂ en presencia o ausencia de cada R-MCB fueron incubadas durante 8 h y luego colectadas para realizar la extracción de ARN.

El ARN total se aisló utilizando RNazol RT siguiendo las instrucciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc.). En resumen, las células se lisaron utilizando 1 mL de RNazol RT y se agregó 400 µL de agua libre de ARNasa a cada tubo. La suspensión se centrifugó durante 15 min a 12.000 x g. Los sobrenadantes conteniendo el ARN se transfirieron a nuevos tubos y se precipitó agregando 1 mL de isopropanol y se incubó durante 3 h a -20 °C. Se centrifugaron las muestras para descartar los sobrenadantes y los pellets se lavaron dos veces con etanol al 70%. Finalmente, los pellets de ARN se disolvieron en 20 µL de agua libre de ARNasa y se trataron con PerfeCTa DNase I (Quanta

Biosciences, Genbiotech, Buenos Aires, Argentina) según el protocolo del fabricante. La pureza y cantidad total de ARN se analizaron mediante un espectrofotómetro Nabi UV/vis Nano (MicroDigital Co., Ltd., Corea).

La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando el qScript cDNA SuperMix (Quanta Bio, Genbiotech, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un sistema de detección de PCR en tiempo real iQ5 (Bio-Rad) con un Supermix SYBR Green iQ5 (Bio-Rad) para realizar la RT-qPCR. Los oligonucleótidos utilizados se enumeran en la Tabla 3. Los resultados se expresaron como cambios relativos en los valores de Ct con respecto al grupo de células no tratadas utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La eficiencia de amplificación se validó y normalizó frente a la del gen de la β -actina. Se realizó un análisis de la curva de fusión inmediatamente al final de cada experimento con una tasa de transición de temperatura lineal de 0,1 °C/s desde 55 hasta 95 °C para determinar la especificidad de la amplificación.

Tabla 3. Cebadores empleados para RT-qPCR en células BV2.

Nombre	Secuencia de cebadores		Referencias
	Cebador sentido (5' → 3')	Cebador anti-sentido (3' → 5')	
β-actina	5'-CGTGAAAAGATGACCCAGATCA-3'	5'-ACAGCCTGGATGGCTACGTA-3'	(Cataldo, Villena, et al., 2020)
TNF-α	5'-GTGGTCAGGTTGCCTCTGTCTC-3'	5'-TGGCTCTGTGAGGAAGGCTGTG-3'	(H. Zhang et al., 2020)
IL-1β	5'-TTTCCTCCTTGCCTCTGATGGG-3'	5'-CCACACGTTGACAGCTAGGTTC-3'	(H. Zhang et al., 2020)
IL-6	5'-CTTGGGACTGATGCTGGTGACA-3'	5'-GCCTCCGACTTGTGAAGTGGTA-3'	(H. Zhang et al., 2020)
SOD-1	5'-TGCCTGCTGAAGGGCGAC-3'	5'-GTCCTGACAACAACCTGGTTC-3'	(Cui et al., 2019)
SOD-2	5'-GGAGCAAGGTCGCTTACAGA-3'	5'-GTGCTCCACACGTCAATC-3'	(Cui et al., 2019)
iNOS	5'-GGACGAGACGGATAGGCAGAGA-3'	5'-TCTTCAAGCACCTCCAGGAACG-3'	(H. Zhang et al., 2020)

5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, Inc., CA, EE. UU.). Se determinaron diferencias significativas mediante la aplicación de ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Tukey. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. A menos que se indique lo contrario, todos los valores fueron las medias de tres ensayos independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Resultados y discusión

Efecto de los medios condicionados de las BL sobre la viabilidad de las células N2a y BV2 frente a la toxicidad de los oA β_{1-42}

En primer lugar, se llevaron a cabo experimentos de dosis-respuesta en las líneas celulares N2a y BV2 utilizando oligómeros A β_{1-42} con el objetivo de corroborar la respuesta de estos modelos celulares, según lo reportado en la bibliografía (Dahlgren et al., 2002; Fu & Jia, 2021). Esto permitió establecer la concentración de oA β_{1-42} que se empleará en los ensayos posteriores. Para ello, ambas líneas celulares fueron incubadas con distintas concentraciones de los oligómeros y se determinó la viabilidad celular mediante el método de MTT a diferentes tiempos.

Los resultados se muestran en la Figura 12, donde la viabilidad de las células N2a fue del 70% en presencia de 10 μ M de oA β_{1-42} luego de 8 h de incubación; del 50% a las 16 h y del 40% a las 24 h de incubación. Cuando la concentración de oligómeros se duplicó la viabilidad cayó rápidamente al 50% durante las primeras 8 h de incubación alcanzando valores menores al 30% luego de 24 h de incubación. En la línea celular de microglía BV2, el tratamiento con 5 μ M de oA β_{1-42} disminuyó la viabilidad a valores de 64% a las 8 h, y en las horas posteriores de incubación la misma se mantuvo en valores cercanos al 50% de viabilidad. En cambio, los tratamientos con mayores concentraciones de oA β_{1-42} , 10 μ M y 20 μ M, provocaron a las 24 h un marcado descenso de la viabilidad celular de BV2 con valores cercanos al 20 y 5%, respectivamente. En base a estos resultados, se comprobó la susceptibilidad de las líneas celulares empleadas al tratamiento con los oligómeros beta amiloides y se decidió utilizar como modelo de estudio una estimulación de 8 h con oA β_{1-42} a concentraciones finales de 10 μ M para la línea N2a y de 5 μ M para las células BV2.

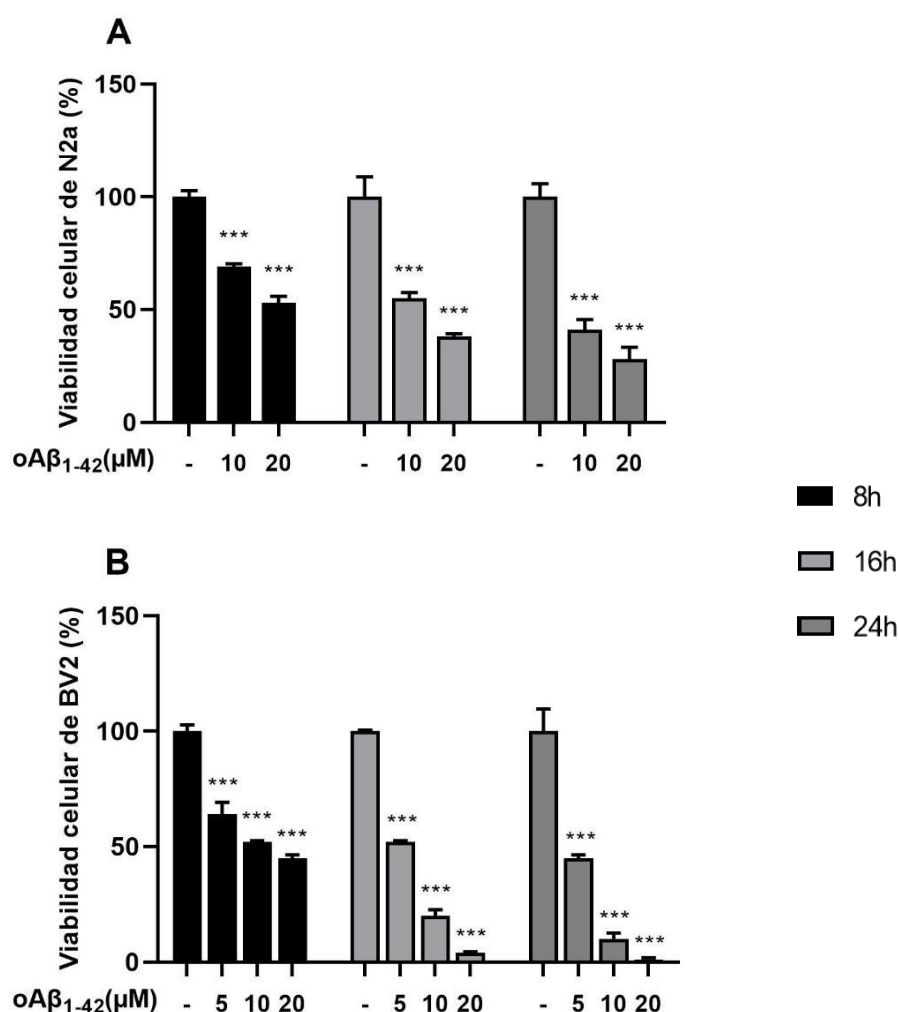


Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de oAβ₁₋₄₂ sobre la viabilidad celular. (A) Células N2a incubadas con 10 y 20 μM de oAβ₁₋₄₂ a diferentes tiempos. (B) Células BV2 incubadas con 5, 10 y 20 μM de oAβ₁₋₄₂ a diferentes tiempos. Los valores de viabilidad celular correspondientes se expresan como porcentaje de células control (sin adición de oAβ₁₋₄₂) y representan la media ± DE de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el grupo control para cada tiempo de exposición a oAβ₁₋₄₂ (***) ($p < 0,001$).

Una vez establecida la concentración de oAβ₁₋₄₂ a utilizar y el tiempo de exposición, se evaluó el efecto de los medios condicionados bacterianos sobre la viabilidad celular en células N2a y BV2. Las células fueron tratadas durante 8 h con los distintos MCB en presencia y ausencia de oligómeros beta-amiloides, y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT. Como se muestra en la Figura 13, ninguno de los medios condicionados bacterianos generó citotoxicidad en las células evaluadas. Además, tal como se observó en el ensayo preliminar, el tratamiento con oAβ₁₋₄₂ redujo significativamente la viabilidad celular. Sin embargo, ninguno de los MCB mostró

capacidad para proteger las células frente a la citotoxicidad inducida por los oligómeros beta-amiloides, y no se detectaron variaciones en la viabilidad celular.

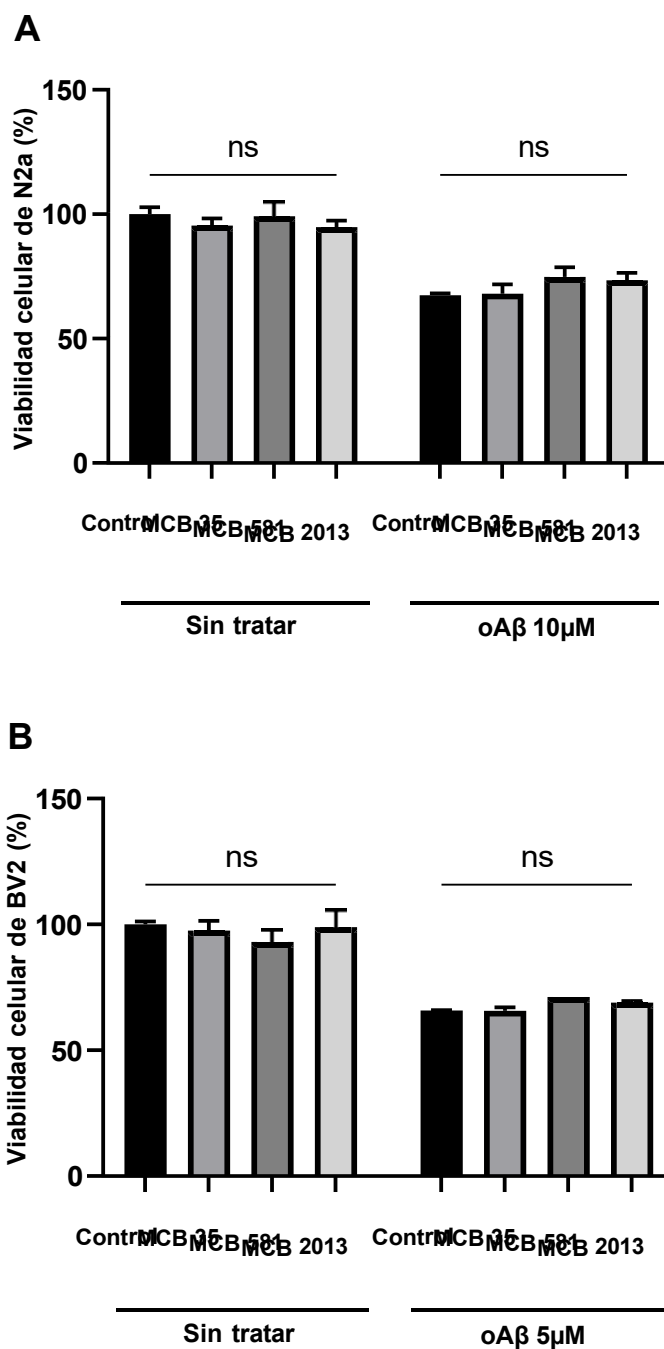


Figura 13. Efecto de los medios condicionados bacterianos en la viabilidad celular. Viabilidad celular de las células N2a (A) y BV2 (B) tratadas con los MCB y oAβ se evaluó mediante el ensayo MTT. Los valores de supervivencia correspondientes se expresan como porcentaje de células de control (medio convencional, DMEM para N2a y RPMI1640 para BV2). ns, no significativo ($p > 0,05$).

Efecto de los MCB sobre el estrés oxidativo generado por $\text{oA}\beta_{1-42}$ en células de la microglía

Para estudiar el efecto de los medios condicionados de las BL sobre el estrés oxidativo generada por los oligómeros beta amiloides se utilizó la línea celular de microglía de ratón (BV2). Esta línea ha sido ampliamente caracterizada y utilizada como sustituto de cultivos celulares primarios en numerosos estudios que examinan las funciones microgliales, la neuroinflamación y las enfermedades neurodegenerativas en ratones (Bocchini et al., 1992; Henn, 2009).

La población de la microglía es la que ejerce la principal acción antioxidante (Orfali et al., 2024). Para ello se evaluó el efecto antioxidante de los medios condicionados bacterianos (R-MCB) en células BV2 desafiadas con $\text{oA}\beta_{1-42}$ según lo detallado en la sección 4.3 de materiales y métodos.

Para el ensayo realizado por el método de ABTS se midió el porcentaje de actividad antioxidante de cada sobrenadante de cultivo de células BV2 tratadas con los diferentes R-MCB en presencia de los $\text{oA}\beta$. Los resultados muestran que la estimulación con $\text{oA}\beta_{1-42}$ provocó una reducción en la actividad antioxidante medida en los sobrenadantes de las células BV2, la cual fue eficientemente contrarrestada al agregar el compuesto antioxidante de referencia, ácido ascórbico (AA) (Figura 14A). Cuando se evaluaron los R-BCM de las cepas seleccionadas en presencia de los $\text{oA}\beta_{1-42}$, todos los sobrenadantes fueron capaces de reducir los cationes ABTS^{*+} (Figura 14A). Este resultado sugiere que las tres cepas de BL analizadas en este estudio secretan metabolitos antioxidantes que pueden reducir significativamente el estrés oxidativo desencadenado por $\text{oA}\beta_{1-42}$ en la línea celular BV2.

En el ensayo de CUPRAC, también se evidenció la reacción oxidativa desencadenada por $\text{oA}\beta_{1-42}$. En este ensayo, el AA (125 μM) fue capaz de reducir los iones cúpricos en el sobrenadante de las células tratadas con $\text{oA}\beta_{1-42}$ (Figura 14B). Sorpresivamente, solo las muestras de R-BCM de CRL 35 y CRL 2013 redujeron eficientemente los iones cúpricos, resaltando su capacidad para mitigar los marcadores de estrés oxidativo producidos por los oligómeros beta-amiloides *in vitro* (Figura 14B). Este hallazgo demuestra que cepas específicas de BL, especialmente *E. mundtii* CRL 35 y *L. brevis* CRL 2013, poseen la

capacidad de atenuar la respuesta oxidativa inducida por $\text{oA}\beta_{1-42}$ en microglía, lo que podría prevenir efectos neurotóxicos en las neuronas adyacentes.

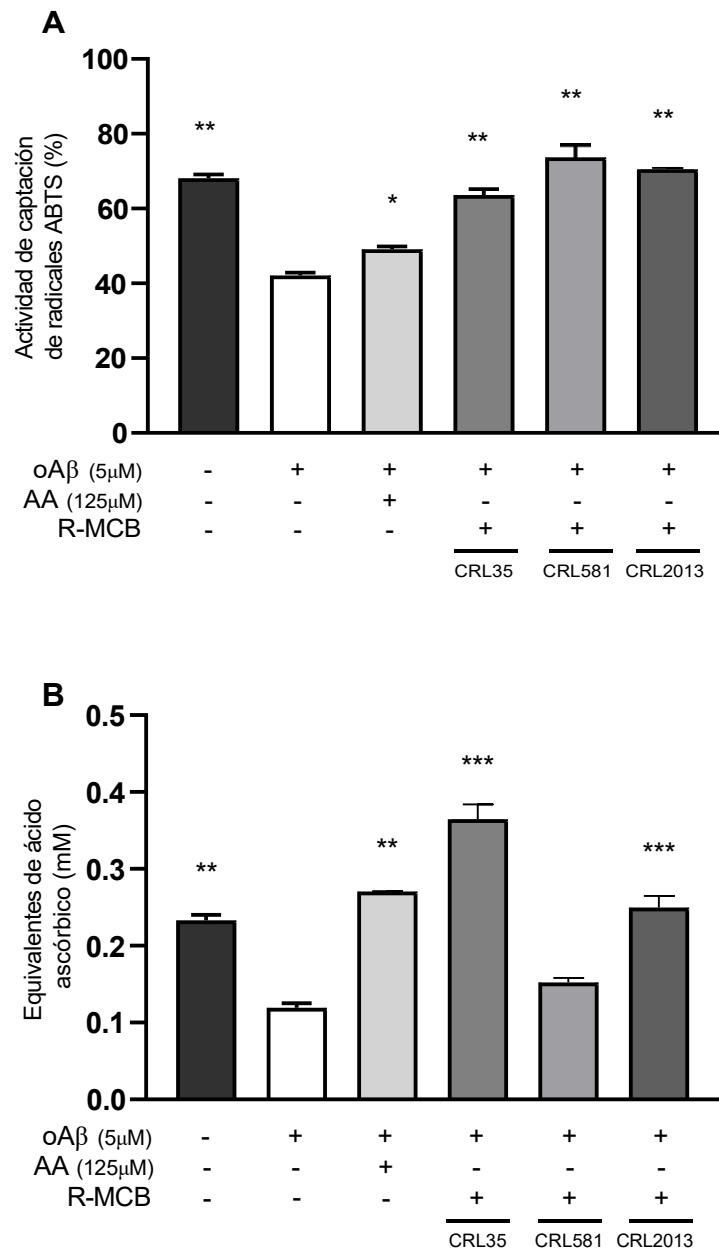


Figura 14. Actividad antioxidante de los MCB en células BV2 frente a la toxicidad de los $\text{oA}\beta$. La actividad antioxidante se midió utilizando (A) el ensayo de decoloración del ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y (B) la capacidad antioxidante reductora de cúprica (CUPRAC). Se utilizó 125 μ M ácido ascórbico (AA) como control positivo. La actividad antioxidante de CUPRAC se expresó como equivalentes de AA. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el grupo tratado con $\text{oA}\beta_{1-42}$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$).

Efecto antiinflamatorio de los medios condicionados bacterianos en células de microglía BV2

El proceso inflamatorio iniciado por la activación de la microglía es otro componente esencial de la EA. Los agregados de A β ₁₋₄₂ exhiben una neurotoxicidad significativa al dañar las neuronas. Además, estos agregados de A β estimulan la microglía, que elimina el A β , pero esta acción conduce a la liberación de mediadores inflamatorios, resultando en efectos neurotóxicos indirectos (Maezawa et al., 2011). Por ello, examinamos la expresión de citoquinas inflamatorias en células BV2 expuestas a oA β ₁₋₄₂, tanto en presencia como en ausencia de los medios condicionados bacterianos.

Las células microgliales desafiadas con oA β ₁₋₄₂ mostraron un aumento en la expresión de las citoquinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Figura 15). Por el contrario, el tratamiento con los R-MCB de las tres cepas seleccionadas redujeron significativamente los niveles de expresión de IL-1 β (Figura 15A). Esta es una de las citoquinas que se detecta en las etapas iniciales de la EA y posee un efecto negativo bien documentado en los pacientes, ya que induce fuertemente la producción de péptidos A β (Di Bona et al., 2008; Xie et al., 2015). A su vez, el péptido A β aumenta el procesamiento de IL-1 β en la microglía, lo que lleva a la sobreexpresión de esta citoquina en la EA (Taneo et al., 2015). Adicionalmente, los R-MCB de las cepas CRL 581 y CRL 2013 redujeron significativamente los niveles de expresión de IL-6 (Figura 15B). Aunque se cree que esta citoquina tiene un papel dual en las neuronas, es decir, puede aumentar la supervivencia neuronal o promover la degeneración neuronal, en la EA parece prevalecer este último efecto. No obstante, IL-6 podría favorecer la gliosis microglial, mejorando la fagocitosis de oA β y la eliminación de placas amiloides (Chakrabarty et al., 2010). Otro marcador importante es el TNF- α , que juega un papel central en la fisiopatología de la EA, siendo una de las primeras citoquinas que desencadena y mantiene el estadio inflamatorio (Zelová & Hošek, 2013). Notablemente, la expresión de TNF- α se redujo significativamente en las células BV2 tratadas con R-MCB de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 y *L. brevis* CRL 2013, destacando la efectividad de los postbióticos de ambas cepas (Figura 15C). Combinando estos hallazgos, podemos postular que los medios condicionados de las BL ensayadas pueden exhibir efectos duales: propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

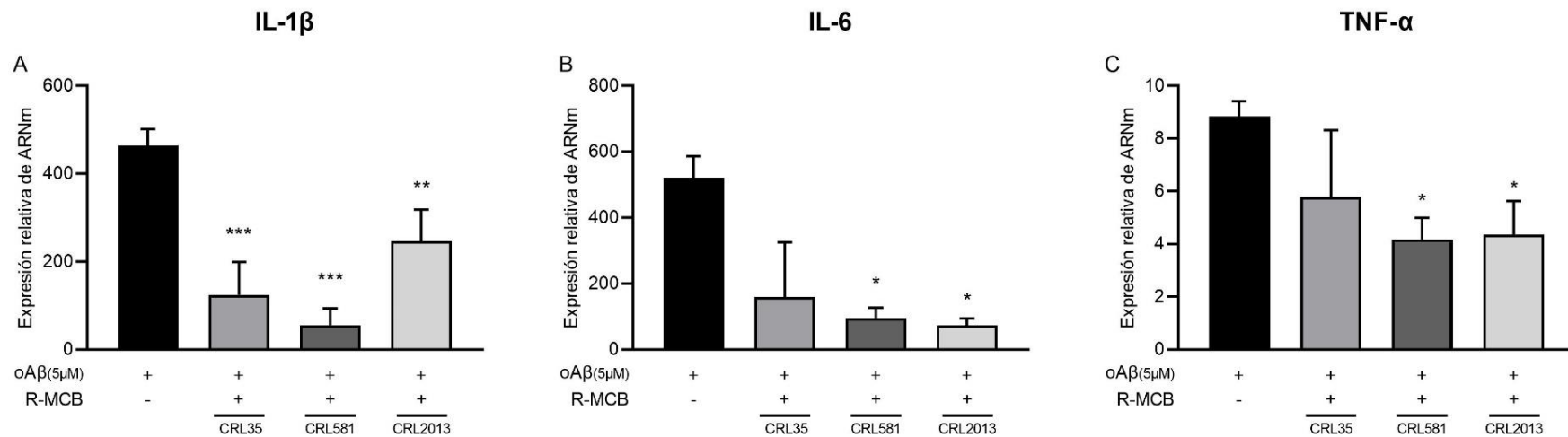


Figura 15. Efecto de los MCB sobre la expresión de genes marcadores de inflamación en células BV2 desafiadas con oAβ₁₋₄₂. Expresión relativa de IL-1β (A), IL-6 (B) y TNF-α (C). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el grupo tratado con oAβ₁₋₄₂ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$).

A menudo, la activación de la microglía en la enfermedad de Alzheimer (EA) produce cantidades excesivas de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que conduce a un aumento en la producción de óxido nítrico, estrés oxidativo y neuroinflamación (Andronie-Cioara et al., 2023). La superóxido dismutasa 1 y 2 (SOD-1 y SOD-2, respectivamente) son enzimas antioxidantes que desempeñan un papel vital en la protección de las células contra el estrés oxidativo. Comprender el efecto de los R-MCB en estos marcadores en el contexto de la EA es esencial para desarrollar terapias dirigidas para aliviar la progresión de la enfermedad y los síntomas asociados. Nuestros hallazgos revelaron que *E. mundtii* CRL 35 provocó un aumento significativo en la expresión de iNOS (Figura 16A), una enzima cuya sobreexpresión se ha relacionado con la generación de peroxinitrito, contribuyendo así a un ciclo progresivo de neuroinflamación. En contraste, ninguno de los R-MCB analizados mostró efectos sobre la expresión de SOD-1 y SOD-2 (Figura 16B y 16C). El efecto observado de la cepa CRL 35 sobre la expresión de iNOS subraya la

importancia de examinar cada postbiótico de manera individual, ya que pueden generar respuestas biológicas distintas en cada contexto, reforzando la necesidad de evaluar tanto probióticos como postbióticos en función de sus efectos específicos.

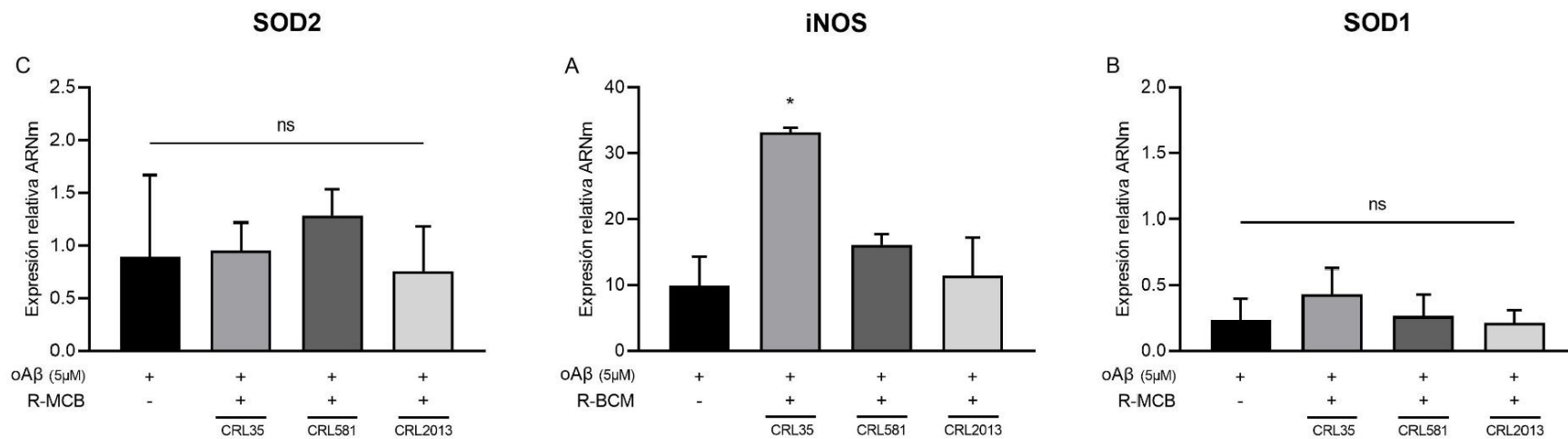


Figura 16. Efecto de los postbióticos sobre la expresión de iNOS (A), SOD-1 (B) y SOD-2 (C) en células BV-2 estimuladas por oAβ₁₋₄₂ 5 μM durante 8 h. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el grupo tratado con oAβ₁₋₄₂ (*p < 0,05, ns = no significativo)

Los resultados obtenidos en este capítulo destacan la capacidad de las BL seleccionadas para influir en el ambiente celular frente al desafío con oligómeros beta-amiloides (oAβ₁₋₄₂). A pesar de no haber observado un efecto sobre la viabilidad celular, los medios condicionados bacterianos (R-MCB) demostraron poseer actividades antioxidantes y antiinflamatorias significativas en las células de microglía BV2. Estos hallazgos sugieren que las BL ensayadas podrían ofrecer un enfoque terapéutico dual, combinando efectos antioxidantes y antiinflamatorios.

Conclusiones parciales

- En células BV2, los sobrenadantes obtenidos tras el tratamiento con los postbióticos de las tres cepas lácticas evaluadas lograron reducir los radicales ABTS•+, lo que evidencia la presencia de metabolitos con marcada actividad antioxidante. Este efecto fue confirmado mediante el ensayo CUPRAC, donde únicamente *E. mundtii* CRL 35 y *L. brevis* CRL 2013 mostraron una reducción eficiente de iones cúpricos. Estos resultados no solo validan la capacidad antioxidante de los metabolitos liberados, sino que revelan diferencias funcionales en los mecanismos antioxidantes entre las cepas, subrayando el valor de su caracterización específica para futuras aplicaciones terapéuticas.
- Todos los postbióticos evaluados redujeron significativamente la expresión de IL-1 β en células BV2 desafiadas con oA β_{1-42} , evidenciando un efecto antiinflamatorio común sobre este marcador temprano. Específicamente, los R-MCB de *L. delbrueckii subsp. lactis* CRL 581 y *L. brevis* CRL 2013 también disminuyeron IL-6 y TNF- α , reforzando su potencial terapéutico en neuroinflamación. En contraste, *E. mundtii* CRL 35 aumentó significativamente la expresión de iNOS, sugiriendo una mayor producción de óxido nítrico.
- Los MCB evaluados no mostraron efectos citotóxicos *per se* sobre las líneas celulares N2a ni BV2 bajo las condiciones experimentales, lo que confirma su seguridad basal en modelos neuronales y microgliales. Sin embargo, tras la estimulación aguda con oA β_{1-42} , ninguno de los MCB logró contrarrestar la pérdida de viabilidad celular, lo que indica que sus efectos beneficiosos no se traducen en una protección directa frente a la citotoxicidad inducida. Este resultado sugiere que la acción de estos postbióticos podría operar a través de mecanismos protectores indirectos.



CAPÍTULO 3

**Estudio *in vivo* del efecto de las BL
seleccionadas en un modelo murino**



Capítulo 3. Estudio *in vivo* del efecto de las BL seleccionadas en un modelo murino.

Introducción

Con la finalidad de evaluar el efecto *in vivo* de las cepas lácticas *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 y *L. brevis* CRL 2013 se decidió utilizar un modelo de deterioro cognitivo inducido por escopolamina. Los modelos animales tratados con escopolamina se utilizan ampliamente en estudios neurocognitivos ya que la administración de esta droga induce algunas características moleculares y conductuales similares a la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos (K. S. Tang, 2019).

La escopolamina es un antagonista de los receptores muscarínicos que bloquea la neurotransmisión colinérgica, provocando deterioro cognitivo en los roedores. Produce una disminución en la actividad de la enzima colinacetiltransferasa (ChAT) y un aumento de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), lo que lleva a una disminución en los niveles de acetilcolina (ACh). Por otro lado, esta droga genera un aumento en la acumulación de especies reactivas de oxígeno que inducen estrés oxidativo y esto conlleva a alteraciones en la cognición y en la memoria de los roedores (Figura 17) (Cheon et al., 2021; Rahimzadegan et al., 2018).

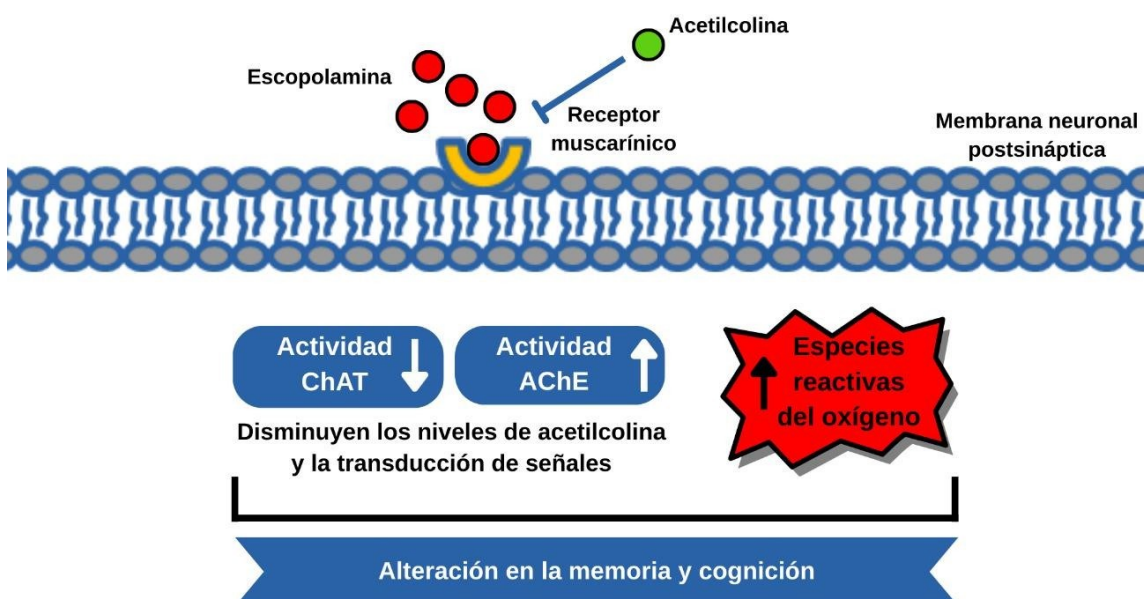


Figura 17. Modo de acción de la escopolamina. La escopolamina actúa como un antagonista de los receptores muscarínicos, bloqueando la neurotransmisión colinérgica. Esta inhibición se asocia con una

disminución en la actividad de la colina acetiltransferasa (ChAT) y un incremento en la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). Además, induce un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), desencadenando estrés oxidativo que contribuye a alteraciones cognitivas y déficits en la memoria.

En este modelo se evaluaron los cambios neurobioquímicos, proteómicos y conductuales del efecto de la administración de las BL seleccionadas sobre los cambios producidos por la escopolamina en un modelo de ratón. Para este estudio, se utilizó la bacteria completa en lugar de los medios condicionados (MCB) debido a que la interacción de la bacteria con las células del huésped es más compleja y podría activar mecanismos adicionales a través del contacto directo o la internalización. Este enfoque permite una evaluación más representativa de su impacto fisiológico, dado que, en un entorno natural, el huésped responde tanto a los metabolitos secretados como a la bacteria en sí, lo que podría generar efectos sinérgicos. Además, el uso de la bacteria completa evita la posible degradación o pérdida de actividad de ciertos metabolitos fuera del sistema bacteriano, lo que podría influir en los efectos observados con el MCB.

Materiales y métodos

1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos y hembras, de 6 semanas de edad pertenecientes a la colonia cerrada de CERELA. Los animales fueron alojados en jaulas de policarbonato con temperatura ambiente controlada (22 ± 2 ° C de temperatura, $55 \pm 2\%$ de humedad) y alimentados *ad libitum* con dieta balanceada convencional. El bienestar animal estuvo a cargo de investigadores y personal capacitado en cuidado y manejo de animales de CERELA, siguiendo estrictamente las recomendaciones de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). La salud y el comportamiento de los animales fueron monitoreados diariamente siguiendo el protocolo CRL-CICUAL-GN-2024/1A. Los ensayos para cada parámetro estudiado se realizaron en cinco ratones por grupo.

1.1 Protocolo de alimentación

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* CRL 581 y *Levilactobacillus brevis* CRL 2013, se administraron durante 28 días consecutivos a las dosis de 10^8 y 10^9 células/ratón/día, respectivamente, en el agua de bebida (LDR 1%, 4 mL por ratón por día) de acuerdo a modelos previamente puestos a punto en CERELA (Cataldo, Villena, et al., 2020; Elean et al., 2020).

2. Modelo de deterioro cognitivo agudo inducido por escopolamina

Se conformaron 5 grupos experimentales, tanto para machos como para hembras, que se dividieron de acuerdo al protocolo de alimentación y al tratamiento recibido. Estos grupos son:

- **Grupo 1: Control bioterio** (Alimentación: LDR 1 %; tratamiento vía intraperitoneal (IP): solución salina 0,9 %)
- **Grupo 2: Escopolamina** (Alimentación: LDR 1 %; tratamiento vía IP: escopolamina 1 mg/kg por 7 días consecutivos)
- **Grupo 3: Donepecilo** (Alimentación: LDR 1 %; tratamiento vía IP: escopolamina 1 mg/kg por 7 días consecutivos; tratamiento vía oral: donepecilo 2,5 mg/kg)

- **Grupo 4: CRL 2013** (Alimentación: LDR 1% + 10^9 UFC de CRL 2013; tratamiento vía IP: escopolamina 1 mg/kg por 7 días consecutivos)
- **Grupo 5: CRL 581** (Alimentación: LDR 1% + 10^8 UFC de CRL 581; tratamiento vía IP: escopolamina 1 mg/kg por 7 días consecutivos)

El día 21 de iniciada la administración de los probióticos, los ratones recibieron escopolamina (1 mg/kg) por vía intraperitoneal durante 7 días consecutivos. A su vez, los ratones del grupo 3, iniciaron el tratamiento con donepecilo, una droga comercial inhibidora de la acetilcolinesterasa, en dosis de 2,5 mg/kg por vía oral.

Un resumen del protocolo del modelo experimental se muestra en la Figura 18. En todos los grupos, se registró el peso corporal de los animales y la ingesta de alimento una vez por semana.

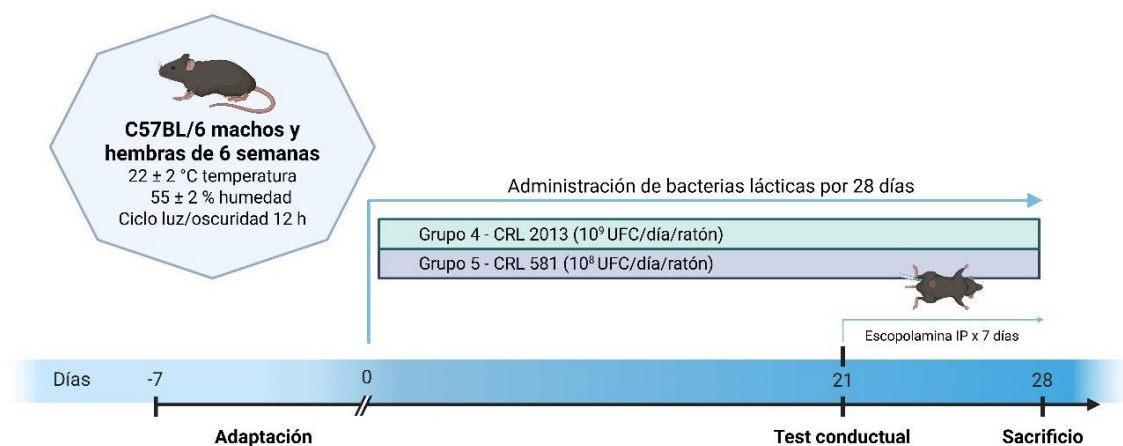


Figura 18. Representación esquemática del protocolo de trabajo en el modelo murino.

3. Ensayo conductual

3.1 Prueba de Reconocimiento de Objetos en Campo Abierto

El primer día de la inyección de escopolamina, se evaluaron los parámetros conductuales utilizando la Prueba de Reconocimiento de Objetos en Campo Abierto.

Esta prueba se realizó utilizando el método descrito por Ennaceur & Delacour, 1988. La misma se llevó a cabo en una caja cuadrada con dimensiones de 40 cm x 40 cm x 32 cm y constó de tres etapas.

1- **Fase de Habitación:** en una primera instancia, los ratones fueron colocados en el campo abierto vacío y se les permitió explorar el área durante 5 minutos para su habituación al espacio.

2- **Fase de Entrenamiento:** 24 horas después de la habituación, los ratones se colocaron en la caja con dos objetos idénticos (objeto familiar: O1) posicionados en dos esquinas adyacentes, a 10 cm de las paredes, y tuvieron libertad de explorar el campo y los objetos durante 5 minutos. Inmediatamente después de esta etapa, los animales recibieron la inyección IP según el grupo experimental al que pertenecían.

3- **Fase de Prueba:** esta última etapa se llevó a cabo 2 horas después de la fase de entrenamiento y uno de los objetos dentro del campo fue reemplazado por otro con una textura y tamaño similares, pero de diferente color y forma (objeto nuevo: O2).

Los objetos y la caja se limpiaron con una solución de etanol al 70% entre cada ratón para eliminar olores y residuos. Las exploraciones durante la sesión de entrenamiento y prueba fueron registradas en video utilizando una cámara Xiaomi Dual Pixel PDAF.

En la figura 19 se muestra una representación gráfica de las etapas del ensayo.

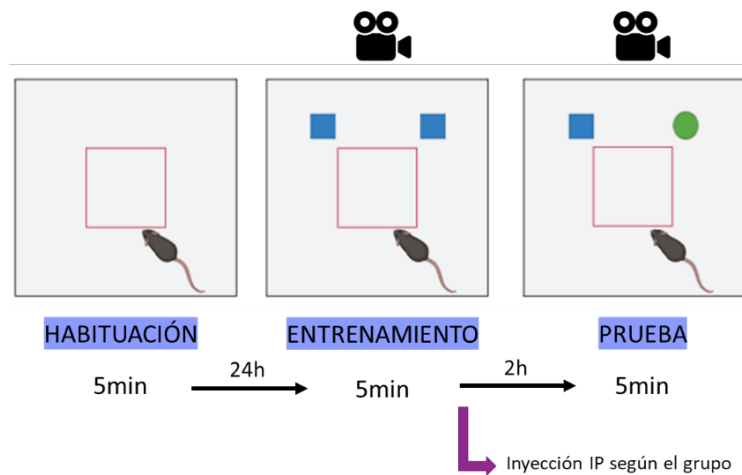


Figura 19. Representación esquemática de las distintas fases del test conductual.

3.2 Análisis de videos con el software STUART (Ing. en Sistemas – UTN)

Para evaluar el comportamiento de los animales en la Prueba de Reconocimiento de Objetos en Campo Abierto, se empleó STUART, un software desarrollado especialmente por estudiantes de Ingeniería en Sistemas de la Universidad Tecnológica Nacional de Tucumán. Este programa permitió un rastreo preciso de la nariz de los ratones, definida como el punto clave de interés para evaluar la exploración animal.

El sistema de procesamiento de videos STUART combina dos modelos de redes neuronales diseñados para tareas específicas y complementarias, permitiendo un análisis preciso del comportamiento animal. El modelo de redes neuronales fue entrenado utilizando un dataset de fotogramas extraídos de diferentes videos.

El primer modelo, se encarga de detectar los objetos de interés en la escena experimental y la base de la caja donde se desarrolla el movimiento del ratón y sus interacciones con los objetos. Una vez identificados los objetos, entra en acción el segundo modelo, que detecta puntos anatómicos claves en el cuerpo de los ratones. En este caso, teniendo conocimiento que los roedores exploran principalmente mediante el olfato, este modelo de seguimiento se basó en la detección del punto de la nariz de los animales. Una vez entrenado el modelo, STUART procesó cada video obtenido durante el ensayo conductual. El software permitió establecer un área de interés de 2 cm a la redonda de cada objeto para evaluar la exploración de los mismos y una zona central de 20 x 20 cm para evaluar el nivel de ansiedad de los animales (Figura 20).

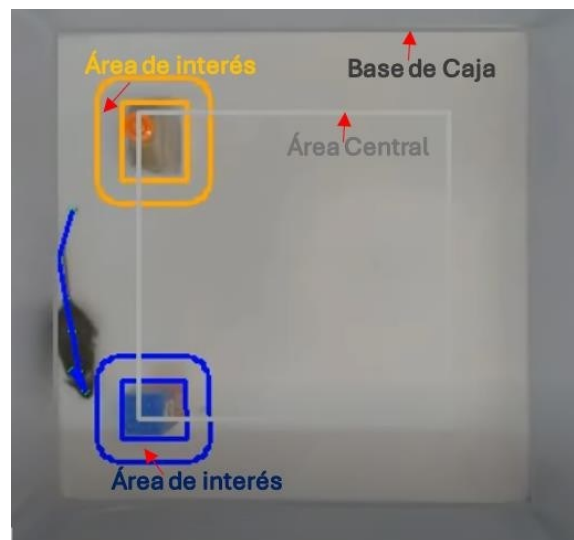


Figura 20. Fotografía del campo, el área central y las zonas de interés alrededor de los objetos.

Los parámetros analizados incluyeron la distancia total recorrida, el tiempo de permanencia en el cuadrante central, y el tiempo dedicado por cada animal a explorar ambos objetos. Además, el rastreo generó un mapa visual de las trayectorias recorridas por los animales dentro del campo, proporcionando un análisis cualitativo de su desplazamiento. El flujo de adquisición y procesamiento de datos mediante STUART se muestran en la Figura 21.

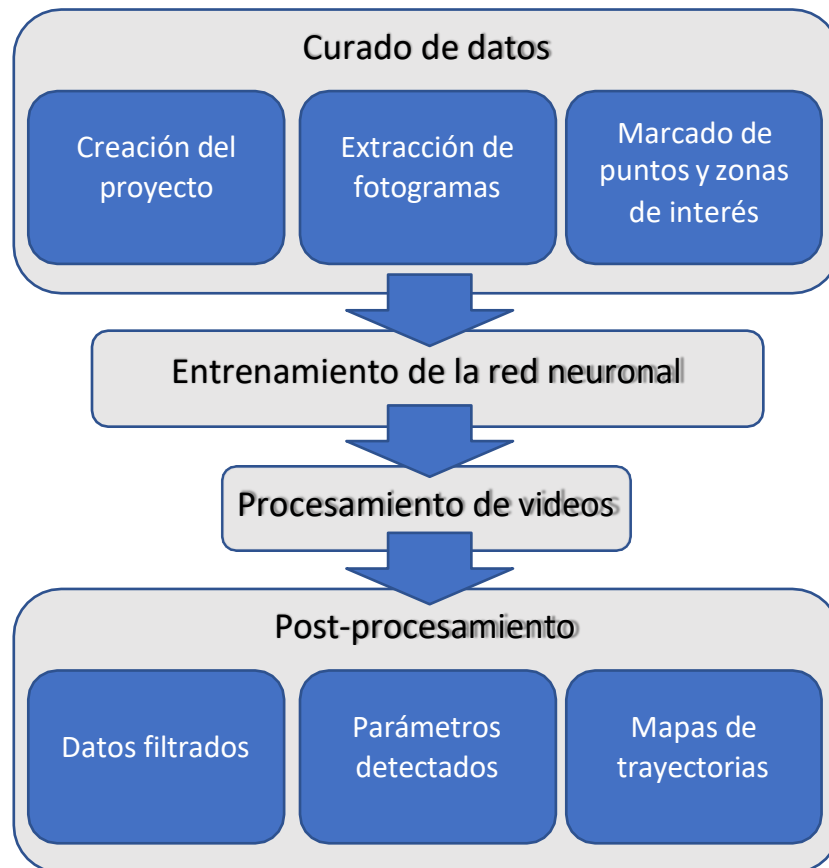


Figura 21. Flujo de adquisición y procesamiento de datos mediante el software STUART.

3.3 Exploración de objetos en campo abierto

El tiempo de exploración de los objetos se calculó analizando el tiempo que los ratones dedicaron a explorar cada objeto durante la fase de prueba del ensayo conductual. Se definió como exploración cuando el ratón se acercaba a menos de 2 cm del objeto y/o lo tocaba con la nariz.

El software STUART permitió delimitar una zona de interés de 2 cm alrededor de cada objeto y, mediante un vector, detectar el momento en que la nariz del animal apuntaba hacia el objeto. Así, el tiempo de exploración se registró únicamente cuando el animal se encontraba a menos de 2 cm del objeto y con la nariz dirigida hacia este (Figura 22).

Además, el software excluyó las situaciones en las que el ratón se posicionaba sobre el objeto, dado que esta acción no se considera exploración activa (Figura 23).

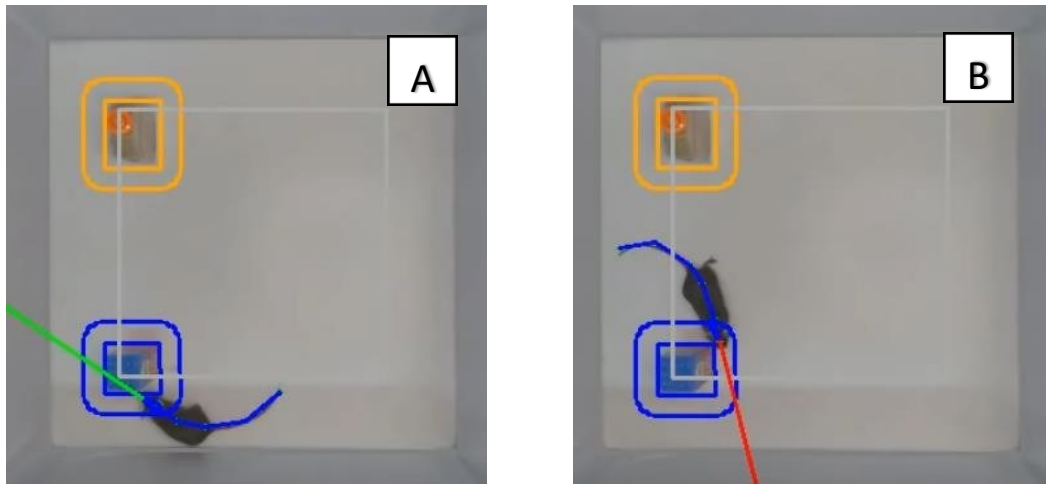


Figura 22. A) El ratón se encuentra a 2 cm del objeto de interés con su nariz apuntando hacia él. B) El ratón se encuentra dentro del área de interés de 2 cm, pero no se contabiliza el tiempo ya que su nariz no está en dirección al objeto.

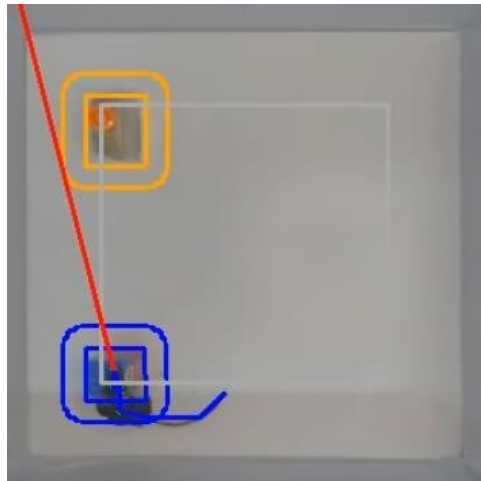


Figura 23. El ratón se encuentra posicionado sobre el objeto, por lo tanto, el software STUART no contabiliza el tiempo ya que no se considera un comportamiento exploratorio.

El índice de reconocimiento porcentual (IR %) se calculó dividiendo el tiempo que el animal explora el objeto nuevo (O2) sobre la sumatoria del tiempo de exploración de ambos objetos (O1 + O2). Finalmente se multiplicó por 100 para expresar el valor en porcentaje.

$$IR \% = \frac{T_{O2}}{T_{O1} + T_{O2}} \times 100$$

4. Parámetros bioquímicos en suero

24 horas después de la última inyección de escopolamina, se anestesió a los animales con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg). Se colectó sangre mediante punción cardiaca, la cual se centrifugó a 10.000 x *g* durante 5 min, y el suero se utilizó para determinar parámetros bioquímicos mediante el uso de kits comerciales específicos. Las determinaciones incluyeron la medición de glucosa, colesterol y triglicéridos, utilizando kits provistos por Wiener Lab. Estas evaluaciones se realizaron con el objetivo de obtener una comprensión integral del estado general de salud de los animales utilizados como sujetos de estudio.

5. Evaluación de translocación bacteriana

Se realizó la disección de hígado y bazo en condiciones de esterilidad y se los colocaron en tubos falcon con 5 mL de SF estéril 0,1% (p/v). El peso de los tejidos se calculó por diferencia de peso en los tubos previamente pesados y se disgregaron mediante un homogenizador. Se realizaron diluciones seriadas de los homogenatos y se sembraron 100 µL de cada dilución y del homogenato puro en medio MacConkey y MRS agar, para realizar el recuento de enterobacterias y lactobacilos respectivamente, luego de la incubación a 37°C (24-48 h).

6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, Inc., CA, EE. UU.). Se determinaron diferencias significativas mediante la aplicación de ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Tukey. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. A menos que se indique lo contrario, todos los valores fueron las medias de 5 ratones por grupo $\pm$ desviación estándar (DE).

7. Preparación y Análisis de homogenatos cerebrales

7.1 Disección de cerebro

El cerebro completo fue cuidadosamente extraído y colocado en una placa de Petri estéril que contenía PBS frío. Se diseccionó el cerebelo y se realizó un corte midsagital del cerebro. La mitad del cerebro se colocó en un tubo de 2 mL que contenía 3 grandes perlas de vidrio de 5 mm para obtener los homogenatos. La otra mitad del cerebro se

utilizó para realizar la disección y extracción de ARN total de hipocampo y córtex (3 ratones por grupo, ver sección 7.2 y 7.5 respectivamente).

7.2 Preparación de homogenatos de cerebro

Se añadió buffer de homogenización al 10 % (p/v) a los tubos que contenían los cerebros junto con las 3 perlas de vidrio y se realizaron 4 ciclos de vortex para disgregar el tejido. La mezcla se centrifugó a 10.000 x *g*, 10 min a 4°C y el sobrenadante se colocó en un nuevo tubo. Los homogenatos obtenidos se utilizaron para determinar diferentes parámetros neurobioquímicos (AChE, GSH, CAT y MDA) y para los análisis proteómicos, se separó una alícuota del homogenato cerebral (200 µL) y se añadió PMSF hasta una concentración final de 1 mM para minimizar la degradación por proteasas.

7.3 Determinación de concentración de proteínas

La concentración de proteínas totales de los homogenatos se determinó utilizando el reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad Laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando albúmina sérica bovina como estándar (0,05-0,50 mg/mL). Se agregó 10 µL de muestra a 200 µL de la solución de Bradford. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se determinó la concentración de proteínas espectrofotométricamente usando un lector de microplacas Infinite 200 PRO (Tecan Trading AG, Suiza) midiendo la absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresaron en mg/mL.

7.4 Ensayos neurobioquímicos

7.4.1 Actividad de enzima acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad de AChE se determinó mediante el método de Ellman descrito en el capítulo 1, donde el homogenato cerebral se incubó con DTNB en un tampón fosfato durante 10 minutos. Inmediatamente después de la adición del sustrato ATC a la mezcla, la absorbancia se leyó a 412 nm durante 5 minutos. La actividad de AChE se expresó en nmol/min/mg de proteína (actividad específica).

7.4.2 Actividad catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa (CAT) se determinó midiendo el peróxido de hidrógeno residual tras la incubación con muestras de homogenato de cerebro. Para ello, se preparó al momento de la determinación una solución de H₂O₂ 11,1 mM,

diluyendo la solución stock de peróxido de hidrógeno en buffer fosfato de sodio (NaPi) 50 mM, pH 7. Se sembraron 20 μ L de la muestra o de buffer NaPi (como blanco de reacción) en una microplaca UV. Se agregaron 180 μ L de la solución de H₂O₂ 11,1 mM para iniciar la reacción. Inmediatamente, la microplaca se colocó en el lector, registrando el cambio en la absorbancia a 240 nm durante 5 minutos. La actividad catalasa se expresó como la constante de velocidad (k) de una reacción de primer orden, ajustada en función de la cantidad de proteína presente (unidades enzimáticas/mg de proteína).

7.4.3 Determinación del contenido de peroxidación lipídica

El ensayo de peroxidación lipídica se llevó a cabo mediante la cuantificación del malondialdehído (MDA) en homogenatos cerebrales, utilizando la técnica de reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA).

Para el procedimiento, se añadieron 300 μ L de homogenato de cerebro 1X en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, al que se le agregaron 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % para precipitar las proteínas. Como control, se utilizó un blanco de reacción con 300 μ L de buffer de homogeneización en lugar del homogenato cerebral. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 30 minutos, seguidas de centrifugación a 10.000 x *g* durante 10 minutos a la misma temperatura. Se recuperaron los sobrenadantes y, en un nuevo tubo, se mezclaron 500 μ L del sobrenadante con 250 μ L de una solución acuosa de TBA al 0,367 % (preparada con calor). Las muestras se incubaron a 80 °C durante 40 minutos en un termobloque, se dejaron enfriar, y posteriormente se sembraron 200 μ L de las muestras y del blanco de reacción en una microplaca para su lectura a 530 nm.

Para el cálculo de la concentración de MDA, se aplicó la Ley de Lambert-Beer utilizando el coeficiente de absorptividad molar del MDA ($\epsilon = 1,56 \times 10^5$ M/cm), donde la absorbancia (Abs_{530nm}) es proporcional a la concentración (C) y a la longitud de la trayectoria óptica (l) de 0,5 cm. Los resultados obtenidos se transformaron en nanomoles de MDA, ajustando por el factor de dilución (1,49) correspondiente al agregado de TBA, y se normalizaron en función de la cantidad de proteínas totales, expresando los resultados en nmol de MDA por mg de proteína.

7.4.4 Estimación del contenido de glutatión reducido (GSH)

El contenido de glutatión reducido (GSH) en el cerebro se determinó mediante el método de Ellman, utilizando una curva estándar de GSH para calcular su concentración en el homogenato cerebral, expresado en mM/mg de proteína.

Se colocaron 300 μ L de homogenato de cerebro en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, al que se le añadieron 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % para precipitar las proteínas. Se incluyó un blanco de reacción con 300 μ L de buffer de homogeneización en lugar de homogenato. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 30 minutos, seguidas de centrifugación a 10.000 x *g* durante 10 minutos a la misma temperatura. Se recuperaron los sobrenadantes para el análisis.

Paralelamente, se prepararon soluciones estándar de GSH (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 y 1 mM) para construir una curva de calibración. La mezcla de reacción, preparada al resguardo de la luz, contenía 125 μ L de buffer NaPi 0,1 M (pH 8,4), 17 μ L de DTNB 3 mM y 38 μ L de agua ultrapura. A continuación, se sembraron 180 μ L de esta mezcla de reacción en una microplaca, junto con 20 μ L de cada muestra o estándar de GSH por duplicado o triplicado. Tras incubar la microplaca a temperatura ambiente durante 10 minutos, se midió la absorbancia a 412 nm. Finalmente, la concentración de GSH se calculó a partir de la recta de calibración, expresando los resultados en mM de GSH por mg de proteína.

7.5 Análisis de expresión de citoquinas en córtex e hipocampo por RT-qPCR

La expresión de citoquinas en tejidos de córtex e hipocampo se evaluó como se describió anteriormente con algunas modificaciones. Los tejidos se mezclaron con perlas de vidrio de 1 mm (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO, Estados Unidos) en RNazol RT (RN190) en una proporción 1 mL de solución cada 100 mg de tejido. Luego, los tejidos fueron fragmentados mediante un disruptor celular Mini-BeadBeater-8 (Biospec Products Inc.; Bartlesville, OK, Estados Unidos), a máxima velocidad durante 2 ciclos de 30 segundos cada uno, intercalando intervalos de enfriamiento en hielo de 1 minuto entre cada ciclo. Luego se agregaron 400 μ L de agua libre de ARNasa por cada 1 mL de RNazol a cada tubo y se centrifugó durante 15 min a 12.000 x *g* para eliminar los restos celulares y las perlas de vidrio. Los sobrenadantes conteniendo el ARN se transfirieron a nuevos tubos y el proceso de aislamiento siguió como se detalló anteriormente. La pureza y cantidad total de ARN se analizaron mediante un espectrofotómetro Nabi UV/vis Nano

(MicroDigital Co., Ltd., Corea). El ADNc se sintetizó a partir del ARN total utilizando el kit qScript cDNA SuperMix (Quanta Bio, Genbiotech, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar la PCR cuantitativa en tiempo real se utilizó Supermix SYBR Green iQ5 (Bio-Rad) y el sistema iQ5 (Bio-Rad). Los oligonucleótidos utilizados se enumeran en la Tabla 4. Se calcularon los cambios relativos luego de la normalización con β -actina y la expresión se obtuvo respecto a los animales control sin tratar establecidos en 1.

Tabla 4. Cebadores empleados para RT-qPCR en córtex e hipocampo de ratones C57BL/6.

Nombre	Secuencia de cebadores		Referencias
	Cebador sentido (5'→3')	Cebador anti-sentido (3'→5')	
β-actina	5'-CGTGAAAAGATGACCCAGATCA-3'	5'-ACAGCCTGGATGGCTACGTA-3'	(Cataldo, Villena, et al., 2020)
TNF-α	5'-GTGGTCAGGTTGCCTCTGTCTC-3'	5'-TGGCTCTGTGAGGAAGGCTGTG-3'	(H. Zhang et al., 2020)
IL-1β	5'-TTTCCTCCTTGCCTCTGATGGG-3'	5'-CCACACGTTGACAGCTAGGTTC-3'	(H. Zhang et al., 2020)
IL-6	5'-CTTGGGACTGATGCTGGTGACA-3'	5'-GCCTCCGACTTGTGAAGTGGA-3'	(H. Zhang et al., 2020)
SOD-1	5'-TGCGTGCTGAAGGGCGAC-3'	5'-GTCCTGACAACAACCTGGTTC-3'	(Cui et al., 2019)
SOD-2	5'-GGAGCAAGGTCGCTTACAGA-3'	5'-GTGCTCCACACGTCATC-3'	(Cui et al., 2019)
iNOS	5'-GGACGAGACGGATAGGCAGAGA-3'	5'-TCTTCAAGCACCTCCAGGAACG-3'	(H. Zhang et al., 2020)

7.6 Análisis proteómico del homogenato de cerebro

7.6.1 Preparación, separación y espectrometría de masa de los péptidos

Después de concentrar las muestras de proteínas mediante SDS-PAGE, las mismas fueron reducidas con 20 mM de ditioneol (DTT) durante 45 minutos a 56 °C y alquiladas con 50 mM de iodoacetamida durante 45 minutos en la oscuridad. Se utilizó tripsina para la digestión durante toda la noche y los péptidos fueron extraídos con acetonitrilo. Las muestras se liofilizaron mediante Speed Vac y se resuspendieron con 30 μ L de ácido trifluoroacético al 0,1%. La desalación se realizó usando columnas zip Tip C18 (Merck). Posteriormente, se analizó mediante nanoHPLC acoplada a un espectrómetro de masas con tecnología Orbitrap, que permite separar los péptidos obtenidos por la digestión con tripsina de la muestra y su identificación posterior. La ionización de las muestras se lleva a cabo mediante electrospray. Se utilizó un cromatógrafo de la marca ThermoScientific, modelo EASY-nLC 1000, adecuado para separar complejos proteicos

con un alto grado de resolución utilizando una columna de fase reversa. La columna utilizada fue una EASY-Spray Accucore (P/N ES902) (ver figura 22).

7.6.2 Identificación y cuantificación de proteínas

Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa *Proteome Discoverer*, utilizando la base de datos correspondiente al proteoma de *Mus musculus* (Mouse) UP000000589. *Proteome Discoverer* versión 2.2 (Thermo Scientific), es un motor de búsqueda en el cual el usuario debe seleccionar la base de datos y ciertas características que se vinculan con la forma en que fue tratada la muestra. En base a esta información y a los datos crudos obtenidos del espectrómetro de masa, el programa desarrolla un informe donde indica que proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación. El programa asigna un nivel de confianza a estos péptidos (*High/Medium/Low*) y el usuario decide con cuál nivel de confianza trabajar, siendo siempre preferible utilizar solo los péptidos de nivel *High*.

Criterios de búsqueda

Base de datos: *Mus musculus* (Mouse) UP000000589

Enzima: tripsina

Miscleavage: 2

Tolerancia de masa para precursor: 10 ppm

Tolerancia de masa para fragmento: 0,05 Da

Modificaciones Dinámicas: Oxidación (M)

Modificaciones estáticas: Carbamidometilación (C)

Nivel de confianza de los péptidos: *High*

Mínima cantidad de péptidos diferentes identificado por proteína: 2

Los resultados se obtienen en dos etapas. En la primera etapa se realiza la búsqueda individual de cada muestra y, en la segunda etapa, se realiza un *Multiconsensus* en el cual se agrupan todas las búsquedas para generar la planilla MC/LFQ donde quedan consolidados los datos en una única tabla. En la segunda etapa la cantidad de proteínas aumenta debido a la utilización de la función *Feature Mapper*. Esta función compara los espectros obtenidos en todas las corridas y esto genera cambios en las proteínas que se muestran en la tabla MC/LFQ con respecto a lo que había en las individuales, resultando

en un aumento en la cantidad de proteínas identificadas. Esto se debe a diversas acciones que realiza el software:

- Si en la búsqueda individual se detecta 1 sólo péptido de alta confianza de una proteína, esta no aparece como hit en la lista porque no cumple con el criterio impuesto de dos péptidos por proteína. Sin embargo, si en al menos otra muestra, esa proteína cumple con los criterios de búsqueda, al realizar el *Multiconsensus* esa proteína también aparecerá como hit en la muestra donde antes no lo estaba y tendrá el valor correspondiente a la muestra individual en la columna PSMs.
- Si en una muestra un pico parental de un posible péptido no es identificado porque la evidencia MS/MS no es suficiente para que tenga alta confianza, pero en otra muestra ese péptido sí es identificado con alta confianza y asignado a su proteína, entonces el programa asume que ese parental sin identidad corresponde al péptido identificado en otra muestra y le asigna una abundancia, en base al área de ese parental. La abundancia de este péptido luego es asignada a la proteína correspondiente, por lo tanto, si esta proteína antes no estaba identificada en esas muestras de forma individual, en el *Multiconsensus* si lo estará. La diferencia con el punto anterior es que en este caso la columna PSMs no tendrá valores ya que el péptido en esa muestra no está identificado con alta confianza. El *Feature Mapper*, además de basarse en los m/z, también realiza un alineamiento según los tiempos de retención utilizando una ventana de 10 min.

7.6.3 Procesamiento de datos y análisis estadístico

El software *Perseus* (Tyanova & Cox, 2018) se utilizó para el análisis bioinformático. Dado que cada tratamiento se realizó por triplicado, las proteínas identificadas en al menos dos de las tres repeticiones y con al menos 2 recuentos de MS/MS se incluyeron para análisis posteriores. El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando intensidades LFQ (*Label-free quantitation*). Después de la transformación Log2 de las intensidades y el filtrado de los datos, se usó una prueba t de *Student* de dos muestras para determinar proteínas diferencialmente abundantes usando un filtro FDR (*false discovery rate*) basado en permutación al 5%. Se utilizaron gráficos de dispersión para determinar la correlación entre las réplicas. Los valores de Log2FC (diferencia de la prueba t de *Student* entre las intensidades de Log2 de las muestras) y los valores de -Log p se usaron para generar gráficas de volcanes. El flujo de trabajo experimental se muestra en la Figura 24.

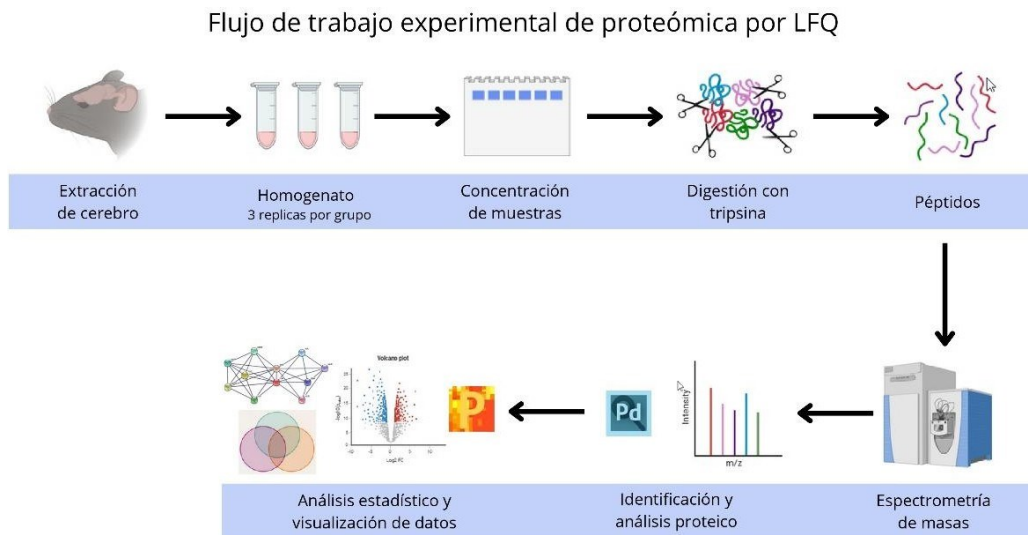


Figura 24. Flujo de trabajo experimental de espectrometría de masas de cuantificación libre de etiquetados (LFQ-MS) utilizado para muestras de homogenato de cerebro de ratones C57BL/6.

Resultados y discusión

Efecto de los probióticos y la escopolamina sobre los procesos de memoria en la prueba de reconocimiento de objetos en campo abierto

La Prueba de Reconocimiento en Campo Abierto es un método empleado para evaluar la memoria y el comportamiento exploratorio en roedores (Carter & Shieh, 2015). Este ensayo se fundamenta en tres aspectos claves:

1. **Actividad general:** los ratones tienen una tendencia natural a explorar su entorno. Durante la prueba, se mide la actividad locomotora y el desplazamiento de los animales dentro del campo.
2. **Ansiedad:** se valora a través del tiempo que los animales permanecen en el área central del campo (zona abierta) en comparación con las áreas periféricas (zona considerada más segura). Los animales con niveles más bajos de ansiedad tienden a explorar el centro, mientras que aquellos con mayor ansiedad se mantienen en los bordes, donde perciben mayor protección.
3. **Memoria de reconocimiento:** se basa en la tendencia natural de los roedores a explorar elementos novedosos, lo que permite inferir la retención de información sobre experiencias previas. Este punto se mide al introducir un nuevo objeto en el campo y los ratones que recuerden al objeto original mostrarán mayor interés en el nuevo, dedicando más tiempo a su exploración.

Para este ensayo los animales se colocaron, de forma individual, en el campo y se les permitió explorar durante 5 minutos para familiarizarse con el entorno (Fase de Habitación). Al día siguiente, se inició el ensayo en sí mismo el cual consta de dos etapas. La primera es la Fase de Entrenamiento, donde los animales permanecieron en la caja, junto con dos objetos (objeto familiar: O1) exactamente idénticos, durante 5 minutos y se registró su actividad exploratoria mediante filmación. Inmediatamente después de la Fase de Entrenamiento, los animales recibieron una inyección de escopolamina o solución salina según el grupo experimental. Luego de 2 h, se realizó la Fase de Prueba, colocando a los animales en la misma caja, pero en esta instancia se reemplazó uno de los objetos por otro del mismo material, pero de diferente forma y color (objeto nuevo: O2).

Para el seguimiento de los animales, se empleó el software STUART desarrollado específicamente para el análisis, el cual permitió entrenar una red neuronal diseñada para rastrear la posición y el desplazamiento de los roedores de manera precisa. En una primera instancia, se cargaron los videos en el programa y se extrajeron distintos fotogramas. Posteriormente, teniendo en cuenta que los roedores exploran principalmente mediante el olfato, se etiquetó la nariz de los ratones como zona de interés ya que es fundamental para evaluar los patrones de exploración y desplazamiento (Antunes & Biala, 2012). De esta forma, luego de entrenar la red, el software detectó y siguió automáticamente este punto de interés a lo largo de cada uno de los videos, brindando datos precisos sobre la posición y el movimiento de los animales a través del campo.

En la Figura 25 se muestra la trayectoria detectada por STUART de un animal representativo de cada grupo experimental. Durante la Fase de Entrenamiento, el patrón de desplazamiento de los animales para cada grupo fue similar. En cambio, en la Fase de Prueba, se observa que la trayectoria de los animales del grupo escopolamina tuvieron un desplazamiento casi exclusivo en la zona de la periferia junto a los bordes del campo (zona segura). En este análisis cualitativo, el patrón de desplazamiento es diferente en los grupos tratados con donepecilo y ambas cepas probióticas donde se puede observar mayor desplazamiento a través de todo el campo en comparación con el grupo que sólo recibe escopolamina.

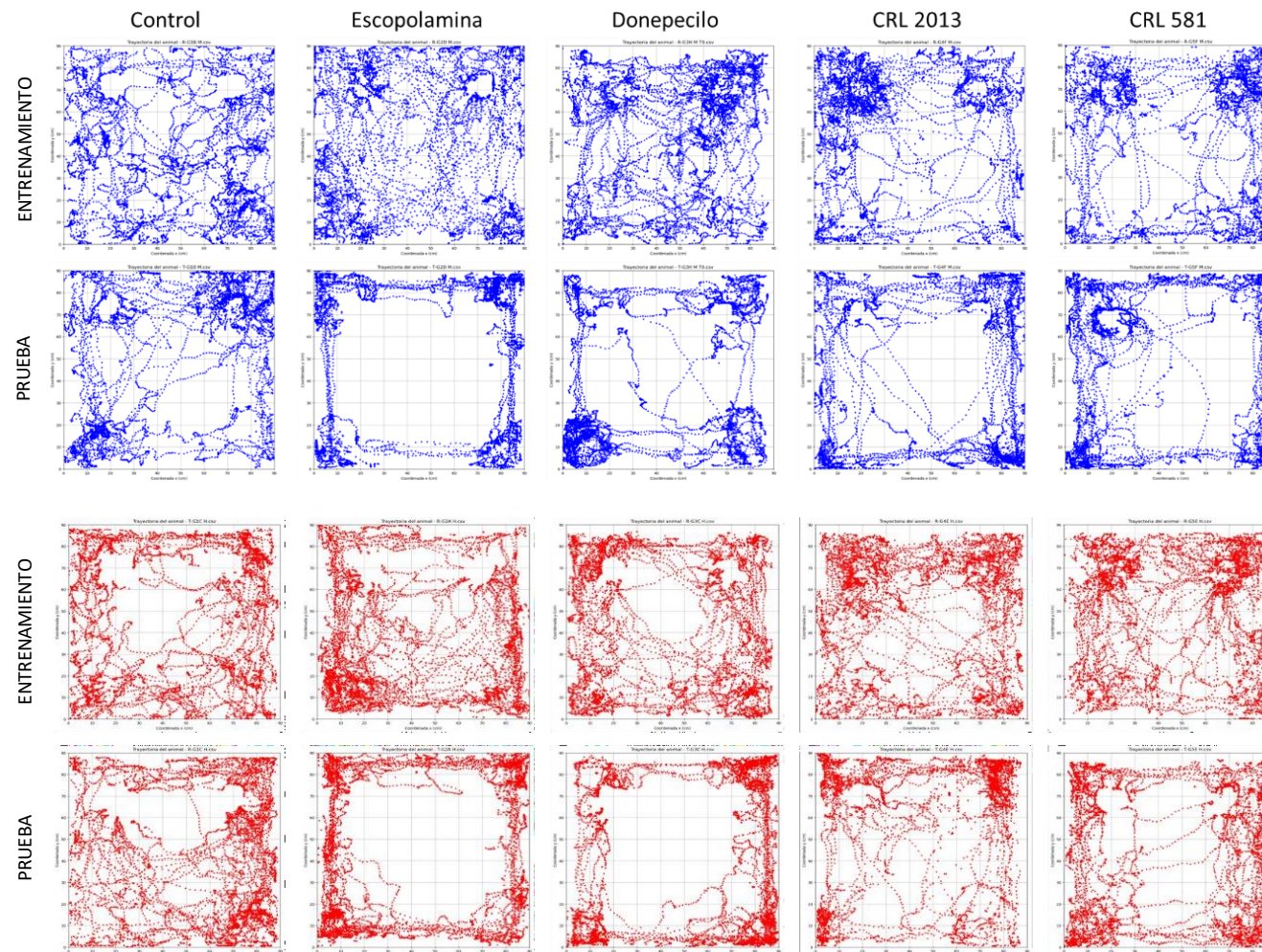


Figura 25. Esquema de las trayectorias registradas durante la Fase de Entrenamiento y de Prueba para todos los grupos. Las imágenes corresponden a un ratón representativo para cada grupo experimental, en azul ratones machos y en rojo hembras.

Para el análisis cuantitativo, los datos obtenidos mediante el software STUART permitieron determinar que no hay diferencias significativas en la distancia total recorrida por los animales en ninguno de los grupos, tanto en la Fase de Entrenamiento como en la Fase de Prueba (Figura 26).

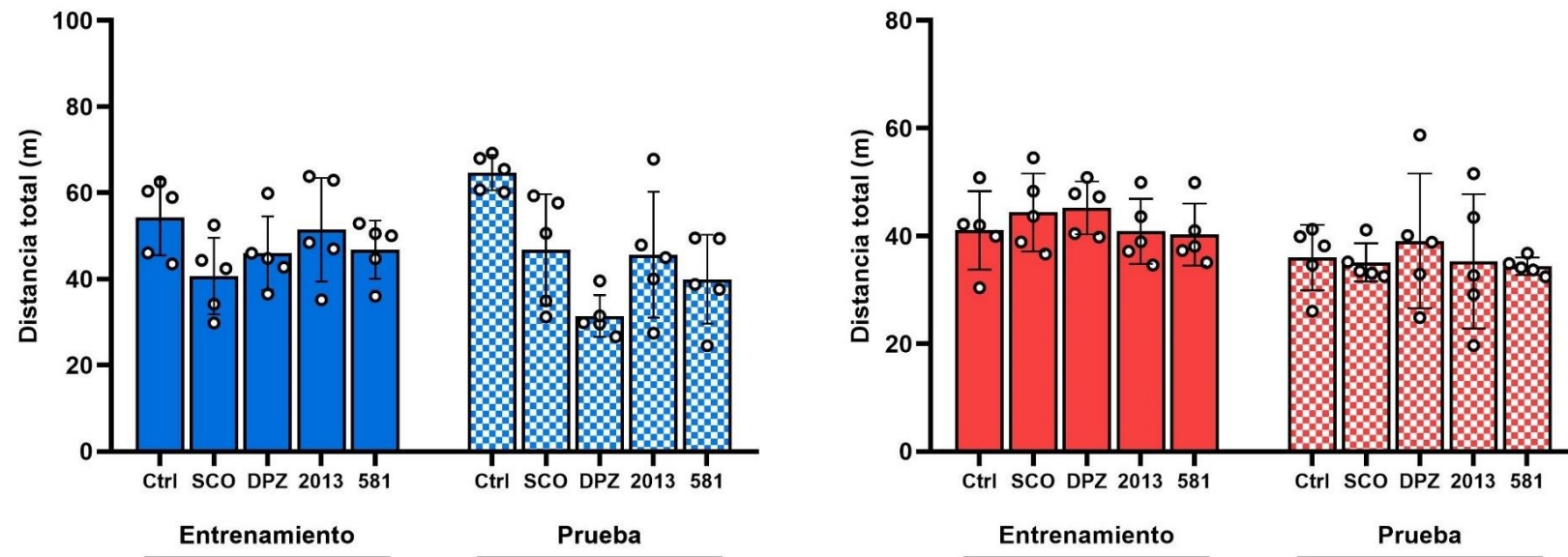


Figura 26. Distancia total recorrida en las fases de entrenamiento y prueba por ratones machos (azul) y hembras (rojo) en todo el campo. Cada grupo de datos ($n = 5$) representa la media $\pm$ DE. **Ctrl**, control; **SCO**, escopolamina; **DPZ**, donepecilo; **2013**, *Lv. brevis* CRL 2013; **581**, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581.

Para evaluar el comportamiento de los animales en este modelo, se delimitó una zona de 20 x 20 cm y se midió el tiempo de permanencia de los ratones en el área central. En la Figura 27, se puede observar que no hay diferencias significativas en el tiempo de permanencia de los ratones del grupo control en el área central entre ambas fases del ensayo. En cambio, el tratamiento con escopolamina produjo una disminución

significativa en el tiempo de permanencia de los animales en el centro del campo. Dicho comportamiento no fue afectado de manera significativa por el tratamiento con donepecilo ni con ambas cepas de BL.

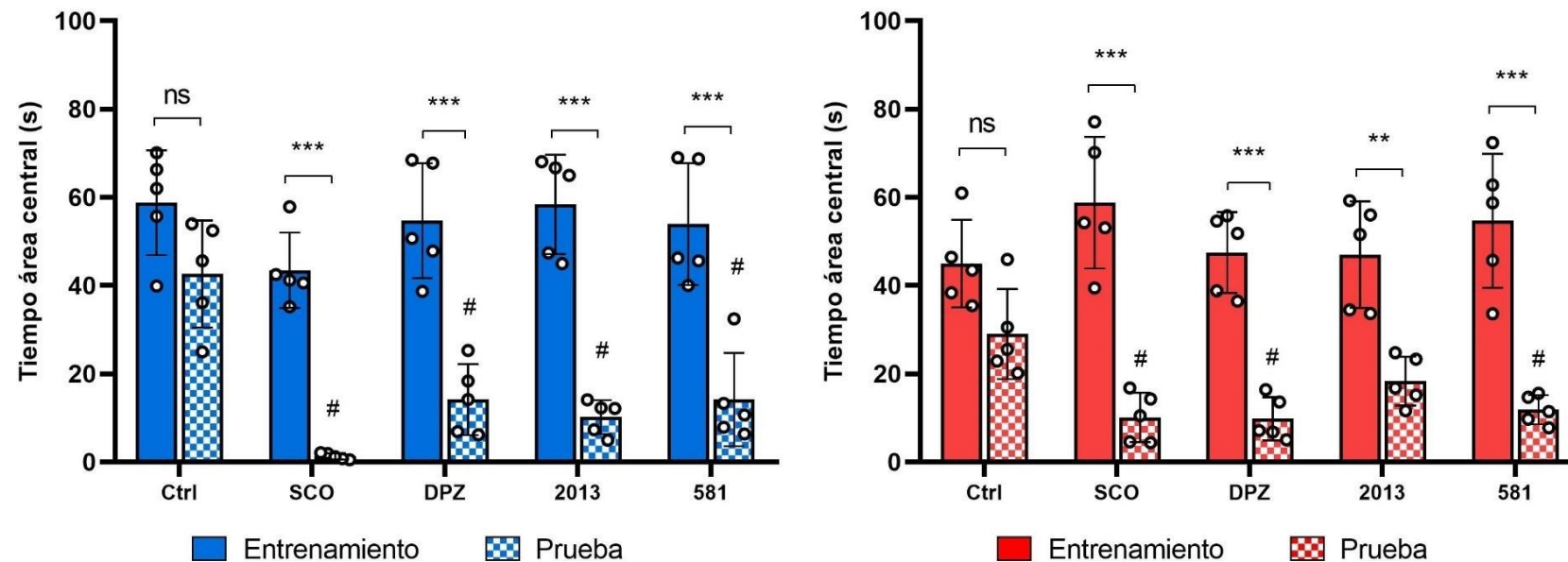


Figura 27. Tiempo en el área central del campo en las fases de entrenamiento y prueba por ratones machos (azul) y hembras (rojo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre la Fase de Entrenamiento y Fase de Prueba (** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$); los símbolos numeral indican diferencias significativas de cada grupo respecto al control bioterio (# $p < 0,01$). **Ctrl**, control; **SCO**, escopolamina; **DPZ**, donepecilo; **2013**, *Lv. brevis* CRL 2013; **581**, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. (n = 5)

Por otro lado, la Figura 28 muestra los resultados obtenidos al evaluar el tiempo de permanencia en el área central exclusivamente en la Fase de Prueba de todos los grupos experimentales. Si bien el tratamiento con donepecilo y con las BL no aumentaron significativamente el tiempo de permanencia en el centro del campo, si se observa una tendencia general a permanecer más tiempo en la zona central en comparación con los

animales que solo recibieron escopolamina. Notablemente, esta diferencia se vuelve significativa en el grupo de las hembras tratadas con la cepa CRL 2013, las cuales mostraron un tiempo de permanencia en el área central comparable al grupo control durante la Fase de Prueba. Este hallazgo sugiere un efecto diferencial y potencialmente protector de dicha cepa en hembras, lo que podría estar vinculado a mecanismos neurobiológicos modulados por el sexo.

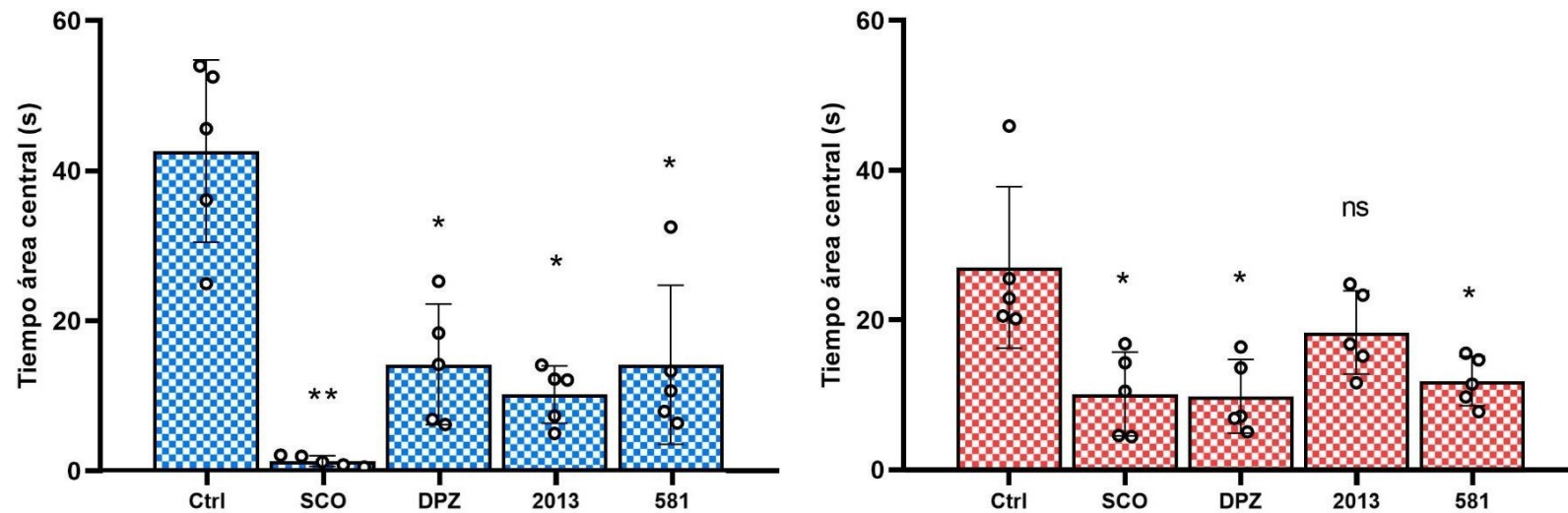


Figura 28. Tiempo en el área central del campo durante la fase de prueba por ratones machos (azul) y hembras (rojo). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). **Ctrl**, control; **SCO**, escopolamina; **DPZ**, donepecilo; **2013**, *Lv. brevis* CRL 2013; **581**, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. (n = 5)

Finalmente, se evaluó la memoria de reconocimiento durante la Fase de Prueba considerando que los ratones tienen tendencia a explorar más tiempo un objeto nuevo (O2) que uno familiar (O1). La exploración del objeto nuevo refleja el nivel de aprendizaje y memoria de reconocimiento de los animales experimentales. En base al tiempo de exploración de cada objeto obtenido durante la Fase de Prueba, se calculó el índice de

reconocimiento porcentual utilizando la fórmula descrita en materiales y métodos. Un índice de reconocimiento mayor al 50% indica una preferencia por explorar el objeto nuevo en lugar del familiar, lo que se utiliza como un indicador de la memoria de los ratones. El índice de reconocimiento mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales. La Figura 29 muestra como la administración de escopolamina redujo notablemente la capacidad de reconocimiento de objetos en comparación con el grupo control, tanto en machos como en hembras. Por otro lado, el tratamiento con ambos probióticos y el donepecilo mejoró significativamente la memoria de reconocimiento respecto al grupo tratado con escopolamina, obteniéndose resultados comparables a los del grupo control.

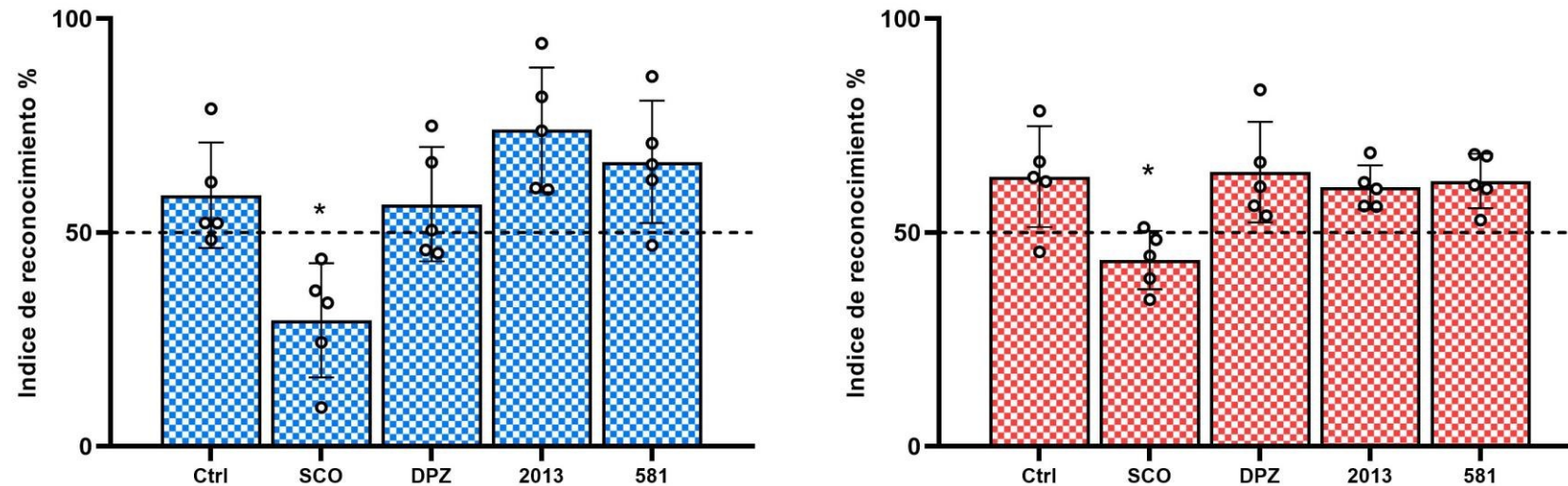


Figura 29. Índice de reconocimiento porcentual durante la fase de prueba como medida de la memoria de reconocimiento de ratones machos (azul) y hembras (rojo). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($*p < 0,05$). **Ctrl**, control; **SCO**, escopolamina; **DPZ**, donepecilo; **2013**, *Lv. brevis* CRL 2013; **581**, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. (n = 5)

Efecto de la administración de las BL y el tratamiento con escopolamina sobre el peso corporal e ingesta alimentaria de los ratones

Durante toda la experimentación, con el objetivo de evaluar el estado general de salud de los animales, se registraron el peso corporal y el consumo de alimento. Los resultados indicaron que no se observaron diferencias significativas en el peso corporal entre los distintos grupos, y el aumento gradual registrado coincide con lo esperado para ratones de esta especie (Figura 30A). De manera similar, el consumo de alimento no presentó variaciones significativas entre los grupos experimentales (Figura 30B).

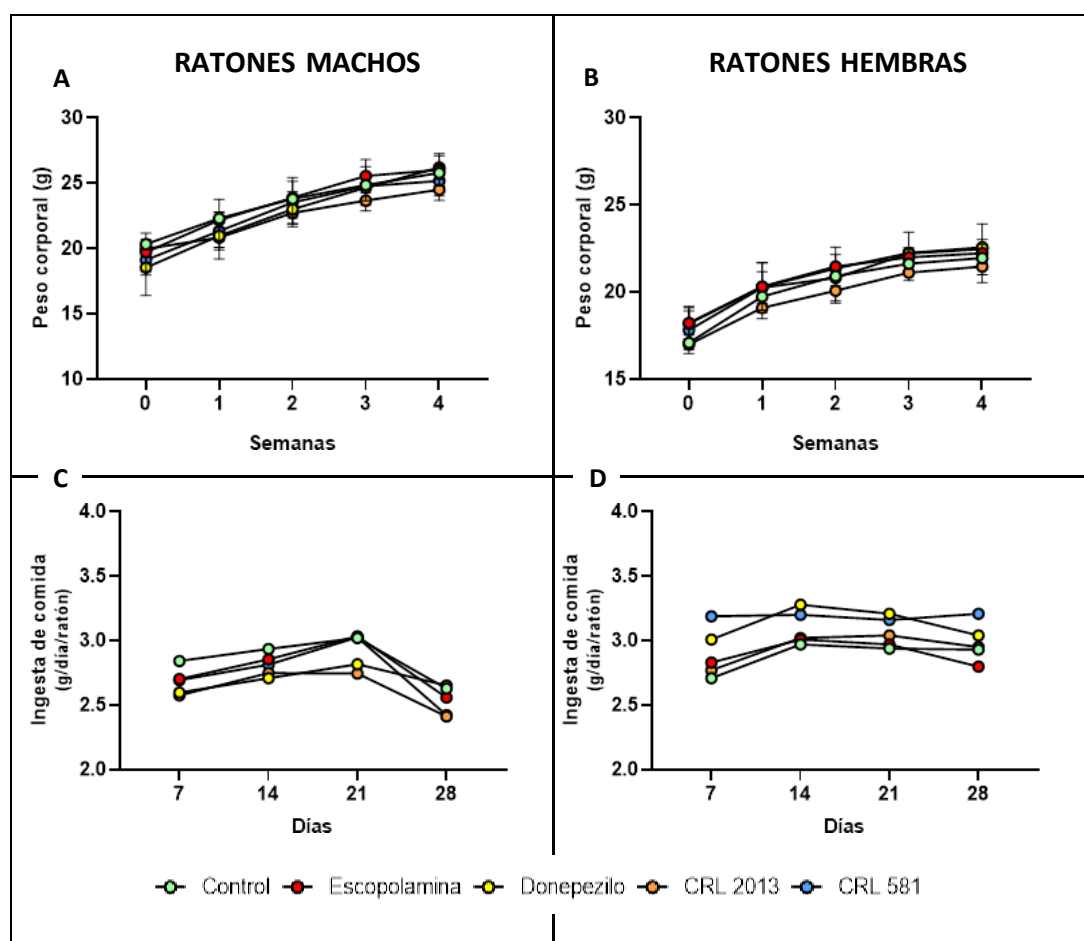


Figura 30. Peso corporal (AyB) e ingesta de comida (CyD) de ratones machos y hembras. Los valores de peso corporal de cada grupo (n = 5) están representados por la media $\pm$ DE.

Parámetros bioquímicos en suero y translocación bacteriana

Con el objetivo de obtener una comprensión detallada e integral del estado general de salud de los animales se analizaron los parámetros bioquímicos en suero. Los resultados

muestran que no hubo diferencias significativas en todos los grupos experimentales evaluados, tanto para ratones machos como hembras (Figura 31).

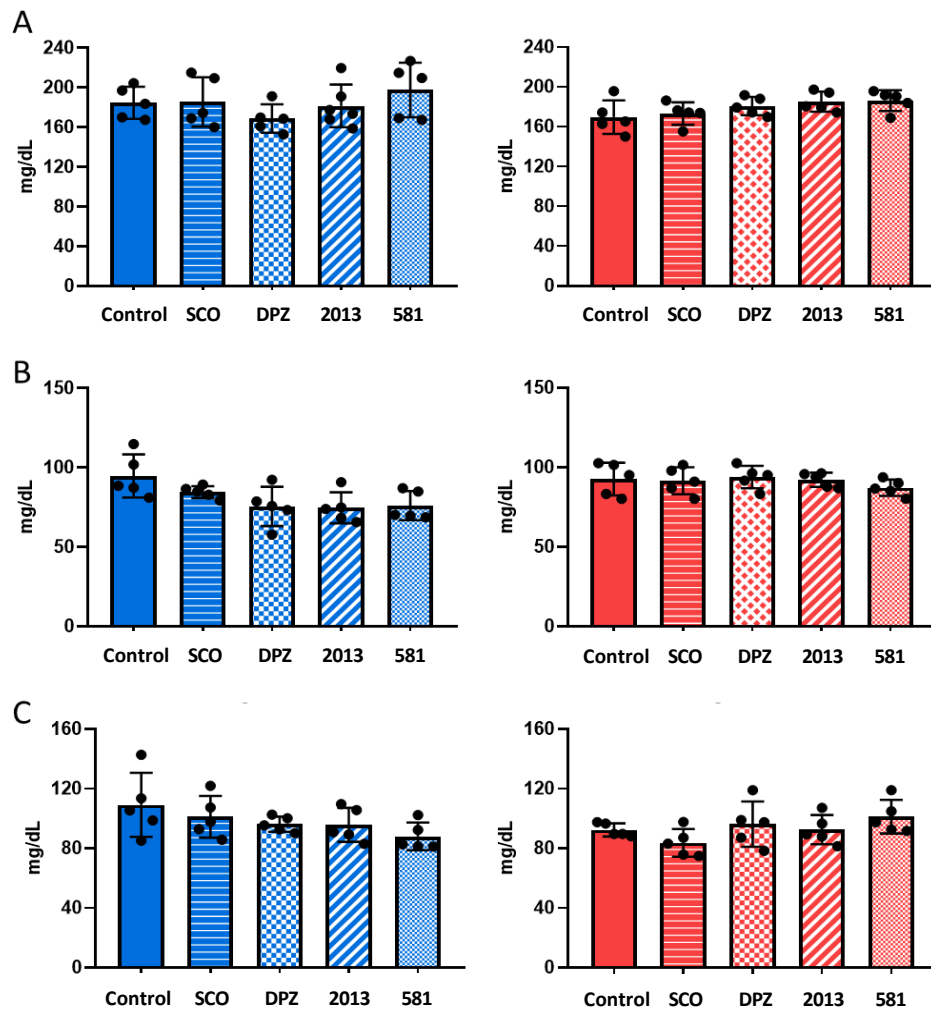


Figura 31. Niveles en suero de glucosa (A), colesterol (B) y triglicéridos (C) en ratones machos (azul) y hembras (rojo) para todos los grupos experimentales. (**Control**: control bioterio; **SCO**: escopolamina; **DPZ**: escopolamina + tratamiento con donepecilo; **2013**: escopolamina + CRL 2013; **581**: escopolamina + CRL 581). Cada grupo de datos (n = 5) representa la media $\pm$ DE.

Por otro lado, se realizó la prueba translocación bacteriana para determinar la seguridad de las cepas probióticas evaluadas. Para ello, se sembraron diluciones seriadas de homogenatos de hígado y bazo en MRS y MacConkey para evaluar la inocuidad del suministro diario de las cepas. Tras 48 h de incubación a 37 °C, no se observó crecimiento en ninguno de los medios, lo que indica que la administración de CRL 2013 y CRL 581, en las dosis y tiempos evaluados, no altera la permeabilidad intestinal ni representa riesgo de translocación bacteriana.

Efecto de las cepas lácticas seleccionadas sobre la actividad acetilcolinesterasa y el estrés oxidativo inducido por escopolamina

Uno de los principales tratamientos que reciben los pacientes con EA son los inhibidores de AChE con la finalidad de evitar la degradación de acetilcolina y mantener niveles adecuados de la misma para la sinapsis colinérgica. En la actualidad, existen diversas investigaciones enfocadas en encontrar terapias más naturales que puedan inhibir a la AChE y disminuir el daño oxidativo.

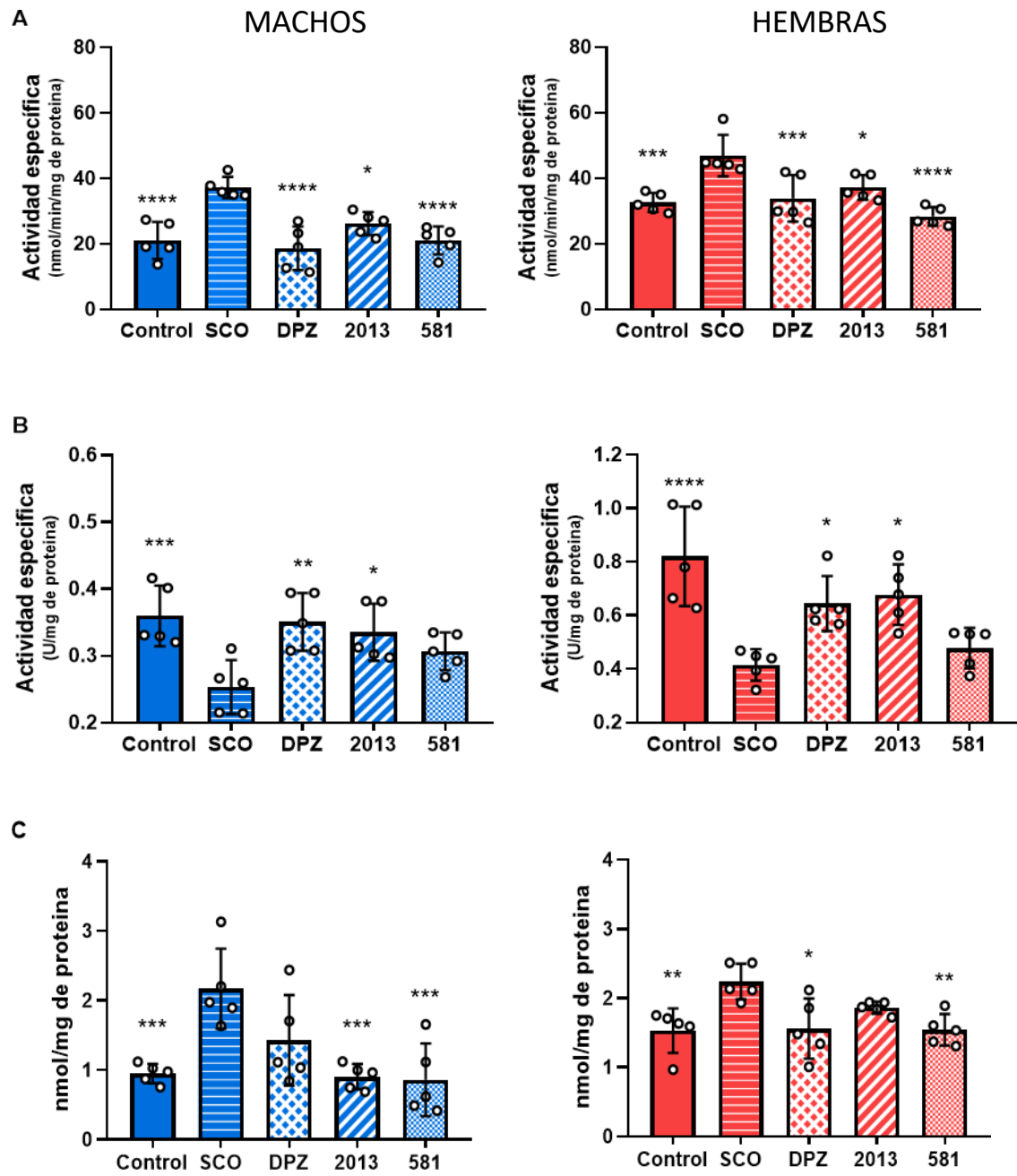
En este estudio, evaluamos el potencial antioxidante e inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa de las BL seleccionadas sobre la neurotoxicidad inducida por escopolamina.

La actividad de AChE en los tejidos cerebrales de todos los grupos se muestran en la Figura 32A. La administración de escopolamina produjo un aumento de los niveles de AChE en el cerebro. Estos resultados son concordantes con los reportados previamente por diversos autores (Choi et al., 2015; Foyet et al., 2019; S.-P. Li et al., 2018). En contraste con el grupo tratado únicamente con escopolamina, se observó una disminución significativa de la actividad de AChE en los grupos que recibieron donepecilo o cualquiera de las cepas probióticas. Particularmente, el tratamiento con la cepa CRL 581 demostró una mayor eficacia en la reducción de la actividad de AChE. Estos resultados sugieren un potencial terapéutico significativo de los probióticos, especialmente de CRL 581, en la mitigación de los efectos inducidos por la escopolamina, sobre todo de la actividad de AChE, en el tejido cerebral.

Por otro lado, los cambios en los estados redox en el cerebro también están relacionados con el deterioro cognitivo inducido por escopolamina. Para evaluar estas alteraciones, se determinaron las actividades de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo.

En este estudio, los ratones tratados con escopolamina mostraron una disminución significativa en la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa y un aumento en los niveles de MDA en el cerebro. La administración de la cepa CRL 2013 mostró un aumento significativo en la actividad de la enzima catalasa en los cerebros de los ratones (Figura 32B). En cuanto a los niveles de MDA, un indicador de peroxidación lipídica, se observaron resultados divergentes según el sexo. En hembras, solo los animales que

recibieron la cepa CRL 581 mostraron una disminución en los niveles de MDA. En cambio, en ratones machos, ambas cepas probióticas demostraron la capacidad de reducir los niveles de MDA, lo que indica un efecto beneficioso en la protección contra el estrés oxidativo (Figura 32C). Es relevante señalar que no se encontraron diferencias significativas en la actividad de GSH entre los grupos, lo que sugiere que los tratamientos con probióticos no afectaron los niveles de este antioxidante en particular (Figura 32D). Estos hallazgos resaltan la complejidad de los mecanismos antioxidantes y subrayan la importancia de investigaciones adicionales para comprender completamente el papel de los probióticos en la modulación de los estados redox en el cerebro de ratones tratados con escopolamina.



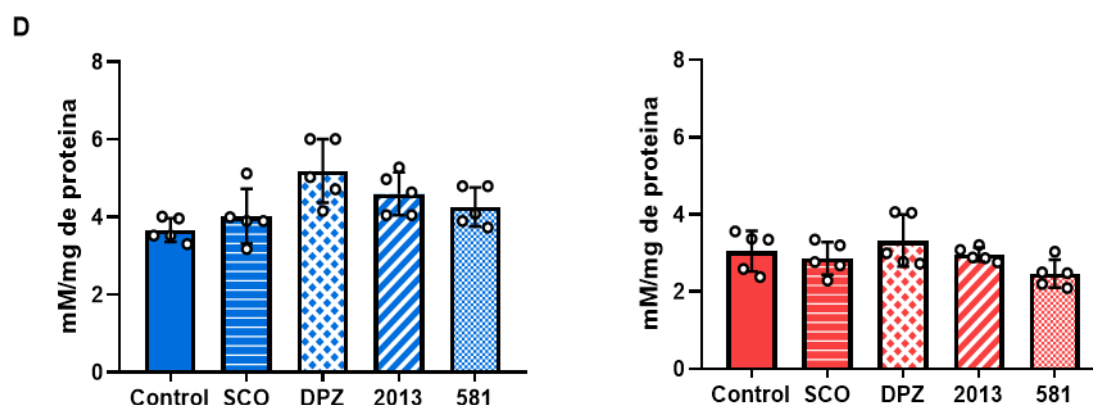


Figura 32. Estimación de la actividad de acetilcolinesterasa (A), actividad de la catalasa (B), niveles de MDA (C) y contenido de GSH (D) en el cerebro de ratones. (**Control:** control bioterio; **SCO:** grupo escopolamina; **DPZ:** escopolamina + tratamiento con donepecilo; **2013:** escopolamina + probiótico CRL 2013; **581:** escopolamina + probiótico CRL 581). Cada conjunto de datos ($n = 5$) representa la media $\pm$ DE. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo escopolamina (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$).

Expresión de genes marcadores de inflamación mediante RT-qPCR en córtex e hipocampo

Se evaluó el efecto de la escopolamina y de los tratamientos administrados sobre la expresión de marcadores inflamatorios en el cerebro de los ratones. Las muestras de córtex e hipocampo se obtuvieron 24 horas después de la última administración de escopolamina, determinándose la expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Figuras 33 y 34). No se detectaron diferencias significativas en ninguno de los tejidos analizados, en ambos sexos. Aunque se ha reportado que la escopolamina induce un aumento en la expresión de estos mediadores, dicho efecto podría ser de corta duración (Akbarian et al., 2022; Amoah et al., 2023). Dado que la metodología utilizada cuantifica variaciones en la expresión génica, es posible que el pico inducido por la escopolamina se haya producido pocas horas después de la administración y disminuido posteriormente, de modo que el muestreo realizado a las 24 horas no reflejara dicho incremento. Estos resultados coinciden con lo informado por T. Zhang et al., 2022, quienes, tras la administración crónica de escopolamina durante 7 semanas, observaron que el aumento en la expresión relativa de TNF e IL-1 β en hipocampo, medido 24 horas después de la última dosis, fue de baja magnitud.

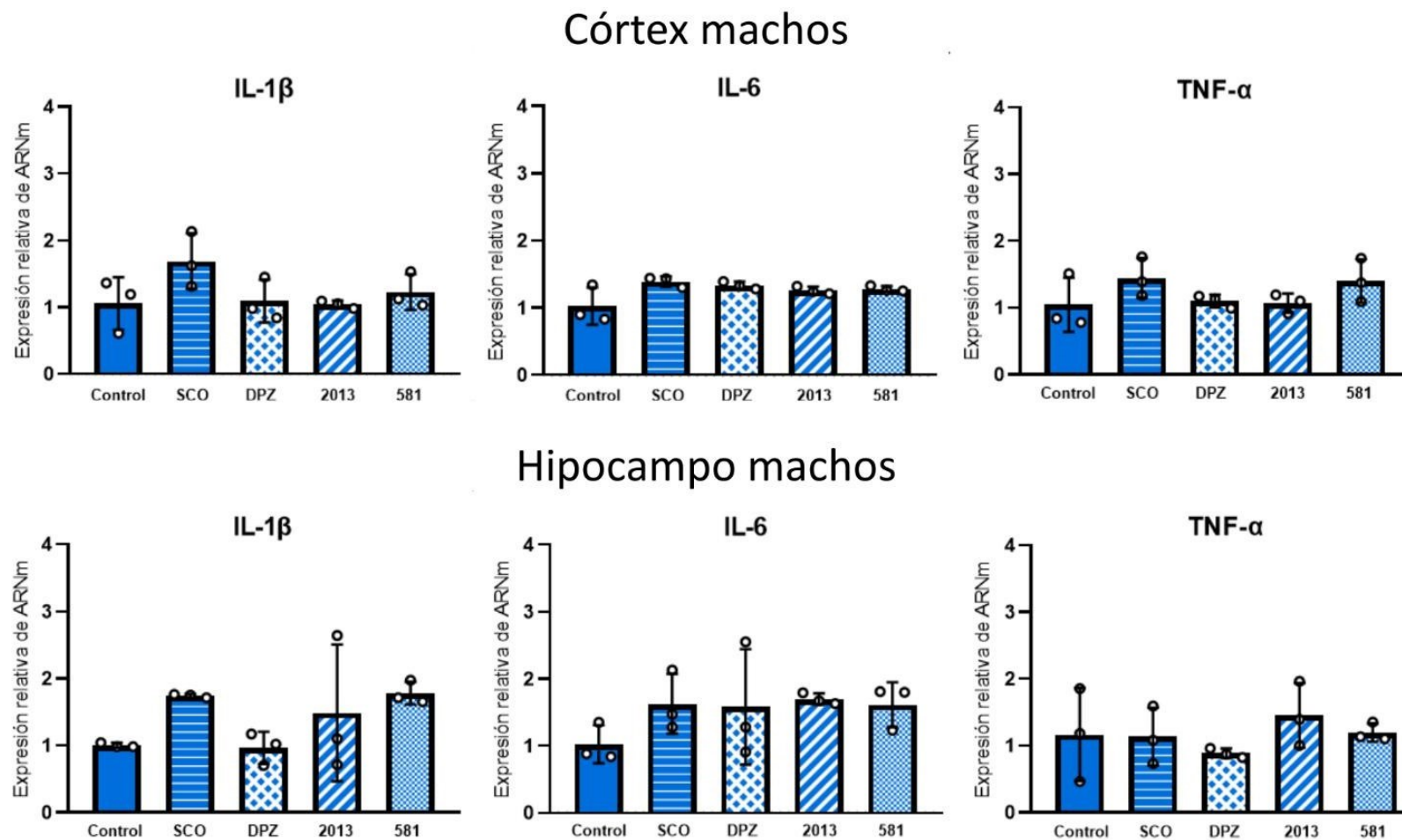


Figura 33. Efecto de la escopolamina y los tratamientos sobre la expresión de genes marcadores de inflamación en cerebro de ratones C57BL/6 machos. Expresión relativa de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en córtex e hipocampo. Cada grupo de datos ($n = 3$) representa la media $\pm$ DE.

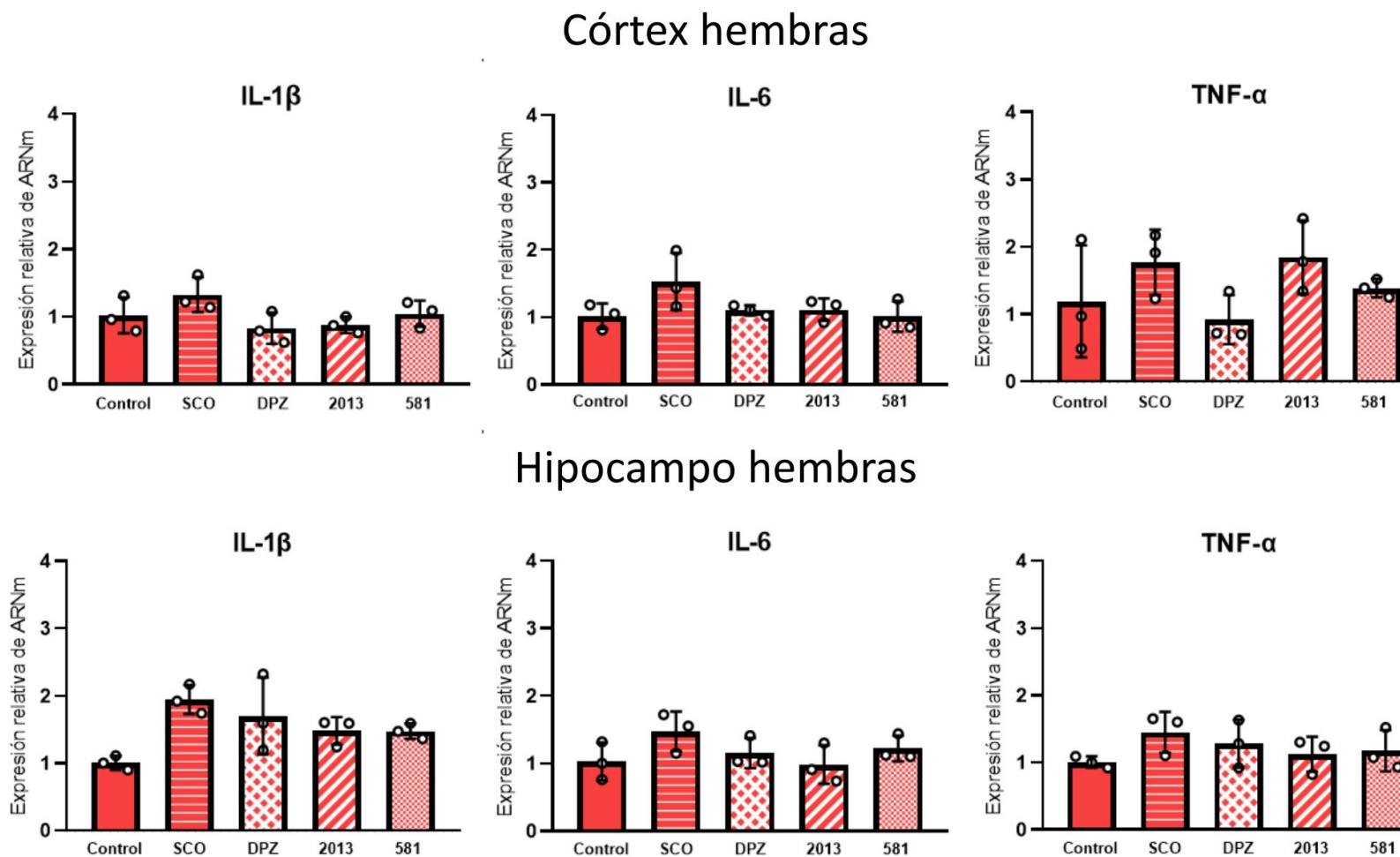


Figura 34. Efecto de la escopolamina y los tratamientos sobre la expresión de genes marcadores de inflamación en cerebro de ratones C57BL/6 hembras. Expresión relativa de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en córtex e hipocampo. Cada grupo de datos ($n = 3$) representa la media $\pm$ DE.

Análisis proteómico del homogenato cerebral

Se realizó un análisis proteómico cuantitativo utilizando tres réplicas biológicas de homogenatos cerebrales provenientes de ratones de todos los grupos experimentales. El diagrama del flujo de trabajo basado en proteómica cuantitativa sin marcaje se muestra en la Figura 24 página 83.

Los valores de intensidad-LFQ fueron cargados en *Perseus* y transformados a escala logarítmica. Posteriormente, se filtraron para conservar únicamente aquellas proteínas con valores válidos en al menos 2 de las 3 réplicas biológicas por grupo. Los valores faltantes fueron imputados y se reemplazaron con valores correspondientes a la distribución normal. Los histogramas correspondientes a las proteínas identificadas y cuantificadas evidenciaron una distribución normal, y la imputación de los datos preservó su carácter unimodal (Figura 35).

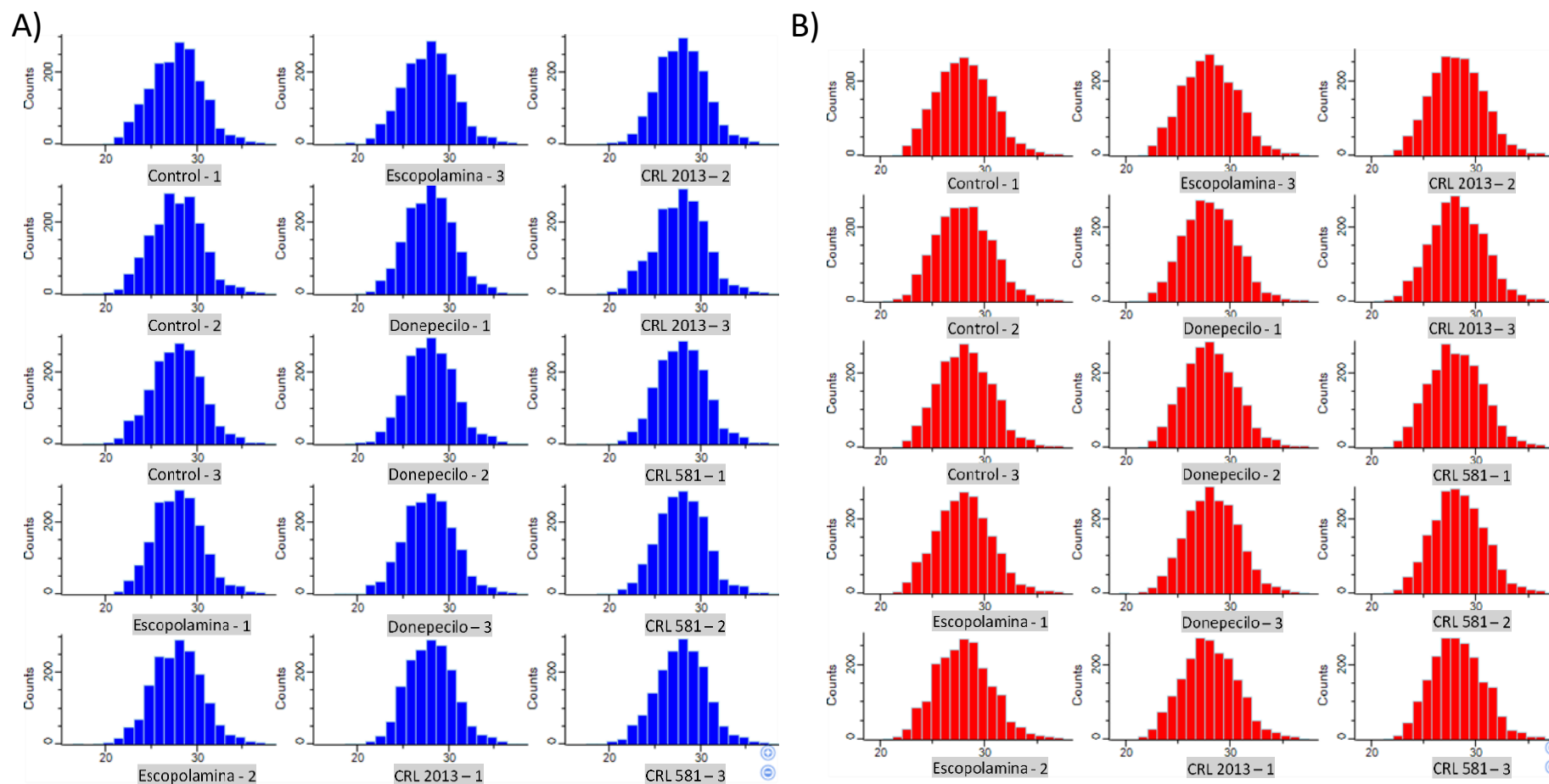


Figura 35- Histograma de distribución de los valores logaritmo ($\log_2(x)$) de intensidad-LFQ representando la distribución unimodal y normal de los datos para ratones machos (A) y hembras (B).

Análisis de proteínas expresadas diferencialmente

Los cambios globales de expresión de proteínas en el cerebro de los ratones se analizaron mediante un enfoque proteómico. Como proteoma de referencia se utilizó <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000589>. Este proteoma comprende 54727 proteínas putativas de las cuales en nuestras muestras se identificaron 17459 en machos y 18571 en hembras. Esto comprendió una cobertura del proteoma del 32% y 34% para machos y hembras respectivamente, lo cual se encuentra en un rango típico de enfoques proteómicos cuantitativos libre de etiquetados (Boeddrich et al., 2023; H. Wang et al., 2006).

Para el análisis, se consideraron las proteínas detectadas en por lo menos 2 réplicas biológicas por grupo experimental, con la finalidad de incrementar la precisión de la evaluación estadística. Esto resultó en un subconjunto de 1799 y 2056 proteínas para machos y hembras respectivamente, cuyos niveles de expresión se compararon entre los diferentes grupos experimentales.

A continuación, con el propósito de facilitar una comprensión más clara y precisa de los patrones de expresión observados, los resultados de machos y hembras serán presentados por separado y al final se realizará una interpretación integradora de los mismos.

PROTEÓMICA DE RATONES MACHOS

Para caracterizar la expresión diferencial en los perfiles de proteínas entre todos los grupos experimentales, luego de aplicar la transformación logarítmica a las intensidades normalizadas de las proteínas y realizar el filtrado detallado anteriormente, se llevó a cabo una prueba de "T de Student múltiple". Esta se realizó utilizando un filtro FDR (tasa de descubrimiento falso) con un nivel de permutación del 5 %. Los resultados obtenidos se representaron mediante un gráfico de clúster jerárquico (Figura 36). Este análisis demostró que los grupos experimentales se separan claramente, indicando que cada condición induce respuestas proteómicas diferentes. Además, el clustering confirmó consistencia interna entre réplicas, lo cual es un indicador de buena calidad del ensayo. Las muestras del grupo escopolamina y control presentan perfiles opuestos en numerosos genes y proteínas, evidenciando una clara diferenciación molecular entre

ambos. Los grupos CRL 581, CRL 2013 y donepecilo muestran un patrón similar entre sí, distinto del control y escopolamina, lo que podría reflejar un efecto regulador o compensatorio derivado del tratamiento.

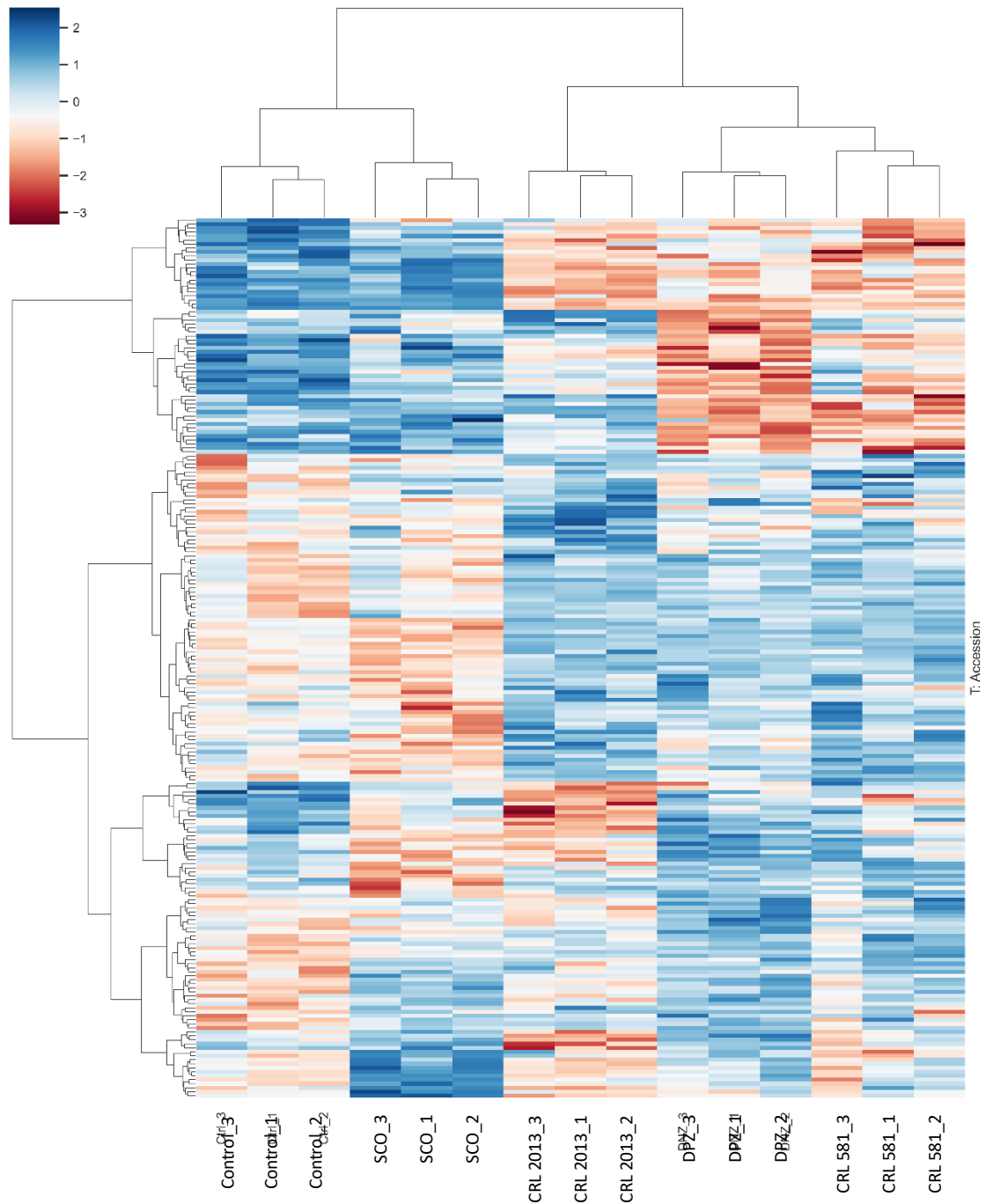


Figura 36. Mapa de calor de agrupamiento jerárquico con Z-score en ratones machos. Solo se muestran las proteínas diferencialmente expresadas (FDR por permutación $\leq 0,05$) en cualquier comparación: Control, Escopolamina (SCO), Donepecilo (DPZ), CRL 2013 y CRL 581. Las proteínas con mayor expresión se representan en azul, mientras que las de menor expresión aparecen en rojo.

Efecto de la escopolamina sobre el cerebro de ratones C57BL/6

Con el objetivo de evaluar los cambios inducidos por la escopolamina en el proteoma del cerebro de los ratones machos, se realizó una comparación entre las muestras del control bioterio vs el grupo que solo recibió escopolamina aplicando la prueba de “T de Student doble” utilizando un filtro FDR basado en un nivel de permutación del 5%. Los resultados se visualizan en un gráfico volcán (Figura 37) y en Tabla 5 de Anexo 1.

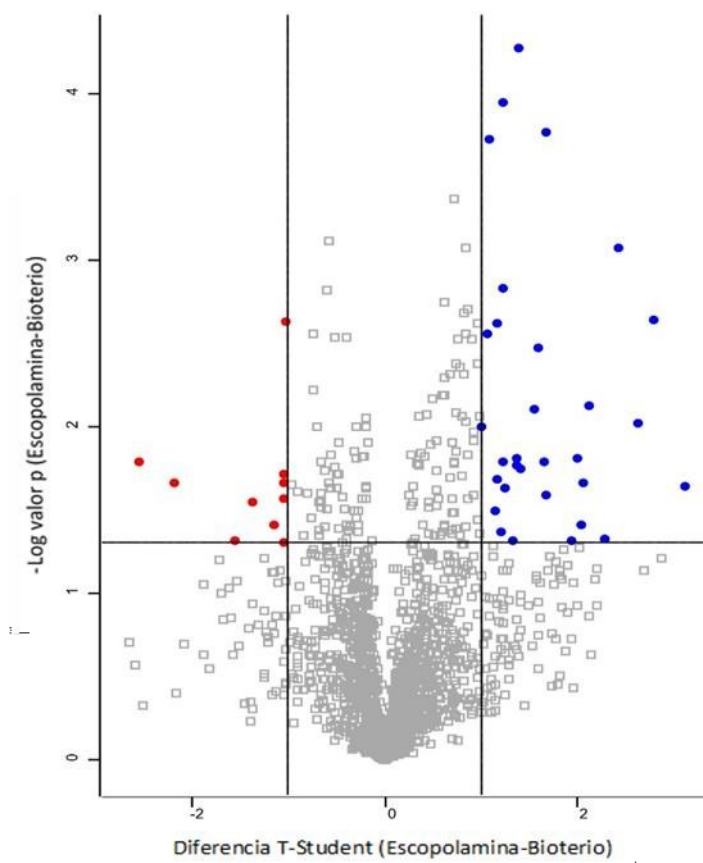


Figura 37- Análisis de proteínas expresadas diferencialmente en ratones machos que recibieron tratamiento con escopolamina vs control bioterio. La gráfica de volcán muestra el valor estadístico p (eje y) frente a la diferencia de los valores logarítmicos de intensidades, (Diferencia T- Student, eje x). La línea horizontal punteada representa el umbral del valor p ajustado de 0,05; mientras que las líneas verticales punteadas representan los puntos de corte de diferencia de las intensidades en escala logarítmica. La expresión diferencial significativa se definió como $p \leq 0,05$ y $\log_2$ diferencia ≥ 1 para proteínas reguladas positivamente (azul) o $p \leq 0,05$ y $\log_2$ diferencia ≤ -1 para proteínas reguladas negativamente (rojo).

Del total de 41 proteínas expresadas diferencialmente (DEPs) en los ratones tratados con escopolamina, se encontraron 31 proteínas reguladas positivamente y 10 reprimidas en comparación al control bioterio. Entre las proteínas reguladas positivamente en el grupo escopolamina podemos destacar a Lrp-1 (A0A0R4J0I9),

17 β -HSD10 (Q99N15), Plec (Q9QXS1) y NEDD8 (P29595); mientras que entre las reguladas negativamente destacamos a Rptor (A2ACM0), Rheb (Q921J2) y Ssbp3 (Q9D032).

LRP1 es una proteína de la superficie celular neuronal que puede regular la endocitosis de múltiples ligandos, participando en la transducción de señales. Se ha visto, que en la EA la interacción de esta proteína con APP produce un aumento en el tráfico endosomal de APP, lo que genera un aumento en la producción de A β . Por otro lado, la proteína mitocondrial 17 β -HSD10 se encuentra sobreexpresada 2,5 veces en los ratones tratados con escopolamina. Además de su rol en el metabolismo mitocondrial de isoleucina y neuroesteroides (17 β -estradiol, 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol), su desregulación compromete la homeostasis esteroidea crítica para la función cognitiva (He et al., 2019). Dado que se han encontrado niveles elevados de esta enzima en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer y en modelos murinos de la misma, se la considera un factor clave en su patogénesis, posiblemente a través de alteraciones en la estructura y función mitocondrial, déficit sináptico y muerte neuronal (He et al., 2023; S.-Y. Yang et al., 2014). Además, se vió que la proteína PLEC se sobreexpresó 8 veces en el cerebro de ratones tratados con escopolamina y esto podría estar relacionado con mecanismos de respuesta al daño neuronal o procesos de neuroinflamación activados por el tratamiento con esta droga. Este hallazgo adquiere relevancia al considerar que el gen PLEC, que codifica la proteína plectina, ha sido identificado como uno de los genes diferencialmente sobreexpresados en cerebros post mortem de pacientes con Alzheimer, y su sobreexpresión ha demostrado modificar la neurodegeneración en modelos animales, sugiriendo un papel funcional en la patología de la enfermedad (Lagisetty et al., 2022). Además, análisis de asociación genética han identificado variantes en PLEC vinculadas tanto al Alzheimer como a enfermedades cardiovasculares, y se ha observado una sobreexpresión de este gen en astrocitos cerebrales y células cardíacas en condiciones patológicas (Koskeridis et al., 2024). La proteína NEDD8 que se encuentra regulada positivamente en los ratones escopolamina, juega un papel clave en la regulación de la degradación de proteínas en el cerebro (S. Zhang et al., 2024). En cerebros de pacientes con Alzheimer, se ha observado acumulación de NEDD8 en ovillos neurofibrilares y otras inclusiones neuronales, lo que sugiere que participa en la

formación y metabolismo de estos agregados patológicos a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Mori et al., 2005).

En nuestro modelo experimental, la administración de escopolamina indujo una disminución en la expresión de Rheb y Rptor en el cerebro de ratones. Esta doble regulación negativa es altamente relevante, ya que tanto Rheb como Rptor son componentes esenciales para la activación y funcionalidad del complejo mTORC1, un regulador clave de procesos celulares esenciales para la función neuronal. Rheb es una GTPasa que activa directamente a mTORC1 al promover su localización en la membrana lisosomal, mientras que Rptor (Proteína reguladora asociada a mTOR), por su parte, regula la señalización de mTOR, que es crucial para el metabolismo celular, la autofagia y la supervivencia neuronal (De La Monte & Tong, 2024; Lehrer & Rheinstein, 2024). La reducción simultánea de Rheb y Rptor sugiere una reducción en la actividad de mTORC1, lo que afectaría la síntesis de proteínas necesarias para la plasticidad sináptica, un proceso crucial para la formación y consolidación de la memoria (De et al., 2021; Shahani et al., 2017). Por otro lado, niveles bajos de Rheb también podrían estar asociados con una disminución en los niveles de acetilcolina, un neurotransmisor esencial para la cognición, cuya alteración es característica en trastornos como el Alzheimer (Moon et al., 2020). En conjunto, estos efectos sugieren que la disminución de Rheb y Rptor inducida por escopolamina podría contribuir de forma significativa al deterioro cognitivo y conductual observado en este modelo.

Por otro lado, en los ratones del grupo escopolamina se observó una regulación negativa de *Ssbp3*, proteína esencial para el desarrollo neuronal. Su disminución podría comprometer la formación sináptica, el volumen del neuropilo y la integridad mitocondrial, además de inducir estrés oxidativo y alterar la vía Wnt, contribuyendo así al deterioro sináptico y cognitivo observado (Salim et al., 2023).

Efecto del tratamiento con donepecilo y las bacterias lácticas en el modelo de escopolamina

Tras analizar los cambios en los niveles de expresión proteica en cerebros de ratones del modelo de escopolamina, se realizó el análisis estadístico aplicando la prueba “T de

Student doble” para comparar los perfiles proteómicos con los cerebros de los animales tratados con donepecilo, con *L. brevis* CRL 2013 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581.

El análisis estadístico de las proteínas diferencialmente expresadas (DEPs) reveló que 46 proteínas encontraron sobreexpresadas, mientras que 20 presentaron una expresión reducida en los animales tratados con donepecilo (Figura 38 y Tabla 6 de Anexo 1).

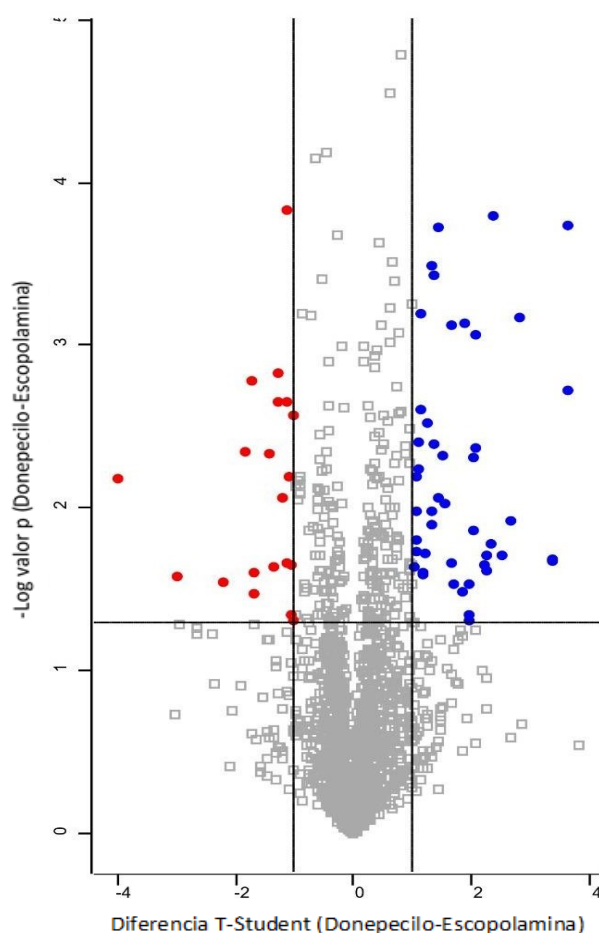


Figura 38. Análisis de DEPs en ratones machos del grupo donepecilo en comparación con escopolamina.

La gráfica de volcán muestra el valor estadístico p (eje y) frente a la diferencia de los valores logarítmicos de intensidades (Diferencia T- Student, eje x). La expresión diferencial significativa se definió como $p \leq 0,05$ y Log_2 diferencia ≥ 1 para proteínas reguladas positivamente (azul) o $p \leq 0,05$ y Log_2 diferencia ≤ -1 para proteínas reguladas negativamente (rojo).

Al analizar las DEPs en animales suplementados con CRL 2013, se encontraron 42 proteínas reguladas positivamente y 13 reguladas en forma negativa (Figura 39A y Tabla 7 de Anexo 1); mientras que en los suplementados con CRL 581 fueron 47 proteínas sobreexpresadas y 26 proteínas reprimidas (Figura 39B y Tabla 8 de Anexo 1).

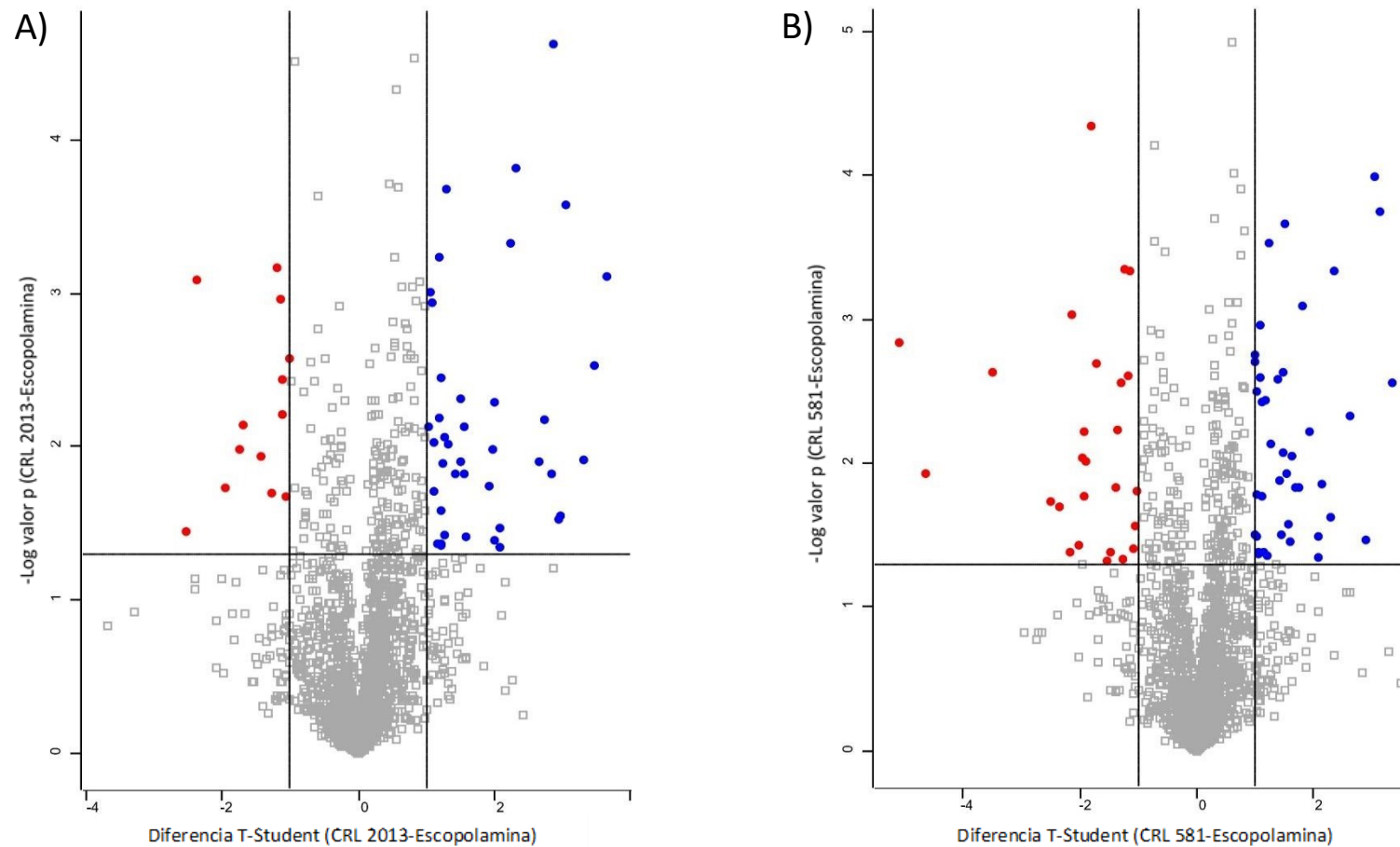


Figura 39. Análisis de DEPs en ratones machos del grupo CRL 2013 (A) y CRL 581 (B) en comparación con escopolamina. La gráfica de volcán muestra el valor estadístico p (eje y) frente a la diferencia de los valores logarítmicos de intensidades (Diferencia T- Student, eje x). La expresión diferencial significativa se definió como $p \leq 0,05$ y Log_2 diferencia ≥ 1 para proteínas reguladas positivamente (azul) o $p \leq 0,05$ y Log_2 diferencia ≤ -1 para proteínas reguladas negativamente (rojo).

Además, con el objetivo de facilitar la interpretación de las relaciones entre los conjuntos de proteínas reguladas en cada grupo experimental, se emplearon diagramas de Venn (Figura 40). Esta representación permitió identificar proteínas compartidas entre tratamientos, así como aquellas exclusivas de cada grupo, evidenciando patrones de solapamiento y especificidad en la regulación proteica.

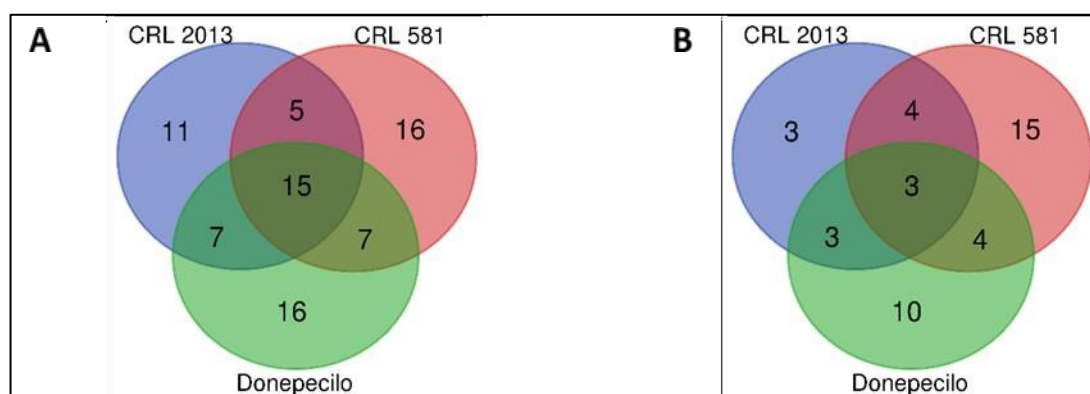


Figura 40. Representación mediante diagramas de Venn de las proteínas reguladas positivamente (A) y negativamente (B) en los cerebros de ratones macho tratados con donepecilo, *L. brevis* CRL 2013 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. Se muestran los patrones de solapamiento y exclusividad entre las condiciones experimentales.

Al analizar las proteínas diferencialmente expresadas en el grupo donepecilo y en los grupos tratados con las bacterias lácticas (BL), se identificaron 15 proteínas compartidas entre los tres grupos, que se encontraron reguladas positivamente frente al grupo escopolamina. En este análisis se destacan proteínas asociadas al transporte intracelular y la sinapsis como Napg (D3Z4B2), Ehd1 (Q9WVK4) y varias septinas: Sept7 (E9Q1G8), Sept11 (A0A0J9YUL3), Sept2 (P42208) y Sept9 (Q80UG5), las cuales participan en procesos de fusión de vesículas, formación de sinapsis y mantenimiento de la arquitectura sináptica (Jakobsson et al., 2011; Tsang et al., 2011). Su regulación positiva sugiere una restauración de los mecanismos de comunicación neuronal alterados por la escopolamina. Asimismo, se observaron aumentos en las proteínas Ssbp3 (Q9D032) y Tnc (Q80YX1). Estas cumplen roles en la adhesión celular, remodelación de la matriz extracelular y regulación del citoesqueleto, procesos fundamentales para la integridad funcional del sistema nervioso central (Irintchev et al., 2005). En particular, la recuperación en los niveles de Ssbp3 observada en los grupos tratados podría reflejar un proceso de reversión de las alteraciones estructurales inducidas por escopolamina, considerando que esta proteína se encontraba disminuida en dicho grupo y ha sido

previamente asociada con mecanismos de regeneración axonal y plasticidad sináptica (Salim et al., 2023). Por otro lado, la regulación positiva de Ckmt1 (P30275), Hexb (P20060) y Cmas (A0A0R4J0B4) sugiere una recuperación del metabolismo energético y de la función lisosomal, necesarios para mantener el equilibrio proteico y la eliminación de residuos intracelulares en neuronas (Z. Wang et al., 2025; Whyte et al., 2022). Finalmente, la sobreexpresión de Cmtr1 (A0A3Q4EHZ1), enzima relacionada con el procesamiento y maduración del ARN mensajero, indica una posible activación de mecanismos de regulación postranscripcional, lo que podría favorecer la síntesis de proteínas necesarias para la respuesta adaptativa al daño neuronal inducido por escopolamina (Y.-L. Lee et al., 2020).

De forma adicional, se identificaron 5 proteínas reguladas positivamente de manera específica en los grupos tratados con los probióticos CRL 2013 y CRL 581. Entre ellas se destaca Wasf1 (Q8R5H6), también conocida como Wave1, una proteína que regula la dinámica del citoesqueleto de actina en las sinapsis. Su deficiencia puede alterar la morfología sináptica, incluyendo cambios en el tamaño y la forma de las espinas dendríticas, lo que se asocia con trastornos del neurodesarrollo y discapacidad intelectual (H.-G. Kim et al., 2025; Tsuchiya et al., 2006). El aumento de Wasf1 en los grupos probióticos sugiere una restitución estructural sináptica, fortaleciendo la formación y estabilidad de espinas dendríticas. También se destaca Sept5 (A0A338P769), otra proteína de la familia de las septinas, implicada en la organización del citoesqueleto y el tráfico vesicular en el cerebro. Su sobreexpresión ha sido asociada con mejoras en la interacción social, desarrollo axonal y función presináptica en modelos animales (Harper et al., 2012; Suzuki et al., 2009).

En cuanto a las proteínas reguladas negativamente, se observó una disminución de Nedd8 (P29595) en ambos grupos tratados con CRL 2013 y CRL 581, en contraste con el aumento detectado en el grupo escopolamina. Este patrón sugiere que ambas cepas bacterianas podrían modular el entorno proteico intracelular reduciendo la acumulación de proteínas disfuncionales, aliviando la carga sobre el sistema ubiquitina-proteasoma y promoviendo un estado funcional neuronal más equilibrado.

En el grupo tratado con CRL 2013 también se evidenció un aumento en la expresión de la proteína Rheb, una GTPasa esencial para la activación de mTORC1. Este cambio indica una posible reversión de la disrupción inducida por escopolamina, restaurando la señalización mTORC1, con implicancias sobre la plasticidad sináptica, la síntesis proteica y la función cognitiva.

Asimismo, se observó una regulación negativa de Lrp1 tanto en el grupo donepecilo como en CRL 581, en contraste con el grupo escopolamina. Esto sugiere que ambos tratamientos podrían actuar como agentes moduladores del entorno proteico y del efecto neurodegenerativo inducido por escopolamina.

Finalmente, uno de los resultados más notables fue la represión de casi 34 veces del receptor de rianodina tipo 2, RyR2 (E9Q401), observada exclusivamente en los ratones tratados con CRL 581. Este receptor es un canal de liberación de calcio intracelular que juega un papel crucial en la función cerebral y está involucrado en procesos como el aprendizaje, la memoria y la plasticidad sináptica. La regulación negativa de los receptores de rianodina (RyR), especialmente el subtipo RyR2, se ha estudiado como una estrategia potencialmente beneficiosa en la enfermedad de Alzheimer (Del Prete et al., 2014). La reducción de la actividad basal de RyR2, ya sea mediante mutaciones genéticas o fármacos inhibidores, promueve la activación de la autofagia neuronal y facilita la eliminación de β -amiloide, mejorando la plasticidad sináptica y la memoria en modelos murinos de la enfermedad (Oulès et al., 2012; H. Zhang et al., 2023). Además, la disminución de la expresión o función de RyR2 puede prevenir la hiperactividad neuronal y la muerte celular, incluso sin afectar directamente la acumulación de β -amiloide (Yao et al., 2020).

El análisis proteómico realizado permitió identificar patrones diferenciales de expresión proteica en el cerebro de ratones tratados con escopolamina y en aquellos que recibieron terapias posteriores con donepecilo o las bacterias lácticas en estudio. En conjunto, estos hallazgos sugieren que tanto el donepecilo como los tratamientos con bacterias lácticas CRL 2013 y CRL 581 promueven respuestas moleculares convergentes y complementarias, que revierten parcialmente las alteraciones sinápticas, metabólicas y estructurales inducidas por la escopolamina. Además, evidencian el potencial de los

probióticos como potenciales agentes moduladores de funciones neuronales clave, incluyendo la plasticidad, el equilibrio del sistema GABAérgico, y las vías asociadas a la neuroprotección y al metabolismo proteico.

Análisis de enriquecimiento categórico

Finalmente, se identificaron las categorías funcionales enriquecidas en el conjunto de proteínas diferencialmente expresadas utilizando la plataforma STRING, junto con los respectivos valores de fuerza de enriquecimiento. Este parámetro cuantifica la magnitud del enriquecimiento funcional, expresando la relación entre la cantidad de proteínas de la red asociadas a un término *Gene Ontology* (GO) y la cantidad esperada en una red aleatoria del mismo tamaño. Los términos GO brindan una descripción estandarizada de la localización o proceso biológico en el que participa cada proteína.

Los *procesos biológicos* hacen referencia a funciones específicas que el organismo realiza de manera programada a nivel genético. Generalmente se describen en base al resultado que generan; por ejemplo, la división celular es un proceso mediante el cual una célula madre origina dos células hijas. En el presente análisis se evidenció que los procesos biológicos enriquecidos con mayor fuerza en los proteomas de los ratones tratados con las cepas CRL 2013 y CRL 581 fueron proteínas vinculadas a procesos de división celular, incluyendo la citocinesis, ciclo celular y organización de organelas. De manera específica, en el grupo CRL 581 también se evidenció un enriquecimiento en términos relacionados con la organización y desarrollo de proyecciones celulares y neurales dependientes de la membrana plasmática (Figuras 41 y 42A).

La categoría *componente celular* hace referencia a la localización subcelular o al entorno estructural específico en el que una proteína, complejo proteico o ARN funcional se encuentra o ejerce su función. Las proteínas reguladas positivamente en ambos grupos tratados con las BL se asociaron principalmente a estructuras relacionadas con el citoesqueleto: fibras del estrés, anillo y complejo de septinas, hendidura de segmentación y sitio de división celular (Figuras 41 y 42B). Estos resultados refuerzan la idea de que los tratamientos probióticos promueven mecanismos celulares relacionados con la reorganización estructural y la proliferación, posiblemente contribuyendo a la recuperación de la integridad neuronal tras el daño inducido por escopolamina.

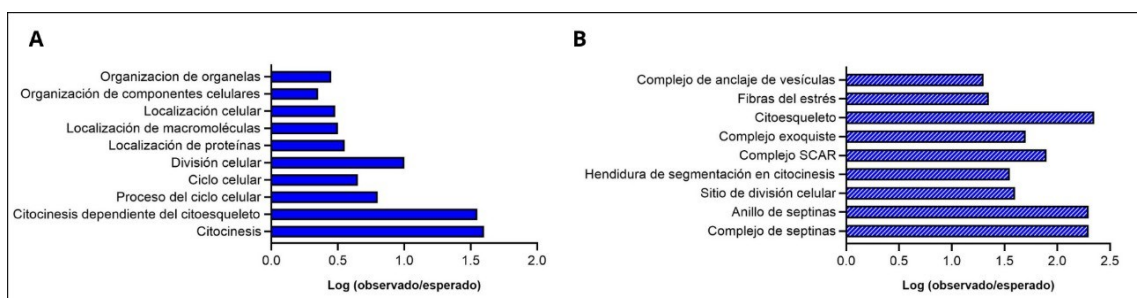


Figura 41. Análisis de enriquecimiento categórico de las proteínas sobre expresadas en cerebro de ratones que recibieron CRL 2013 con respecto a las categorías funcionales correspondientes a procesos biológicos (A) y componente celular (B).

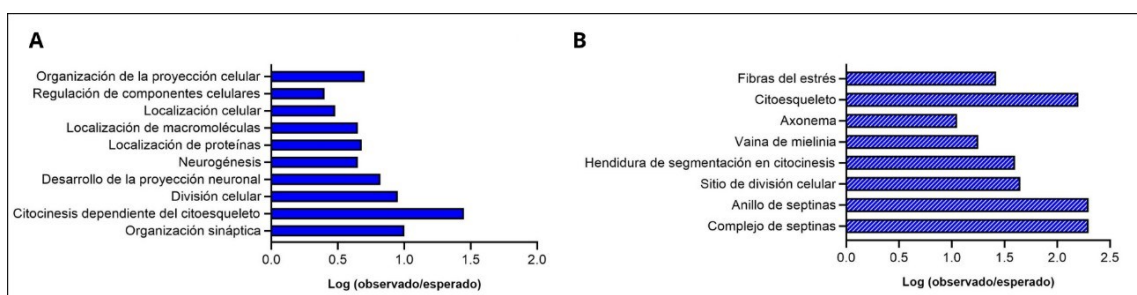


Figura 42. Análisis de enriquecimiento categórico de las proteínas sobre expresadas en cerebro de ratones que recibieron CRL 581 con respecto a las categorías funcionales correspondientes a procesos biológicos (A) y componente celular (B).

PROTEOMICA DE RATONES HEMBRAS

Con el objetivo de realizar una comparación conjunta de los datos proteómicos de los cerebros de ratones hembras procesados por LFQ, se aplicó la prueba “T de Student múltiple” con un filtro de descubrimiento en falso (FDR) del 5%. En los resultados obtenidos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 5 grupos experimentales, mediante comparaciones múltiples. Este resultado puede relacionarse a limitaciones técnicas durante el procesamiento de las réplicas de los grupos control bioterio y escopolamina (CEQUIBIEM). La baja calidad técnica de algunas muestras de estos grupos, evidenciada por un menor número de proteínas identificadas y una alta dispersión en los valores de cuantificación, podría actuar como un efecto amortiguador sobre las diferencias reales de expresión entre los grupos, comprometiendo significativamente la solidez de los análisis estadísticos. Asimismo, estas limitaciones impidieron la realización de un análisis de agrupamiento jerárquico robusto, debido a la falta de consistencia y comparabilidad en los datos generados. Sin embargo, se realizó un análisis estadístico diferencial con los datos obtenidos.

Efecto de la escopolamina sobre el cerebro de ratones C57BL/6

Con el propósito de identificar las alteraciones proteicas inducidas por la administración de escopolamina en ratones hembras, se realizó un análisis comparativo entre el grupo control (bioterio) y el grupo experimental tratado con escopolamina. Para ello, se aplicó una prueba “T de Student doble”, incorporando un control estadístico mediante FDR con un nivel de permutación establecido en el 5%. Las proteínas diferencialmente expresadas entre ambas condiciones fueron representadas gráficamente mediante un diagrama de volcán (Figura 43) y en Tabla 9 de Anexo 2.

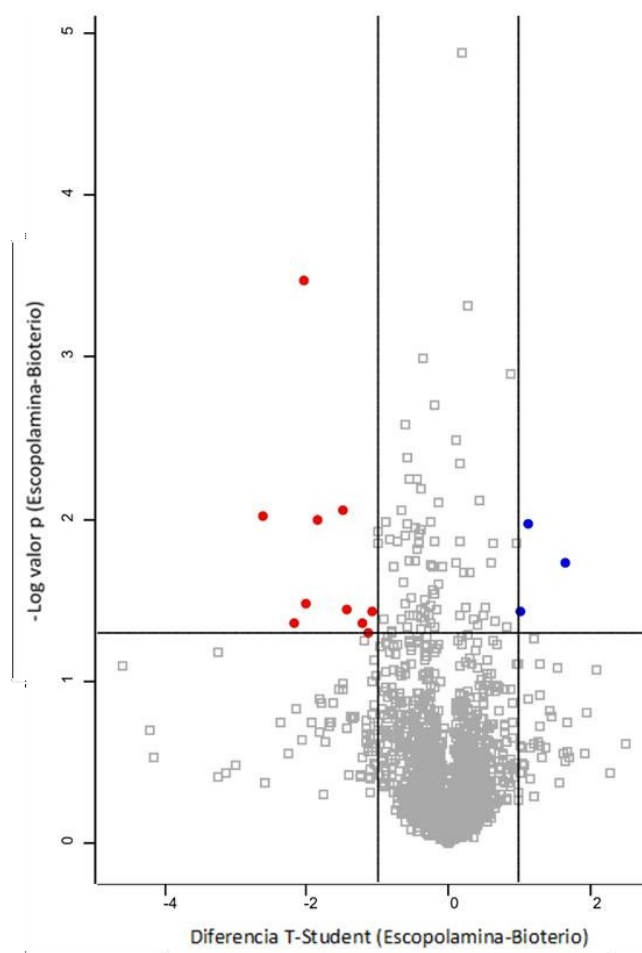


Figura 43- Análisis de proteínas expresadas diferencialmente en ratones hembras que recibieron tratamiento con escopolamina vs control bioterio. La gráfica de volcán muestra el valor estadístico p (eje y) frente a la diferencia de los valores logarítmicos de intensidades, (Diferencia T- Student, eje x). La línea horizontal punteada representa el umbral del valor p ajustado de 0,05, mientras que las líneas verticales punteadas representan los puntos de corte de diferencia de las intensidades en escala logarítmica. La expresión diferencial significativa se definió como $p \leq 0,05$ y $\log_2$ diferencia ≥ 1 para proteínas reguladas positivamente (azul) o $p \leq 0,05$ y $\log_2$ diferencia ≤ -1 para proteínas reguladas negativamente (rojo).

No obstante, los resultados deben interpretarse en el contexto de las limitaciones técnicas previamente señaladas, ya que algunas réplicas biológicas de estos grupos presentaron una calidad analítica reducida. Esta circunstancia podría haber comprometido la sensibilidad del análisis estadístico y, en consecuencia, contribuir a la escasa cantidad de proteínas diferencialmente expresadas detectadas entre ambos grupos. En este caso, se identificaron 13 proteínas con cambios significativos en su expresión en los ratones tratados con escopolamina, de las cuales 3 se encontraron reguladas positivamente y 10 reprimidas en comparación con el grupo control bioterio. Entre las proteínas reguladas negativamente en el grupo escopolamina se destacan Actr1a (P61164), Map7d2 (A2AG50), Arf6 (P62331), Pak2 (Q8CIN4), Celf1 (A0A0R4J0T5) y Uros (P51163).

La disminución de las proteínas Actr1a, Map7d2 y Arf6 en ratones tratados con escopolamina sugiere una alteración importante en la dinámica del citoesqueleto y el transporte intracelular neuronal. Actr1a, como parte del complejo dinactina, y Map7d2, estabilizador de microtúbulos en el axón, son esenciales para el tráfico axonal mediado por motores moleculares (Gulesserian et al., 2002; Holleran et al., 1996; K. Kikuchi et al., 2022), mientras que Arf6 es una GTPasa que regula el tráfico de membranas y la organización sináptica (Eva et al., 2012; H. Kim et al., 2020). Su reducción podría afectar la arquitectura neuronal y la eficacia sináptica, contribuyendo a déficits estructurales y funcionales del sistema nervioso.

Por otro lado, la disminución de Pak2 y Celf1 compromete tanto la plasticidad sináptica como la regulación de procesos relacionados con la memoria y el metabolismo cerebral. Pak2 participa en la morfología y densidad de espinas sinápticas, así como en la captación de glucosa neuronal, mientras que Celf1 regula el empalme alternativo de genes asociados a la patología amiloide, como Klc1 (M. Kikuchi et al., 2022, 2024; Kreis & Barnier, 2009; Y. Wang et al., 2018). La reducción de ambas proteínas podría contribuir con alteraciones cognitivas y procesos neurodegenerativos. Las proteínas Srsf5 y Prpf3, implicadas en el procesamiento y empalme del ARN mensajero, también se encuentran disminuidas en los ratones tratados con escopolamina, lo que indica una posible disfunción en la regulación postranscripcional de genes neuronales clave (Jeong, 2017; Long et al., 2011; Slišković et al., 2022).

Finalmente, la reducción de Uros, enzima clave en la síntesis del grupo hemo, sugiere un compromiso del metabolismo oxidativo neuronal, ya que el hemo es esencial para la función de citocromos y la síntesis de vitamina B12 (Aizencang et al., 2000; Scott & Roessner, 2002).

En conjunto, la disminución de estas proteínas refleja alteraciones integradas en el citoesqueleto, la plasticidad sináptica, el procesamiento de ARN y el metabolismo neuronal, lo que podría contribuir al deterioro cognitivo observado en este modelo experimental.

Efecto del tratamiento con donepecilo y las bacterias lácticas en el modelo de escopolamina

Se realizó el análisis estadístico aplicando la prueba “T de Student doble” para comparar los perfiles proteómicos de los animales del grupo escopolamina con los de los grupos tratados con donepecilo, *L. brevis* CRL 2013 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581.

El análisis estadístico de las proteínas diferencialmente expresadas reveló que se sobreexpresaron 30 proteínas y se reprimieron un total de 8 proteínas en los animales que recibieron el tratamiento con donepecilo (Figura 44 y Tabla 10 de Anexo 2).

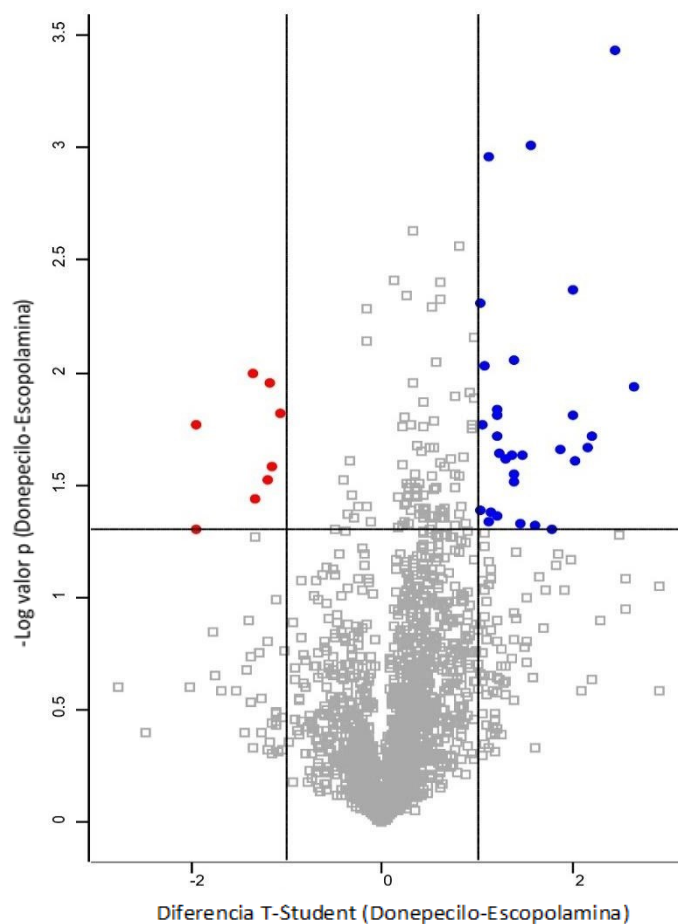


Figura 44. Análisis de DEPs en ratones hembras del grupo donepecilo en comparación con escopolamina. La gráfica de volcán muestra el valor estadístico p (eje y) frente a la diferencia de los valores logarítmicos de intensidades (Diferencia T- Student, eje x). La expresión diferencial significativa se definió como $p \leq 0,05$ y Log_2 diferencia ≥ 1 para proteínas reguladas positivamente (azul) o $p \leq 0,05$ y Log_2 diferencia ≤ -1 para proteínas reguladas negativamente (rojo).

Al analizar las DEPs en animales suplementados con CRL 2013, se encontraron 38 proteínas reguladas positivamente y 14 reguladas en forma negativa (Figura 45A y Tabla 11 de Anexo 2); mientras que en los suplementados con CRL 581 fueron 56 proteínas sobreexpresadas y 7 proteínas reprimidas (Figura 45B y Tabla 12 de Anexo 2).

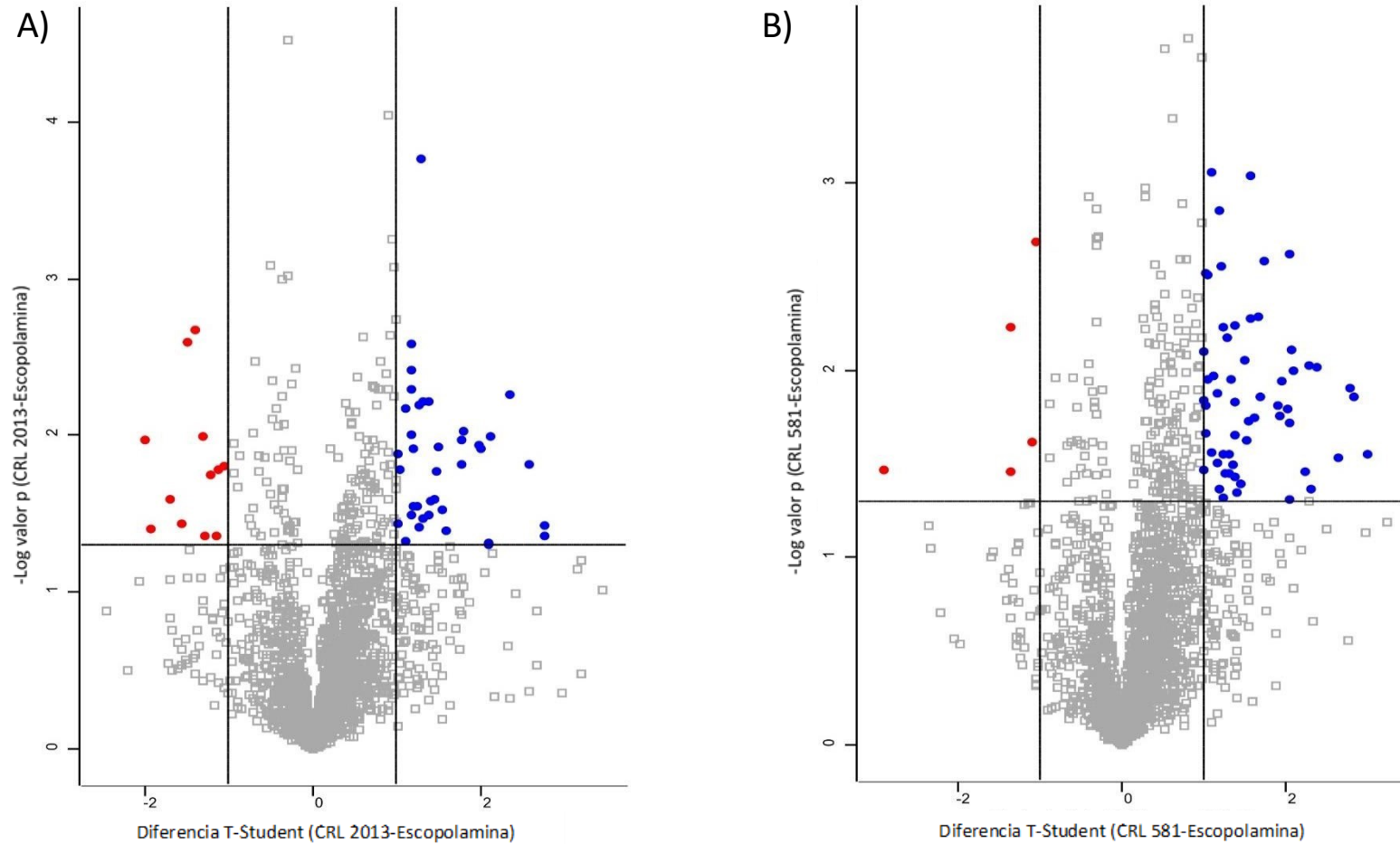


Figura 45. Análisis de DEPs en ratones hembras del grupo CRL 2013 (A) y CRL 581 (B) en comparación con escopolamina. La gráfica de volcán muestra el valor estadístico p (eje y) frente a la diferencia de los valores logarítmicos de intensidades (Diferencia T- Student, eje x). La expresión diferencial significativa se definió como $p \leq 0,05$ y Log_2 diferencia ≥ 1 para proteínas reguladas positivamente (azul) o $p \leq 0,05$ y Log_2 diferencia ≤ -1 para proteínas reguladas negativamente (rojo)

Con el objetivo de facilitar la interpretación de las relaciones entre los conjuntos de proteínas reguladas en cada grupo experimental, se emplearon diagramas de Venn (Figura 46). Esta representación permitió identificar proteínas compartidas entre tratamientos, así como aquellas exclusivas de cada grupo, evidenciando patrones de solapamiento y especificidad en la regulación proteica.

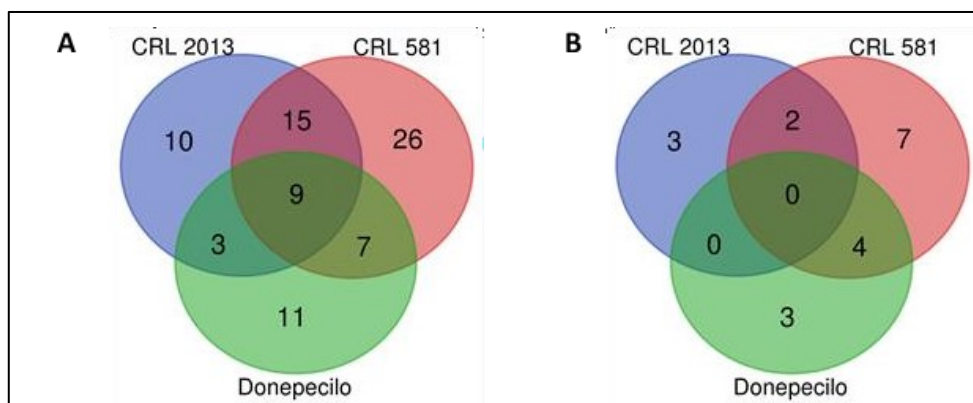


Figura 46. Representación mediante diagramas de Venn de las proteínas reguladas positivamente (A) y negativamente (B) en los cerebros de ratones hembras tratadas con donepecilo, *L. brevis* CRL 2013 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. Se muestran los patrones de solapamiento y exclusividad entre las condiciones experimentales.

El análisis de las proteínas diferencialmente expresadas reveló un conjunto de moléculas compartidas por los tres tratamientos, muchas de las cuales cumplen funciones clave en la homeostasis neuronal, la plasticidad sináptica, la regulación génica postranscripcional y la respuesta al estrés celular.

Dentro de las proteínas expresadas positivamente en los tres grupos tratados se destaca a Cyp46a1 (Q9WVK8), una enzima cerebral responsable de convertir colesterol en 24S-hidroxicolesterol, facilitando su eliminación. Esta vía es esencial para mantener el equilibrio de colesterol en el cerebro, lo cual resulta crítico para procesos como la sinaptogénesis, el crecimiento axonal y la estabilidad de membranas neuronales. Su disfunción se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Djelti et al., 2015). Recientemente se ha reportado que su sobreexpresión en modelos murinos mejora la memoria y la señalización estrogénica en hembras, con posibles efectos dependientes del sexo (Latorre-Leal et al., 2024). Además, estudios en modelos animales han demostrado que los efectos de la activación de Cyp46a1 no se limitan al mantenimiento del colesterol cerebral, sino que también involucran vías celulares

críticas como la transcripción génica, la endocitosis, la eliminación de proteínas mal plegadas, el transporte vesicular y la transmisión sináptica (Kacher et al., 2019).

También se observó una regulación positiva común de proteínas relacionadas con el plegamiento y transporte proteico, Lrpap1 (P55302), una chaperona esencial para el tráfico del receptor Lrp1, el cual participa en la depuración de agregados patológicos en el cerebro y en la modulación de la neuroinflamación (K. M. Reid & Brown, 2023). En paralelo, se identificó una sobreexpresión conjunta de proteínas implicadas en el procesamiento y empalme de ARN mensajero (ARNm), como Celf1 (A0A0R4J0T5), Celf4 (Q7TSY6), Prpf3 (Q922U1) y Bclaf1 (Q8K019), fundamentales para la especificidad transcripcional neuronal (M. Kikuchi et al., 2024; Long et al., 2011; Salamon et al., 2023; S.-J. Zhang et al., 2017). Particularmente, la recuperación de los niveles de Celf1 y Prpf3 tras la disminución observada en el grupo escopolamina podría reflejar un efecto restaurador del tratamiento.

Adicionalmente, en los tres grupos tratados, hubo un aumento en la expresión proteínas reguladoras del estrés celular y mitocondrial como Npm1 (Q61937), la cual promueve la supervivencia neuronal evitando la activación apoptótica (Zhao et al., 2025). También se vio una sobreexpresión del receptor de pentaxina neuronal Nptxr (E9PZM8) la cual se expresa principalmente en estructuras cerebrales involucradas en la memoria y el aprendizaje, como el hipocampo y la corteza, participando en la organización sináptica y la formación de redes neuronales funcionales (Dulewicz et al., 2023; Lim et al., 2020).

Se identificaron 15 proteínas reguladas positivamente de manera específica en los grupos tratados con las bacterias lácticas CRL 2013 y CRL 581, muchas de ellas asociadas a funciones neuroprotectoras. Entre ellas, se destacan reguladores clave del procesamiento y empalme del ARNm, como Srsf5 (Q9D8S5), Rbm25 (B2RY56) y Snrpa1 (P57784), fundamentales para la diversidad proteica y el funcionamiento adecuado del sistema nervioso (Carlson et al., 2017; Chen et al., 2022; Slišković et al., 2022). También se identificó Nt5dc3 (Q3UHB1), cuya expresión en neuronas se asoció con la regulación de comportamientos como la habituación, el sueño y el aprendizaje, lo que sugiere un papel relevante en la modulación de la actividad neuronal (Singgih et al., 2021). Por otro lado, se observó una expresión diferencial de proteínas implicadas en procesos de

señalización intracelular y maduración neuronal, como Camk2g (Q923T9) y Actr1a (P61164) (Rigter et al., 2023). Finalmente, se destaca Gcdh (A0A0A0MQ68), una enzima mitocondrial clave en el catabolismo de aminoácidos, cuya deficiencia se ha vinculado con la acumulación de metabolitos neurotóxicos y neurodegeneración (Seminotti et al., 2022).

La regulación positiva de todas estas proteínas sugiere la activación de mecanismos neuroprotectores comunes entre ambas cepas de BL, con potencial para restaurar funciones sinápticas, metabólicas y regulatorias alteradas por la escopolamina.

Adicionalmente, se destaca la regulación negativa de la Synaptogirina-3, Syngr3 (Q8R191), una proteína de las vesículas sinápticas que interactúa físicamente con la proteína Tau (McInnes et al., 2018). Diversos estudios en modelos murinos han demostrado que la reducción parcial de Syngr3 restaura la memoria y previene la degeneración sináptica inducida por Tau (Largo-Barrientos et al., 2021).

En el grupo CRL 2013 se evidenció un aumento en la expresión de Sod2 (P09671), una enzima mitocondrial clave en la defensa antioxidante del cerebro. Sod2 cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno, mitigando el estrés oxidativo y protegiendo a las neuronas frente a daño mitocondrial, neurodegeneración y deterioro cognitivo (Flynn & Melov, 2013). Estudios previos han demostrado que su sobreexpresión tiene efectos neuroprotectores en diversos modelos de daño neurológico (Massaad et al., 2009). En este contexto, la regulación positiva de Sod2 en respuesta al tratamiento con CRL 2013 sugiere la activación de mecanismos antioxidantes que podrían contribuir a contrarrestar el daño inducido por escopolamina.

Por otro lado, el tratamiento con la cepa CRL 2013 indujo una regulación positiva de la proteína Uros (P51163), en contraste con lo observado en el grupo escopolamina, lo que sugiere una posible restauración del metabolismo oxidativo neuronal.

En cuanto al grupo tratado con CRL 581 se identificaron diversas proteínas reguladas positivamente de forma exclusiva, destacándose algunas con funciones relevantes en la plasticidad sináptica y el procesamiento del ARN. Por ejemplo, se detectó un aumento en la expresión de la proteína U2af2 (P26369), un componente esencial del espliceosoma, cuya disfunción se asocia a trastornos del neurodesarrollo con déficits

cognitivos y alteraciones en la formación de neuritas (D. Li et al., 2024). Hnrnpab (Q20BD0) y Hnrnpc (Q9Z204), también se encontraron reguladas positivamente en ratones del grupo CRL 581. Estas proteínas participan en el procesamiento y transporte de ARNm, y su alteración se ha vinculado a patologías neurodegenerativas por defectos en la maduración del ARN y la acumulación de inclusiones patológicas en las neuronas (Geuens et al., 2016; Low et al., 2021). A nivel sináptico se destacó la sobreexpresión de Clstn1 (Q9EPL2), regulador del transporte axonal y la maduración de espinas dendríticas (De Ramon Francàs et al., 2017), y Syngap1 (F6SEU4), cuya deficiencia puede provocar disfunción sináptica y discapacidad intelectual (Berryer et al., 2016; R. Yang et al., 2023). La regulación positiva de estas proteínas sugiere efectos neuroprotectores del tratamiento con CRL 581, favoreciendo la integridad sináptica y la regulación génica postranscripcional.

Análisis de enriquecimiento categórico

Se realizó la identificación de las categorías funcionales enriquecidas en las proteínas expresadas diferencialmente utilizando la plataforma STRING. Para ello, al igual que en ratones machos, se utilizaron los valores de fuerza de enriquecimiento para realizar una descripción estandarizada de los *procesos biológicos* y *componentes celulares* en los que participa cada proteína expresada diferencialmente en los animales que recibieron los tratamientos con las bacterias lácticas.

En el presente análisis se evidenció que los procesos biológicos enriquecidos con mayor fuerza en los proteomas de ratones hembras tratados con las cepas CRL 2013 y CRL 581 corresponden, en su mayoría, a proteínas vinculadas al procesamiento y empalme de ARN, la expresión génica y el metabolismo de compuestos orgánicos. Específicamente, en el grupo CRL 581, también se evidenció un enriquecimiento de procesos relacionados con el ensamblaje y la biogénesis de complejos ribonucleoproteicos, así como con el metabolismo de compuestos cíclicos y aromáticos, y de compuestos nitrogenados (Figuras 47 y 48A).

En cuanto a la categoría componente celular, las proteínas reguladas positivamente en ambos grupos se asociaron principalmente a estructuras nucleares funcionales involucradas en el procesamiento del ARN, como el speck nuclear y organelas

intracelulares. En el caso del grupo CRL 581, además, se evidenció un enriquecimiento de proteínas localizadas en el espliceosoma, citoplasma y la sinápsis (Figura 47 y 48B).

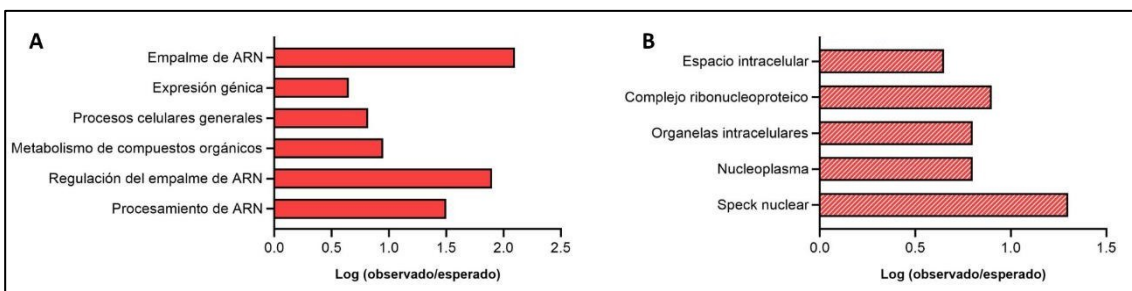


Figura 47. Análisis de enriquecimiento categórico de las proteínas sobre expresadas en cerebro de ratones hembras que recibieron **CRL 2013** con respecto a las categorías funcionales correspondientes a procesos biológicos (A) y componente celular (B).

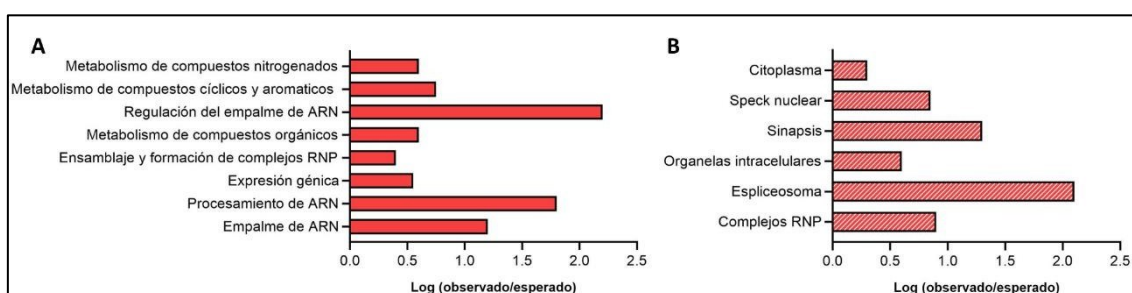


Figura 48. Análisis de enriquecimiento categórico de las proteínas sobre expresadas en cerebro de ratones hembras que recibieron **CRL 581** con respecto a las categorías funcionales correspondientes a procesos biológicos (A) y componente celular (B).

Estos hallazgos sugieren que ambos tratamientos probióticos inducen una activación coordinada de mecanismos celulares asociados a la maduración y regulación del ARN, reflejando una posible mejora en la capacidad de respuesta a nivel transcripcional ante el daño inducido por escopolamina en ratones hembras.

Efecto diferencial del proteoma cerebral según el sexo frente al tratamiento con los probióticos en el modelo de deterioro cognitivo inducido por escopolamina

Si bien ambos sexos mostraron alteraciones en la expresión proteica tras la inducción del deterioro cognitivo por escopolamina, las proteínas involucradas y los procesos biológicos asociados fueron sustancialmente distintos.

En ratones machos, la escopolamina indujo un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con el estrés mitocondrial, la disfunción sináptica y el desequilibrio en la proteostasis, como Hsd17b10, Nedd8 y Plec, además de una disminución en

componentes clave de la vía mTORC1, como Rheb y Rptor. En cambio, en hembras se observó una disminución de proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto y el procesamiento de ARN, como Map7d2, Arf6 y Celf1, lo que sugiere un perfil de vulnerabilidad distinto, orientado hacia la alteración del transporte intracelular y la regulación génica.

Los tratamientos con las bacterias lácticas (CRL 2013 y CRL 581) también promovieron perfiles de regulación proteica distintos entre machos y hembras. En los primeros, las proteínas reguladas positivamente estuvieron asociadas a rutas de tráfico vesicular, remodelación del citoesqueleto y restauración de la estructura neuronal. En hembras, los tratamientos promovieron una mayor expresión de proteínas vinculadas a funciones nucleares, empalme de ARN y control de la expresión génica. Cabe destacar que la sobreexpresión de la enzima colesterol-24 hidroxilasa (Cyp46a1) se detectó exclusivamente en hembras tratadas, lo cual adquiere especial relevancia considerando estudios recientes que demuestran efectos neuroprotectores sexo-dependientes de esta enzima. En modelos murinos, la sobreexpresión de Cyp46a1 en hembras envejecidas se asoció con una mejora en la memoria y una potenciación de la señalización estrogénica en el hipocampo, mientras que en machos produjo efectos adversos como ansiedad, deterioro cognitivo y un aumento de 5 α -dihidrotestosterona en dicha región cerebral (Latorre-Leal et al., 2024). Estos hallazgos respaldan la posibilidad de que la activación de Cyp46a1 tenga consecuencias beneficiosas en el cerebro de ratones hembras.

Desde un punto de vista funcional, los análisis de enriquecimiento reforzaron estas diferencias. En machos se destacaron procesos ligados a la división celular, organización estructural y vías de señalización intracelular, mientras que en hembras predominaron procesos asociados al procesamiento de ARN mensajero, ensamblaje de ribonucleoproteínas y regulación transcripcional.

En conjunto, estos resultados subrayan la necesidad de considerar el dimorfismo sexual en el estudio de las respuestas cerebrales al deterioro cognitivo y a los potenciales tratamientos neuroprotectores. Comprender estas diferencias puede ser clave para

diseñar estrategias terapéuticas más eficaces y específicas para cada sexo en el contexto de enfermedades neurodegenerativas.

Conclusiones parciales

- La administración de escopolamina y los tratamientos con bacterias lácticas (BL) desencadenaron respuestas claramente diferenciadas según el sexo, evidentes en múltiples niveles de análisis: conductual, bioquímico y molecular. Estas diferencias incluyeron variaciones en la actividad de la AChE, el equilibrio oxidativo y la expresión de proteínas en el sistema nervioso central, revelando una modulación sexo-dependiente de rutas biológicas específicas. Este hallazgo subraya la relevancia de incorporar la variable sexo en el estudio de intervenciones neurobiológicas, dado su impacto directo en la eficacia funcional de los tratamientos evaluados.
- El tratamiento con escopolamina afectó negativamente el comportamiento exploratorio de los ratones, evidenciado por una marcada reducción en el tiempo de permanencia en el área central del campo abierto. Este patrón conductual sugiere un incremento en los niveles de ansiedad, sugiriendo a la escopolamina como un agente negativo del equilibrio emocional en este modelo experimental.
- En ratones machos, el tratamiento con *L. brevis* CRL 2013 y con *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 produjo una tendencia general a permanecer más tiempo en área central en comparación con los animales que solo recibieron escopolamina. Notablemente, en hembras, CRL 581 fue capaz de revertir significativamente este parámetro asociado a la ansiedad evidenciando una modulación conductual sexo-dependiente.
- La administración de escopolamina redujo significativamente la memoria de reconocimiento en ambos sexos, efecto que se revirtió por el tratamiento con donepecilo y ambos probióticos, alcanzando niveles comparables al grupo control.
- La administración oral de las bacterias lácticas *L. brevis* CRL 2013 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 disminuyeron significativamente la actividad cerebral de AChE en ratones tratados con escopolamina, evidenciando un efecto inhibitor potencialmente beneficioso sobre la neurotransmisión colinérgica. Ambas cepas lácticas mitigaron el estrés oxidativo inducido por escopolamina mediante mecanismos diferenciados, los cuales parecen estar modulados por factores dependientes del sexo.

- En el proteoma cerebral, los tratamientos con bacterias lácticas evidenciaron respuestas adaptativas sexo-específicas. En machos, predominaron procesos vinculados al tráfico vesicular, remodelación del citoesqueleto y restauración neuronal, mientras que en hembras se destacó la modulación de funciones nucleares, regulación transcripcional y procesamiento de ARN. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de incorporar la variable sexo en el diseño de estrategias terapéuticas basadas en probióticos.

CONCLUSIONES FINALES



Conclusiones

- Se seleccionaron siete cepas autóctonas de bacterias lácticas potencialmente productoras de metabolitos neuroactivos, y se evaluó *in vitro* su potencial inhibitorio sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE). El análisis *in vitro* reveló que el medio condicionado de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* CRL 581 (MCB 581) exhibe una potente actividad anti-acetilcolinesterasa, inhibiendo significativamente tanto la isoforma eritrocitaria (AChE-E) como la cerebral (AChE-C). Esta acción fue comparable a la de 12 nM y 8 nM de donepecilo, respectivamente, y se atribuyó exclusivamente a su fracción de compuestos de bajo peso molecular (<3 kDa). Estos hallazgos consolidan su valor bioactivo y proyectan nuevas posibilidades terapéuticas en la modulación colinérgica.
- Los medios condicionados de *Enterococcus mundtii* CRL 35 y *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* CRL 581 y *Levilactobacillus brevis* CRL 2013 evidenciaron actividades funcionales relevantes, como la capacidad antioxidante y la modulación de mediadores inflamatorios en modelos celulares *in vitro* expuestos a oligómeros del péptido β -amiloide $A\beta_{1-42}$. Estos resultados refuerzan su valor como fuente de postbióticos con propiedades neuroprotectoras, abriendo nuevas perspectivas para intervenciones basadas en la microbiota.
- Los medios condicionados de *E. mundtii* CRL 35 y *L. delbrueckii subsp. lactis* CRL 581 y *L. brevis* CRL 2013 no proporcionaron protección directa frente a la citotoxicidad causada por los oligómeros del péptido beta amiloide $A\beta_{1-42}$.
- La administración oral de *L. brevis* CRL 2013 y *L. delbrueckii subsp. lactis* CRL 581 redujo la actividad cerebral de AChE en un modelo de deterioro cognitivo inducido por escopolamina, sugiriendo un efecto beneficioso sobre la neurotransmisión colinérgica. Además, ambas cepas mitigaron el estrés oxidativo mediante mecanismos diferenciados y dependientes del sexo, lo que refuerza su potencial como agentes moduladores de la función cerebral.
- Este trabajo de tesis permitió desarrollar un software de análisis conductual (STUART), en colaboración interdisciplinaria con estudiantes de Ingeniería en Sistemas de la UTN. La herramienta fue clave para garantizar precisión, reproducibilidad y trazabilidad en la medición de parámetros conductuales, al

tiempo que optimizó el procesamiento de datos y el uso de recursos. Su implementación fortaleció significativamente la calidad metodológica del estudio y aportó mayor solidez a la interpretación de los hallazgos experimentales, consolidando un avance técnico con alto impacto en investigación preclínica.

- Los ensayos conductuales analizados con el software STUART evidenciaron que la administración oral de las cepas CRL 2013 y CRL 581 logró revertir parámetros conductuales vinculados a ansiedad y deterioro de la memoria en ratones tratados con escopolamina. Estos resultados reflejan efectos funcionales positivos sobre el comportamiento, consolidando el potencial neuroactivo de ambas cepas en modelos de disfunción cognitiva.
- Por primera vez, se analizaron los cambios en el proteoma cerebral de ratones tras la administración combinada de bacterias lácticas y escopolamina, revelando una respuesta adaptativa claramente sexo-específica. En machos, se observaron alteraciones vinculadas al tráfico vesicular, la remodelación del citoesqueleto y la recuperación de la arquitectura neuronal, mientras que en hembras predominaron procesos nucleares y transcripcionales, junto con modificaciones en el procesamiento y empalme de ARN. Estos hallazgos no solo evidencian la profundidad funcional del tratamiento, sino que subrayan la importancia de incorporar el análisis proteómico y la variable sexo en estudios de neurointervención.

Este trabajo de tesis integró herramientas innovadoras y modelos preclínicos para demostrar el potencial neuroactivo de cepas lácticas autóctonas: L. delbrueckii subsp. lactis CRL 581 y L. brevis CRL 2013. Estos probióticos inhibieron AChE con eficacia comparable al donepecilo, mostraron efectos antioxidantes e inmunomoduladores, y mejoraron parámetros conductuales en modelos de deterioro cognitivo. La respuesta sexo-específica observada en estudios in vivo y proteómicos refuerza la necesidad de enfoques personalizados. Además, el desarrollo del software STUART fortaleció la calidad metodológica, consolidando un avance técnico con alto impacto en investigación neurobiológica.

PROYECCIONES



Proyecciones

- Identificar las putativas moléculas responsables de la inhibición de AChE presentes en la fracción <3 kDa del MCB 581 mediante técnicas de espectrometría de masas (LC-MS/MS), ensayos de inhibición enzimática y modelado molecular para caracterizar la interacción específica de estas moléculas con la enzima acetilcolinesterasa.
- Evaluar el efecto de los medios condicionados en co-cultivos de microglía y neuronas para determinar si la capacidad antioxidante y antiinflamatoria observada sobre BV2 ejerce un efecto neuroprotector sobre células N2a.
- Analizar la actividad dual de la administración conjunta de *L. brevis* CRL 2013 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 en modelos murinos, evaluando posibles efectos sinérgicos sobre la función cognitiva y la modulación de la neurotransmisión colinérgica.
- Optimizar la detección de marcadores inflamatorios en hipocampo y córtex en el modelo de deterioro cognitivo inducido por escopolamina.
- Analizar el proteoma en tejidos cerebrales diferenciadas, como hipocampo y córtex, para identificar cambios asociados específicamente a estas regiones del cerebro.
- Evaluar el efecto de la administración de *L. brevis* CRL 2013 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 en modelos murinos de la EA, como por ejemplo en ratones transgénicos PDAPP-J20.

ANEXOS



Listado de enlaces de acceso a los anexos:

[ANEXO 1: Tabla DEPs proteómica ratones machos](#)

[ANEXO 2: Tabla DEPs proteómica ratones hembras](#)

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Abedin, M. M., Chourasia, R., Phukon, L. C., Sarkar, P., Ray, R. C., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2024). Lactic acid bacteria in the functional food industry: Biotechnological properties and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(29), 10730–10748. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2227896>
- Aguirre-Garcia, Y. L., Cerda-Alvarez, N. C., Santiago-Santiago, R. M., Chantre-López, A. R., Rangel-Ortega, S. D. C., & Rodríguez-Herrera, R. (2025). The Metabolites Produced by Lactic Acid Bacteria and Their Role in the Microbiota–Gut–Brain Axis. *Fermentation*, 11(7), 378. <https://doi.org/10.3390/fermentation11070378>
- Aizencang, G. I., Bishop, D. F., Forrest, D., Astrin, K. H., & Desnick, R. J. (2000). Uroporphyrinogen III Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2295–2304. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2295>
- Akbari, E., Asemi, Z., Daneshvar Kakhaki, R., Bahmani, F., Kouchaki, E., Tamtaji, O. R., Hamidi, G. A., & Salami, M. (2016). Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer’s Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00256>
- Akbarian, M., Mirzavi, F., Amirahmadi, S., Hosseini, M., Alipour, M., Feizi, H., & Rajabian, A. (2022). Amelioration of oxidative stress, cholinergic dysfunction, and neuroinflammation in scopolamine-induced amnesic rats fed with pomegranate seed. *Inflammopharmacology*, 30(3), 1021–1035. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-00971-7>
- Allegri, R. F., Butman, J., Arizaga, R. L., Machnicki, G., Serrano, C., Taragano, F. E., Sarasola, D., & Lon, L. (2007). Economic impact of dementia in developing countries: An evaluation of costs of Alzheimer-type dementia in Argentina. *International Psychogeriatrics*, 19(4), 705–718. <https://doi.org/10.1017/S1041610206003784>

- Álvarez, J., Fernández Real, J. M., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., Saenz De Pipaon, M., & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*, 44(7), 519–535. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>
- Amoah, V., Atawuchugi, P., Jibira, Y., Tandoh, A., Ossei, P. P. S., Sam, G., & Ainooson, G. (2023). *Lantana camara* leaf extract ameliorates memory deficit and the neuroinflammation associated with scopolamine-induced Alzheimer's-like cognitive impairment in zebrafish and mice. *Pharmaceutical Biology*, 61(1), 825–838. <https://doi.org/10.1080/13880209.2023.2209130>
- Andronie-Cioara, F. L., Ardelean, A. I., Nistor-Cseppento, C. D., Jurcau, A., Jurcau, M. C., Pascalau, N., & Marcu, F. (2023). Molecular Mechanisms of Neuroinflammation in Aging and Alzheimer's Disease Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1869. <https://doi.org/10.3390/ijms24031869>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Asen, N. D., & Aluko, R. E. (2022). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of antioxidant peptides obtained from enzymatic pea protein hydrolysates and their ultrafiltration peptide fractions. *Journal of Food Biochemistry*, 46(11). <https://doi.org/10.1111/jfbc.14289>
- Baker, J. L., Mark Welch, J. L., Kauffman, K. M., McLean, J. S., & He, X. (2024). The oral microbiome: Diversity, biogeography and human health. *Nature Reviews Microbiology*, 22(2), 89–104. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00963-6>
- Banks, W. A. (2012). Drug delivery to the brain in Alzheimer's disease: Consideration of the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 629–639. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.005>

- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schlöter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Berryer, M. H., Chattopadhyaya, B., Xing, P., Riebe, I., Bosoi, C., Sanon, N., Antoine-Bertrand, J., Lévesque, M., Avoli, M., Hamdan, F. F., Carmant, L., Lamarche-Vane, N., Lacaille, J.-C., Michaud, J. L., & Di Cristo, G. (2016). Decrease of SYNGAP1 in GABAergic cells impairs inhibitory synapse connectivity, synaptic inhibition and cognitive function. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms13340>
- Biedermann, L., & Rogler, G. (2015). The intestinal microbiota: Its role in health and disease. *European Journal of Pediatrics*, 174(2), 151–167. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2476-2>
- Bloom, G. S. (2014). Amyloid- β and Tau: The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis. *JAMA Neurology*, 71(4), 505. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5847>
- Bocchini, V., Mazzolla, R., Barluzzi, R., Blasi, E., Sick, P., & Kettenmann, H. (1992). An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *Journal of Neuroscience Research*, 31(4), 616–621. <https://doi.org/10.1002/jnr.490310405>
- Boeddrich, A., Haenig, C., Neuendorf, N., Blanc, E., Ivanov, A., Kirchner, M., Schleumann, P., Bayraktaroğlu, I., Richter, M., Molenda, C. M., Sporbert, A., Zenkner, M., Schnoegl, S., Suenkel, C., Schneider, L.-S., Rybak-Wolf, A., Kochnowsky, B., Byrne, L. M., Wild, E. J., ... Wanker, E. E. (2023). A proteomics analysis of 5xFAD mouse brain regions reveals the lysosome-associated protein Arl8b as a candidate biomarker for Alzheimer's disease. *Genome Medicine*, 15(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13073-023-01206-2>

- Bonacina, J., Saavedra, L., Suárez, N. E., & Sesma, F. (2014). Draft Genome Sequence of the Nonstarter Bacteriocin-Producing Strain *Enterococcus mundtii* CRL35. *Genome Announcements*, 2(3), e00444-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00444-14>
- Börner, R. A., Kandasamy, V., Axelsen, A. M., Nielsen, A. T., & Bosma, E. F. (2019). Genome editing of lactic acid bacteria: Opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FEMS Microbiology Letters*, 366(1). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny291>
- Boskey, E. R., Telsch, K. M., Whaley, K. J., Moench, T. R., & Cone, R. A. (1999). Acid Production by Vaginal Flora In Vitro Is Consistent with the Rate and Extent of Vaginal Acidification. *Infection and Immunity*, 67(10), 5170–5175. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.10.5170-5175.1999>
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 16050–16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
- Brown, L., Pingitore, E. V., Mozzi, F., Saavedra, L., Villegas, J. M., & Hebert, E. M. (2017). Lactic Acid Bacteria as Cell Factories for the Generation of Bioactive Peptides. *Protein and Peptide Letters*, 24(2), 146–155. <https://doi.org/10.2174/0929866524666161123111333>
- Busche, M. A., & Hyman, B. T. (2020). Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 23(10), 1183–1193. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0687-6>

- Buttó, L. F., & Haller, D. (2016). Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(5), 302–309.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.02.010>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Calandri, I. L., Suemoto, C. K., Allegri, R., & Equipo de Estadística e Investigación social, Agencia Nacional de Discapacidad, Argentina. (2024). A Decade-Long Analysis of Dementia Incidence in Argentina: Insights from a Public Registry Study. *Alzheimer's & Dementia*, 20(S7), e090532. <https://doi.org/10.1002/alz.090532>
- Calvaresi, E., & Bryan, J. (2001). B Vitamins, Cognition, and Aging: A Review. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences*, 56(6), P327–P339.
<https://doi.org/10.1093/geronb/56.6.P327>
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A., & Severi, C. (2015). The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology*, 28(2), 203–209.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., & Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(0).
<https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26191>
- Carlson, S. M., Soulette, C. M., Yang, Z., Elias, J. E., Brooks, A. N., & Gozani, O. (2017). RBM25 is a global splicing factor promoting inclusion of alternatively spliced exons and is itself regulated by lysine mono-methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 292(32), 13381–13390. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784371>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). Animal Behavior. In *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (pp. 39–71). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800511-8.00002-2>

- Cataldo, P. G., Villegas, J. M., Savoy de Giori, G., Saavedra, L., & Hebert, E. M. (2020). Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CRL 2013 based on carbohydrate fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108792. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108792>
- Cataldo, P. G., Villena, J., Elean, M., Savoy de Giori, G., Saavedra, L., & Hebert, E. M. (2020). Immunomodulatory Properties of a γ -Aminobutyric Acid-Enriched Strawberry Juice Produced by *Levilactobacillus brevis* CRL 2013. *Frontiers in Microbiology*, 11, 610016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.610016>
- Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provati, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U. P., Paghera, B., Muscio, C., Bianchetti, A., Volta, G. D., Turla, M., Cotelli, M. S., Gennuso, M., Prella, A., Zanetti, O., Lussignoli, G., Mirabile, D., ... Frisoni, G. B. (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiology of Aging*, 49, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019>
- Chakrabarty, P., Jansen-West, K., Beccard, A., Ceballos-Diaz, C., Levites, Y., Verbeeck, C., Zubair, A. C., Dickson, D., Golde, T. E., & Das, P. (2010). Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses A β deposition *in vivo*: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *The FASEB Journal*, 24(2), 548–559. <https://doi.org/10.1096/fj.09-141754>
- Chen, P.-C., Han, X., Shaw, T. I., Fu, Y., Sun, H., Niu, M., Wang, Z., Jiao, Y., Teubner, B. J. W., Eddins, D., Beloate, L. N., Bai, B., Mertz, J., Li, Y., Cho, J.-H., Wang, X., Wu, Z., Liu, D., Poudel, S., ... Peng, J. (2022). Alzheimer's disease-associated U1 snRNP splicing dysfunction causes neuronal hyperexcitability and cognitive impairment. *Nature Aging*, 2(10), 923–940. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00290-0>

- Cheon, S. Y., Koo, B.-N., Kim, S. Y., Kam, E. H., Nam, J., & Kim, E. J. (2021). Scopolamine promotes neuroinflammation and delirium-like neuropsychiatric disorder in mice. *Scientific Reports*, 11(1), 8376. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87790-y>
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>
- Choi, Y. J., Yang, H. S., Jo, J. H., Lee, S. C., Park, T. Y., Choi, B. S., Seo, K. S., & Huh, C. K. (2015). Anti-Amnesic Effect of Fermented *Ganoderma lucidum* Water Extracts by Lactic Acid Bacteria on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats. *Preventive Nutrition and Food Science*, 20(2), 126–132. <https://doi.org/10.3746/pnf.2015.20.2.126>
- 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>
- Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 735–742. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2876>
- Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Correia, A. S., & Vale, N. (2022). Tryptophan Metabolism in Depression: A Narrative Review with a Focus on Serotonin and Kynurenine Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8493. <https://doi.org/10.3390/ijms23158493>
- Coyle, J. T., Price, D. L., & DeLong, M. R. (1983). Alzheimer's Disease: A Disorder of Cortical Cholinergic Innervation. *Science*, 219(4589), 1184–1190. <https://doi.org/10.1126/science.6338589>

- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(10), 701–712.
<https://doi.org/10.1038/nrn3346>
- Cui, B., Zhang, S., Wang, Y., & Guo, Y. (2019). Farrerol attenuates β -amyloid-induced oxidative stress and inflammation through Nrf2/Keap1 pathway in a microglia cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 112–119.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.053>
- Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Baker, L. K., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2002). Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32046–32053.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M201750200>
- Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., & Verbeke, K. (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(8), 461–478. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>
- De, D., Mukherjee, I., Guha, S., Paidi, R. K., Chakrabarti, S., Biswas, S. C., & Bhattacharyya, S. N. (2021). Rheb-mTOR activation rescues A β -induced cognitive impairment and memory function by restoring miR-146 activity in glial cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 24, 868–887. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.04.008>
- De La Monte, S. M., & Tong, M. (2024). Dysregulated mTOR networks in experimental sporadic Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, 1432359.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1432359>
- De Ramon Francàs, G., Alther, T., & Stoeckli, E. T. (2017). Calsyntenins Are Expressed in a Dynamic and Partially Overlapping Manner during Neural Development. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 76. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00076>

- Del Prete, D., Checler, F., & Chami, M. (2014). Ryanodine receptors: Physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Molecular Neurodegeneration*, 9(1), 21.
<https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-21>
- Deng, C.-M., Liu, S.-X., Huang, C.-H., Pang, J.-Y., & Lin, Y.-C. (2013). Secondary Metabolites of a Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus terreus* (No. GX7-3B) from the South China Sea. *Marine Drugs*, 11(7), 2616–2624. <https://doi.org/10.3390/md11072616>
- Di Bona, D., Plaia, A., Vasto, S., Cavallone, L., Lescai, F., Franceschi, C., Licastro, F., Colonna-Romano, G., Lio, D., Candore, G., & Caruso, C. (2008). Association between the interleukin-1 β polymorphisms and Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Brain Research Reviews*, 59(1), 155–163.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.07.003>
- Dinan, T. G., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. *Biological Psychiatry*, 74(10), 720–726.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001>
- Dioguardi, M., Crincoli, V., Laino, L., Alovise, M., Sovereto, D., Mastrangelo, F., Lo Russo, L., & Lo Muzio, L. (2020). The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 495. <https://doi.org/10.3390/jcm9020495>
- Djelti, F., Braudeau, J., Hudry, E., Dhenain, M., Varin, J., Bièche, I., Marquer, C., Chali, F., Ayciriex, S., Auzeil, N., Alves, S., Langui, D., Potier, M.-C., Laprevote, O., Vidaud, M., Duyckaerts, C., Miles, R., Aubourg, P., & Cartier, N. (2015). CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain*, 138(8), 2383–2398. <https://doi.org/10.1093/brain/awv166>
- Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L. J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M. I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., ... Potempa, J. (2019).

- Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*, 5(1), eaau3333.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>
- Dulewicz, M., Kulczyńska-Przybik, A., Borawska, R., Slowik, A., & Mroczko, B. (2023). The neuronal pentraxin receptor (NPTXR) as a candidate biomarker of synaptic dysfunction in mild cognitive impairment. *Alzheimer's & Dementia*, 19(S2).
<https://doi.org/10.1002/alz.063018>
- Elean, M., Albarracín, L., Cataldo, P. G., Londero, A., Kitazawa, H., Saavedra, L., Villena, J., & Hebert, E. M. (2020). New immunobiotics from highly proteolytic *Lactobacillus delbrueckii* strains: Their impact on intestinal antiviral innate immune response. *Beneficial Microbes*, 11(4), 375–390. <https://doi.org/10.3920/BM2019.0198>
- Elean, M., Albarracín, L., Fukuyama, K., Zhou, B., Tomokiyo, M., Kitahara, S., Araki, S., Suda, Y., Saavedra, L., Villena, J., Hebert, E. M., & Kitazawa, H. (2021). *Lactobacillus delbrueckii* CRL 581 Differentially Modulates TLR3-Triggered Antiviral Innate Immune Response in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages. *Microorganisms*, 9(12), 2449.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9122449>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Emery, D. C., Davies, M., Cerajewska, T. L., Taylor, J., Hazell, M., Paterson, A., Allen-Birt, S. J., & West, N. X. (2022). High resolution 16S rRNA gene Next Generation Sequencing study of brain areas associated with Alzheimer's and Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 1026260. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1026260>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59.
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)

- Espeche Turbay, M. B., De Moreno De LeBlanc, A., Perdigón, G., Savoy De Giori, G., & Hebert, E. M. (2012). β -Casein hydrolysate generated by the cell envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* CRL 581 protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1108–1118. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4735>
- Eva, R., Crisp, S., Marland, J. R. K., Norman, J. C., Kanamarlapudi, V., ffrench-Constant, C., & Fawcett, J. W. (2012). ARF6 Directs Axon Transport and Traffic of Integrins and Regulates Axon Growth in Adult DRG Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 32(30), 10352–10364. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1409-12.2012>
- Ewins, A. J. (1914). Acetylcholine, a New Active Principle of Ergot. *Biochemical Journal*, 8(1), 44–49. <https://doi.org/10.1042/bj0080044>
- Flynn, J. M., & Melov, S. (2013). SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027>
- Forsythe, P., Bienenstock, J., & Kunze, W. A. (2014). Vagal Pathways for Microbiome-Brain-Gut Axis Communication. In M. Lyte & J. F. Cryan (Eds.), *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease* (Vol. 817, pp. 115–133). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_5
- Foster, J., & Zhou, L. (Linda). (2015). Psychobiotics and the gut–brain axis: In the pursuit of happiness. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 715. <https://doi.org/10.2147/NDT.S61997>
- Foyet, H. S., Keugong Wado, E., Ngatanko Abaïssou, H. H., Assongalem, E. A., & Eyong, O. K. (2019). Anticholinesterase and Antioxidant Potential of Hydromethanolic Extract of *Ziziphus mucronata* (Rhamnaceae) Leaves on Scopolamine-Induced Memory and Cognitive Dysfunctions in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/4568401>

- Fu, Y., & Jia, J. (2021). Isoliquiritigenin Confers Neuroprotection and Alleviates Amyloid- β 42-Induced Neuroinflammation in Microglia by Regulating the Nrf2/NF- κ B Signaling. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 638772. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.638772>
- 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>
- GEM Project Research Consortium, Turpin, W., Espin-Garcia, O., Xu, W., Silverberg, M. S., Kevans, D., Smith, M. I., Guttman, D. S., Griffiths, A., Panaccione, R., Otley, A., Xu, L., Shestopaloff, K., Moreno-Hagelsieb, G., Paterson, A. D., & Croitoru, K. (2016). Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nature Genetics*, 48(11), 1413–1417. <https://doi.org/10.1038/ng.3693>
- Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: Insights into their role in health and disease. *Human Genetics*, 135(8), 851–867. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5>
- Geula, C., Dunlop, S. R., Ayala, I., Kawles, A. S., Flanagan, M. E., Gefen, T., & Mesulam, M. (2021). Basal forebrain cholinergic system in the dementias: Vulnerability, resilience, and resistance. *Journal of Neurochemistry*, 158(6), 1394–1411. <https://doi.org/10.1111/jnc.15471>
- Gosztyla, M. L., Brothers, H. M., & Robinson, S. R. (2018). Alzheimer's Amyloid- β is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(4), 1495–1506. <https://doi.org/10.3233/JAD-171133>
- Green, R., Allen, L. H., Bjørke-Monsen, A.-L., Brito, A., Guéant, J.-L., Miller, J. W., Molloy, A. M., Nexø, E., Stabler, S., Toh, B.-H., Ueland, P. M., & Yajnik, C. (2017). Vitamin B12 deficiency. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17040. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.40>

- Gulesserian, T., Hwan Kim, S., Fountoulakis, M., & Lubec, G. (2002). Aberrant Expression of Centractin and Capping Proteins, Integral Constituents of the Dynactin Complex, in Fetal Down Syndrome Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(1), 62–67. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6389>
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., & M. Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*, 14(1), 101–115. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666150716165726>
- Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(7), 1917–1933. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
- Haran, J. P., & McCormick, B. A. (2021). Aging, Frailty, and the Microbiome—How Dysbiosis Influences Human Aging and Disease. *Gastroenterology*, 160(2), 507–523. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.060>
- Harper, K. M., Hiramoto, T., Tanigaki, K., Kang, G., Suzuki, G., Trimble, W., & Hiroi, N. (2012). Alterations of social interaction through genetic and environmental manipulation of the 22q11.2 gene Sept5 in the mouse brain. *Human Molecular Genetics*, 21(15), 3489–3499. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds180>
- He, X.-Y., Dobkin, C., & Yang, S.-Y. (2019). 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases and neurosteroid metabolism in the central nervous system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 489, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.10.002>
- He, X.-Y., Frackowiak, J., Dobkin, C., Brown, W. T., & Yang, S.-Y. (2023). Involvement of Type 10 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Pathogenesis of Infantile Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17604. <https://doi.org/10.3390/ijms242417604>

- Hebert, E. M., De Giori, G. S., & Mozzi, F. (2015). Nutraceuticals and High Value Metabolites Produced by Lactic Acid Bacteria. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* (1st ed., pp. 297–313). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9781118868386.ch18>
- Hebert, E. M., De Giori, G. S., & Raya, R. R. (2001). Isolation and Characterization of a Slowly Milk-Coagulating Variant of *Lactobacillus helveticus* Deficient in Purine Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1846–1850.
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1846-1850.2001>
- Hebert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P., & Addeo, F. (2008). Characterization of the pattern of alphas1- and beta-casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CRL 581. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3682–3689.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00247-08>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhatsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Henn, A. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*, 83–94.
<https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

- Hoffmann, A. R., Proctor, L. M., Surette, M. G., & Suchodolski, J. S. (2016). The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Veterinary Pathology*, 53(1), 10–21.
<https://doi.org/10.1177/0300985815595517>
- Holleran, E. A., Tokito, M. K., Karki, S., & Holzbaur, E. L. (1996). Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. *The Journal of Cell Biology*, 135(6), 1815–1829.
<https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1815>
- Honda, K., & Littman, D. R. (2012). The Microbiome in Infectious Disease and Inflammation. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 759–795. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074937>
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Hu, X., Mckenzie, C.-A., Smith, C., Haas, J. G., & Lathe, R. (2023). *The remarkable complexity of the brain microbiome in health and disease*.
<https://doi.org/10.1101/2023.02.06.527297>
- Irintchev, A., Rollenhagen, A., Troncoso, E., Kiss, J. Z., & Schachner, M. (2005). Structural and Functional Aberrations in the Cerebral Cortex of Tenascin-C Deficient Mice. *Cerebral Cortex*, 15(7), 950–962. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh195>
- Ismail, R., Parbo, P., Madsen, L. S., Hansen, A. K., Hansen, K. V., Schaldemose, J. L., Kjeldsen, P. L., Stokholm, M. G., Gottrup, H., Eskildsen, S. F., & Brooks, D. J. (2020). The relationships between neuroinflammation, beta-amyloid and tau deposition in Alzheimer's disease: A longitudinal PET study. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01820-6>

- Jakobsson, J., Ackermann, F., Andersson, F., Larhammar, D., Löw, P., & Brodin, L. (2011). Regulation of Synaptic Vesicle Budding and Dynamin Function by an EHD ATPase. *The Journal of Neuroscience*, 31(39), 13972–13980.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1289-11.2011>
- Jenkins, T., Nguyen, J., Polglaze, K., & Bertrand, P. (2016). Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients*, 8(1), 56. <https://doi.org/10.3390/nu8010056>
- Jeong, S. (2017). SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA. *Molecules and Cells*, 40(1), 1–9. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2319>
- Kacher, R., Lamazière, A., Heck, N., Kappes, V., Mounier, C., Despres, G., Dembitskaya, Y., Perrin, E., Christaller, W., Sasidharan Nair, S., Messent, V., Cartier, N., Vanhoutte, P., Venance, L., Saudou, F., Néri, C., Caboche, J., & Betuing, S. (2019). CYP46A1 gene therapy deciphers the role of brain cholesterol metabolism in Huntington's disease. *Brain*, 142(8), 2432–2450. <https://doi.org/10.1093/brain/awz174>
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., & Núñez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*, 14(7), 685–690.
<https://doi.org/10.1038/ni.2608>
- Kennedy, M. S., & Chang, E. B. (2020). The microbiome: Composition and locations. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 176, pp. 1–42). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.08.013>
- Khushboo, Karnwal, A., & Malik, T. (2023). Characterization and selection of probiotic lactic acid bacteria from different dietary sources for development of functional foods. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1170725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1170725>
- Kikuchi, K., Sakamoto, Y., Uezu, A., Yamamoto, H., Ishiguro, K., Shimamura, K., Saito, T., Hisanaga, S., & Nakanishi, H. (2022). Map7D2 and Map7D1 facilitate microtubule

- stabilization through distinct mechanisms in neuronal cells. *Life Science Alliance*, 5(8), e202201390. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201390>
- Kikuchi, M., Viet, J., Nagata, K., Sato, M., David, G., Audic, Y., Silverman, M. A., Yamamoto, M., Akatsu, H., Hashizume, Y., Chiba, K., Takeda, S., Akamine, S., Miyamoto, T., Uozumi, R., Gotoh, S., Mori, K., Ikeda, M., Paillard, L., & Morihara, T. (2022). *An Alzheimer's disease pathway uncovered by functional omics: The risk gene CELF1 regulates KLC1 splice variant E expression, which drives Aβ pathology*. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/2022.02.28.22271320>
- Kikuchi, M., Viet, J., Nagata, K., Sato, M., David, G., Audic, Y., Silverman, M. A., Yamamoto, M., Akatsu, H., Hashizume, Y., Takeda, S., Akamine, S., Miyamoto, T., Uozumi, R., Gotoh, S., Mori, K., Ikeda, M., Paillard, L., & Morihara, T. (2024). Gene-gene functional relationships in Alzheimer's disease: CELF1 regulates KLC1 alternative splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 721, 150025. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150025>
- Kim, C.-S., Cha, L., Sim, M., Jung, S., Chun, W. Y., Baik, H. W., & Shin, D.-M. (2021). Probiotic Supplementation Improves Cognitive Function and Mood with Changes in Gut Microbiota in Community-Dwelling Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial. *The Journals of Gerontology: Series A*, 76(1), 32–40. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa090>
- Kim, H., Jung, H., Jung, H., Kwon, S.-K., Ko, J., & Um, J. W. (2020). The small GTPase ARF6 regulates GABAergic synapse development. *Molecular Brain*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0543-3>
- Kim, H.-G., Berdasco, C., Nairn, A. C., & Kim, Y. (2025). The WAVE complex in developmental and adulthood brain disorders. *Experimental & Molecular Medicine*, 57(1), 13–29. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01386-w>

- Kim, W.-G., Song, N.-K., & Yoo, I.-D. (2001). Quinolactacins A1 and A2, New Acetylcholinesterase Inhibitors from *Penicillium citrinum*. *The Journal of Antibiotics*, 54(10), 831–835. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.54.831>
- Ko, Y. K., Kim, E., Lee, E.-J., Nam, S. J., Kim, Y., Kim, S., Choi, S.-Y., Kim, H. Y., & Choi, Y. (2024). Enrichment of infection-associated bacteria in the low biomass brain bacteriota of Alzheimer's disease patients. *PLOS ONE*, 19(2), e0296307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296307>
- Koskeridis, F., Fancy, N., Tan, P. F., Meena, D., Evangelou, E., Elliott, P., Wang, D., Matthews, P. M., Dehghan, A., & Tzoulaki, I. (2024). Multi-trait association analysis reveals shared genetic loci between Alzheimer's disease and cardiovascular traits. *Nature Communications*, 15(1), 9827. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53452-6>
- Kreis, P., & Barnier, J.-V. (2009). PAK signalling in neuronal physiology. *Cellular Signalling*, 21(3), 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.11.001>
- Kriss, M., Hazleton, K. Z., Nusbacher, N. M., Martin, C. G., & Lozupone, C. A. (2018). Low diversity gut microbiota dysbiosis: Drivers, functional implications and recovery. *Current Opinion in Microbiology*, 44, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.003>
- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*, 8(11), 1424. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>
- Kumar, A., Singh, A., & Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>
- Kurokawa, T., Suzuki, K., Hayaoka, T., Nakagawa, T., Izawa, T., Kobayashi, M., & Harada, N. (1993). Cyclophostin, acetylcholinesterase inhibitor from *Streptomyces lavendulae*.

- The Journal of Antibiotics*, 46(8), 1315–1318.
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1315>
- Lagisetty, Y., Bourquard, T., Al-Ramahi, I., Mangleburg, C. G., Mota, S., Soleimani, S., Shulman, J. M., Botas, J., Lee, K., & Lichtarge, O. (2022). Identification of risk genes for Alzheimer's disease by gene embedding. *Cell Genomics*, 2(9), 100162.
<https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100162>
- Largo-Barrientos, P., Apóstolo, N., Creemers, E., Callaerts-Vegh, Z., Swerts, J., Davies, C., McInnes, J., Wierda, K., De Strooper, B., Spires-Jones, T., De Wit, J., Uytterhoeven, V., & Verstreken, P. (2021). Lowering Synaptogyrin-3 expression rescues Tau-induced memory defects and synaptic loss in the presence of microglial activation. *Neuron*, 109(5), 767-777.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.12.016>
- Latorre-Leal, M., Rodriguez-Rodriguez, P., Franchini, L., Nikolidakis, O., Daniilidou, M., Delac, L., Varshney, M. K., Arroyo-García, L. E., Erol, F., Winblad, B., Blennow, K., Zetterberg, H., Kivipelto, M., Pacciarini, M., Wang, Y., Griffiths, W. J., Björkhem, I., Matton, A., Nalvarte, I., ... Maioli, S. (2024). CYP46A1-mediated cholesterol turnover induces sex-specific changes in cognition and counteracts memory loss in ovariectomized mice. *Science Advances*, 10(4). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adj1354>
- Lee, J., Yang, W., Hostetler, A., Schultz, N., Suckow, M. A., Stewart, K. L., Kim, D. D., & Kim, H. S. (2016). Characterization of the anti-inflammatory *Lactobacillus reuteri* BM36301 and its probiotic benefits on aged mice. *BMC Microbiology*, 16(1), 69.
<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0686-7>
- Lee, J.-H., & Lee, J. (2010). Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 426–444. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x>
- Lee, Y.-L., Kung, F.-C., Lin, C.-H., & Huang, Y.-S. (2020). CMTR1-Catalyzed 2'-O-Ribose Methylation Controls Neuronal Development by Regulating Camk2α Expression

- Independent of RIG-I Signaling. *Cell Reports*, 33(3), 108269.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108269>
- Lehrer, S., & Rheinstein, P. H. (2024). RPTOR Is an Alzheimer's Disease Susceptibility Gene Associated with the Risk Factors Body Mass Index and Infectious Encephalitis. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 8(1), 715–721. <https://doi.org/10.3233/ADR-230185>
- Leng, F., & Edison, P. (2021a). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17(3), 157–172.
<https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Leng, F., & Edison, P. (2021b). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17(3), 157–172.
<https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaïss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 219–232.
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>
- Li, D., Wang, Q., Bayat, A., Battig, M. R., Zhou, Y., Bosch, D. G. M., Van Haaften, G., Granger, L., Petersen, A. K., Pérez-Jurado, L. A., Aznar-Lain, G., Aneja, A., Hancarova, M., Bendova, S., Schwarz, M., Kremlikova Pourova, R., Sedlacek, Z., Keena, B. A., March, M. E., ... Hakonarson, H. (2024). Spliceosome malfunction causes neurodevelopmental disorders with overlapping features. *Journal of Clinical Investigation*, 134(1), e171235.
<https://doi.org/10.1172/JCI171235>
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y. (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-85>
- Li, S.-P., Wang, Y.-W., Qi, S.-L., Zhang, Y.-P., Deng, G., Ding, W.-Z., Ma, C., Lin, Q.-Y., Guan, H.-D., Liu, W., Cheng, X.-M., & Wang, C.-H. (2018). Analogous β -Carboline Alkaloids Harmaline and Harmine Ameliorate Scopolamine-Induced Cognition Dysfunction by

- Attenuating Acetylcholinesterase Activity, Oxidative Stress, and Inflammation in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 346. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00346>
- Li, X., Ji, M., Zhang, H., Liu, Z., Chai, Y., Cheng, Q., Yang, Y., Cordato, D., & Gao, J. (2023). Non-drug Therapies for Alzheimer's Disease: A Review. *Neurology and Therapy*, 12(1), 39–72. <https://doi.org/10.1007/s40120-022-00416-x>
- Lim, B., Sando, S. B., Grøntvedt, G. R., Bråthen, G., & Diamandis, E. P. (2020). Cerebrospinal fluid neuronal pentraxin receptor as a biomarker of long-term progression of Alzheimer's disease: A 24-month follow-up study. *Neurobiology of Aging*, 93, 97.e1-97.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.03.013>
- Liu, A. K. L., Chang, R. C.-C., Pearce, R. K. B., & Gentleman, S. M. (2015). Nucleus basalis of Meynert revisited: Anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 129(4), 527–540. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1392-5>
- Liu, P.-P., Xie, Y., Meng, X.-Y., & Kang, J.-S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 29. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>
- Liu, Z., Ling, Y., Peng, Y., Han, S., Ren, Y., Jing, Y., Fan, W., Su, Y., Mu, C., & Zhu, W. (2023). Regulation of serotonin production by specific microbes from piglet gut. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00903-7>
- Long, S. W., Ooi, J. Y. Y., Yau, P. M., & Jones, P. L. (2011). A brain-derived MeCP2 complex supports a role for MeCP2 in RNA processing. *Bioscience Reports*, 31(5), 333–343. <https://doi.org/10.1042/bsr20100124>
- Lotti, M. (1995). Cholinesterase inhibition: Complexities in interpretation. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1814–1818. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.12.1814>

- Low, Y.-H., Asi, Y., Foti, S. C., & Lashley, T. (2021). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins: Implications in Neurological Diseases. *Molecular Neurobiology*, 58(2), 631–646. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02137-4>
- Ma, B., Forney, L. J., & Ravel, J. (2012). Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 371–389. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150157>
- Maezawa, I., Zimin, P. I., Wulff, H., & Jin, L.-W. (2011). Amyloid- β Protein Oligomer at Low Nanomolar Concentrations Activates Microglia and Induces Microglial Neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3693–3706. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.135244>
- Man, W. H., De Steenhuijsen Pijters, W. A. A., & Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 259–270. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14>
- Margoob, M., Kouser, S., & Jan, N. (2024). Serotonin: The Link between Gut Microbiome and Brain. In *Serotonin—Neurotransmitter and Hormone of Brain, Bowels and Blood [Working Title]*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1003826>
- Massaad, C. A., Washington, T. M., Pautler, R. G., & Klann, E. (2009). Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13576–13581. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902714106>
- McInnes, J., Wierda, K., Snellinx, A., Bounti, L., Wang, Y.-C., Stancu, I.-C., Apóstolo, N., Gevaert, K., Dewachter, I., Spires-Jones, T. L., De Strooper, B., De Wit, J., Zhou, L., & Verstreken, P. (2018). Synaptogyrin-3 Mediates Presynaptic Dysfunction Induced by Tau. *Neuron*, 97(4), 823–835.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.022>
- Meyer-Luehmann, M., Spires-Jones, T. L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., De Calignon, A., Rozkalne, A., Koenigsknecht-Talboo, J., Holtzman, D. M., Bacskai, B. J., & Hyman, B. T.

- (2008). Rapid appearance and local toxicity of amyloid- β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 451(7179), 720–724.
<https://doi.org/10.1038/nature06616>
- Milligan, T. W., Doran, T. I., Straus, D. C., & Mattingly, S. J. (1978). Growth and Amino Acid Requirements of Various Strains of Group B Streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(1), 28–33. <https://doi.org/10.1128/jcm.7.1.28-33.1978>
- Mohamed, A., Saavedra, L., Di Pardo, A., Sipione, S., & Posse De Chaves, E. (2012). β -Amyloid Inhibits Protein Prenylation and Induces Cholesterol Sequestration by Impairing SREBP-2 Cleavage. *The Journal of Neuroscience*, 32(19), 6490–6500.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0630-12.2012>
- Molina, V. C., Médici, M., Taranto, M. P., & Font De Valdez, G. (2009). *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 prevents side effects produced by a nutritional vitamin B₁₂ deficiency. *Journal of Applied Microbiology*, 106(2), 467–473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04014.x>
- Mondal, P., Gupta, V., Das, G., Pradhan, K., Khan, J., Gharai, P. K., & Ghosh, S. (2018). Peptide-Based Acetylcholinesterase Inhibitor Crosses the Blood-Brain Barrier and Promotes Neuroprotection. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(11), 2838–2848.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00253>
- Moné, Y., Earl, J. P., Król, J. E., Ahmed, A., Sen, B., Ehrlich, G. D., & Lapidés, J. R. (2023). Evidence supportive of a bacterial component in the etiology for Alzheimer's disease and for a temporal-spatial development of a pathogenic microbiome in the brain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1123228.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1123228>
- Moon, G. J., Shin, M., & Kim, S. R. (2020). Upregulation of Neuronal Rheb(S16H) for Hippocampal Protection in the Adult Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms21062023>

- Moore, E., Mander, A., Ames, D., Carne, R., Sanders, K., & Watters, D. (2012). Cognitive impairment and vitamin B12: A review. *International Psychogeriatrics*, 24(4), 541–556.
<https://doi.org/10.1017/S1041610211002511>
- Mori, F., Nishie, M., Piao, Y. -S., Kito, K., Kamitani, T., Takahashi, H., & Wakabayashi, K. (2005). Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 31(1), 53–61.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00603.x>
- Moss, D. E. (2020). Improving Anti-Neurodegenerative Benefits of Acetylcholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease: Are Irreversible Inhibitors the Future? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3438. <https://doi.org/10.3390/ijms21103438>
- Mrak, R. E., Sheng, J. G., & Griffin, W. S. T. (1995). Glial cytokines in Alzheimer's disease: Review and pathogenic implications. *Human Pathology*, 26(8), 816–823.
[https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90001-2)
- Murao, S., & Hayashi, H. (1986). Physostigmine and N8-norphysostigmine, insecticidal compounds, from *Streptomyces* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(2), 523–524. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.50.523>
- Nguyen, L. D. N., Viscogliosi, E., & Delhaes, L. (2015). The lung mycobiome: An emerging field of the human respiratory microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 6.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00089>
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science*, 336(6086), 1262–1267.
<https://doi.org/10.1126/science.1223813>
- Nimgampalle, M. (2017). Anti-Alzheimer Properties of Probiotic, *Lactobacillus plantarum* MTCC 1325 in Alzheimer's Disease induced Albino Rats. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/26106.10428>

- Nordengen, K., Kirsebom, B.-E., Henjum, K., Selnes, P., Gísladóttir, B., Wettergreen, M., Torsetnes, S. B., Grøntvedt, G. R., Waterloo, K. K., Aarsland, D., Nilsson, L. N. G., & Fladby, T. (2019). Glial activation and inflammation along the Alzheimer's disease continuum. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1399-2>
- Ogura, H., Kosasa, T., Kuriya, Y., & Yamanishi, Y. (2000). Comparison of inhibitory activities of donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in vitro. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 22(8), 609. <https://doi.org/10.1358/mf.2000.22.8.701373>
- Ohlendorf, B., Schulz, D., Erhard, A., Nagel, K., & Imhoff, J. F. (2012). Geranylphenazinediol, an Acetylcholinesterase Inhibitor Produced by a *Streptomyces* Species. *Journal of Natural Products*, 75(7), 1400–1404. <https://doi.org/10.1021/np2009626>
- O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, 277, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>
- Orfali, R., Alwatban, A. Z., Orfali, R. S., Lau, L., Chea, N., Alotaibi, A. M., Nam, Y.-W., & Zhang, M. (2024). Oxidative stress and ion channels in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Physiology*, 15, 1320086. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1320086>
- O'Riordan, K. J., Aburto, M. R., Nagpal, J., Clarke, G., & Cryan, J. F. (2025). Microbiome: A Key Regulator of Body-Brain Interactions. In D. Tropea & E. Giacometti (Eds.), *Brain-Body Connections* (Vol. 1477, pp. 139–203). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-89525-8_6
- Oulès, B., Del Prete, D., Greco, B., Zhang, X., Lauritzen, I., Sevalle, J., Moreno, S., Paterlini-Bréchet, P., Trebak, M., Checler, F., Benfenati, F., & Chami, M. (2012). Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid- β Load and Memory Impairments in Tg2576

- Mouse Model of Alzheimer Disease. *The Journal of Neuroscience*, 32(34), 11820–11834. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0875-12.2012>
- Pandey, S., Sree, A., Sethi, D., Kumar, C., Kakollu, S., Chowdhury, L., & Dash, S. (2014). A marine sponge associated strain of *Bacillus subtilis* and other marine bacteria can produce anticholinesterase compounds. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-24>
- Pang, S., Ren, Z., Ding, H., & Chan, P. (2026). Short-chain fatty acids mediate enteric and central nervous system homeostasis in Parkinson's disease: Innovative therapies and their translation. *Neural Regeneration Research*, 21(3), 938–956. <https://doi.org/10.4103/NRR.NRR-D-24-01265>
- Paroni, G., Bisceglia, P., & Seripa, D. (2019). Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 68(2), 493–510. <https://doi.org/10.3233/JAD-180802>
- Pessione, E., & Cirrincione, S. (2016). Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00876>
- Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., & Núñez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews*, 279(1), 70–89. <https://doi.org/10.1111/imr.12567>
- Raboni, S., Bettati, S., & Mozzarelli, A. (2009). Tryptophan synthase: A mine for enzymologists. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(14), 2391–2403. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0028-0>
- Rahimzadegan, M., Department of Toxicology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran., Soodi, M., & Department of Toxicology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. (2018). Comparison of Memory Impairment and Oxidative Stress Following Single or Repeated Doses Administration of

- Scopolamine in Rat Hippocampus. *Basic and Clinical Neuroscience Journal*, 9(1), 5–14.
<https://doi.org/10.29252/nirp.bcn.9.1.5>
- Ramírez-Labrada, A. G., Isla, D., Artal, A., Arias, M., Rezusta, A., Pardo, J., & Gálvez, E. M. (2020). The Influence of Lung Microbiota on Lung Carcinogenesis, Immunity, and Immunotherapy. *Trends in Cancer*, 6(2), 86–97.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.12.007>
- Reid, G. (2016). Probiotics: Definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17–25.
<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.12.001>
- Reid, K. M., & Brown, G. C. (2023). LRPAP1 is released from activated microglia and inhibits microglial phagocytosis and amyloid beta aggregation. *Frontiers in Immunology*, 14, 1286474. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1286474>
- Reynoso-García, J., Miranda-Santiago, A. E., Meléndez-Vázquez, N. M., Acosta-Pagán, K., Sánchez-Rosado, M., Díaz-Rivera, J., Rosado-Quñones, A. M., Acevedo-Márquez, L., Cruz-Roldán, L., Tosado-Rodríguez, E. L., Figueroa-Gispert, M. D. M., & Godoy-Vitorino, F. (2022). A complete guide to human microbiomes: Body niches, transmission, development, dysbiosis, and restoration. *Frontiers in Systems Biology*, 2, 951403.
<https://doi.org/10.3389/fsysb.2022.951403>
- Rigter, P. M. F., De Konink, C., & Van Woerden, G. M. (2023). Loss of CAMK2G affects intrinsic and motor behavior but has minimal impact on cognitive behavior. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 1086994. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1086994>
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(0). <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>

- Rojas, G., Bartoloni, L., Dillon, C., Serrano, C. M., Iturry, M., & Allegri, R. F. (2011). Clinical and economic characteristics associated with direct costs of Alzheimer's, frontotemporal and vascular dementia in Argentina. *International Psychogeriatrics*, 23(4), 554–561. <https://doi.org/10.1017/S1041610210002012>
- Rosenberg, E. (2024). Diversity of bacteria within the human gut and its contribution to the functional unity of holobionts. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 10(1), 134. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00580-y>
- Rowatt, E. (1948). The Relation of Pantothenic Acid to Acetylcholine Formation by a Strain of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of General Microbiology*, 2(1), 25–30. <https://doi.org/10.1099/00221287-2-1-25>
- Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y., & Tao, F. (2016). The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: A systematic review. *BMC Gastroenterology*, 16(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0498-0>
- Saavedra, L., Mohamed, A., Ma, V., Kar, S., & De Chaves, E. P. (2007). Internalization of β -Amyloid Peptide by Primary Neurons in the Absence of Apolipoprotein E. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35722–35732. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701823200>
- Salamon, I., Park, Y., Miškić, T., Kopic, J., Matteson, P., Page, N. F., Roque, A., McAuliffe, G. W., Favate, J., Garcia-Forn, M., Shah, P., Judaš, M., Millonig, J. H., Kostović, I., De Rubeis, S., Hart, R. P., Krsnik, Ž., & Rasin, M.-R. (2023). Celf4 controls mRNA translation underlying synaptic development in the prenatal mammalian neocortex. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41730-8>
- Salazar, P. B., De Athayde Moncorvo Collado, A., Canal-Martínez, V., & Minahk, C. J. (2017). Differential inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by polyphenols epigallocatechin-3-gallate and resveratrol. Relevance of the membrane-bound form. *BioFactors*, 43(1), 73–81. <https://doi.org/10.1002/biof.1322>

- Salim, S., Hussain, S., Banu, A., Gowda, S. B. M., Ahammad, F., Alwa, A., Pasha, M., & Mohammad, F. (2023). The ortholog of human ssDNA-binding protein SSBP3 influences neurodevelopment and autism-like behaviors in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Biology*, 21(7), e3002210. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002210>
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
- Salvucci, E., Saavedra, L., Hebert, E. M., Haro, C., & Sesma, F. (2012). Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(1), 68–74. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0972>
- Salvucci, E., Saavedra, L., & Sesma, F. (2007). Short peptides derived from the NH₂-terminus of subclass IIa bacteriocin enterocin CRL35 show antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1102–1108. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm096>
- 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>
- Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D. J., & Klaenhammer, T. R. (2018). Shared mechanisms among probiotic taxa: Implications for general probiotic claims. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.09.007>

- Santello, M., Toni, N., & Volterra, A. (2019). Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nature Neuroscience*, 22(2), 154–166.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0325-8>
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, 30(3), 350–358. <https://doi.org/10.1002/mds.26069>
- Scott, A. I., & Roessner, C. A. (2002). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12). *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 613–620. <https://doi.org/10.1042/bst0300613>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Seminotti, B., Brondani, M., Ribeiro, R. T., Leipnitz, G., & Wajner, M. (2022). Disturbance of Mitochondrial Dynamics, Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Crosstalk, Redox Homeostasis, and Inflammatory Response in the Brain of Glutaryl-CoA Dehydrogenase-Deficient Mice: Neuroprotective Effects of Bezafibrate. *Molecular Neurobiology*, 59(8), 4839–4853. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02887-3>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, 14(8), e1002533.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Senejani, A. G., Maghsoudlou, J., El-Zohiry, D., Gaur, G., Wawrzoniak, K., Caravaglia, C., Khatri, V. A., MacDonald, A., & Sapi, E. (2022). *Borrelia burgdorferi* Co-Localizing with Amyloid Markers in Alzheimer's Disease Brain Tissues. *Journal of Alzheimer's Disease*, 85(2), 889–903. <https://doi.org/10.3233/JAD-215398>

- Shahani, N., Huang, W.-C., Varnum, M., Page, D. T., & Subramaniam, S. (2017). Forebrain depletion of Rheb GTPase elicits spatial memory deficits in mice. *Neurobiology of Aging*, 50, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.11.006>
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>
- Singgih, E. L., Van Der Voet, M., Schimmel-Naber, M., Brinkmann, E. L., Schenck, A., & Franke, B. (2021). Investigating cytosolic 5'-nucleotidase II family genes as candidates for neuropsychiatric disorders in *Drosophila* (114/150 chr). *Translational Psychiatry*, 11(1), 55. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01149-x>
- Singh Rao, S. K., & Olsen, I. (2019). Assessing the role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis to determine a causative relationship with Alzheimer's disease. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1), 1563405. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1563405>
- Siracusa, R., Fusco, R., & Cuzzocrea, S. (2019). Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1114. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114>
- Slišković, I., Eich, H., & Müller-McNicoll, M. (2022). Exploring the multifunctionality of SR proteins. *Biochemical Society Transactions*, 50(1), 187–198. <https://doi.org/10.1042/bst20210325>
- Sonnenburg, J. L., & Bäckhed, F. (2016). Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 535(7610), 56–64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
- Stephenson, M., Rowatt, E., & Harrison, K. (1947). The Production of Acetylcholine by a Strain of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of General Microbiology*, 1(3), 279–298. <https://doi.org/10.1099/00221287-1-3-279>
- Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*, 1693, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>

- Su, J., Liu, H., Guo, K., Chen, L., Yang, M., & Chen, Q. (2017). Research Advances and Detection Methodologies for Microbe-Derived Acetylcholinesterase Inhibitors: A Systemic Review. *Molecules*, 22(1), 176. <https://doi.org/10.3390/molecules22010176>
- Su, J., & Yang, M. (2015). Huperzine A production by *Paecilomyces tenuis* YS-13, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*. *Natural Product Research*, 29(11), 1035–1041. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.980245>
- Suárez, N. E., Saavedra, L., Složilová, I., Bonacina, J., Demnerová, K., & Sesma, F. (2013). Draft Genome Sequence of *Enterococcus faecium* Strain CRL 1879, Isolated from a Northwestern Argentinian Artisanal Cheese. *Genome Announcements*, 1(4), e00514-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00514-13>
- Suzuki, G., Harper, K. M., Hiramoto, T., Sawamura, T., Lee, M., Kang, G., Tanigaki, K., Buell, M., Geyer, M. A., Trimble, W. S., Agatsuma, S., & Hiroi, N. (2009). Sept5 deficiency exerts pleiotropic influence on affective behaviors and cognitive functions in mice. *Human Molecular Genetics*, 18(9), 1652–1660. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp086>
- Taneo, J., Adachi, T., Yoshida, A., Takayasu, K., Takahara, K., & Inaba, K. (2015). Amyloid β oligomers induce interleukin-1 β production in primary microglia in a cathepsin B- and reactive oxygen species-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(3), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.006>
- Tang, K. S. (2019). The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of Alzheimer's biomarkers. *Life Sciences*, 233, 116695. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116695>
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 1181–1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>

- Targa Dias Anastacio, H., Matosin, N., & Ooi, L. (2022). Neuronal hyperexcitability in Alzheimer's disease: What are the drivers behind this aberrant phenotype? *Translational Psychiatry*, 12(1), 257. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02024-7>
- Toniolo, S., Sen, A., & Husain, M. (2020). Modulation of Brain Hyperexcitability: Potential New Therapeutic Approaches in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9318. <https://doi.org/10.3390/ijms21239318>
- Torres, A. C., Elean, M., Hebert, E. M., Saavedra, L., & Taranto, M. P. (2020). Metabolic shift in the production of corrinoid compounds by *Lactobacillus coryniformis* in the absence of purines. *Biochimie*, 168, 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.003>
- Torres, A. C., Vannini, V., Bonacina, J., Font, G., Saavedra, L., & Taranto, M. P. (2016). Cobalamin production by *Lactobacillus coryniformis*: Biochemical identification of the synthesized corrinoid and genomic analysis of the biosynthetic cluster. *BMC Microbiology*, 16(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0854-9>
- Torres-Fuentes, C., Golubeva, A. V., Zhdanov, A. V., Wallace, S., Arbolea, S., Papkovsky, D. B., Aidy, S. E., Ross, P., Roy, B. L., Stanton, C., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Schellekens, H. (2019). Short-chain fatty acids and microbiota metabolites attenuate ghrelin receptor signaling. *The FASEB Journal*, 33(12), 13546–13559. <https://doi.org/10.1096/fj.201901433R>
- Tsang, C. W., Estey, M. P., DiCiccio, J. E., Xie, H., Patterson, D., & Trimble, W. S. (2011). Characterization of presynaptic septin complexes in mammalian hippocampal neurons. *Bchm*, 392(8–9), 739–749. <https://doi.org/10.1515/BC.2011.077>
- Tsuchiya, D., Kitamura, Y., Takata, K., Sugisaki, T., Taniguchi, T., Uemura, K., Miki, H., Takenawa, T., & Shimohama, S. (2006). Developmental expression of neural Wiskott–Aldrich syndrome protein (N-WASP) and WASP family verprolin-homologous protein (WAVE)-related proteins in postnatal rat cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience Research*, 56(4), 459–469. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.09.007>

- Tyanova, S., & Cox, J. (2018). Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. In L. Von Stechow (Ed.), *Cancer Systems Biology* (Vol. 1711, pp. 133–148). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7493-1_7
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70, S38–S44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>
- Vandenplas, Y., Carnielli, V. P., Ksiazek, J., Luna, M. S., Migacheva, N., Mosselmans, J. M., Picaud, J. C., Possner, M., Singhal, A., & Wabitsch, M. (2020). Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition*, 78, 110812. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110812>
- Villageliú, D. N., Rasmussen, S., & Lyte, M. (2018). A microbial endocrinology-based simulated small intestinal medium for the evaluation of neurochemical production by gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(7). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy096>
- Villegas, J. M., Brown, L., Savoy de Giori, G., & Hebert, E. M. (2015). Characterization of the mature cell surface proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CRL 581. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4277–4286. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6258-6>
- Vogt, N. M., Kerby, R. L., Dill-McFarland, K. A., Harding, S. J., Merluzzi, A. P., Johnson, S. C., Carlsson, C. M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Bendlin, B. B., & Rey, F. E. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7(1), 13537. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13601-y>
- Wall, R., Cryan, J. F., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Dinan, T. G., & Stanton, C. (2014). Bacterial Neuroactive Compounds Produced by Psychobiotics. In M. Lyte & J. F. Cryan (Eds.), *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease* (Vol. 817, pp. 221–239). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_10

- Wang, H., Qian, W.-J., Chin, M. H., Petyuk, V. A., Barry, R. C., Liu, T., Gritsenko, M. A., Mottaz, H. M., Moore, R. J., Camp, D. G., Khan, A. H., Smith, D. J., & Smith, R. D. (2006). Characterization of the Mouse Brain Proteome Using Global Proteomic Analysis Complemented with Cysteiny-Peptide Enrichment. *Journal of Proteome Research*, 5(2), 361–369. <https://doi.org/10.1021/pr0503681>
- Wang, Y., Zeng, C., Li, J., Zhou, Z., Ju, X., Xia, S., Li, Y., Liu, A., Teng, H., Zhang, K., Shi, L., Bi, C., Xie, W., He, X., Jia, Z., Jiang, Y., Cai, T., Wu, J., Xia, K., & Sun, Z. S. (2018). PAK2 Haploinsufficiency Results in Synaptic Cytoskeleton Impairment and Autism-Related Behavior. *Cell Reports*, 24(8), 2029–2041. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.061>
- Wang, Y., Zeng, Q. G., Zhang, Z. B., Yan, R. M., Wang, L. Y., & Zhu, D. (2011). Isolation and characterization of endophytic huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1267–1278. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0905-4>
- Wang, Z., Wu, H., Chang, X., Song, Y., Chen, Y., Yan, Z., Gu, L., Pang, R., Xia, T., He, Z., Li, Z., Wang, S., & Bai, Y. (2025). CKMT1 deficiency contributes to mitochondrial dysfunction and promotes intestinal epithelial cell apoptosis via reverse electron transfer-derived ROS in colitis. *Cell Death & Disease*, 16(1), 177. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07504-4>
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R., & Kirkpatrick, C. J. (2003). The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sciences*, 72(18–19), 2055–2061. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00083-3)
- Whiteside, S. A., McGinniss, J. E., & Collman, R. G. (2021). The lung microbiome: Progress and promise. *Journal of Clinical Investigation*, 131(15), e150473. <https://doi.org/10.1172/JCI150473>

- Whyte, L. S., Fourrier, C., Hassiotis, S., Lau, A. A., Trim, P. J., Hein, L. K., Hattersley, K. J., Bensalem, J., Hopwood, J. J., Hemsley, K. M., & Sargeant, T. J. (2022). Lysosomal gene Hexb displays haploinsufficiency in a knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *IBRO Neuroscience Reports*, 12, 131–141.
<https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.01.004>
- Wu, Q., & Shah, N. P. (2017). High γ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactobacillus brevis* as a functional dairy starter. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3661–3672.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147418>
- Wypych, T. P., Wickramasinghe, L. C., & Marsland, B. J. (2019). The influence of the microbiome on respiratory health. *Nature Immunology*, 20(10), 1279–1290.
<https://doi.org/10.1038/s41590-019-0451-9>
- Xiao, Y., Liang, W., Liu, D., Zhang, Z., Chang, J., & Zhu, D. (2022). Isolation and acetylcholinesterase inhibitory activity of asterric acid derivatives produced by *Talaromyces aurantiacus* FL15, an endophytic fungus from *Huperzia serrata*. *3 Biotech*, 12(3), 60. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03125-2>
- Xie, L., Lai, Y., Lei, F., Liu, S., Liu, R., & Wang, T. (2015). Exploring the association between interleukin-1 β and its interacting proteins in Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports*, 11(5), 3219–3228. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3183>
- Yang, R., Feng, X., Arias-Cavieres, A., Mitchell, R. M., Polo, A., Hu, K., Zhong, R., Qi, C., Zhang, R. S., Westneat, N., Portillo, C. A., Nobrega, M. A., Hansel, C., Garcia Iii, A. J., & Zhang, X. (2023). Upregulation of SYNGAP1 expression in mice and human neurons by redirecting alternative splicing. *Neuron*, 111(10), 1637-1650.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.02.021>
- Yang, S.-Y., He, X.-Y., Isaacs, C., Dobkin, C., Miller, D., & Philipp, M. (2014). Roles of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in neurodegenerative disorders. *The Journal of*

- Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 460–472.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.001>
- Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C. R., Ismagilov, R. F., Mazmanian, S. K., & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell*, 161(2), 264–276.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
- Yanofsky, C. (2007). RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria. *RNA*, 13(8), 1141–1154. <https://doi.org/10.1261/rna.620507>
- Yao, J., Sun, B., Institoris, A., Zhan, X., Guo, W., Song, Z., Liu, Y., Hiess, F., Boyce, A. K. J., Ni, M., Wang, R., Ter Keurs, H., Back, T. G., Fill, M., Thompson, R. J., Turner, R. W., Gordon, G. R., & Chen, S. R. W. (2020). Limiting RyR2 Open Time Prevents Alzheimer’s Disease-Related Neuronal Hyperactivity and Memory Loss but Not β -Amyloid Accumulation. *Cell Reports*, 32(12), 108169. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108169>
- Zaki, A. G., El-Sayed, E.-S. R., Abd Elkodous, M., & El-Sayyad, G. S. (2020a). Microbial acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer’s therapy: Recent trends on extraction, detection, irradiation-assisted production improvement and nano-structured drug delivery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4717–4735.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10560-9>
- Zaki, A. G., El-Sayed, E.-S. R., Abd Elkodous, M., & El-Sayyad, G. S. (2020b). Microbial acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer’s therapy: Recent trends on extraction, detection, irradiation-assisted production improvement and nano-structured drug delivery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4717–4735.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10560-9>
- Zelová, H., & Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62(7), 641–651.
<https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>

- Zhang, H., Jia, L., & Jia, J. (2020). Oxiracetam Offers Neuroprotection by Reducing Amyloid β -Induced Microglial Activation and Inflammation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*, 11, 623. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00623>
- Zhang, H., Knight, C., Chen, S. R. W., & Bezprozvanny, I. (2023). A Gating Mutation in Ryanodine Receptor Type 2 Rescues Phenotypes of Alzheimer's Disease Mouse Models by Upregulating Neuronal Autophagy. *The Journal of Neuroscience*, 43(8), 1441–1454. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1820-22.2022>
- Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, J., & Chen, L. (2024). Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 211. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01911-3>
- Zhang, S., Yu, Q., Li, Z., Zhao, Y., & Sun, Y. (2024). Protein neddylation and its role in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 85. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01800-9>
- Zhang, S.-J., Luo, D., Li, L., Tan, R.-R., Xu, Q.-Q., Qin, J., Zhu, L., Luo, N.-C., Xu, T.-T., Zhang, R., Yang, L., & Wang, Q. (2017). Ethyl Acetate Extract Components of Bushen-Yizhi Formula Provides Neuroprotection against Scopolamine-induced Cognitive Impairment. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10437-4>
- Zhang, T., Kim, M. J., Kim, M. J., Wu, X., Yang, H. J., Yuan, H., Huang, S., Yoon, S. M., Kim, K.-N., & Park, S. (2022). Long-Term Effect of Porcine Brain Enzyme Hydrolysate Intake on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3361. <https://doi.org/10.3390/ijms23063361>
- Zhao, J., Xing, W., Ji, C., Hu, H., Zhang, Y., Wang, Z., & Liu, J. (2025). Nucleophosmin 1 overexpression enhances neuroprotection by attenuating cellular stress in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 383, 115019. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.115019>