



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Caracterización de la microbiota intestinal de un modelo murino
para la enfermedad de Alzheimer.

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

QFB. Gabriela Bravo Ruiseco Sánchez

COMITÉ TUTURAL

Codirector

Dr. Gustavo Pacheco López

Codirector

Dr. Hugo César Ramírez Saad

Asesora

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Noviembre 2015



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00157

Matrícula: 2133801771

CARACTERIZACION DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE UN MODELO MURINO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

En México, D.F., se presentaron a las 13:00 horas del día 17 del mes de noviembre del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO
- DR. JOSE FELIX AGUIRRE GARRIDO
- DRA. KIOKO RUBI GUZMAN RAMOS
- DRA. RINA MARIA GONZALEZ CERVANTES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: GABRIELA BRAVO RUISECO SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



GABRIELA BRAVO RUISECO SANCHEZ
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

VOCAL

DR. JOSE FELIX AGUIRRE GARRIDO

VOCAL

DRA. KIOKO RUBI GUZMAN RAMOS

SECRETARIA

DRA. RINA MARIA GONZALEZ CERVANTES

Comité tutorial

Codirector

Dr. Gustavo Pacheco López

Depto. Ciencias Biológicas y de la Salud, DCBS.

Unidad Lerma, UAM

Codirector

Dr. Hugo César Ramírez Saad

Depto. Sistemas Biológicos, DCBS.

Unidad Xochimilco, UAM

Asesora

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Depto. Biología de la Reproducción, DCBS.

Unidad Iztapalapa, UAM

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada: “Caracterización de la microbiota intestinal de un modelo murino para la enfermedad de Alzheimer.”, que presentó:

QFB: Gabriela Bravo Ruiseco Sánchez

El día 17 de Noviembre del año 2015

Sinodales

Presidenta

Dra. Anabel Jiménez Anguiano
Depto. de Biología de la Reproducción
UAM-I

Secretaria

Dra. Rina María González Cervantes
Depto. de Sistemas Biológicos
UAM-X

Vocal

Dr. José Félix Aguirre Garrido
Depto. de Sistemas Biológicos
UAM-X

Vocal

Dra. Kioko Rubí Guzmán Ramos
Depto. de Ciencias de la Salud
UAM-L

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Sistemas Biológicos de la Unidad Xochimilco y el Laboratorio de Investigación Divisional de la DCBS de la Unidad Lerma, Universidad Autónoma Metropolitana, con la colaboración del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

La ponente tuvo apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca con número de registro 302041.

Así como el amor, la vida y la muerte; la ciencia es pasión fundida en sangre sudor y lágrimas. Como científicos, vivimos de la ciencia y también por ella sufrimos bajo el yugo de un equilibrio caro e insostenible: el hambre por conocimiento enfrentado a la vida y el curso del reloj.

Como estoy hablando de pasiones, la poesía me pareció la mejor forma de comenzar con este viaje.

Somos uno
sin saberlo, sin esperarlo
lentamente a través del tiempo
llegamos a la unidad
tú sin mí y yo sin ti, impensable
interactuamos tan íntimamente
que la vida sin ti es insostenible
y sin mí la cabalidad te avade.

Ahora que me conoces
descubres las posibilidades de esta relación
encuentras las quimeras de la inestabilidad
como los milagros de la armonía
somos tu y yo
somos uno.

La fuerza somos tú y yo
el futuro somos tú y yo
de tu alba a tu ocaso
no te olvides somos uno.

GBRS

Agradecimiento

El conocimiento, su búsqueda y construcción siempre han sido importantes para mí, son mi droga preferida y el ambiente donde me siento más cómoda, la vida me permitió seguir mi vocación y he arrastrado a todos los que me aman a esta senda por lo tanto les AGRADEZCO:

A mi compañero Oliver, porque me has demostrado que no solo eres mi ancla a la realidad sino que también te has convertido en mi vela y timón para llegar a nuevos horizontes. Gracias por la ausencia que has soportado, solo expresando palabras de aliento y amor. Gracias por todos sacrificios para ayudarme a lograr mis metas. Te amo.

A Mi. Kaela, porque te pareció innecesario el riesgo, gracias por haber sido la más mala del mundo. Me hiciste lo que soy y me enseñaste como vivir la vida. Sigo encontrándote en mí día a día y en tu himno que predicaste hasta el final: la vida te permite hacer lo que te dé la gana si te obstinas lo suficiente y estás dispuesto a pagar el precio. No sé si es bueno o malo pero lo estoy convirtiendo también en el mío. Siempre, te quiero.

A Caro, Jany y Cris por su apoyo incondicional, comidas calientes, platica amena y techo amoroso bajo el cual se han fraguado mis sueños desde la infancia.

A mi Madre por nunca dejar de creer en mí y seguir cuidándome de todos, en especial de mi misma. Espero poder ser tan ruda como tú y seguir tus enseñanzas.

A la mitad de mi alma Pablo, porque aún a la distancia te siento cerca de mí, vigilando mi esfuerzo y animándome a lograr mis metas

A Rosa, Álvaro, Yaya, Lupe, Irving y Armando por su vela constante, palabras y actos de apoyo y amor.

A la Dra. Rina y al Dr. Pacheco por permitirme retomar mi camino en la ciencia y apoyarme tanto en lo académico como en lo personal.

A la Dra. Anabel por ser mi mecenas en la unidad Iztapalapa, tuve la suerte de que sin conocerme apostó por un proyecto innovador y una mujer irreverente. Gracias por estar al pendiente del proyecto y hacer un espacio para mí siempre que lo requerí.

Al Dr. Hugo por adoptarme en su laboratorio y preocuparse por formar una persona y un científico de calidad. Nunca había sentido tanto miedo y gracias a ti ahora lo hago.

A la Dra. Kioko y el Dr Félix por dar dirección y luz a mis esfuerzos, de ustedes he aprendido tanto de ciencia como del ser humano en el que estoy trabajando por convertirme.

Muchas muchas gracias a la Dra. Maru de la Torre, Dr. Marcos López, Dr. Humberto García, Dr. Augusto Montiel, Dr. Jaime García, Dr. Selvasankar Murugesan y al Dr. Rurik List por su infinita paciencia y extensas horas intercambiando ideas tanto de mi proyecto como de la insoportable levedad del ser. Gracias por aportar tanto obteniendo solo una sonrisa como recompensa.

Al equipo del Laboratorio de Ecología Molecular: Mario, Abraham, Yovani, Daniel, Leilani y Vanesa, gracias por mejorar los días malos con las comidas y sonrisas, así como disfrutar de los días buenos conmigo.

A mi gran familia en la unidad Lerma, a TODOS porque he sentido su apoyo de múltiples formas. En especial muchas gracias al poder femenino administrativo de la división de CBS y a todos los profesores que constantemente preguntan por mi progreso y se emocionan con mis logros

Estoy muy agradecida con todos ustedes, espero estas palabras puedan transmitirles el cariño y admiración que siento por cada uno de ustedes.

GBRS

Índice

Agradecimiento	v
Índice	vii
Índice de tablas y figuras	ix
Índice de anexos	xi
Abreviaciones	xii
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Antecedentes	9
Microbiota intestinal en los procesos de salud y enfermedad	9
Eje Microbiota – Intestino – Cerebro	12
Enfermedad de Alzheimer y microbiota intestinal	16
La microbiota intestinal como factor determinante en la etiología de enfermedad de Alzheimer	21
Modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer	24
Justificación	30
Pregunta de investigación	32
Hipótesis	32
Objetivo general	33
Objetivos específicos	33
Material y métodos	34
Modelo experimental murino	34
Análisis conductual	35
Genotipificación del modelo murino	36
Inmunohistoquímica	37
Muestreo de Microbiota Intestinal	38
Determinación de la Microbiota Intestinal	39
Resultados	42
Caracterización de animales	42

Determinación de la microbiota intestinal del 3xTg-AD	49
Comparación de la microbiota intestinal	52
Discusión	82
Conclusiones	87
Perspectivas	90
Bibliografía	91
Anexos	98

Índice de tablas y figuras

Tabla 1: Microbiota intestinal en los procesos de salud y enfermedad	11
Tabla 2: Neurotransmisores producidos por géneros bacterianos.	12
Figura 1: Esquema del sistema nervioso entérico	14
Figura 2: Lesiones histopatológicas de la AD16	
Figura 3: Esquema de como la MI puede funcionar como un factor ambiental en la etiología del EA.	24
Figura 4: Lesiones de la EA en el modelo 3XTg-AD	25
Tabla 3: Presencia de agregados de proteína β A y Tau en l estructuras cerebrales del modelo 3xTG-AD	26
Figura 5: Pirámides poblacionales 2000-2050. Tomado de: (Consejo Nacional de Población. 2002).	30
Tabla 4: Grupos de experimentación	34
Figura 6: Características del laberinto de agua de Morris	36
Figura 8: Resultados de genotipificación en geles de agarosa al 1.5%	45
Figura 9: Caracterización de β -amiloide en cortes histológicos	47
Figura 10: Extracción de DNA metagenómico en gel de agarosa al 1.5%	48
Figura 11: Amplicones V6-V8 con clamp GC para el análisis por DGGE en gel de agarosa al 1.5%.	49
Figura 12: Selección de bandas para análisis filogenético.	51
Figura 13: Agrupamiento de todos los perfiles de bandeo por UPGMA	55
Figura 14: Agrupamiento de los perfiles de bandeo por UPGMA de los grupos C5M y T5M	56
Figura 15: Agrupamiento de los perfiles de bandeo por UPGMA de los grupos C10M y T10M	57
Figura 16: Agrupamiento de los perfiles de bandeo por UPGMA de los grupos C5M y C10M	58
Figura 17: Agrupamiento de los perfiles de bandeo por UPGMA de los grupos T5M y C10M	59
Tabla 5: Secuencias bacterianas filogenéticamente más próximas a las secuencias obtenidas	62
Figura 18: Porcentaje relativo de las secuencias obtenidas ordenadas por género.	69

Figura 19: Bandas cortadas con similar distancia de migración.	70
Figura 20: Árbol filogenético de las secuencias de los animales C5M.	72
Figura 21: Árbol filogenético de las secuencias de los animales C10M.	73
Figura 22: Árbol filogenético de las secuencias de los animales T5M	74
Figura 23: Árbol filogenético de las secuencias de los animales T10M	75
Figura 24: Árbol filogenético en el que se representan todas las secuencias obtenidas, las ramas se encuentran contraídas a nivel de familia.	76
Figura 25: Distribución de las familias más abundantes en las muestras.	77
Figura 26: Distribución de los géneros más abundantes en las muestras.	78
Tabla 6: Análisis de secuencias asignadas como “Otros clostridiales” por RDP	79
Figura 27: Análisis de coordinada principal.	80

Índice de anexos

No.	Título	Pág.
1	PEO1: Disección de intestino de ratón para muestra de microbiota intestinal.	100
2	PEO 2: Preparación de muestra proveniente de tejido intestinal.	105
3	PEO 3: Extracción de ADN de muestra intestinal.	111
4	PEO 4: Preparación de amplicones para DGGE.	116
5	PEO 5: Preparación de DGGE para el análisis de microbiota intestinal murina.	121
6	PEO 6: Elución de ADN de bandas cortadas.	129
7	PEO 7: Amplificación de bandas cortadas de DGGE.	132
8	PEO 8: Purificación de muestras para secuenciación.	137
9	PEO 9: Entrenamiento de ratones para laberinto de Morris.	140
10	PEO 10: Prueba de memoria viso-espacial en laberinto de Morris.	144
11	PEO 11: Genotipificación de ratones 3xTg-AD.	148
12	PEO 12: Perfusión de ratones con paraformaldehído.	153
13	PEO 13: Disección de cerebro y almacenamiento.	157
14	PEO 14: Cortes histológicos de cerebro para la determinación de β -amiloide.	161
15	PEO 15: Inmunohistoquímica para β -amiloide en cerebro de ratón.	164
16	Publicación de un artículo de revisión	168

Abreviaciones

Abreviación	Significado
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
3xTg-AD	Triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer
ABC	Complejo Avidina-Biotina-peroxidasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
APP	Proteína precursora de amiloide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr16s	Ácido ribonucleico ribosomal 16s
BHE	Barrera hematoencefálica
BMAA	Beta-N-Metilamino-L-Alanina
CA1	Área Cornu Ammonis 1 del hipocampo
CAS	Condicionamiento aversivo a los sabores
DGGE	Gel con gradiente de desnaturalización
EA	Enfermedad de Alzheimer
Eje MIC	Eje Microbiota-Intestino-Cerebro
GABA	Ácido gamaaminobutírico
GI	Gastrointestinal
i.p.	Inyección intraperitoneal
IFG	Factor de crecimiento insulínico
LiCl	Cloruro de litio
LPS	Lipopolisacárido
MAMP	Patrones de reconocimiento moleculares asociados a microorganismos
MI	Microbiota intestinal
mL	Mililitros

MRRR	Patrones de reconocimiento moleculares
NCBI	Centro Nacional de Información para Biotecnología
nt	Nucleótido
OMS	Organización mundial de la salud
pb	Pares de base
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEO	Procedimiento estándar de operación
pH	Potencial de hidrógeno
PS1	Presenilina 1
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
rrnDB	Base de datos del número de copias del operón ARN ribosomal
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
TREM2	Receptor activador 2 expresado en células mieloides
TRL	Receptores extracelulares tipo Toll
UPGMA	Método de no ponderación de las medias aritméticas
β A	Beta-amiloide

Resumen

La teoría de que la microbiota intestinal (MI) puede ser factor determinante en la etiología de las enfermedades neuropsiquiátricas no es nueva, ni reciente; fue propuesta desde hace un siglo. En ese entonces, se referían a la teoría de la “Autointoxicación” que se define como el daño o enfermedad causada por los microorganismos que viven en el intestino humano. Esta teoría no prosperó debido que no se contaba con las técnicas necesarias para registrar los procesos bioquímicos que subyacen a la conducta ni los cambios ecológicos que sufría la microbiota intestinal (Bested y cols., 2013)

A principios del año 2000, comenzó un resurgimiento del tema. Se ha podido encontrar evidencia de la correlación entre la disbiosis y cambios de conductuales, en algunos casos inclusive una correlación con enfermedades neuropsiquiátricas como los trastornos del espectro autista (Bravo y cols., 2011, Hsiao y cols., 2013).

Por otra parte la etiología de la enfermedad de Alzheimer (EA) familiar se encuentra relacionada con la mutación de genes puntuales y hasta la fecha no existe un modelo animal que pueda reproducir la EA esporádica, por lo cual utilizamos un modelo triple transgénico 3xTg-AD para comenzar a dilucidar el papel de la MI en la etiología de la EA. Estudiamos la MI del modelo murino 3xTg-AD antes (5 meses) y después (10 meses) de que se presentaran los síntomas conductuales de la EA por medio de la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE). Nuestros resultados indican que el phylum Verrucomicrobia (encontrado

normalmente en cantidades no mayores al 2%) presenta un aumento en las muestras de los animales 3xTg-AD, no es posible distinguir los cambios en la MI atribuibles a la aparición de la enfermedad en modelo al comparar los estadios pre sintomático del sintomático. Se sabe poco de la función del phylum Verrucomicrobia dentro de la MI normal, de igual manera se desconocen las funciones metabólicas de las especies que lo componen por lo que no se puede decir más que son bacterias que se adhieren a la pared del intestino y fermentan moco intestinal.

Los resultados nos permite observar que los cambios de la MI provocados por la edad son similares a los encontrados en el modelo murino para la EA por lo que las funciones fisiológicas de esta MI pudieran estar también relacionadas con los cambios fisiológicos en la senectud como el aumento de la permeabilidad intestinal permitiendo con esto la absorción de metabolitos microbianos posiblemente neurotóxicos o con características amiloideas.

Abstract

The theory that the gut microbiota (GM) can be decisive factor in the etiology of neuropsychiatric diseases is not new or recent; it was proposed a century ago. At the time, the "autointoxication" theory was proposed. It is defined as damage or disease caused by microorganisms living in the human gut. This theory did not prosper because the lack of techniques to record the biochemical processes underlying behavior and ecological changes that suffered the intestinal microbiota (Bested et al., 2013)

In early 2000, the issue resurged by findings in correlation between disbiosis and changes in behavior, in some cases even GM can be correlated with neuropsychiatric disorders such as autism spectrum disorders (Bravo et al. 2011, Hsiao et al., 2013). Moreover the etiology of early onset of Alzheimer's disease (AD) is related to the specific mutation of genes to date there is no animal model that can reproduce sporadic AD, so we use a triple transgenic model 3xTg-AD to begin to elucidate the role of IM in the etiology of AD. We 3xTg study the GM of AD mouse model before (5 months) and after (10 months) behavioral symptoms of AD were presented, using the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique. Our results indicate that the phylum Verrucomicrobia (normally found in no larger quantities than 2%) showed an increase in samples of 3xTg-AD animals. It is not possible to distinguish changes in IM attributable to the onset of the disease in the model comparing pre symptomatic and symptomatic stages. Few is known about the phylum Verrucomicrobia function within normal GM, likewise it is unknown the metabolic capabilities of the species of

the phylum. The only information about Verrucomicrobia bacteria is that are intestine wall adhering bacteria able to ferment intestinal mucus.

The results allow us to observe the changes of the GM caused by age are similar to those found in the transgenic model for AD so physiological roles of this GM may also be related to physiological changes in senescence as the increased intestinal permeability thereby allowing absorption of possibly neurotoxic or amyloid microbial metabolites.

Introducción

Nuestra percepción sobre los microorganismos ha cambiado a lo largo del tiempo, desconocíamos su existencia hasta que en 1676, Anton van Leeuwenhoek describió los "animáculos". Con sus observaciones describió un mundo nuevo de seres diminutos, comenzando así, la era de la microbiología. Casi doscientos años después en 1860, Luis Pasteur comenzó con sus estudios sobre los "fermentos" y cómo mejorar el uso de los microorganismos en la vinicultura. Entre 1870 y 1880 guiados por Luis Pasteur, Robert Koch y otros grandes investigadores (Bestedy cols., 2013), descubrimos que varias enfermedades (como el carbunco y el cólera) eran producidas por microorganismos, gestando así la teoría microbiana de la enfermedad que sigue vigente hasta nuestros días. Con este fundamento y para prever enfermedades la sociedad se ha educado para mantener estándares de higiene y evitar el contacto con microorganismos patógenos.

Otros cien años pasaron y en la década de 1960, se empezó a considerar que no todos los microorganismos eran causantes de enfermedad, ya que se encontraban de manera normal en el cuerpo de humanos, animales y plantas, proponiendo que existía una relación comensal entre el huésped y ciertas bacterias. Más reciente, durante 1980 se descubrió que también podíamos tener beneficios de algunas especies de microorganismos y a estos se les llamo probióticos. Finalmente a partir de 2005 se comenzó a encontrar evidencia clínica y experimental de que las bacterias no solo podían ser benéficas sino que además, son necesarias para el correcto funcionamiento del cuerpo humano. Así nuestra definición de organismo

(sistema viviente capaz de mantener un metabolismo y reproducción autónoma) está cambiando a la definición de súper-organismo (Sommer y cols., 2013) al incluir a los microorganismos (microbiota) que viven en la superficie interna y externa del organismo huésped.

Es importante hacer hincapié en que actualmente se reconoce una relación endosimbiótica entre el huésped y su microbiota. Un ejemplo es que el conjunto de todos los genes de este súper-organismo (huésped+microbiota) han evolucionado de forma adaptativa ya que los genes bacterianos permiten al huésped adquirir las ventajas de los genes que no posee (como los necesarios para la degradación de la fibra dietética) y a la vez las bacterias que poseen la habilidad de ocupar un nicho en el huésped encuentran un hábitat estable con un flujo de alimentos ininterrumpido (den Besten y cols., 2013).

La adquisición de la microbiota por el huésped se da por dos vías: en la primera llamada vertical, se adquieren los microorganismos de la madre por medio de la placenta, el parto, la leche materna y el contacto con la piel materna por medio de algunas costumbres sociales como el beso y las caricias (Montiel-Castro y cols., 2013, Aagaard y cols., 2014); la segunda ruta de transmisión es de carácter horizontal, puesto que el huésped obtiene estos organismos mediante el contacto cercano con parientes, personas cercanas, parejas (sexo, besos, caricias) y mascotas, así como por la exploración del ambiente y las prácticas de compartir comida y utensilios (Jost y cols., 2012, Azad y cols., 2014). Durante el primer año de vida la composición de la microbiota es muy variable, pero entre los 12 y 33 meses

de edad, se estabiliza hasta la forma en que se encuentra en adultos (Arrieta y cols., 2014). Es importante apuntar que la composición de las comunidades microbianas depende de la zona del cuerpo humano que habiten ya que son intrínsecas las características de los nichos disponibles (ej. condiciones anaerobias en algunas partes del intestino vs condiciones aerobias en la superficie exterior de la piel) (Ackerman. 2012). La mayor concentración de microorganismos en el cuerpo humano se observa en el tracto gastrointestinal, principalmente el colon en donde se contabilizan hasta 10^{12} organismos por gramo de contenido luminal (Sartor 2007.).

La microbiota intestinal (MI), está formada por virus, protozoarios y algunos miembros de los reinos Fungi y Arquea pero es ampliamente dominada por bacterias (Grenham y cols., 2011). Los principales Phyla bacterianos encontrados en adultos sanos son Firmicutes (60%), Bacteroidetes (25%), Actinobacteria (10%), Verrucomicrobia(1.5%), Fusobacteria (1.5%), (Rajilić-Stojanović. 2007)

Bajo una perspectiva evolutiva, los microorganismos y el ser humano han coevolucionado de forma mutualista (Ley y cols., 2008). Es importante mencionar que esta situación prácticamente se presenta en todos los organismos multicelulares (plantas, animales, insectos, etc.). Por otra parte desde un enfoque fisiológico, la MI pudiera considerarse también como un órgano adicional (Cash y cols., 2006) ya que cumple funciones metabólicas esenciales y es capaz de comunicarse y recibir información de otros órganos.

En este nuevo paradigma, la MI como órgano adicional tienen injerencias en los estados de salud y enfermedad, por lo que es actualmente investigada con objetivos diagnósticos y terapéuticos (Dinan y cols., 2013). En este sentido recientemente se ha encontrado evidencia de la importancia de la MI en el neurodesarrollo (Sudo y cols., 2004), neurogénesis (Ait-Belgnaoui y cols., 2014) y algunos trastornos neuropsiquiátricos como la depresión (Bravo y cols., 2011).

Con base en las evidencias anteriormente expuestas es que estamos interesados y se justifica el estudio de la MI como un factor de riesgo en las enfermedades neurodegenerativas.

Antecedentes

Microbiota intestinal en los procesos de salud y enfermedad

La composición de la MI se mantiene relativamente estable a lo largo de la vida, sin embargo puede ser modificada o cambiada totalmente por factores externos como la dieta, la administración de medicamentos (especialmente antibióticos) (Flint y cols., 2012), procesos de estrés, embarazo así como por el envejecimiento normal del cuerpo (Pérez Martínez y cols., 2014). Es importante recordar que la MI es un ecosistema complejo y dinámico en el que conviven miles de especies de microorganismos. La composición de la MI, se entiende por la descripción de las especies microbianas presentes en el tracto gastrointestinal y la cantidad de cada especie, estas dependen de las interacciones entre los microorganismos que se dan por las interacciones ecológicas descritas por la ecología microbiana como el comensalismo, sinergismo, mutualismo y la competencia (Atlas y cols., 2002). Cuando dicho ecosistema se encuentra en equilibrio, la MI brinda múltiples beneficios al huésped. Uno de los principales aportes de la MI es actuar como una barrera física evitando el contacto de la mucosa intestinal con bacterias patógenas. Otros beneficios son la producción de nutrientes esenciales como vitaminas (K y B12) (LeBlanc y cols., 2013), la obtención de nutrientes de la dieta de otra forma inaccesibles (el 30% de las calorías de la dieta provienen del metabolismo microbiano de azúcares complejos) y el entrenamiento y desarrollo del sistema inmune adaptativo (Arrieta y cols., 2014)

Sin embargo un desequilibrio del ecosistema o disbiosis (la proliferación de especies oportunistas capaces de producir enfermedad y/o producir metabolitos secundarios nocivos) puede desarrollar diversas patologías del tracto gastrointestinal y otros sistemas incluyendo el SNC, con efectos neuropsiquiátricos.

La función de la MI en los estados de salud y enfermedad se resume en el la Tabla 1, evidenciado también como los mismos metabolitos secundarios producidos por las bacterias pueden influenciar al huésped.

Al analizar la Tabla 1, se encuentra que la MI puede ofrecer beneficios a la salud, tanto como producir enfermedad. Hacia qué proceso se enfoca la influencia de la MI depende de dos factores: el primero son las características ecológicas de la microbiota (qué especies son las dominantes y qué interacciones tengan con los demás miembros de la comunidad, determinará el patrón de metabolitos secundarios producidos así como las interacciones con el huésped). El segundo es el sistema inmune y el estado nutricional del huésped ya que el primero seleccionará activamente las especies que conforman la microbiota y el segundo determinará la función (efecto) de los metabolitos secundarios producidos.

Un ejemplo de esto es el aporte de la MI de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), estos metabolitos secundarios pueden causar obesidad (Million y cols., 2012), porque aumenta la cantidad de calorías disponibles de la dieta o por el contrario pueden ayudar a la disminución de peso asociada a un cambio de dieta (Park y cols., 2013). En ambos casos se ha reportado un aumento en la cantidad de especies

bacterianas del género *Lactobacillus* (productores de AGCC) pero las interacciones en la comunidad de la MI son diferentes y por lo tanto el efecto en la salud también es diferente.

Tabla 1: Microbiota intestinal en los procesos de salud y enfermedad

Salud	Actividad o productos microbianos	Enfermedad	Referencia
Suplemento de nutrientes y energía	Producción de AGCC, síntesis de vitaminas Influencia en la producción de hormonas intestinales y gasto energético	Obesidad y síndrome metabólico	(Flinty cols., 2012, Nicholson y cols., 2012)
Inhibición de patógenos	Producción de metabolitos bacteriostáticos, modificación del pH intestinal, competencia por sustratos, barrera física	Fuente de patógenos	(Cashy cols., 2006)
Desarrollo y modulación del sistema inmune	Balance y producción de señales inflamatorias y antiinflamatorias	Alergias SCI Inflamación crónica	(Chow y cols., 2010, de La Serre y cols., 2010)
Salud mental	Neurotransmisores y sus precursores	Ansiedad , depresión Neurodesarrollo	(Bravoy cols., 2011, Hsiaoy cols., 2013)

En cuanto a la salud mental, se ha encontrado que las bacterias del intestino pueden producir compuestos neuroactivos y modificar la absorción de nutrientes como el triptófano que es esencial para la producción de serotonina. En la Tabla 2 se muestran algunos de los neurotransmisores producidos por bacterias intestinales. Cabe mencionar que algunos metabolitos secundarios bacterianos como los ácidos grasos de cadena corta están vinculados al tratamiento o etiología de enfermedades neuropsiquiátricas. Por ejemplo, el butirato puede funcionar para tratar la depresión y la sobreproducción de ácido propiónico se ha asociado con enfermedades del espectro autista. (Wall y cols., 2014).

Tabla 2: Neurotransmisores producidos por géneros bacterianos.

Género	Neuroquímico
<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	GABA
<i>Streptococcus, Escherichia, Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus</i>	Serotonina
<i>Escherichia, Bacillus</i>	Norepinefrina
<i>Escherichia, Bacillus, Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus</i>	Dopamina
<i>Lactobacillus, Bacillus</i>	Acetilcolina
<i>Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus</i>	Histamina

Modificado de (Wally cols., 2014)

Eje Microbiota – Intestino – Cerebro

El eje microbiota - intestino – cerebro (MIC) es el conjunto de las vías de comunicación por las que la microbiota puede interactuar con el Sistema Nervioso Central (SNC) como se muestra en la Figura 1B. Este eje está integrado por el

sistema nervioso central, el sistema nervioso entérico (SNE) en sus vías eferente y aferente, los sistemas neuroendocrino y neuroinmune, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales y la MI. (Grenham y cols., 2011).

El SNE es el punto clave del eje MIC ya que es la principal vía de comunicación (vía neuronal), el SNE reacciona por reflejos que pasan a través de ganglios simpáticos, reflejos entéricos locales y reflejos que regresan al SNC. En la Figura 1A se muestran las inervaciones al tracto gastrointestinal que provienen del nervio vago, la médula espinal toracolumbar y lumbosacral en sus vías aferentes (azul) y eferentes (rojo) así mismo se muestran ejemplos de neuronas motoras en azul claro, neuronas sensoriales en morado y esfínteres controlados por el SNC en óvalos de color naranja. (Furness. 2012). Las vías neurales se conecta al tracto gastrointestinal por dos plexos ganglionares que están formados por neuronas y células gliales, el primero es el plexo mesentérico, se encuentra entre las capas musculares del tracto gastrointestinal, se encarga de la iniciación y control de los patrones motores y absorción de nutrientes. El segundo es el plexo submucoso, localizado entre la capa muscular y la mucosa, se extiende por la lámina propia, contiene terminaciones eferentes (células neuronales endocrinas) y terminaciones aferentes (neuronas aferentes vágales y neuronas intrínsecas aferentes primarias), las neuronas intrínsecas aferentes no necesariamente envían información al SNC si no que procesan la información recibida y sirven como un sistema de control independiente (Rescigno. 2008).

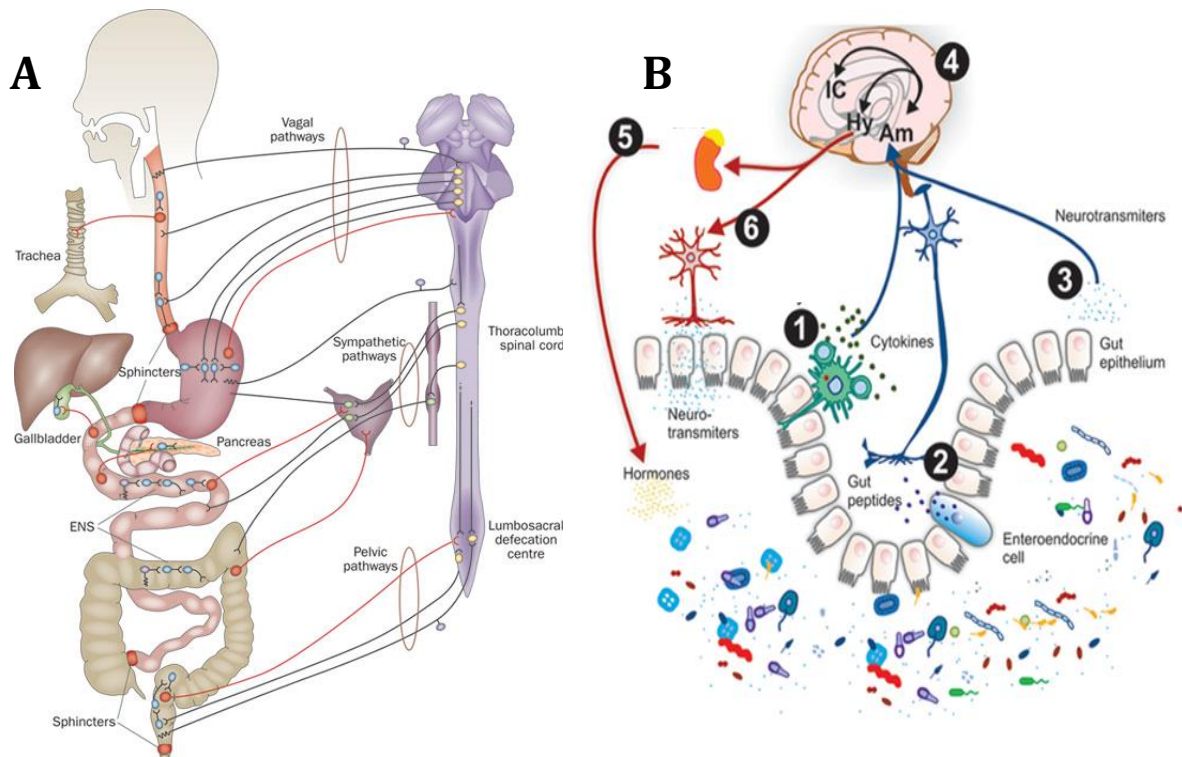


Figura 1: A Esquema del sistema nervioso entérico en el que se muestra la inervación por el SNC; las vías aferentes se observan en rojo y las eferentes en morado, los óvalos azules corresponden a neuronas sensoriales, los óvalos naranja corresponden a los diferentes esfínteres. B Esquema del eje microbiota intestino cerebro. 1, 2 y 3 vías aferentes que reciben información del sistema neuroinmune, lumen intestinal y neuronas sensoriales del plexo intestinal respectivamente. 4 SNC. 5 vía eferente sistema neuroendocrino. 6 liberación de neurotransmisores al lumen intestinal por la vía eferente neuronal. Modificadas de (Furness. 2012, Montiel-Castro y cols., 2013)

La vía de señalización neuroinmune está formada por las estructuras secundarias y terciarias del sistema inmune, así como por las células del sistema inmune adaptativo y los receptores extracelulares TLR (Toll like receptors) y otros receptores extracelulares de reconocimiento de patrones moleculares MPRR (Molecular Pattern Recognition Receptors). En conjunto estos receptores extracelulares permiten un preciso reconocimiento y diferenciación entre bacterias comensales y patógenas. La evidencia experimental indica que este reconocimiento de moléculas bacterianas, permite al huésped activar su sistema inmune. Es decir que a lo largo de la evolución

el sistema inmune del huésped ha perfeccionado el reconocimiento de microorganismos basándose en patrones moleculares asociados a microorganismos MAMP (Microorganism-Associated Molecular Pattern), por ejemplo: lipopolisácaridos, moléculas de péptidoglicano, ácidos nucleicos y otras moléculas de origen bacteriano.

Por otra parte la vía de señalización neuroendocrina está principalmente formada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, así como por las células enterocromafines en el lumen del tracto gastrointestinal. La señalización en este caso se da mediante hormonas, neurotransmisores y compuestos neuroactivos (Wally cols., 2014). Los corticoesteroides, en particular el cortisol tienen efectos directos tanto en el sistema inmune como en la proliferación bacteriana (O'Mahony y cols.).

Aunque no se conoce totalmente el funcionamiento de estas vías de señalización, se sabe que tienen un carácter bidireccional, esto significa que tanto el SNC puede alterar la MI (por ejemplo, la norepinefrina secretada al lumen intestinal puede modificar la virulencia de *Campilobacter jejuni* (Cogan y cols., 2007, Freestone y cols.), así como la MI puede modular el funcionamiento del SNC, por ejemplo mediante la administración de *Lactobacillus ramnosus* se puede modificar la expresión de receptores para el ácido gama-aminobutírico (GABA) en algunas estructuras cerebrales, mejorando los síntomas de depresión en ratas (Bravoy cols., 2011).

Enfermedad de Alzheimer y microbiota intestinal

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurológica progresiva e irreversible que afecta principalmente al cerebro. Se presenta como un trastorno neurológico, evidenciado por la merma progresiva de la memoria, se caracteriza por la pérdida adquirida de habilidades cognitivas y emocionales que llega al deterioro de las actividades básicas de la vida diaria e impacta sustancialmente en la calidad de vida de los pacientes y sus familias. La EA, se encuentra catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la principal causa de demencia (del 60 al 70% de los casos) y hasta la fecha no puede ser completamente diagnosticada hasta que se practica un examen al tejido cerebral obtenido por autopsia (Cruz y cols., 2010, Organización Mundial de la Salud. 2015).

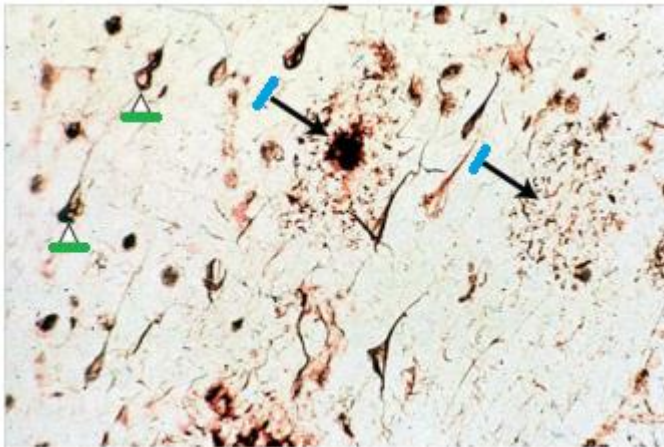


Figura 2: Lesiones histopatológicas de la AD, corte histológico de corteza cerebral teñida con plata. las placas amiloides están señaladas por flechas y los ovillo neurofibrilares con triángulos. Tomado de:(Chin y cols., 2008)

El curso clínico de la EA se caracteriza por el deterioro de la memoria de forma crónica e irreversible, pérdida de la capacidad de orientarse en tiempo y espacio, deterioro del lenguaje, el pensamiento abstracto y la capacidad de aprender, hasta la pérdida de la habilidad de realizar los hábitos rutinarios(Mitchell y cols.,

2011).

A nivel histopatológico la EA es un proceso neurodegenerativo que daña de forma selectiva y progresiva áreas cerebrales, existe pérdida de conexiones del tejido cortical, produciendo un aislamiento del neocortex y la pérdida de habilidades cognitivas. Las principales estructuras dañadas son el hipocampo y sus estructuras corticales (cortezas entorrinal, parahipocampal y perirrinal) así como el lóbulo temporal. Estas estructuras cerebrales permiten la comunicación entre las áreas de asociación y las áreas paralímbicas por lo tanto su deterioro produce las primeras señales de la enfermedad como la desorientación, dificultad de aprendizaje y memoria (Mesulam. 2004).

A través de un análisis histopatológico se ha evidenciado que en estas áreas se encuentran dos tipos de lesiones: la primera es llamada placa amiloide y se encuentra formada por dos tipos de proteínas β -amiloide (βA), la βA_{42} que es una forma insoluble de la proteína y βA_{40} una forma abundante de la proteína que se adhiere a los núcleos formados por βA_{42} provocando el crecimiento de las lesiones. Estas lesiones histológicas se ven acompañadas por astrogliosis, aumento en el daño oxidativo y desbalance iónico. El segundo tipo de lesión son los ovillos neurofibrilares, los cuales están formados por una proteína asociada a los microtúbulos de citoesqueleto que se encuentra hiper-fosforilada y también forma agregados insolubles. Estas lesiones, provocan el deterioro del transporte axonal y la integridad sináptica, promoviendo la desconexión sináptica y muerte neuronal

(Billings y cols., 2005). En la Figura 2 se muestran ambos tipos de lesiones en un corte histológico de cerebral teñida con plata.

Existen dos tipos de EA, ambos comparten la características citológicas de la enfermedad pero se caracterizan por tener etiologías diferentes: La primera es la EA temprana o familiar (la cual se desarrolla antes de los 60 años), es la causante del 2% de los caos, su etiología está relacionada a una influencia genética bien conocida: los genes proteína precursora de amiloide (APP) y presenilina 1 (PS1) que promueven la acumulación de β A y la fosforilación de la proteína Tau. Las mutaciones del gen APP se producen por sustituciones de los aminoácidos generalmente en el dominio transmembranal de la proteína, al menos 17 de estas mutaciones están relacionadas con la EA.(Wang J. y cols., 2008). Las mutaciones producidas en el gen PS1 también contribuye a la formación de placas de β A, ya que forma parte del sitio activo de la γ -secretasa por lo que las mutaciones en ésta afectan el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloidea produciendo acumulaciones de β A (Wang J.y cols., 2008).

En cuanto a la proteína Tau, se ha encontrado que las modificaciones post-transduccionales de la proteína pueden producir la agregación de la misma. En primer lugar la proteólisis endógena puede producir cortes en el C-terminal de la proteína produciendo fragmentos insolubles que al agruparse formarán el núcleo de los ovillos. Por otra parte se creía que la hiperfosforilacion de la proteína Tau era la causante de la agregación y ahora se tiene evidencia de que la Tau hiperfosforilada sirve como protección celular para evitar la muerte celular y estas proteínas

fosforiladas después son reclutada por el núcleo del ovillo neurofibrilar durante su crecimiento (Luna-Muños J. y cols., 2012).

En resumen los estudios genéticos han permitido entender en gran parte cómo funcionan los mecanismos moleculares que llevan a la formación de los ovillos neurofibrilares y las placas amiloides.

El segundo tipo de la EA es denominada tardía o esporádica Esta forma de EA se presenta después de los 65 años, todavía no ha sido posible encontrar una etiología única y clara. Los estudios concuerdan que se debe a diversos factores ambientales pero en las correlaciones sólo se han ligado las siguientes tres variables:

- 1 Estrés oxidante. Se ha encontrado que en los cerebros de pacientes con EA los niveles de moléculas antioxidantes como glutatión se encuentran en niveles inferiores a los controles (Pocernich y cols., 2012). En otros estudios se ha encontrado que el balance entre las especies oxidantes y antioxidantes se modifican desde las fases tempranas de la enfermedad, sin embargo, se desconoce qué provoca el desbalance inicial pero una vez comenzado, se genera un círculo vicioso, ya que los agregados de β A producen más agentes oxidantes y los agentes oxidantes producen más β A (Chang y cols., 2014).
- 2 Dieta occidental. Los estudios de prevalencia de la EA en diferentes etnias ha dirigido la atención de los investigadores hacia las características de la dieta occidental, ya que se ha encontrado que en japoneses que emigran a los Estados Unidos de América la prevalencia de la enfermedad aumenta 2.5 veces y similarmente en personas afroamericanas la prevalencia pasa de 1.4% a 6.8% (Grant y cols., 2002). El aumento en el consumo de azúcares sencillos (sacarosa,

fructosa) y grasas en la alimentación occidental ha provisto ciertas evidencias de que la dieta promueve un estado de resistencia a la insulina en el cerebro. Se ha propuesto identificar esta condición como “diabetes tipo III” ya que se desarrolla de forma independiente de la diabetes tipo I y II (de la Monte y cols., 2008). La resistencia central a la insulina y al factor de crecimiento insulínico (IFG) produce las características celulares de la EA familiar como el déficit en el uso de glucosa, aumento en el estrés oxidante, activación de las señales proinflamatorias y disfunciones mitocondriales (de la Monte y cols., 2014). En esta línea de evidencias se puede mencionar el estudio realizado por Hsu y cols., 2015, en el que se muestra evidencia documentada que la adición de azúcares a la dieta de ratas adolescentes produce un aumento en la producción de interleucinas proinflamatorias así como un déficit en la memoria espacial de los animales adolescentes, (Hsu y cols., 2015).

- 3 Apolipoproteína E4. Las apolipoproteínas son proteínas especializadas que se encargan del transporte de ácidos grasos y colesterol por el torrente sanguíneo. La apolipoproteína E4 se ha identificado como factor de riesgo para la EA porque es menos eficiente que las otras formas para el transporte de lípidos, produciendo un desbalance energético al provocar que los astrocitos ocupen otros recursos energéticos para la producción de colesterol, promoviendo un déficit en el uso de glucosa en las neuronas (Seneff y cols., 2011). En este sentido, se ha encontrado evidencia de que una baja cantidad de colesterol en las membranas neuronales promueve la agregación de β A además, formando poros que provocan un cambio en el potencial eléctrico de dichas membranas (Kawahara y cols., 2011).

La microbiota intestinal como factor determinante en la etiología de enfermedad de Alzheimer

La hipótesis de que la MI puede ser factor determinante en la etiología de las enfermedades neuropsiquiátricas no es nueva, esta teoría se ha estado investigando desde hace más de un siglo; médicos y científicos proponían que las bacterias del intestino podían contribuir en enfermedades como la fatiga, la melancolía y la neurosis (Brower. 1898, Townsend. 1904). En ese entonces, se referían a la teoría de la “Auto intoxicación” que se definía como el daño o enfermedad causado por los microorganismos que viven en el intestino humano (Bouchard. 1897).

La teoría no prosperó debido que en ese tiempo no se contaba con las técnicas necesarias para registrar los procesos bioquímicos que subyacen a la conducta ni los cambios ecológicos y metabólicos que experimenta la MI (Bestedy cols., 2013). Sin embargo hasta este siglo se ha registrado un resurgimiento de esta teoría, ahora con las nuevas herramientas bioquímicas estamos siendo capaces de encontrar una correlación entre la disbiosis y cambios de conducta e inclusive ya se ha documentado claramente la participación de la MI en casos de enfermedades neuropsiquiátricas como los trastornos del espectro autista y la depresión (Bravoy cols., 2011, Hsiaoy cols., 2013).

En este contexto, recientemente se ha propuesto que la MI puede estar influenciando el desarrollo de la EA por medio de un aminoácido neurotóxico Beta-N-Metilamino-L-Alanina (BMAA), que se ha relacionado con el plegamiento erróneo de proteínas neuronales como es el caso del β A. Este aminoácido, se encontró elevado en pacientes con la EA y esclerosis lateral amiotrófica (Brenner. 2013). Se cree que

especies bacterianas residentes en la MI relacionadas con el *phylum Cyanobacteria* pueden producir este aminoácido tóxico como un metabolito secundario. Recientemente se ha propuesto el taxón *Melainabacteria* para estos microorganismos, que se encuentran ampliamente distribuidos en aguas subterráneas y el tracto gastrointestinal aunque no se ha podido determinar su función en ambos ecosistemas (Di Rienzi y cols., 2013). Horning y colaboradores (Hornig. 2013) propusieron que la desnutrición, la ansiedad y el estrés así como procesos crónicos de inflamación intestinal podrían promover el crecimiento de estas bacterias

Otra hipótesis sobre el papel de la MI en la EA propone que el lipopolisacárido (LPS) y otras lipoproteínas producidas por las especies residentes de la MI puede estar regulando a la baja la actividad del receptor TREM2 necesario para la detección y fagocitosis de los agregados de βA , produciendo un desbalance en la relación producción – eliminación del βA promoviendo así su acumulación (Zhao y cols., 2015).

Adicionalmente, se ha encontrado que la endotoxina de *E.coli* es capaz de potenciar la formación de agregados de βA (Asti y cols., 2014).

En la Figura 3, se esquematizan las teorías que explican el papel de la MI como un factor ambiental en la etiología del EA. Se ha encontrado evidencia de que los microorganismos de la MI tienen capacidad de producir metabolitos secundarios neurotóxicos y proteínas de naturaleza amiloideas. Así mismo se tiene evidencia de que el epitelio intestinal y la barrera hematoencefálica tienden a ser más permeables

con la edad (Farrall y cols., Turner.). Bajo esta perspectiva, mientras envejecemos, los productos de la MI pueden pasar al torrente sanguíneo y llegar al SNC. Una vez ahí, las proteínas amiloideas pueden sumarse al amiloide endógeno producido por las neuronas y saturar los receptores TREM2 produciendo una inhibición de la fagocitosis de los agregados proteicos llevando a la agregación de los mismos. En el caso de los metabolitos neurotóxicos, pueden directamente aumentar la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) o producir directamente la muerte neuronal. Ambos mecanismos detonan el círculo vicioso de la EA que es el aumento de ROS por el incremento en la acumulación de β A, como respuesta a estos estímulos se produce astrogliosis, que promueve aún más la producción de ROS y la acumulación de β A. Estos procesos modifican el potencial eléctrico de las neuronas así como su metabolismo y capacidad de transporte por lo que promueven la muerte neuronal

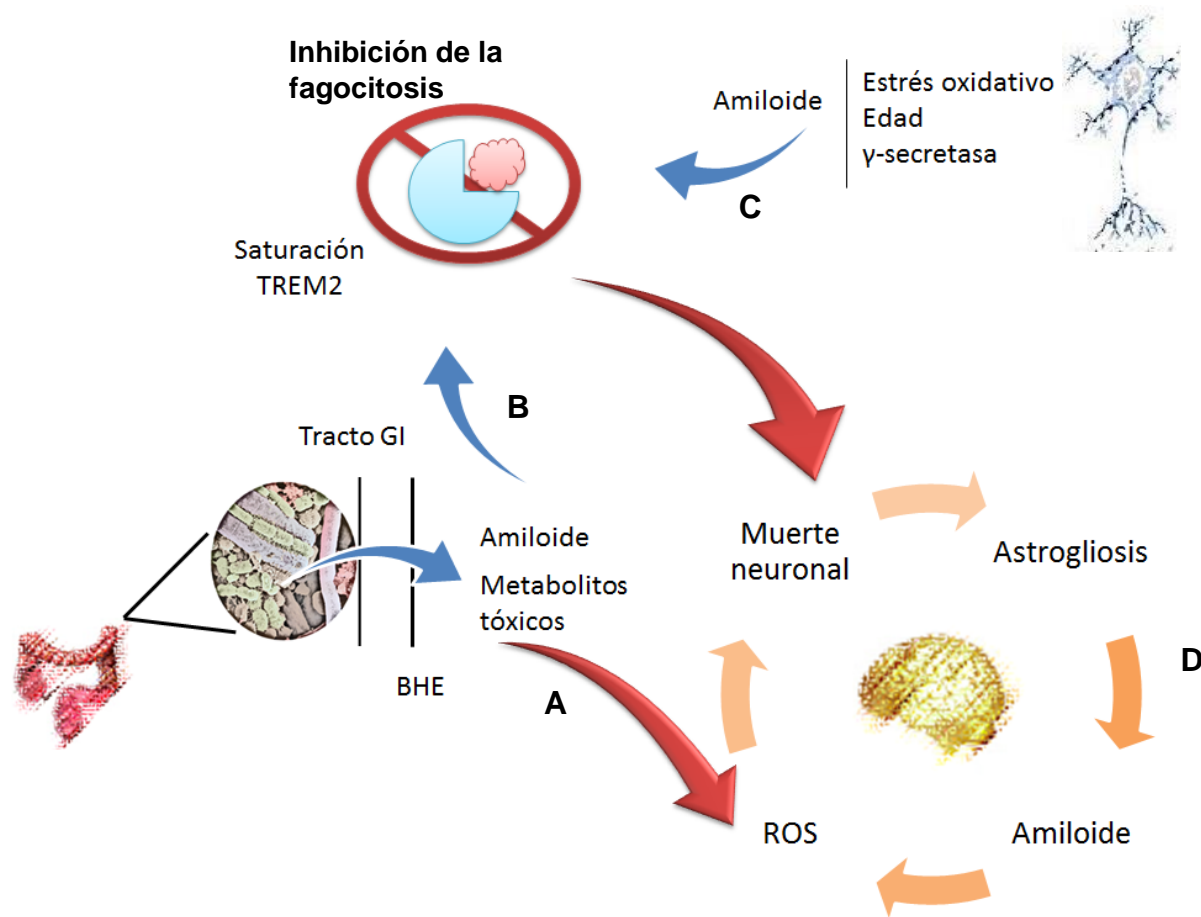


Figura 3: Esquema de como la MI puede funcionar como un factor ambiental en la etiología del EA. A) Metabolitos neurotóxicos producidos por la MI. B) Producción de proteínas amiloides por la MI. C) Producción de amiloide por tejido neuronal. D) Circulo vicioso de la EA

Modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer

El uso de modelos animales para el estudio de la EA ha sido parte fundamental para la comprensión de la misma, en 1995 se creó el primer ratón transgénico portador el gen APP humano que desarrollaba características distintivas de la patología. En el cerebro de estos ratones se producían las agregaciones de βA y se pudo determinar que eran estas y no los ovillos neurofibrilares eran los causantes de la neurodegeneración (LaFerla y cols., 1995). Desde entonces se han desarrollado

otros modelos experimentales que tratan de reproducir mejor las características de la EA, sin embargo, hasta la fecha, no se ha podido desarrollar uno que emule la EA esporádica.

En este contexto el modelo animal seleccionado en este proyecto es el triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTgAD) en el que se expresan la mutaciones de los tres principales genes encontrados en la EA familiar: Presenilina (PS1_{M146V}), APP (APP_{Swe}) y Tau (Tau_{P301L}) (Oddoy cols., 2003). Es el primer modelo animal que presenta la formación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares en regiones cerebrales relevantes, en la Figura 4 se muestran las lesiones histopatológicas de la EA en el modelo animal.

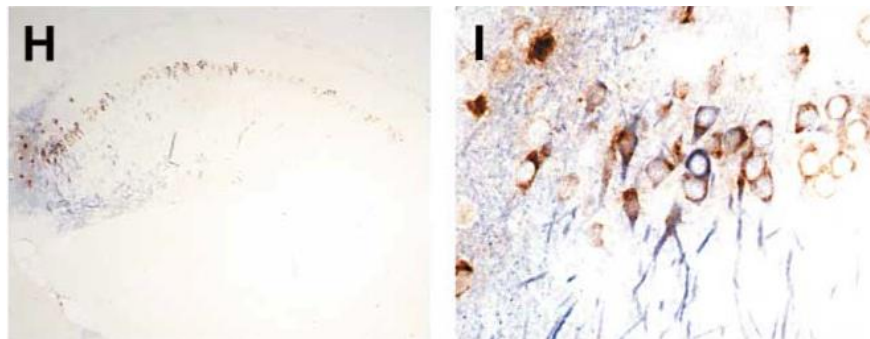


Figura 4: Lesiones de la EA en el modelo 3XTg-AD. En H se muestra la colocación de los antígenos anti β A y Tau en el hipocampo de ratones 3XTg-AD. En I una amplificación de células piramidales del hipocampo en su región CA1 (Oddo y cols., 2003)

El modelo 3xTg-AD imita la EA en humanos al presentar depósitos extracelulares de β A antes de la formación de los ovillos neurofibrilares, así como la presencia de estos biomarcadores relacionados con la edad. De igual forma en este modelo

experimental, las estructuras cerebrales se dañan de forma jerárquica, es decir, en primer lugar las células piramidales del hipocampo en su región CA1, la vía musgosa del hipocampo y cortezas hipocámpales, para sucesivamente progresar al resto de las cortezas y estructuras relacionadas. En la Tabla 3 se resume la presencia de las proteínas en estructuras cerebrales clave en dos momentos de la vida del animal equivalentes a un adulto joven (6 meses) y senectud (12 meses) (Oddoy cols., 2003).

Tabla 3: Presencia de agregados de proteína β A y Tau en estructuras cerebrales a los 6 y 12 meses de edad del modelo 3xTG-AD

Estructura cerebral	6 meses	12 meses
Neocortex	β A intraneuronal β A extra celular	β A intraneuronal β A extra celular Tau hiperfosforilada
Hipocampo (CA1)	β A intraneuronal	β A intraneuronal β A extra celular Tau hiperfosforilada
Regiones corticales del hipocampo	-	β A intraneuronal β A extra celular Tau hiperfosforilada

En cuanto a la conducta del modelo 3xTg-AD, estos animales son más inquietos en comparación con los controles y también presentan mayor reacción de sobresalto frente a un sonido repentino, así como también presentan un aumento en el

comportamiento de congelamiento. Respecto a su actividad locomotora, su deambulaci3n y exploraci3n est3n disminuidas. En cuanto a la coordinaci3n visomotora se encuentran aumentadas compar3ndolo con el control (Sterniczuk y cols., 2010). Por otra parte las deficiencias cognitivas del modelo 3xTg-AD se han identificado por varios m3todos experimentales de reconocimiento de aprendizaje y memoria:

- a) Reconocimiento gustativo. Esta prueba conductual se realiza mediante un condicionamiento aversivo los sabores (CAS), que se logra mediante la administraci3n de un irritante visceral como el LiCl despu3s de probar alg3n sabor novedoso (ej. sacarina). Con este paradigma experimental se mide la funci3n de las estructuras colin3rgicas ya que es necesaria la producci3n de un pico de acetilcolina para la formaci3n de la memoria gustativa. En el modelo 3xTg-AD se producir3 una diferencia entre animales j3venes y viejos, debido al da1o de las estructuras colin3rgicas. En este caso los animales j3venes recordarán la asociaci3n del sabor con el malestar visceral y generar3n una respuesta aversiva al sabor y por lo tanto evitar3n el consumo del mismo. Por el contrario, los ratones viejos no lograr3n aprender la relaci3n sabor-malestar g3strico y por consiguiente, el consumo del agua de este sabor en particular no se modifica (Bermudez-Rattoni. 2014).
- b) Reconocimiento de objetos. En esta prueba se utiliza el instinto natural del animal de explorar los objetos nuevos, por lo tanto si el animal discrimina un objeto nuevo de otro ya conocido, se espera que invierta m3s tiempo explorando los novedosos. Esta prueba conductual, sirve para medir el

funcionamiento del lóbulo temporal, es especialmente útil porque es un centro de asociación multimodal y una de las estructuras que se dañan de forma temprana durante la EA. En el modelo 3xTg-AD se encuentran diferencias entre los animales jóvenes y viejos, los animales jóvenes presentarán mayor tiempo de exploración en los objetos novedosos, sin embargo, los animales viejos invierten el mismo tiempo en objetos nuevos y conocidos por lo que se concluye que presentan un déficit cognitivo al no ser capaces de reconocer entre los objetos nuevos y los ya conocidos (Guzmán-Ramos y cols., 2012).

- c) Memoria viso-espacial. Para esta prueba se utiliza un laberinto de agua de Morris, cuyas características permiten el reconocimiento de rutas de escape hacia una plataforma invisible solamente guiado por referencias visuales y espaciales. Al tratarse de un laberinto acuático se evita que el animal utilice referencias de olor para encontrar la ruta hacia la plataforma. Esta prueba conductual permite medir la formación de aprendizaje nuevo, así como la memoria de las vías de escape ya conocidas, permitiendo evaluar el desempeño de las estructuras hipocámpales y su interconexión con el neocórtex. En el modelo 3xTg-AD, no se presentaron diferencias significativas en los animales jóvenes pero en los animales viejos se presenta un aumento en el tiempo que el animal tarda para encontrar la ruta de escape hacia la plataforma y una disminución en el tiempo que el animal pasa por la zona donde se encontraba la plataforma durante las sesiones de aprendizaje, por lo que se concluye que el ratón no recuerda en dónde se encuentra la plataforma

y/o no es capaz de integrar la información viso espacial para llegar a la misma (D'Hooge y cols., 2001).

En resumen, aunque hasta la fecha no existe evidencia experimental de la comunicación del eje MIC en la EA, existen fuertes indicios del potencial terapéutico y la posibilidad de diagnóstico prematuro de la EA por medio de la MI (Bhattacharjee y cols., 2013, Pérez Martínezy cols., 2014). Por lo tanto nos proponemos caracterizar la MI del modelo murino 3xTg-AD durante dos etapas de la enfermedad: la fase pre sintomática (5 meses), y la fase sintomática (10 meses). Así mismo proponemos comparar la MI intestinal entre estos dos estadios para conocer si se mantiene la firma bacteriana de la enfermedad.

Justificación

Las proyecciones para la prevalencia de la EA no son alentadoras, se calcula que en Estados Unidos para el 2050 el número de personas con la EA será de 15 millones de personas (Brookmeyer y cols., 1998). Desafortunadamente en México no existe un estudio serio que nos permita conocer la prevalencia actual en nuestro país. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Latinoamérica tiene el mayor índice de prevalencia de demencia a nivel mundial con 8.5% de la población mayor de 60 años (Duthey. 2013). En este sentido, en la Figura 5 se muestra la comparación de las pirámides poblacionales para los años 2000 y 2050 en México. Claramente podemos observar un aumento en la proporción de la población mayor de 60 años para 2050 (28%). Si la prevalencia de demencia para Latinoamérica es del 8.5%, el aproximado de personas con demencia en nuestro país en el 2050 será de 3 millones de personas (Consejo Nacional de Población. 2002, Llibre Rodriguez y cols., 2008).

Pirámides de población en México

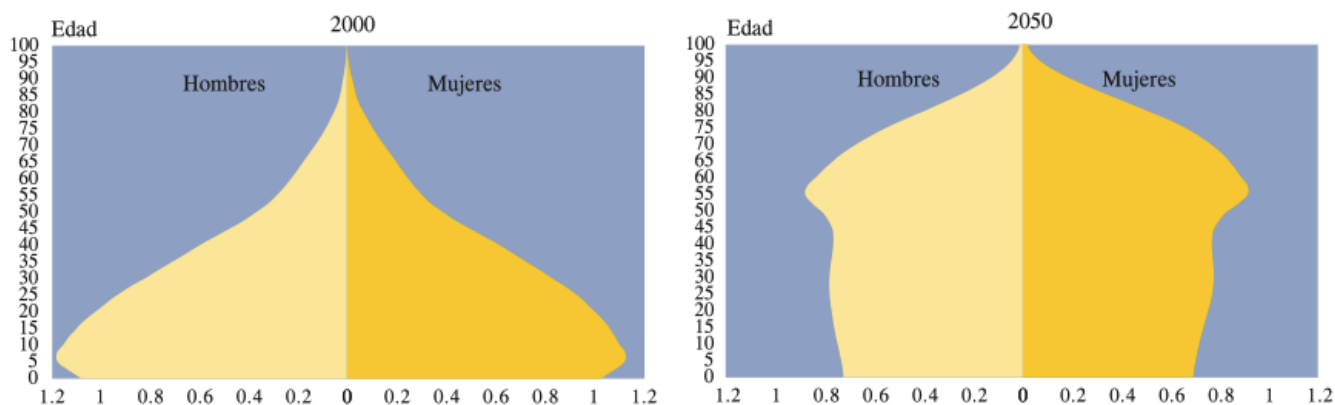


Figura 5: Pirámides poblacionales 2000-2050. Tomado de: (Consejo Nacional de Población. 2002).

Este aumento en el número de personas con demencia es preocupante, principalmente desde el punto de vista económico, ya que la población afectada no podrá ser económicamente activa. Adicionalmente el sistema de salud deberá cubrir los gastos de la enfermedad ya que se requiere de un tratamiento médico continuo para monitorear los avances de la enfermedad, así como pagar los medicamentos necesarios.

De manera importante, las personas encargadas de los pacientes deberán invertir un gran número de horas para el cuidado de los enfermos o contratar servicios especializados. Es evidente que esta situación conlleva gastos superiores comparados al cuidado de una persona mayor sin demencia. Para EUA., en 2014 el gasto promedio sólo para el tratamiento de largo plazo y hospitalización de los pacientes con demencia fue de 150 mil millones de dólares. En nuestro país no hay datos formales al respecto pero seguramente la carga económica para el sistema de salud como para las familias causará una mella importante.

Por estas razones es relevante la investigación biomédica que se realice al respecto de las causas y posibles tratamientos de la EA.

Pregunta de investigación

¿Existen cambios en la MI que permitan diferenciarla entre los estadios pre sintomático (5meses) y sintomático (10meses) en el modelo murino 3xTg-AD para la de EA?

Hipótesis

Si ocurren cambios de la MI asociado al desarrollo de la EA en el modelo murino 3xTg-AD, se espera encontrar diferencias en la composición de la MI en los estadios pre-sintomático (5 meses) y sintomático (10 meses).

Objetivo general

Caracterizar los cambios en la MI del modelo murino 3xTg-AD antes y después del desarrollo de la sintomatología cognitiva de la EA.

Objetivos específicos

En el modelo murino 3xTg-AD para la EA en el estadio pre sintomático (5 meses) y sintomático (10 meses)

1. Caracterizar la MI.
2. Comparar la composición y estructura de la microbiota intestinal.
3. Determinar de las capacidades cognitivas.
4. Determinar biomarcadores de EA.

Material y métodos

Modelo experimental murino

Los ratones control fueron machos de la cepa B6129SF1/J (primera generación filial de machos 129S1 y hembras C57BL/6J), ya que la cepa 3xTg-AD tiene un fondo genético B6;129.(Guo y cols., 1999). Se formaron 4 grupos: Control joven, Control senil, 3xTG-AD joven, 3xTg-AD senil, en la Tabla 4 se muestra la edad de sacrificio y el número de animales por grupo

Tabla 4: Grupos de experimentación

Grupo	Edad de sacrificio	No de ratones
Control joven (C5M)	5 meses	5
Control senil (C10M)	10 meses	5
3xTg-AD joven (T5M)	5 meses	5
3xTg-AD senil (T10M)	10 meses	5

El sacrificio se realizó con una dosis letal de pentobarbital sódico (>50mg/kg i.p.) y los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca con solución salina (0.9% p/v) a 37°C seguido por buffer de fijado (formaldehído 0.4% y glutaraldehído 1% en buffer de fosfatos 0.2M pH 7.4

Los animales se mantuvieron en instalaciones adecuadas y diseñadas para el mantenimiento y experimentación animal (Bioterio del Centro Nacional Siglo XXI, IMSS), con ciclos de luz- oscuridad de 12 h y acceso al agua y alimento *ad libitum*, conforme las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.(Diario Oficial de la Federación. 2001)

Análisis conductual

El objetivo de la prueba del laberinto de agua de Morris (Bromley-Brits y cols., 2011) es determinar el funcionamiento de la memoria dependiente de hipocampo (aprendizaje y memoria espacial). Durante el entrenamiento, se coloca al animal en una piscina cuyas características se muestran en la Figura 6. Se utiliza una plataforma sumergida no visible, por lo tanto el animal debe encontrar la plataforma sirviéndose solo de referencias visuales creando así un mapa mental viso-espacial. (Ver Anexo 9: PEO 9: Entrenamiento de ratones para laberinto de Morris). Durante la prueba, se quita la plataforma y se permite el libre nado de los animales durante 60 segundos. Durante este tiempo, se mide cuantos segundos le toma al animal llegar al área que ocupaba la plataforma y el tiempo que pasa el ratón en el cuadrante donde se encontraba la plataforma, a mayor tiempo en esta área se considera mayor nivel de memoria o retención (D'Hoogey cols., 2001). Ver Anexo 10: PEO 10: Prueba de memoria viso-espacial en laberinto de Morris.

El análisis conductual se llevó a cabo a en los grupos C5M y T5M a la edad de 5 meses y en los grupos C10M y T10m a la edad de 10 meses

Los resultados del análisis conductual fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianzas (ANOVA), con un análisis post hoc de mínima diferencia significativa de Fisher.

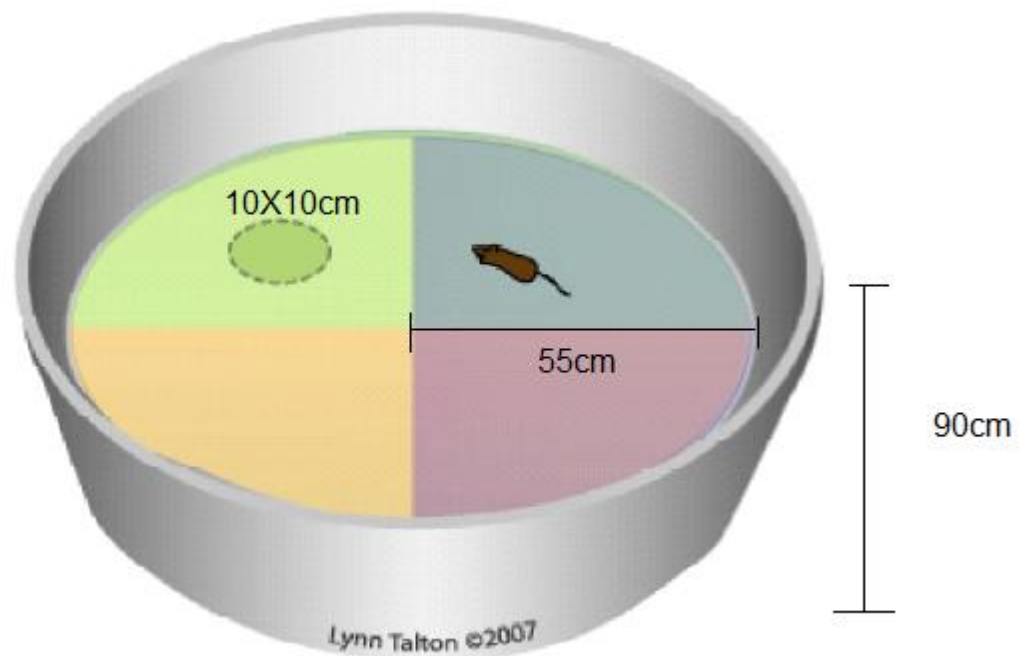


Figura 6: Características del laberinto de agua de Morris utilizado para la prueba conductual. La piscina tiene una altura de 90cm con un radio de 55cm y la plataforma para la tarea mide 10X10cm

Genotipificación del modelo murino

El ADN bacteriano obtenido mediante el PEO 3: Extracción de ADN de muestra intestinal contiene del 30 al 50% de ADN del huésped por lo que puede ser utilizado para la genotipificación de los animales. Para lo anterior se agregó 1µl de este ADN a las reacciones de genotipificación. Los primers para la amplificación de los genes

APP-Tau son: 5'TauRev 5' TCCAAAGTTCACCTGATAGT 3', APPinternal 5'
GCTTGCACCAGTTCTGGATGG 3', Thy12.4 5'GAGGTATTC AGTCATGTGCT 3'
Ver Anexo 11: PEO 11: Genotipificación de ratones 3xTg-AD.

Inmunohistoquímica

Después de la disección del intestino, se perfundio el animal con paraformaldehído al 4% como lo describe el Anexo 12: PEO12 Perfusión de ratones con paraformaldehído. Inmediatamente después se realizó la disección de cerebro como se muestra en el Anexo 13: PEO 13 Disección de cerebro y almacenamiento.

Se analizó la presencia de placas amiloides en cortes histológicos del cerebro de 40µm que se obtuvieron como se describe en el Anexo 14: PEO 14 Cortes histológicos de cerebro para la determinación de β-amiloide, utilizando la técnica de inmunohistoquímica descrita por Guzmán-Ramos y cols. (Guzmán-Ramos y cols., 2012).

Para la determinación de β-amiloide. Se midió la cantidad de agregados βA utilizando como anticuerpo primario Beta Amyloid, rodent specific monoclonal antibody, purified (Biolegend, California, E.U.A.) y como anticuerpo secundario Anti mouse IgG del Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Inc, California, E.U.A.).

La concentración del anticuerpo anti-βA fue 1::250, se incubó toda la noche a 4°C y se reveló con diaminobenzidina utilizando el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ver Anexo 15: PEO 15: Inmunohistoquímica para β-amiloide en cerebro de ratón.).

Muestreo de Microbiota Intestinal

Se ha encontrado que la información acerca de la composición de la microbiota se ve sesgada dependiendo de qué parte del intestino se haya estudiado, en el caso de las heces se ha encontrado que representan una combinación de bacterias desprendidas de la mucosa y las bacterias no adherentes que se encuentran en el lumen intestinal (Eckburg y cols., 2005). Por lo tanto la determinación de la MI se realizó utilizando como muestra todo el contenido intestinal, haciendo lavados con solución isotónica que permitió el desprendimiento de las comunidades adheridas al epitelio intestinal. Para tal efecto el procedimiento para la toma de muestra fue el siguiente:

Antes de perfundir al animal, se abrió la cavidad abdominal y seccionó desde el inicio del intestino delgado y hasta el canal anal, se colocó la muestra en 10mL de búfer salino de fosfatos (PBS) y congeló a -20°C hasta su utilización (Ver Anexo 1. PEO1: Disección de intestino de ratón para muestra de microbiota intestinal).

La preparación de la muestra de MI para extracción de ADN se realizó mediante el vaciado del contenido intestinal y el posterior lavado del tejido con la solución en la que fue conservado. Posteriormente se centrifugó por 5 min a 8000rpm para separar las células, se desechó el sobrenadante y resuspendió el botón celular con 3mL de PBS, se congeló a -20°C hasta su subsecuente procesamiento (Ver Anexo 2. PEO 2: Preparación de muestra proveniente de tejido intestinal).

Para la extracción de ADN metagenómico, se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Stool kit (Hilden, Alemania) que cuenta con la ventaja de una pastilla inactivadora de sustancias inhibidoras de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y

ribonucleasas, este kit está basado en la adsorción del ADN en perlas de sílice por medio de concentraciones de sales, que permiten el lavado del material genético y su posterior elución (Ver Anexo 3. PEO 3: Extracción de ADN de muestra intestinal).

Determinación de la Microbiota Intestinal

La caracterización de la MI se realizó a partir de muestras de ADN metagenómico que es la totalidad de ácidos nucleicos de un sistema dado, en este caso, el contenido intestinal de los animales sujetos al estudio. El análisis de las comunidades bacterianas se realizó bajo un enfoque de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplado a geles con gradiente de desnaturalización (DGGE), como se describe en (Díaz-Ramírez y cols., 2008). Esta combinación de técnicas permite mediante la PCR, incrementar la cantidad de moléculas diana, en este caso las regiones V6-V8 del gen 16S ARN ribosomal, para posteriormente diferenciar las especies encontradas en comunidades bacterianas dependiendo de la cantidad de nucleótidos guanina (G) y citosina (C) de las moléculas diana de ADN de cada bacteria. Mientras mayor sea contenido GC, mayor será el tiempo que tardarán los amplicones en desnaturalizarse y migrarán mayor distancia en el gel. Para evitar la separación completa de los amplicones se utiliza una pinza-GC (“clamp”) unida a uno de los iniciadores (primers), en este caso el GC968_F. Los primers fueron seleccionados debido a que su diana es la región variable V6-V8 del gen ARN ribosomal 16S que presenta tanto secuencias conservadas como hipervariables por lo que es útil para el análisis filogenético. Las secuencias de los primers son: 1401_R (5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3') y GC968_F

(5'-GC-Clamp [CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G]-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'). Ver el Anexo 4: PEO 4: Preparación de amplicones para DGGE.

Bajo un gradiente de concentración, se forman patrones de bandeo, cada banda corresponde a un amplicón ARNr16S representativos de cada población de la comunidad bacteriana (Ver Anexo 5: PEO 5: Preparación de DGGE para el análisis de muestras de microbiota intestinal murina)

Adicionalmente las bandas en los geles pueden cortarse y secuenciarse para conocer la identidad y las relaciones filogenéticas de cada especie. La preparación de las bandas cortadas para secuenciación se realizó mediante la técnica reportada por (Ramírez-Saad y cols., 2000), ver Anexo 6: PEO 6: Elución de ADN de bandas cortadas de DGGE. Para lo cual se utilizó una amplificación con el primer F-968 para eliminar la pinza-GC (Ver Anexo 7: PEO 7: Amplificación de bandas cortadas de DGGE).

Posteriormente las muestras se purificaron por medio el kit comercial Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Wisconsin, E.U.A.) (Ver Anexo 8: PEO 8: Purificación de muestras para secuenciación).

La secuenciación de ácidos nucleicos se realizó por el método de Sanger, utilizando servicios externos de Magrogen Inc.(Seoul, Korea).

El análisis de la similitud entre los patrones de bandeo en los perfiles de DGGE es calculado con base a la presencia o ausencia de bandas expresadas como un coeficiente de similitud Este coeficiente se realiza bajo la fórmula:

$$DSC = \frac{2j}{a + b}$$

En donde: a = bandas del perfil 1, b = bandas presentes en el perfil 2, j = número de bandas comunes entre ambos perfiles. En este análisis, mientras más cercano sea el coeficiente a la unidad la similitud entre los perfiles será mayor.

La agrupación de los datos en forma de árbol, conocida como dendrogramas, agrupan los perfiles de bandeo por su similitud fueron construidos por el método de no ponderación de las medias aritméticas de grupos (UPGMA) utilizando el software "PyElph" (Pavel y cols., 2012).

Resultados

Caracterización de animales

La caracterización de los animales se llevó a cabo mediante el estudio de conducta, la genotipificación y la cuantificación de β -amiloide en cortes histológicos de cerebro. En la Figura 7 se muestran los resultados del estudio de conducta, en el panel A, se muestra el tiempo que tarda el animal en llegar a la plataforma (latencia) a lo largo del entrenamiento.

Se puede observar que las curvas de aprendizaje de todos los grupos son similares y la latencia disminuye con el número de entrenamientos a excepción del grupo T10M, en el que no se disminuye el tiempo de latencia en el segundo y tercer día de entrenamiento. Sin embargo al final del entrenamiento, la latencia de los grupos control es similar así como la latencia entre los grupos transgénicos dejando evidencia de que los animales control tienen un mejor desempeño al aprender tareas de memoria como se ha reportado en (Sterniczuky cols., 2010). Esta diferencia no es estadísticamente significativa en ninguno de los días de entrenamiento (día 1 $p=0.41$, día 2 $p=0.29$, día 3 $p=0.32$, día 4 $p=0.31$, día 5 $p=0.36$).

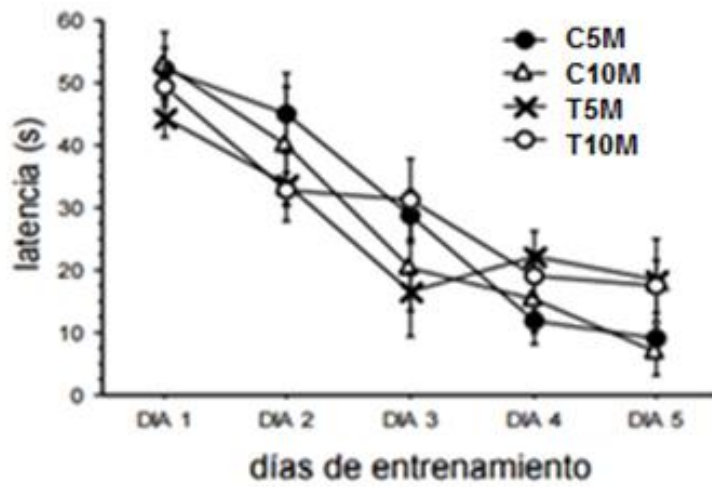
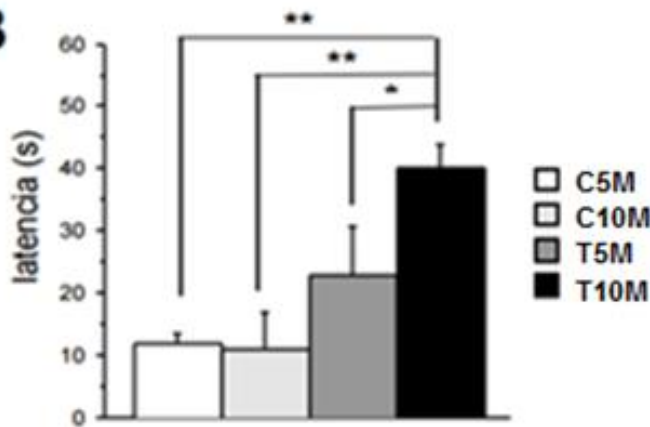
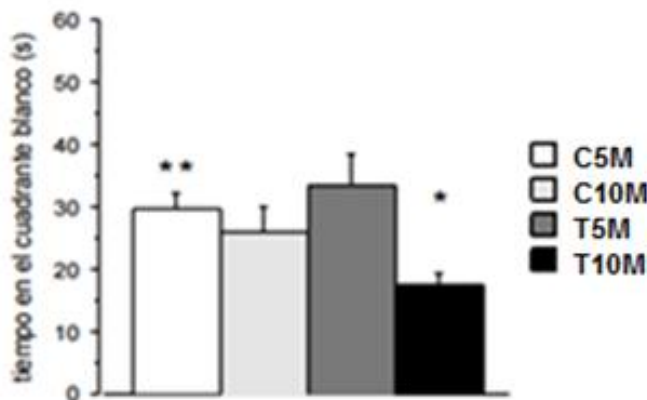
A**B****C**

Figura 7: Resultados del análisis de conducta. A) Latencia en entrenamiento, B). Latencia durante prueba (*) $p < 0.02$; (**) $p < 0.006$. C) Tiempo en cuadrante blanco durante prueba. (*) $p < 0.002$ entre T5M y T10M; (**) $p < 0.02$ entre C5M y T10M.

En la Figura 7B se muestra la latencia en el día de la prueba, ANOVA indico que existen diferencias significativas entre los grupos ($F_{(3,16)}=7.733$, $p<.0.003$), y después del análisis post hoc se encontró que la diferencia entre los grupos C5M y C10M comparados con el grupo T10M es estadísticamente significativa ($p<0.006$), de igual manera, que el grupo T5M al ser comparado con el grupo T10M ($p<0.02$)

En la Figura 7C, se muestra el tiempo que los animales pasan en el cuadrante blanco (el área donde solía ubicarse la plataforma), ANOVA indica diferencias significativas entre los grupos ($F_{(3,16)}=5.552$, $p<0.009$), y el análisis post hoc evidencio diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo C5M con el T10M ($p<0.02$), así como al comparar los grupos T5M con el T10M ($p<0.002$).

Con estos resultados podemos afirmar que los animales transgénicos jóvenes (5M) no presentan un deterioro cognitivo mientras que los animales transgénicos seniles (10M) ya presentan un marcado deterioro de la memoria espacial. Así mismo, los animales controles seniles no presentan una diferencia en su desempeño cognitivo en comparación a los animales jóvenes.

Genotipificación.

En la Figura 8 se muestran las genotipificaciones de los animales mediante PCR, en el panel A se muestran los animales jóvenes y en el panel B los animales seniles. Los animales transgénicos presentan dos bandas, una aproximadamente de 500 pb correspondiente al gen APP y la segunda aproximadamente a 350 pb correspondiente al gen Tau. Los animales control no presentan ninguna banda, de

esta forma se confirmó que los animales 3xTg-AD tienen insertados los genes humanos relacionados con la EA familiar.

En la figura 8A se muestran de izquierda a derecha: Animales jóvenes (5M), T5K (1), T5L(2), T5M (3), T5N (4), T5O (5), Marcador de peso molecular 100pb Axygen (6), C5A (7), C5B (8), C5C (9),C5D (10),C5E (11). Y en la figura 8B de izquierda a derecha: Animales seniles (10M) de marcador de peso molecular 100pb Axygen (1), T10P (2), T10Q (3), T10R (4), T10S (5), T10T (6), C10F (7), C10G (8), C10H (9), C10I (10), C10J (11).

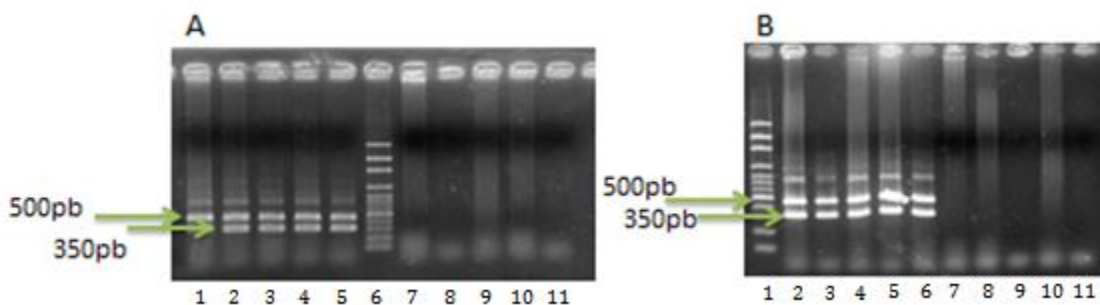


Figura 8: Resultados de genotipificación en geles de agarosa al 1.5%. A) Animales jóvenes (5 meses), transgénicos (carriles 1-5), marcador de peso molecular 100 pb Axygen (carril 6), controles (carriles 7-11). B) Animales seniles (10 meses), marcador de peso molecular 100 pb Axygen (carril 1), transgénicos (carriles 2-6) y controles (carriles 7-11)

Caracterización inmunohistoquímica de β -amiloide.

En la Figura 9 se muestran los resultados de la caracterización de β A, en los paneles superiores se muestran imágenes de tinciones inmunohistoquímicas en cortes histológicos de corteza prefrontal representativos a cada grupo: A) C5M, B) C10M, C)

T5M y D) T10M. Para determinar si se produce un cambio en la acumulación de β A en cada uno de los grupos se realizó una determinación densitométrica semicuantitativa mediante el software Image J (National Institute of Health, E.U.A.). Las variables consideradas fueron el área de análisis y la densidad de pixeles marcados por la acumulación de agregados proteicos teñidos, obteniendo como resultado el porcentaje del área en la que se presentan dichos agregados.

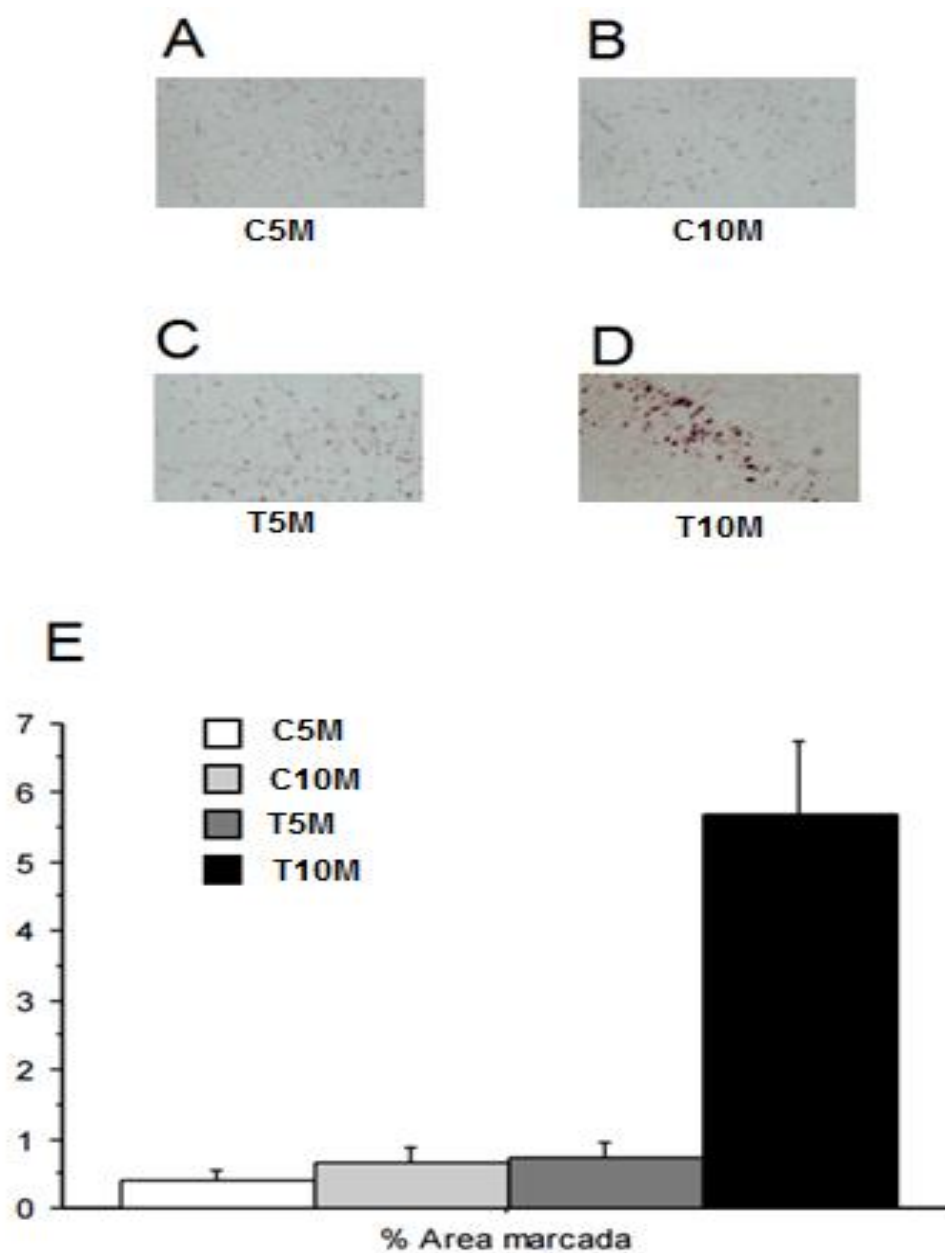


Figura 9: Caracterización de β -amiloide en cortes histológicos de corteza prefrontal; en A) C5M, B) C10M, C) T5M, D) T10M, se presentan imágenes representativas de cada grupo. E) Grafica comparativa de la determinación semicuantitativa de β -amiloide.

En la Figura 9E, se muestra la comparación de los resultados de cada grupo. En el grupo C5M el se cuantificó poca cantidad de amiloide ya que no puede aislarse la señal de fondo que se presenta normalmente en las inmunohistoquímicas, en los C10M y T5M, se encontró un porcentaje mayor de amiloide comparado con los C5M debido a que los animales C10M producen agregados amiloideos difusos en forma normal durante el proceso de envejecimiento y en los animales transgénicos, se puede encontrar agregados difusos de β A desde los 5 meses sin que esto cause un déficit cognitivo (Oddoy cols., 2003). En cuanto a los animales T10M el aumento de β A es de 5 veces el encontrado en los animales T5M.

Al realizar el análisis estadístico por ANOVA, se encontró que el grupo T10M es significativamente diferente de los otros con una $p < 0.006$ en todos los casos. Esto nos permite corroborar que el déficit cognitivo presentado por los animales se produce debido al aumento en la cantidad de β A en las estructuras cerebrales afectadas por la EA.

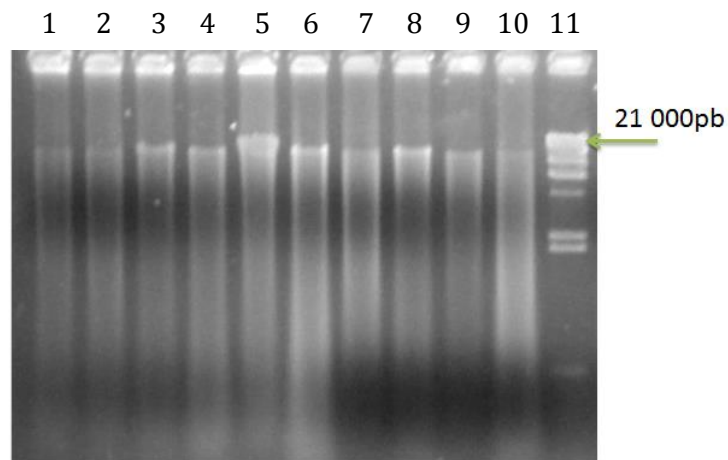


Figura 10: Extracción de DNA metagenómico en gel de agarosa al 1.5% De izquierda a derecha: C10F (1), T5O (2), T5M (3), T10S (4), C5B (5), T10P (6), C5C (7), C10J (8), T5K (9), T10T (10), Marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI+HindIII (11).

Determinación de la microbiota intestinal del 3xTg-AD

Para realizar la determinación de la microbiota se obtuvo ADN metagenómico del contenido intestinal total de los ratones. En la Figura 10, se muestran ejemplos de las extracciones de DNA metagenómico.

Posteriormente mediante PCR se obtuvieron amplicones de la región V6-V8 del gen ribosomal 16s con un clamp de GC, los que se corrieron en los geles de DGGE. En la Figura 11 se muestra un gel de agarosa con muestras amplificadas con los primers 968GCf y 1401r.

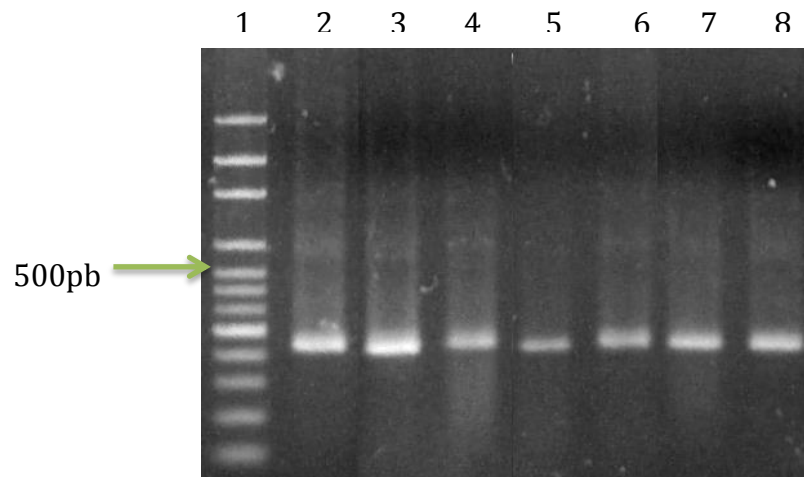


Figura 11: Amplicones V6-V8 con clamp GC para el análisis por DGGE en gel de agarosa al 1.5%. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular 100pb Axygen (1), C5C (2), C5E (3), C10H (4), C10I (5), T5K (6), T5O (7), T10R (8).

Mediante DGGE se determinaron los perfiles de bandeo de las comunidades microbianas de la MI de los cuatro grupos, en la Figura 12 se muestran las bandas representativas cortadas y re amplificadas para el análisis filogenético. Con el fin de encontrar tanto diferencias como similitudes entre las comunidades bacterianas, se seleccionaron bandas comunes entre grupos como la F1 y B7, se encontraron en todas las muestras de los grupos C10M y C5M respectivamente; y bandas conspicuas que solo pueden ser encontradas en algunas muestras como lo son la banda L2 de la muestra T5L y la banda J7 de la muestra C10J, Se obtuvieron 109 secuencias de estas bandas.

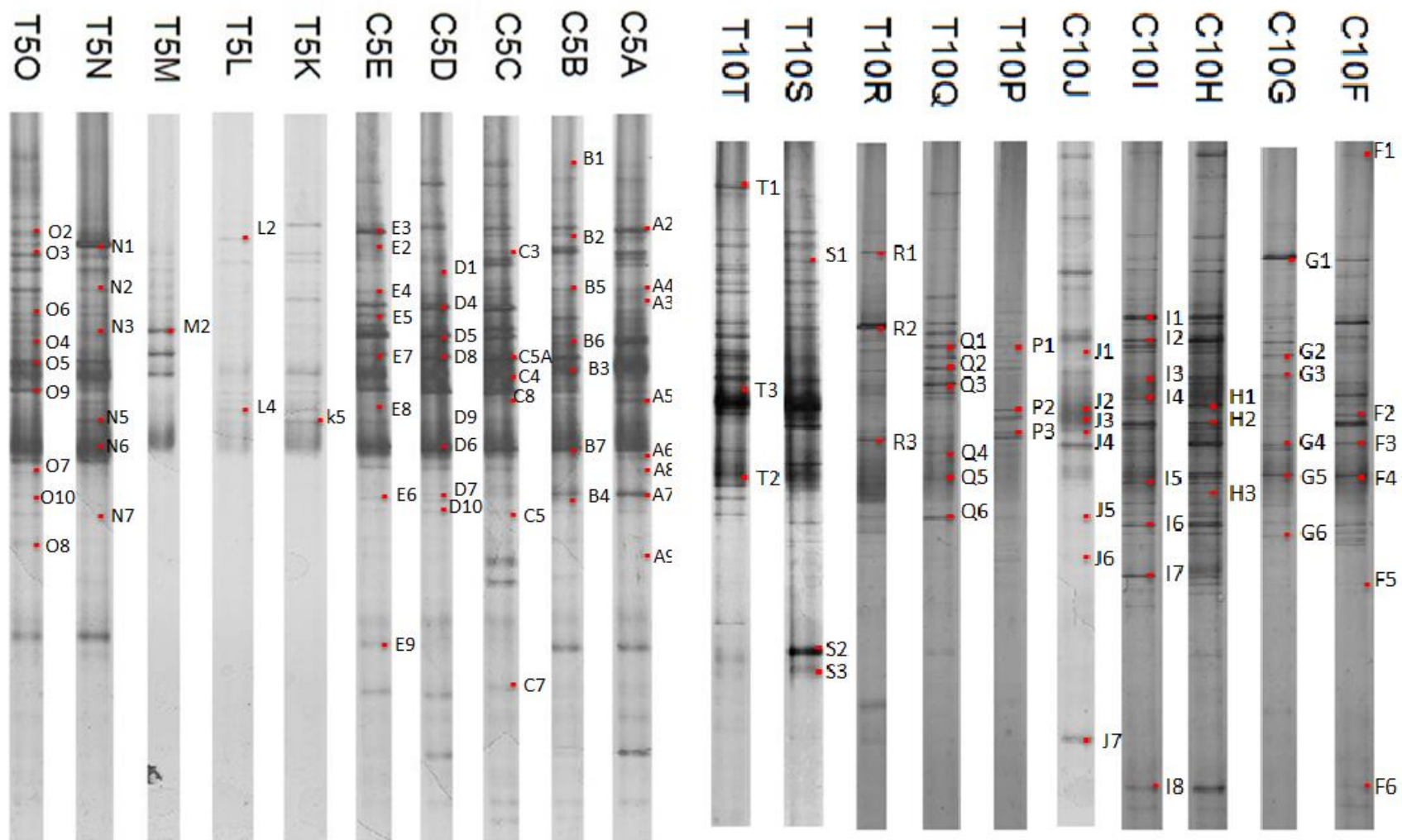


Figura 12: Selección de bandas para análisis filogenético, Se señalan con puntos rojos las bandas extraídas de los gels de DGGE y reamplificadas.

Comparación de la microbiota intestinal

Para la comparación de la MI se utilizaron dos herramientas, la primera fue el análisis de los perfiles de bandeo en los geles de DGGE que aportó información sobre la comunidad bacteriana en general. La segunda fue el análisis taxonómico de las secuencias obtenidas para determinar en qué familia o género bacteriano se llevó a cabo el cambio de la MI.

Durante el análisis de las especies bacterianas presentes en cada muestra se utilizó el análisis de los perfiles de bandeo, para poder compararlos se utilizó el programa PyElph,. Este programa bioinformático crea una matriz de similitud en la que se asignan valores de 0 y 1 a cada carril dependiendo de la ausencia o presencia de bandas respectivamente a una distancia de migración determinada por carril. Después se determinó la distancia genética mediante el índice de similitud de Dice. La matriz de distancias genéticas se analizó por el método UPGMA para construir dendrogramas. El método UPGMA forma clusters jerárquicos de forma aglomerativa, es decir que compara los patrones de bandeo y construye un dendrograma enraizado comenzando por los dos perfiles más similares y va adicionando ramas al clúster dependiendo de la distancia (diferencia) que exista entre los demás patrones. En el extremo inferior de cada uno se muestran los porcentajes de similitud

Al tratar de estudiar todos los perfiles de bandeo en un solo análisis se obtuvo un dendrograma que no permite visualizar cuáles son los factores por los que se agrupan las muestras, debido a que se presentan perfiles muy complejos y se obtienen porcentajes de similitud con valores menores al 80%. Por lo tanto, se

decidió realizar un análisis fraccionado por pares de grupos. En la figura 13 se muestra el dendrograma que se genera al analizar todos los perfiles de bandeo del estudio.

En la Figura 14 se muestra el dendrograma de los perfiles de bandeo en el que se comparan los animales C5M con los T5M para determinar si se encuentra diferencia entre los animales jóvenes debido al modelo de estudio. Se encontró que se forman dos clados bien definidos, el superior (formado por las muestras T5L, T5K y T5M) tiene un porcentaje de similitud menor al 80% al compararlo con el inferior, por lo que se considera que las muestras son diferentes. Además no se encuentra una diferencia en los perfiles de bandeo de la microbiota de los animales transgénicos jóvenes T5N y T5O ya que se agrupan con las muestras control en un porcentaje mayor al 85%.

En la Figura 15 se muestra la comparación de los perfiles de bandeo de los grupos C10M y T10M para corroborar que los cambios en la microbiota está determinado por el desarrollo de la enfermedad en el modelo animal. En este contexto se encontró que no existe una diferencia entre ambos grupos ya que los perfiles de bandeo se agrupan con un porcentaje de similitud mayor al 80% adicionalmente, las muestras control y transgénico se encuentran dispersas a lo largo del dendrograma.

La comparación de los perfiles de bandeo de los grupos C5M y C10M se muestran en la Figura 16, en este dendrograma se forman dos clados con un porcentaje de similitud mayor al 80%. Cada uno, están claramente definidos y en ellos se agrupan las todas las muestras del grupo C5M en el clado inferior y cuatro del grupo C10M en el superior.

En la Figura 17 se muestra la comparación de los perfiles de bandeo de los T5M y T10M, el árbol se enraíza en la muestra T5M debido a su poca similitud con el resto de las muestras (<80%), así mismo se puede observar que las muestras de los animales T10M, se agrupan con una similitud mayor al 80%. Aunque no se forme un clado separado de las muestras de los animales T5M, estas se encuentran en un nodo inferior (con un porcentaje de similitud menor al 80%) por lo que pueden considerarse diferentes.

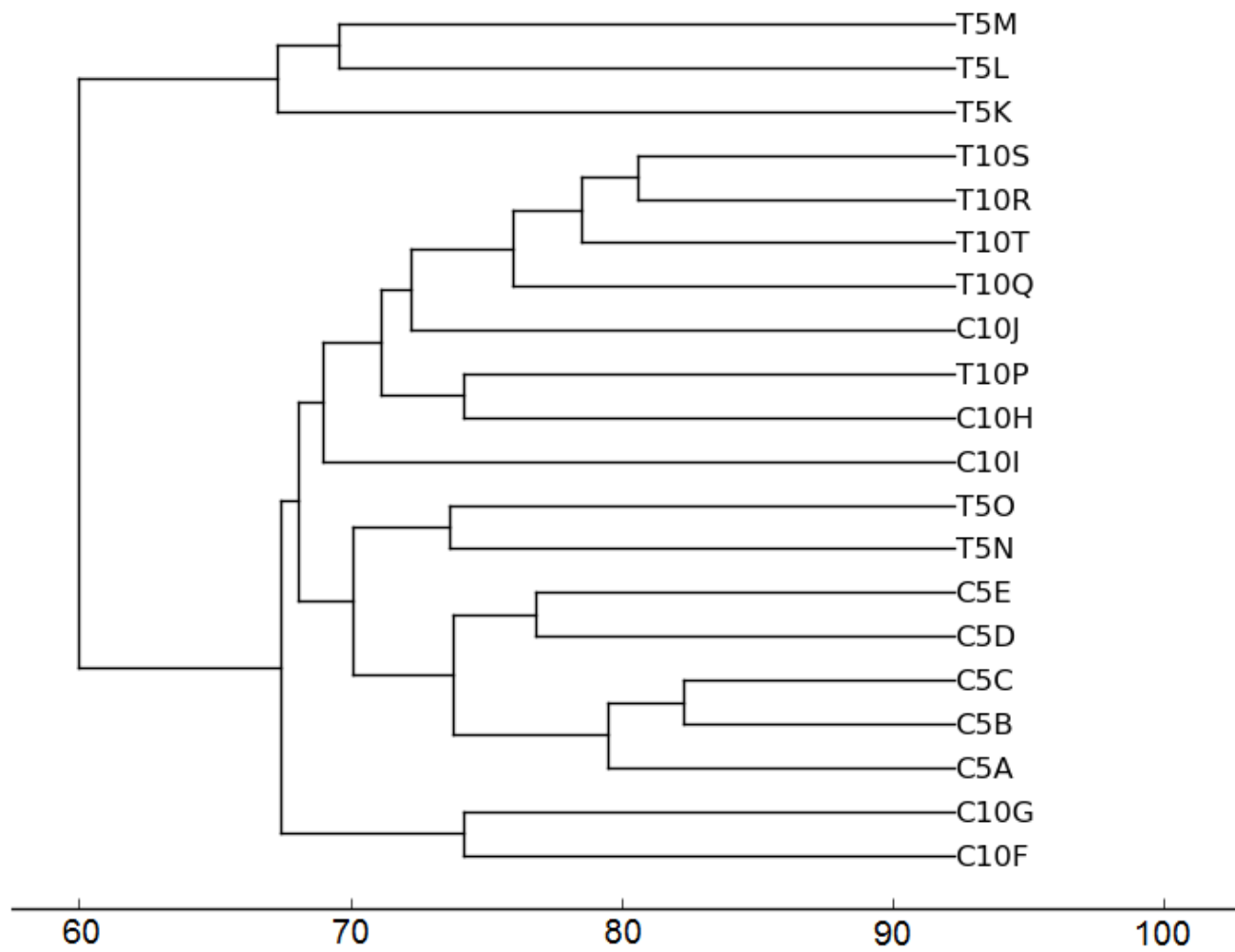


Figura 13: Agrupamiento de todos los perfiles de bandeado por UPGMA

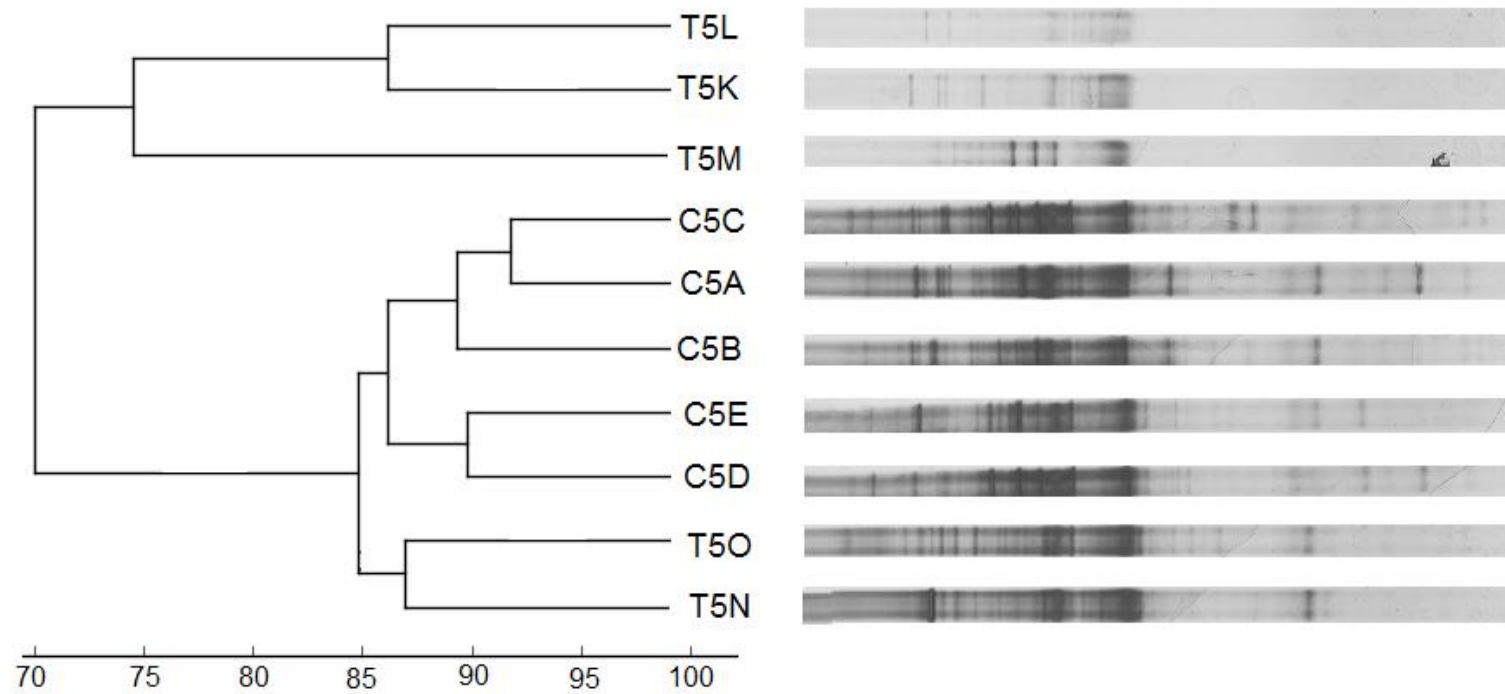


Figura 14: Agrupamiento de los perfiles de bandeo por UPGMA de los grupos C5M y T5M

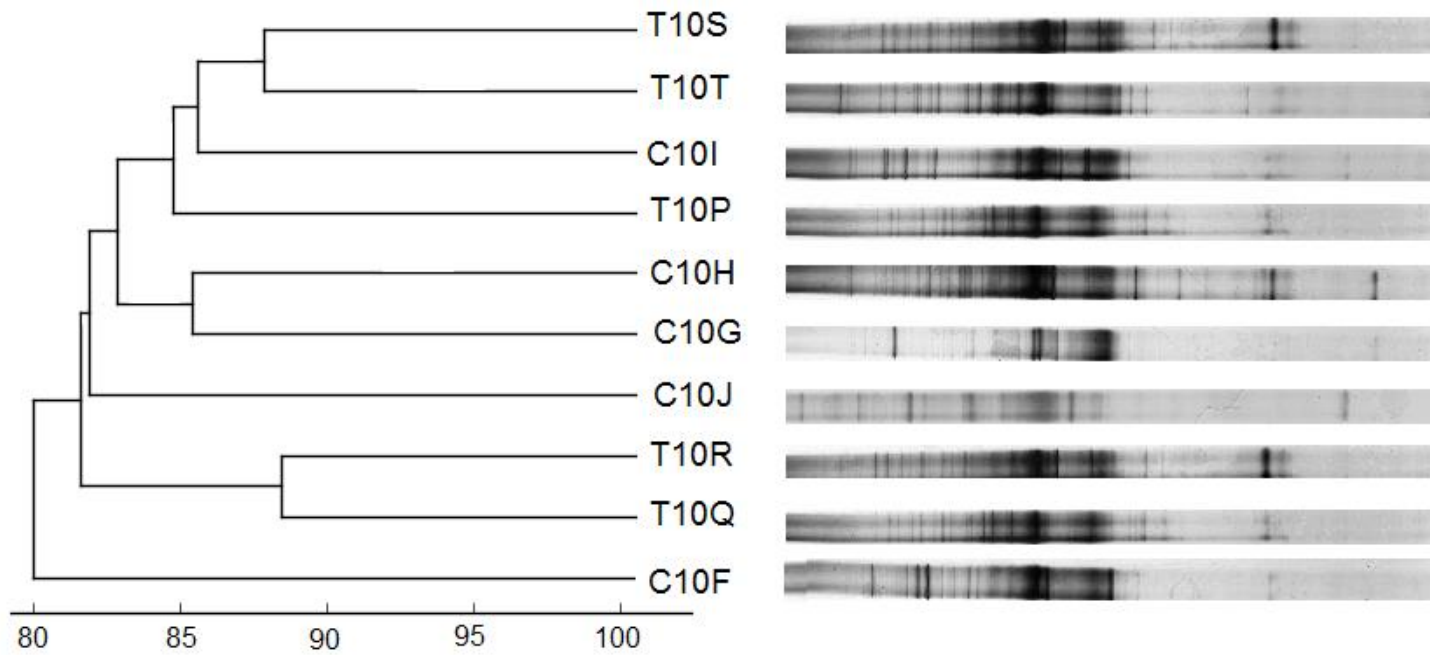


Figura 15: Agrupamiento de los perfiles de bandeos por UPGMA de los grupos C10M y T10M

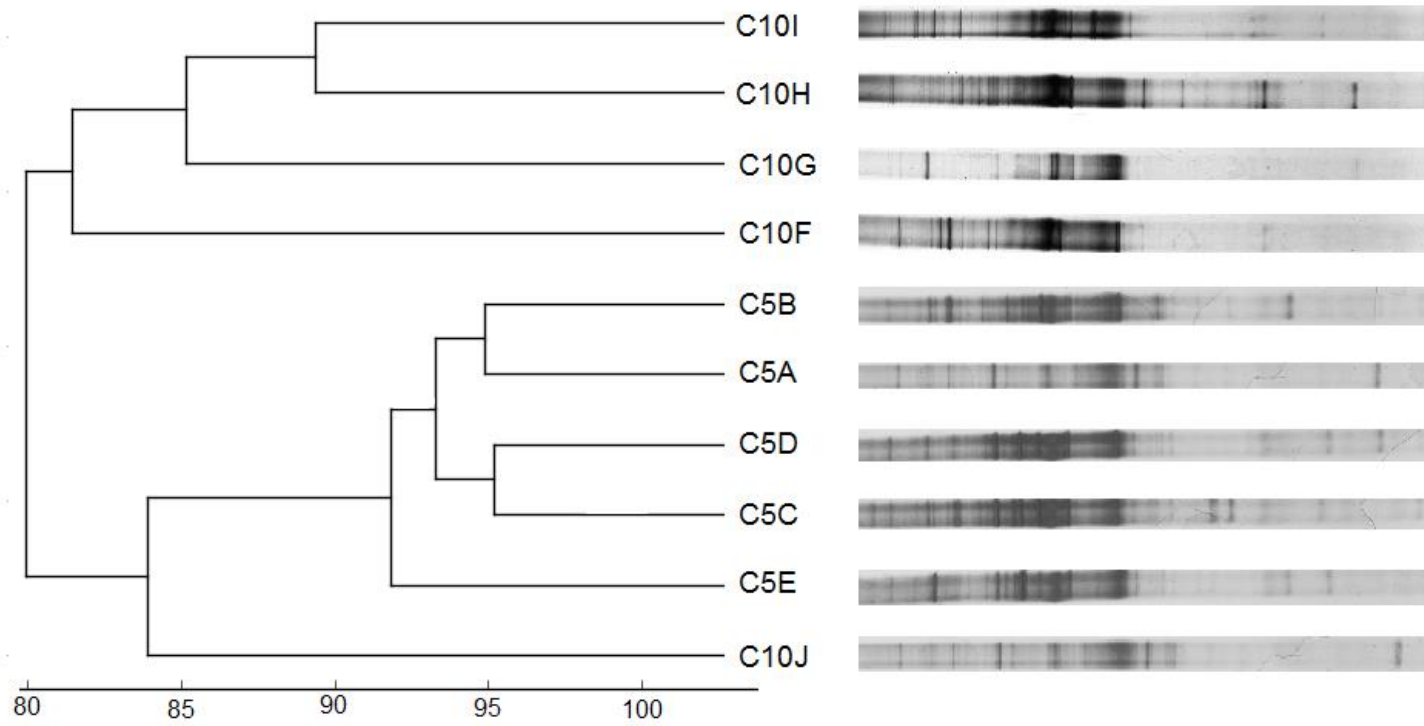


Figura 16: Agrupamiento de los perfiles de bandeo por UPGMA de los grupos C5M y C10M

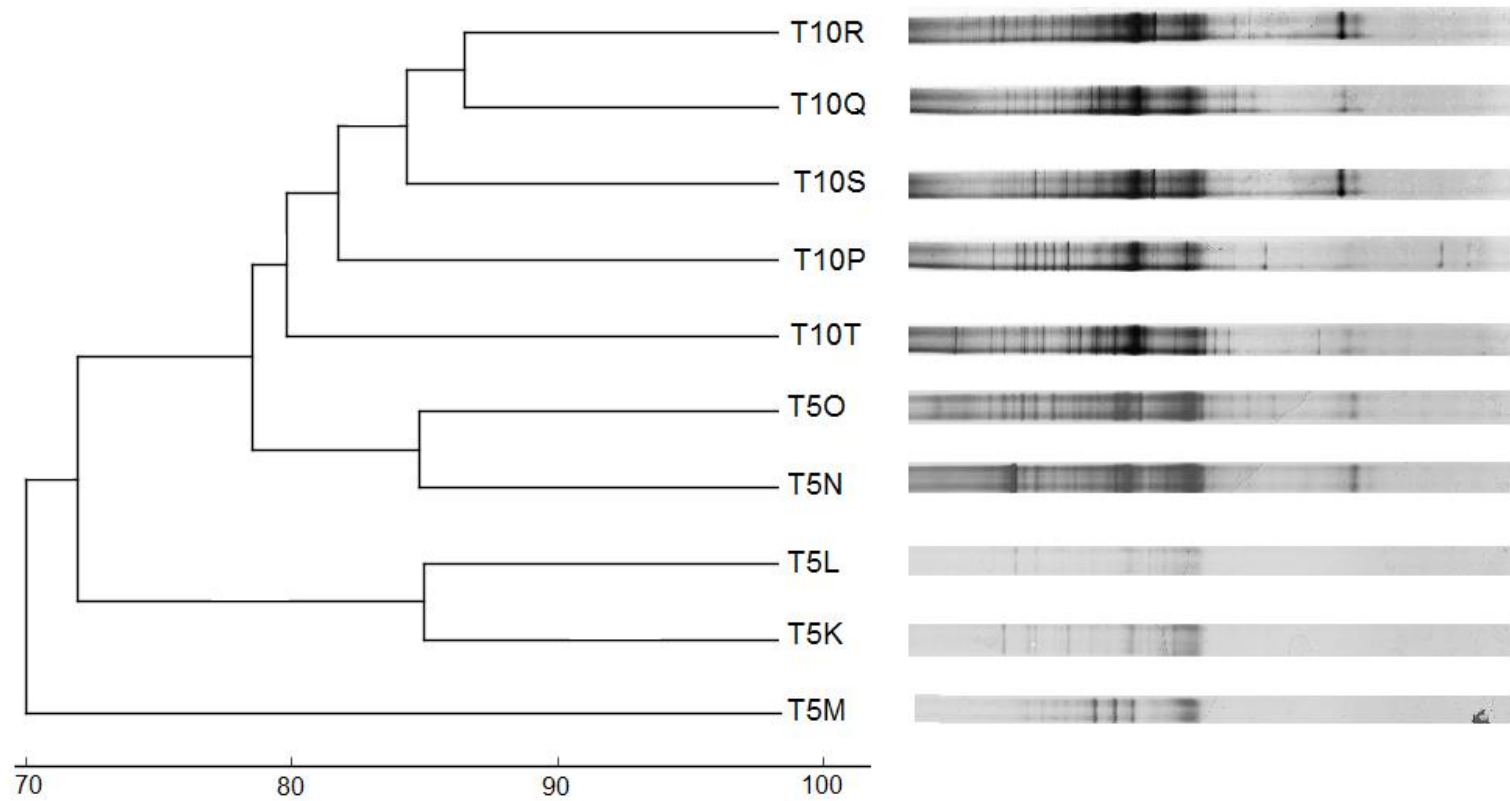


Figura 17: Agrupamiento de los perfiles de bandeo por UPGMA de los grupos T5M y C10M

Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

Las secuencias se compararon contra la base de datos de NCBI (Centro Nacional de Información para Biotecnología, EUA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante la herramienta en línea BLASTn, posteriormente se editaron manualmente utilizando el programa Seaview (Gouy y cols., 2010) y finalmente se analizó la presencia de secuencias quiméricas mediante el programa en línea DECIPHER (Wright y cols., 2012).

Posteriormente se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica para los datos por medio del programa Jmodeltest2 (Darriba y cols., 2011), con el criterio de información de Akaike. La reconstrucción filogenética se llevó a cabo mediante métodos de distancia por el programa MEGA6 (Tamura y cols., 2013) y la robustez de los arboles filogenéticos presentados se corroboró por medio de Bootstrap con 1000 iteraciones también por el programa MEGA6.

En la Tabla 5 se presentan las especies bacterianas más estrechamente relacionadas con las secuencias obtenidas. Se muestran los porcentajes de cobertura y similitud obtenidos con las secuencias más próximas.

El análisis de componente principal se realizó con el programa STAMP (Parks y cols., 2014). Debido a que el programa está diseñado para trabajar con datos obtenidos de secuenciadores de nueva generación, fue necesario procesar las secuencias mediante la herramienta bioinformática de acceso abierto para el análisis de secuencias del gel rARN 16s Mothur (Schloss y cols., 2009). El procesamiento

detallado de las secuencias se muestra en el Anexo 14: Procesamiento de secuencias de rARN 16s para el análisis estadístico por STAMP

Tabla 5: Secuencias bacterianas filogenéticamente más próximas a las secuencias obtenidas

Banda	Organismo relacionado	No. Acceso	Orden	Cobertura %	Similitud %
A2	<i>Tyzzarella nexilis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	97	92
A3	<i>Tyzzarella nexis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	97	91
A4	Clostridiales bacterium CIEAF 020	AB702928	Clostridiales	96	95
A5	Uncultured bacterium 2.c3.2	HQ681765		90	97
A6	Uncultured bacterium WT ctrl D5iii G10	JQ085179		86	98
A7	<i>Lactonifactor longoviformis</i> ED-Mt61/PYG-s6	NR_043551	Clostridiales	98	93
A8	Uncultured bacterium 16saw40-2f07.p1k	EF604685		98	93
A9	<i>Blautia glucerasea</i> JCM 17039	NR_113231	Clostridiales	92	90
B1	<i>Ruminococcus torques</i> VPI B2-51	NR_036777	Clostridiales	97	84
B2	Uncultured bacterium CRWD5	EU504165		96	83
B3	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	96	91
B4	<i>Ruminococcus gauvreauii</i> CCRI-16110	NR_044265	Clostridiales	95	93

B5	Uncultured bacterium K7N2 18c05	EU454459		97	93
B6	Uncultured bacterium C2II E02	JQ084721		96	91
B7	Uncultured bacterium C2II E02	JQ084721		97	89
C3	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	97	95
C4	Uncultured bacterium CT18-26F	JN105220		98	85
C5	<i>Clostridium citroniae</i> RMA 16102	NR_043681	Clostridiales	91	96
C5A	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	90	94
C7	<i>Ruminococcus torques</i> VPI B2-51	NR_036777	Clostridiales	91	95
C8	Uncultured bacterium CJ10	JN674469		99	85
D1	Uncultured bacterium ALP5	GQ402111		98	85
D10	<i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149	NR_036800	Clostridiales	97	95
D4	Uncultured clostridiales M Fe Clo060	AB702807	Clostridiales	88	99
D5	Uncultured clostridiales M Fe Clo074	AB702817	Clostridiales	94	99
D6	Uncultured WT ctrl D5iii G10	JQ085179		89	97
D7	Uncultured bacterium R-8196	FJ881206		81	99

D8	Uncultured bacterium H777s4 14d04	EU455566		92	90
D9	Uncultured bacterium C2II E02	JQ084721		97	99
E2	Uncultured bacterium WT ctrl D2 G05	JQ085030		95	88
E3	Uncultured bacterium 5 C5 3	JN012909		85	89
E4	<i>Anaerostipes caccae</i> L1-92	NR_028915	Clostridiales	97	91
E5	<i>Anaerostipes butyraticus</i> JCM 17446	NR_113319	Clostridiales	98	91
E6	Uncultured bacterium 2.C4.8.	HQ681770		85	95
E7	Uncultured <i>Escherichia sp.</i> DGGE	FJ877142		96	85
E8	<i>Anaerostipes butyraticus</i> JCM 17446	NR_113319	Clostridiales	98	90
E9	<i>Clostridium citroniae</i> RMA 16102	NR_043681	Clostridiales	97	95
F1	<i>Clostridium Clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	96	95
F2	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	97	97
F3	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	97	95
F4	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	98	94
F5	<i>Tyzzarella nexilis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	98	94

F5	Uncultured bacterium clone 2 10p1 17	JN012678		97	97
F6	<i>Tyzzarella nexilis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	98	94
G1	<i>Eubacterium eligens</i> ATCC27750	NR_074613	Clostridiales	97	91
G2	<i>Butyrivibrio crossotus</i> DSM 2876	NR_104735	Clostridiales	97	96
G3	Uncultured bacterium 5 25P5	JN012874		98	82
G4	<i>Eubacterium eligens</i> ATCC27750	NR_074613	Clostridiales	98	94
G5	<i>Butyrivibrio crossotus</i> DSM 2876	NR_104735	Clostridiales	97	95
G6	<i>Butyrivibrio crossotus</i> DSM 2876	NR_104735	Clostridiales	97	93
H1	<i>Clostridium citroniae</i> RMA 16102	NR_043681	Clostridiales	97	92
H2	<i>Lactonifactor longoviformis</i> ED-Mt61/PYG-s6	NR_043551	Clostridiales	94	94
H3	<i>Lactonifactor longoviformis</i> ED-Mt61/PYG-s6	NR_043551	Clostridiales	94	94
I1	Uncultured bacterium clone 2 10p1 17	JN012678		97	94
I3	<i>Tyzzarella nexis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	96	95
I4	<i>Tyzzarella nexis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	97	94
I5	<i>Clostridium citroniae</i> RMA 16102	NR_043681	Clostridiales	97	93

I6	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	97	95
I7	<i>Tyzzrella nexis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	97	94
I8	<i>Clostridium citroniae</i> RMA 16102	NR_043681	Clostridiales	97	94
J1	Uncultured <i>Aerococcus</i> banda DGGE	KC880966		96	82
J2	<i>Tyzzrella nexilis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	98	94
J3	<i>Blautia hydrogenotrophica</i> S5a36	NR_026314	Clostridiales	93	95
J5	Uncultured bacterium WD2 aak11d09	EU511929		97	84
J7	Uncultured bacterium RL179 aah28c03	DQ796431		98	83
K5	<i>Tyzzrella nexis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	92	96
L2	<i>Clostridium sphenoides</i> ATCC 19403	NR_112174	Clostridiales	92	87
L4	Uncultured bacterium clone SWPT15	EF098480		94	91
M2	<i>Blautia</i> sp. A-C6-0	GQ456208	Clostridiales	99	99
N1	<i>Eubacterium contortum</i> DSM 3982	NR_117147	Clostridiales	96	98
N2	<i>Eubacterium contortum</i> DSM 3982	NR_117147	Clostridiales	93	96
N3	Uncultured bacterium R-7809	FJ879722		84	89

N5	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	99	95
N6	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	98	99
N7	Uncultured bacterium C2II E02	JQ084721		92	83
N8	<i>Clostridium Clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	97	94
O2	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	98	100
O3	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	98	100
O4	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiae	98	100
O6	Uncultured bacterium RL180	DQ807998		80	86
O7	Uncultured bacterium 2 10p2 1	JN012684		81	94
O8	Uncultured bacterium 2 lop5 7	JN012641		79	86
O9	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	98	97
O10	<i>Eisenbergiella taji</i> B086562	NR_118643	Clostridiales	98	94
O11	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	98	100
P1	Uncultured bacterium 10 25P2 12	JN013107		98	99
P2	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	96	94

P3	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	98	94
Q1	<i>Uncultured bacterium</i> 66	FJ535011		97	90
Q2	<i>Uncultured bacterium</i> DP3 46	EU813287		98	91
Q3	<i>Tyzzarella nexilis</i> DSM 1787	NR_029248	Clostridiales	98	94
Q4	<i>Clostridium clostridiforme</i> ATCC 25537	NR_044715.2	Clostridiales	97	91
Q5	<i>Blautia hydrogenotrophica</i> S5a36	NR_026314	Clostridiales	98	94
Q6	<i>Clostridium citroniae</i> RMA 16102	NR_043681	Clostridiales	98	94
R1	<i>Eubacterium contortum</i> DSM 3982	NR_117147	Clostridiales	98	97
R2	<i>Eubacterium contortum</i> DSM 3982	NR_117147	Clostridiales	97	97
R3	<i>Eubacterium contortum</i> DSM 3982	NR_117147	Clostridiales	97	97
S1	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	97	95
S2	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	98	97
S3	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	98	99
T1	<i>Butyrivibrio crossotus</i> DSM 2876	NR_104735	Clostridiales	96	95
T3	<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	NR_074436	Verrucomicrobiales	98	99

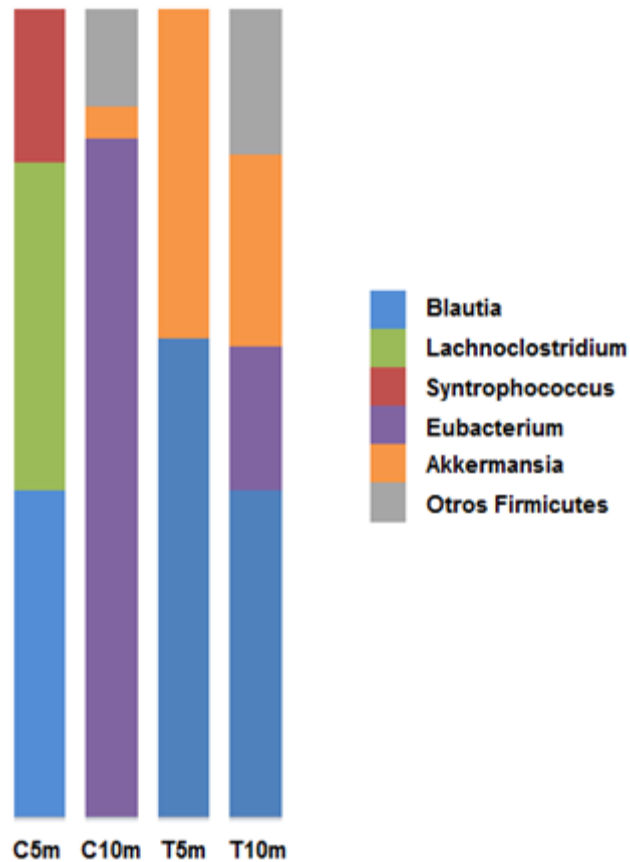


Figura 18: Porcentaje relativo de las secuencias obtenidas ordenadas por género.

El resumen de la asignación taxonómica de las secuencias provenientes de las bandas cortadas de todas las muestras, se muestra en la Figura 18 mediante una gráfica de porcentajes relativos

Durante la selección de bandas representativas de cada grupo de estudio, se seleccionaron bandas que migraron a la misma distancia del gel para corroborar que se tratara de las mismas especies y así poder correlacionar las bandas cortadas con las encontradas en otros carriles que tuvieran una distancia de migración similar, es decir, asegurar que las bandas que tuvieron una misma distancia de migración son iguales, se encontró que ninguno de los pares corresponde a una secuencia similar,

En la Figura 19 se muestra en el panel A) los pares de bandas con una distancia de migración similar: CA5-D8, I8-F6, G4-F3 y G5-F4. En el panel B) se muestra el árbol filogenético de las mismas secuencias.

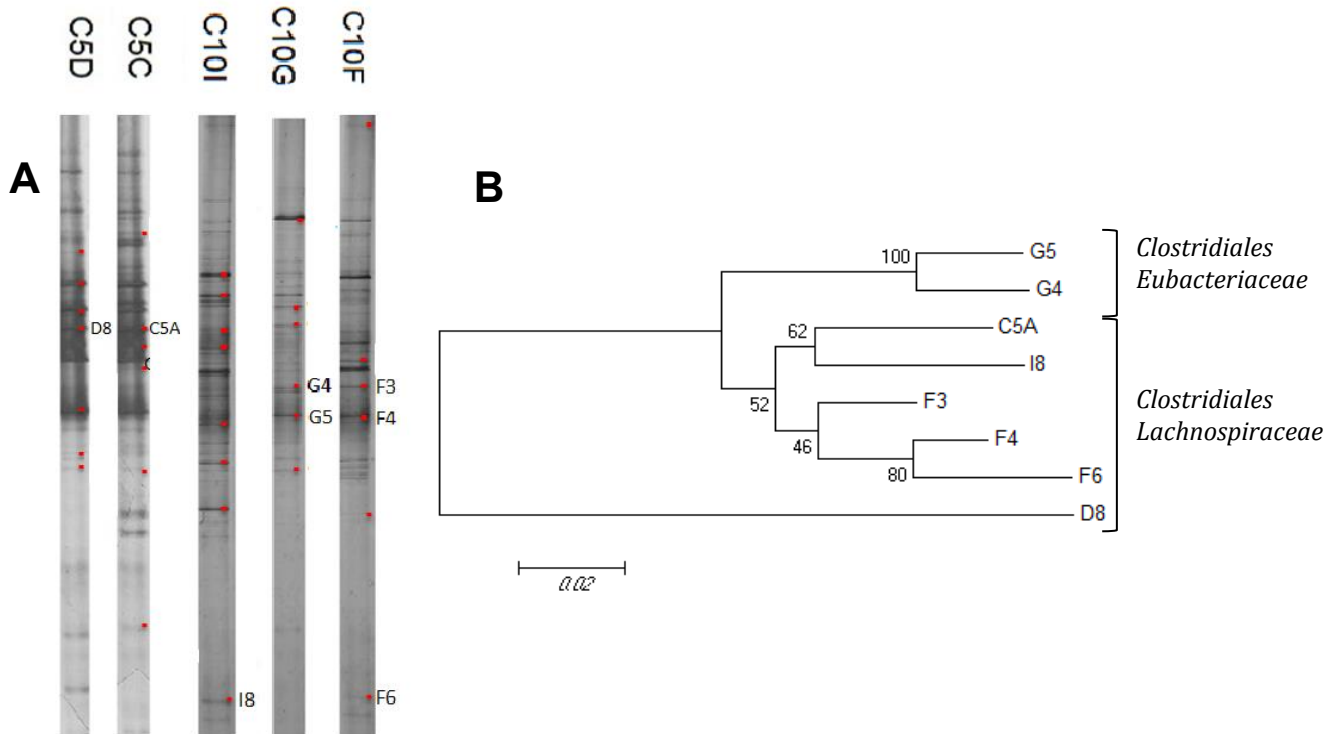


Figura 19: A) Bandas cortadas con similar distancia de migración. B) Árbol filogenético de las secuencias con similar distancia de migración.

Se crearon los árboles filogenéticos para cada grupo de animales estudiados. Las construcciones se llevaron a cabo de la siguiente forma:

Se utilizó el método de neighbor joining con el modelo de sustitución de Kimura 2 parámetros que fue el más adecuado para cada grupo de datos según el programa jModeltest2. Las secuencias fueron ajustadas a 365pb para los grupos control joven (Figura 20) y transgénico joven (Figura 22), para los grupos control senil (Figura 21) y transgénico senil (Figura 23), la longitud de las secuencias utilizadas fue de 376pb y 378pb respectivamente. Los árboles se enraizaron a la especie *Halobacterium piscisalsi*, puesto que es una bacteria halófila que no se encuentra relacionada con las secuencias problema.

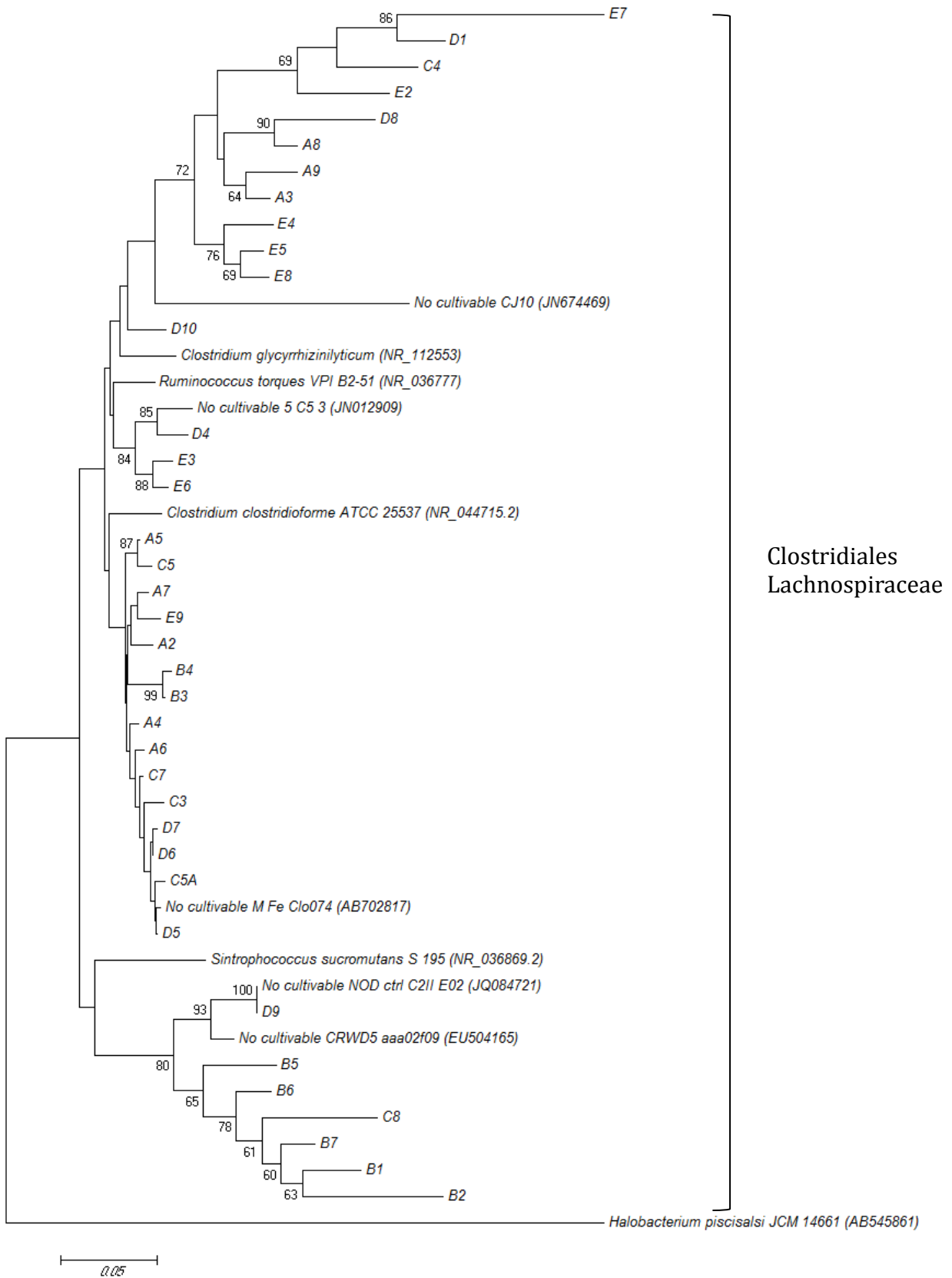


Figura 20: Árbol filogenético de las secuencias de los animales C5M.

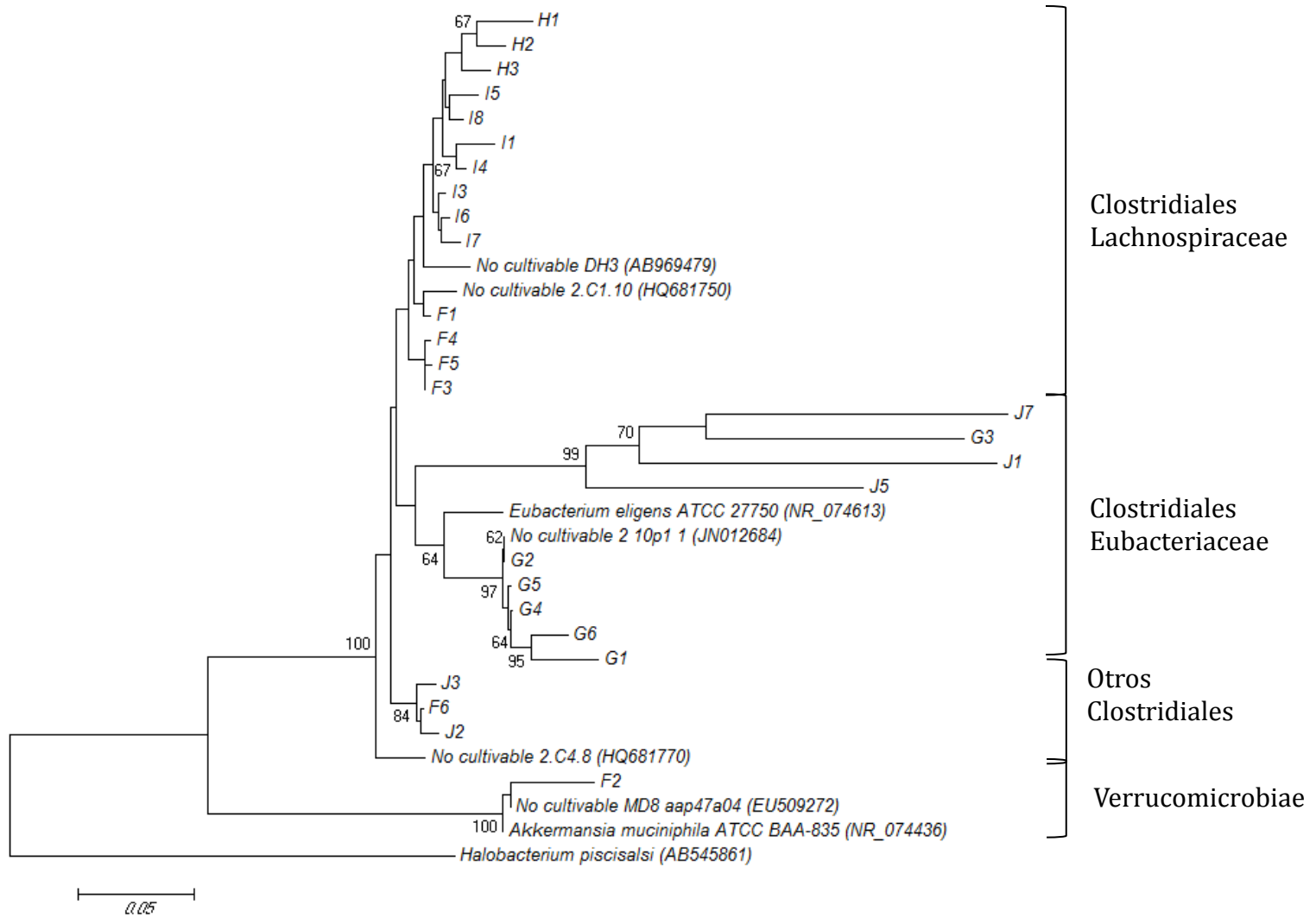


Figura 21: Árbol filogenético de las secuencias de los animales C10M.

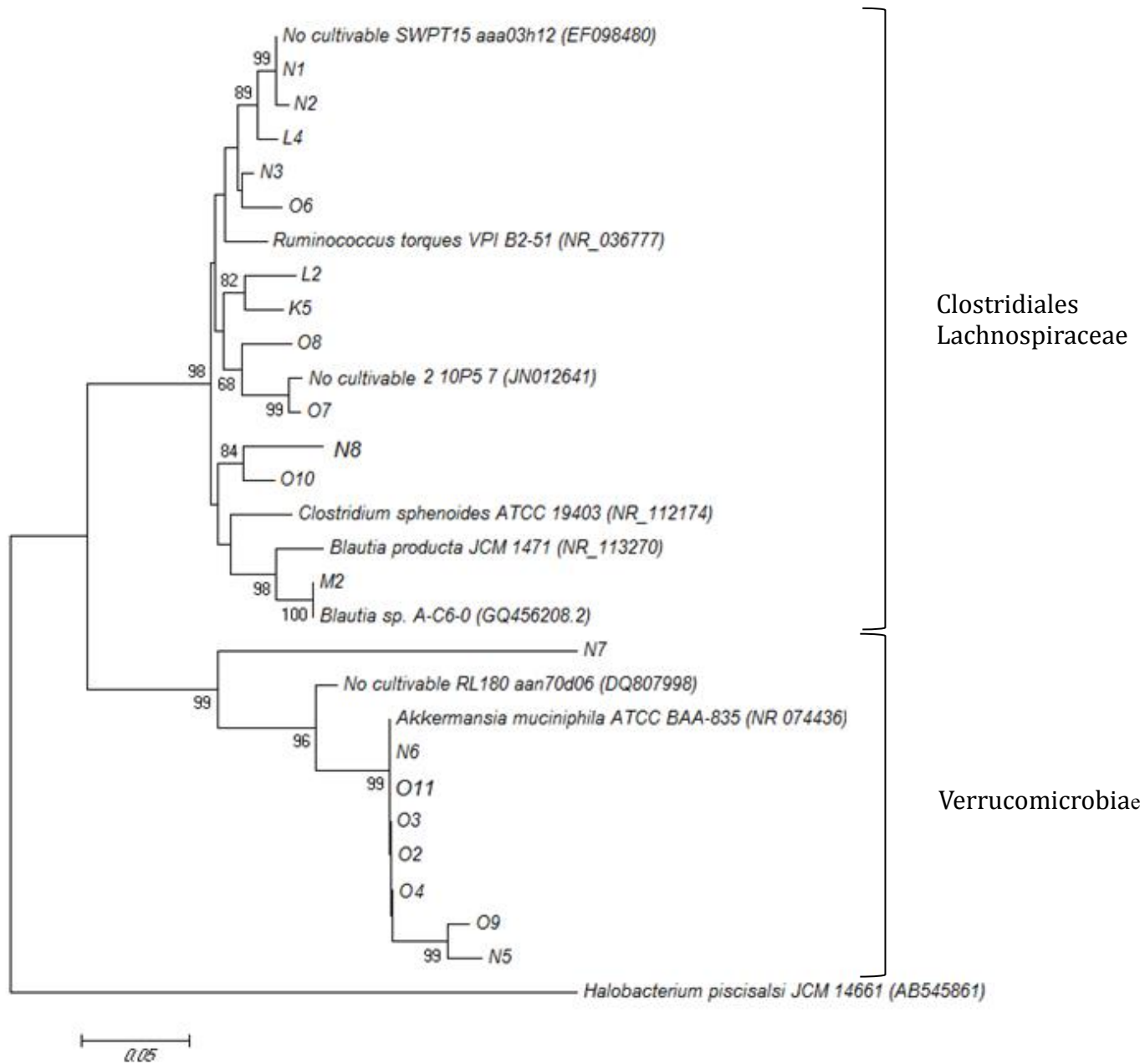


Figura 22: Árbol filogenético de las secuencias de los animales T5M

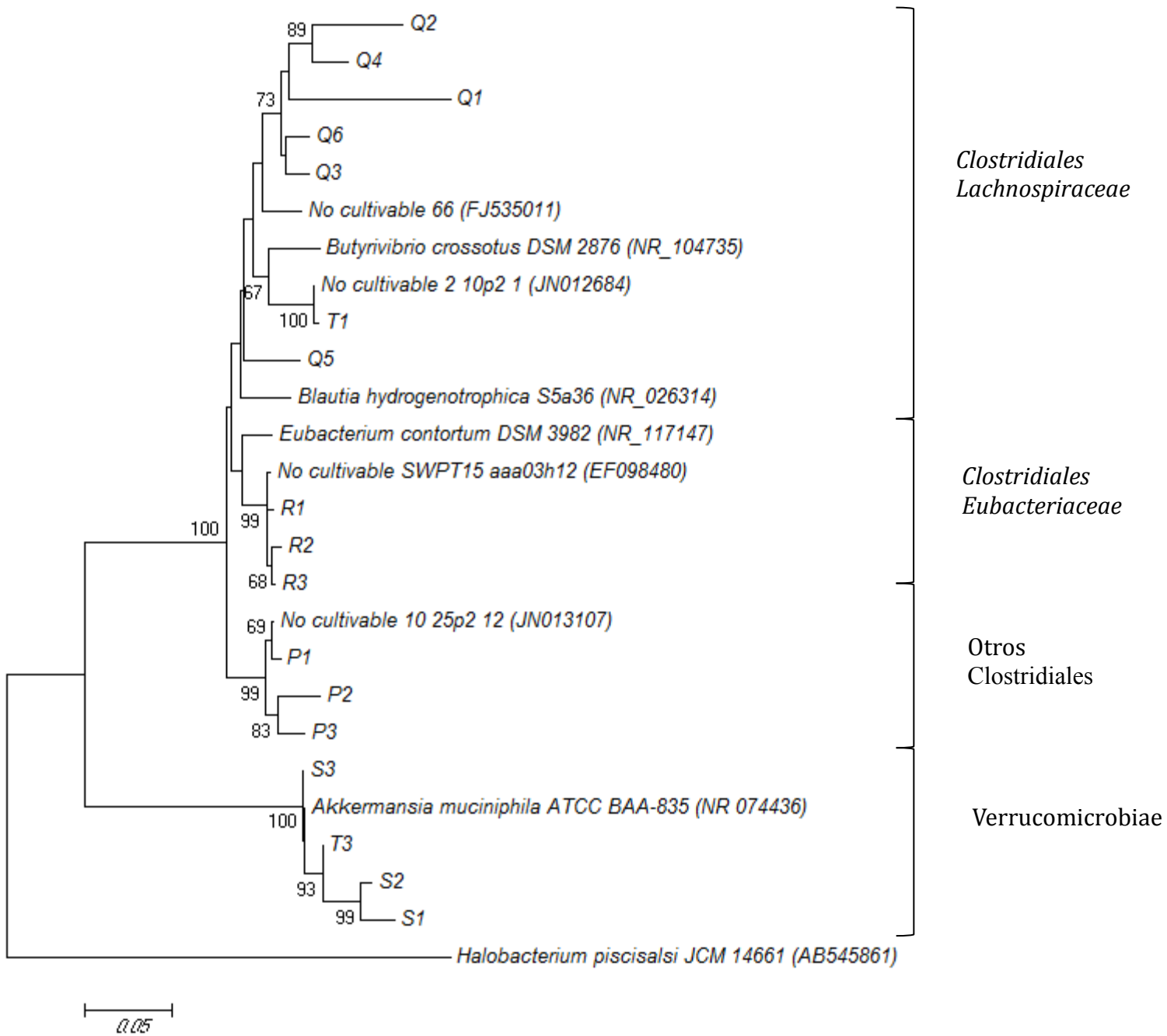


Figura 23: Árbol filogenético de las secuencias de los animales T10M

De 109 secuencias obtenidas para el análisis filogenético, 8 fueron de baja calidad por lo que se descartaron del análisis, en la Figura 24 se muestra el árbol filogenético de todas las secuencias obtenidas contraído por familia. En este análisis se puede observar que la familia predominante en las muestras fue Lachnospiraceae con un 64% de las secuencias, seguida por las familias Eubacteriaceae con el 16%, Akkermansiaceae con el 13% y otros clostridiales con 7% de las secuencias a las que no fue posible asignar familia.

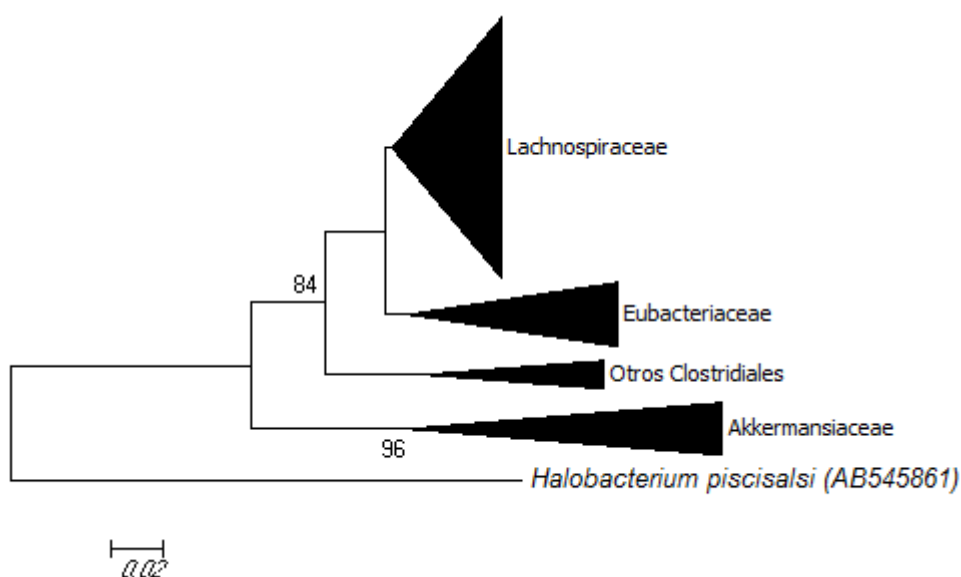


Figura 24: Árbol filogenético en el que se representan todas las secuencias obtenidas, las ramas se encuentran contraídas a nivel de familia.

Se consideró como límite de corte para la asignación de familia un porcentaje de similitud mayor al 90% y para la asignación de género se consideró un porcentaje de similitud mayor a 96%. Bajo este criterio, se pudo asignar familia a 65 secuencias que se muestran en la Figura 25. Del mismo modo, fue posible asignar género a 32 secuencias, que se pueden observar en la Figura 26

Se encontraron 4 secuencias con un porcentaje de similitud del 100%, todas correspondientes a *Akkermansia muciniphila*

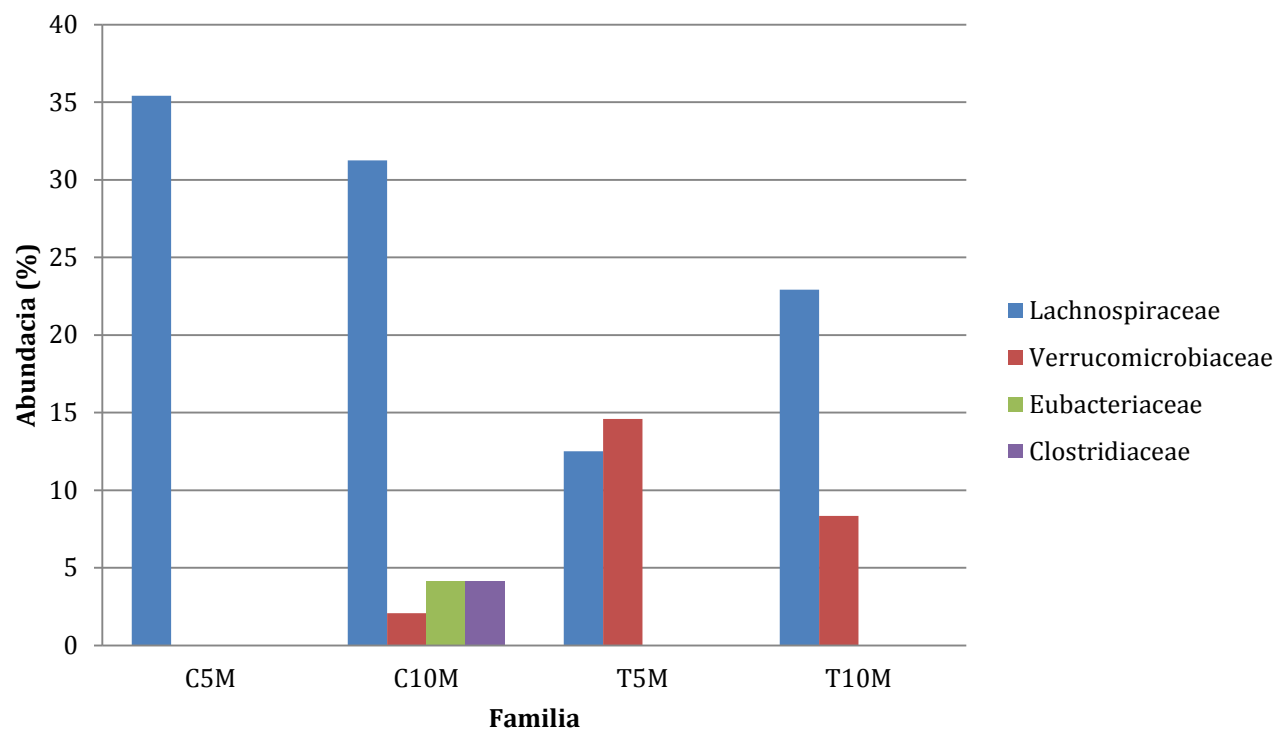


Figura 25: Distribución de las familias más abundantes en las muestras.

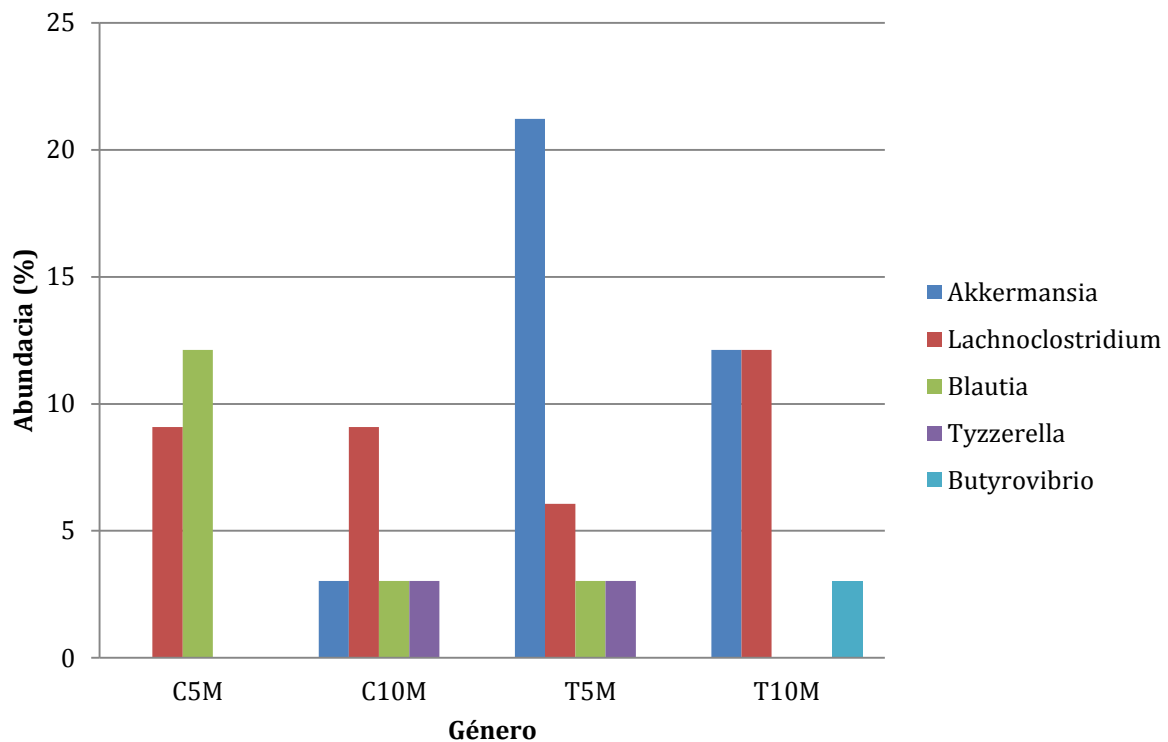


Figura 26: Distribución de los géneros más abundantes en las muestras.

En cuanto a las secuencias catalogadas como otros clostridiales, se compararon contra la base de datos RDP 16s rRNA training set 14 mediante la herramienta en línea RDP Naive Bayesian RRNA Classifier Version 2.10 (Wang y cols., 2007) con un umbral de confianza del 80. Se encontró que 5 secuencias tienen un porcentaje de similitud mayor al 95% con la familia lachnospiraceae. Debido al análisis anterior y a la buena calidad de las secuencias, podemos considerarlas como bacterias no cultivables no reportadas anteriormente en la base de datos de NCBI

Tabla 6: Análisis de secuencias asignadas como “Otros clostridiales” por RDP

Secuencia	Asignación taxonómica por RDP
E3	Bacteria;100%;Firmicutes;100%;Clostridia;100%;Clostridiales;100%;Lachnospiraceae;100%;Ruminococcus2;21%
L2	Bacteria;100%;Firmicutes;100%;Clostridia;98%;Clostridiales;96%;Lachnospiraceae;95%;Ruminococcus2;19%
N3	Bacteria;100%;Firmicutes;100%;Clostridia;100%;Clostridiales;100%;Lachnospiraceae;100%;Ruminococcus2;54%
O6	Bacteria;100%;Firmicutes;100%;Clostridia;100%;Clostridiales;100%;Lachnospiraceae;98%;Lactonifactor;17%
O8	Bacteria;100%;Firmicutes;99%;Clostridia;98%;Clostridiales;98%;Lachnospiraceae;98%;Anaerostipes;41%

Para poder diferenciar cuál de las es causante de las diferencias observadas en la MI se utilizó un análisis de componente principal (PCA). En la Figura 27 se muestran los resultados del PCA, cada punto representa una muestra, no se observan todas las muestras porque el programa discrimina las secuencias no clasificadas.

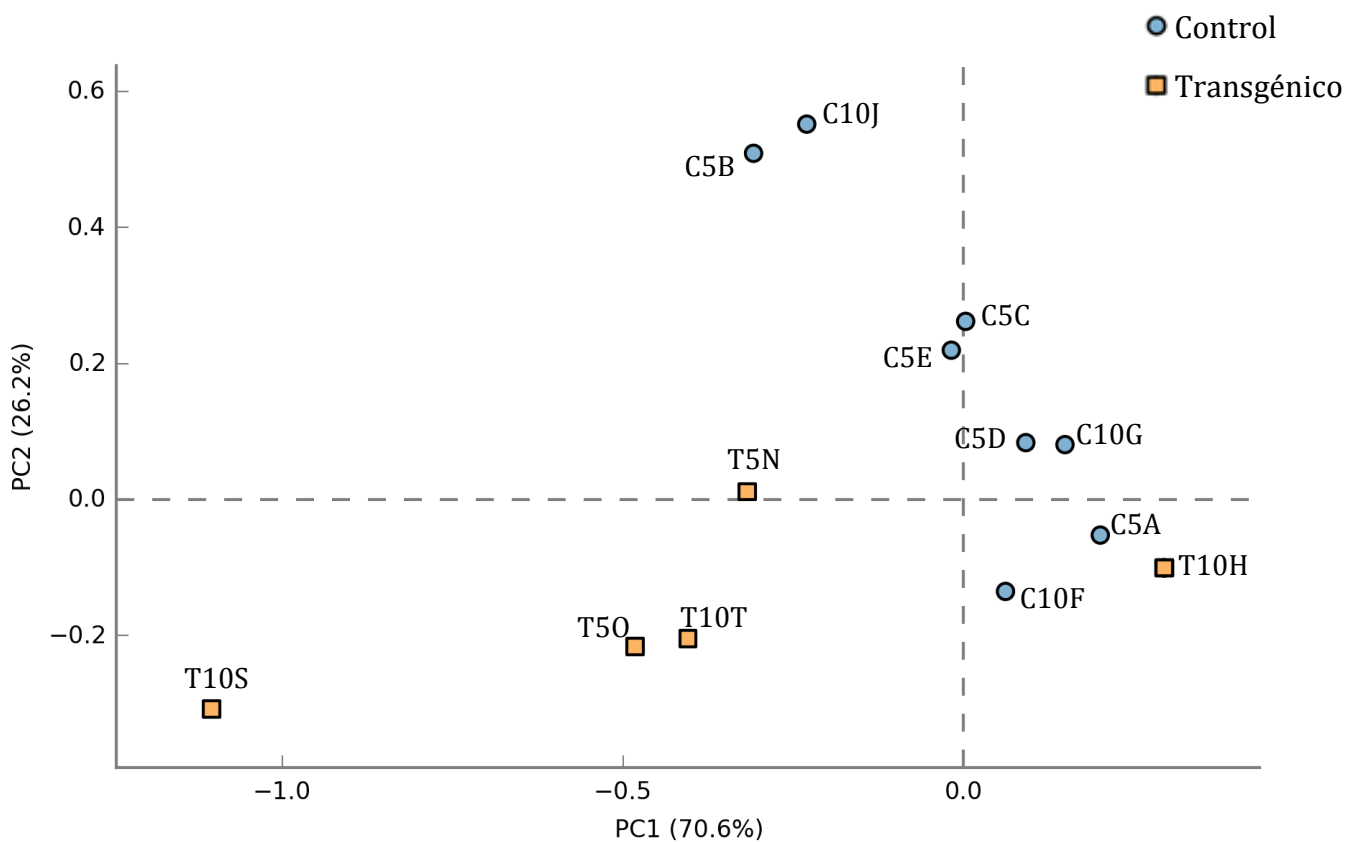


Figura 27: Análisis de coordinada principal. Realizado con las 20 muestras pertenecientes a los 4 grupos considerando las secuencias clasificadas a nivel de familia.

Al comparar las muestras, se observa que las muestras de los animales control se encuentran distribuidas a lo largo de la PC2 mientras que las muestras de los animales transgénicos se distribuyen a lo largo de PC1. La PC1 (coordinada principal 1, que explica el 70.6% de la varianza entre las muestras) y agrupa las muestras de los animales control. De igual forma en la parte inferior en los valores más negativos del PC2 (coordinada principal 2, que explica el 26.2% de la varianza entre las muestras) se encuentran las muestras de los animales transgénicos.

Discusión

Hasta la fecha no existe un modelo animal que permita producir y emular la EA esporádica por lo cual se decidió utilizar el modelo 3xTg-AD para comenzar caracterizar las posibles diferencias en la MI que pudieran estar asociadas a la patología de la EA.

En primer lugar mediante la genotipificación del modelo fue posible corroborar que los animales transgénicos (3xTg-AD) eran efectivamente portadores de los genes humanos mutados que desencadenan la EA familiar.

El modelo animal 3xTg-AD produce una acumulación de β A, como se ha reportado en la literatura (Oddoy cols., 2003), desde los 5 meses se comienza a observar una acumulación mayor a la encontrada en los animales control de la misma edad. De igual forma se encontró que los animales C10M presentan una acumulación de agregados difusos que se consideran normales durante el proceso de envejecimiento y al ser comparados contra el grupo T5M se observa que son muy similares. Cuando la enfermedad progresa se ve un aumento en la acumulación de β A. Aunado a esto mediante el laberinto de agua de Morris se documentó una diferencia significativa de ($P < 0.006$) el desempeño cognitivo de los animales T10M al compararlos con los T5M ($P < 0.02$). De esta forma se confirma que el deterioro cognitivo de los animales T10M la cual se asocia a la acumulación neuronal de β A.

El análisis de la MI trata de evidenciar tres posibles diferencias importantes mediante comparaciones independientes: la primera determinada por el envejecimiento de los animales (jóvenes 5M vs. Seniles 10M), la segunda determinada por el factor

genético [controles (C) vs. Transgénicos (T)] y la tercera determinada por el estadio de la EA [pre sintomáticos (T5M) vs. Sintomáticos (T10M)] El análisis de los datos de MI ha evidenciado que en este modelo una de las principales causas de la modificación de la MI es la edad. Tanto en humanos (Yatsuneneko y cols., 2012), como en modelos murinos (Langille y cols., 2014) se ha reportado que con la edad disminuye la diversidad de la MI, haciéndose más evidente en la diversidad de los *phylum Firmicutes*, como lo reportan Langille y colaboradores (2014): en ratones adultos jóvenes, se encuentra una gran cantidad de especies de la familia *lachnospiraceae* misma que disminuye en animales seniles dando paso a un aumento en la familia *bacteroidaceae*. Nuestro análisis filogenético de las secuencias de las muestras provenientes de los animales control corrobora esta información, en la Figura 20 se puede observar que todas las secuencias obtenidas de los animales C5M se relacionan filogenéticamente con bacterias del *phylum firmicutes* familia *lachnospiraceae*, al compararlas con la Figura 21 se encuentra las secuencias encontradas en los C10M también corresponden al *phylum firmicutes* pero se relacionan filogenéticamente con la familia *eubacteriaceae*.

En el caso de los animales transgénicos este cambio es menos drástico pero también evidente, como se muestra en las Figuras 23 y 24 no se pierde totalmente la familia *lachnospiraceae* que predomina en los T5M, la microbiota en los animales T10M sigue dominada por los clostridiales pero la familia más abundante es la *eubacteriaceae*. Por otro lado el análisis de los perfiles de bandeo al comparar los animales transgénicos contra los controles no se presenta una diferencia tan

evidente como cuando se comparan los animales jóvenes contra los seniles, sin importar si se trata de grupos controles o transgénicos.

En cuanto a la caracterización de la MI por la condición genética de los ratones, se encontró que el análisis de los patrones de bandeo no permite identificar una diferencia obvia entre los grupos controles y transgénicos. Sin embargo en el análisis filogenético de las secuencias obtenidas se encontró un aumento en la cantidad de especies del phylum verrucomicrobia en los animales transgénicos. Las secuencias de este phylum son las más representativas en los perfiles de bandeo de las muestras de los animales transgénicos como se puede observar en la Figura 18. Las secuencias O2, O3, O4, O9, O11, N5, N6, S1, S2, S3 y T3 pertenecen a este phylum.

Las especies de verrucomicrobiales en la microbiota intestinal normal representan entre el 1 y 2% de las especies encontradas tanto en humanos como en ratones (Rajilić-Stojanović. 2007, Smith y cols., 2012), por lo que es de notar que se observe un aumento tanto en el número de secuencias en las muestras provenientes de los animales transgénicos como en la cantidad de especies del phylum. En la Figura 18, se puede observar el aumento en el número de secuencias correspondientes al phylum Verrucomicrobia (*Akkermansia*) en las muestras de los grupos T5M y T10M. En cuanto a las especies provenientes del phylum, se determinó que las secuencias N6, O11, O3, O2, O4, O9, N5, S3, S2 y T3 corresponden a la especie *Akkermansia muciniphila*. Esto se realizó mediante la comparación de las secuencias con el programa MEGA6, se encontró que tienen un porcentaje de similitud mayor al 95% y difieren de la secuencia de referencia en menos de 12nt por lo que puede tratarse de

distintas copias del operón 16s ribosomal de la bacteria. Por medio de la herramienta en línea rrnDB, Base de datos del número de copias del operón ARN ribosomal por sus siglas en inglés (Stoddard y cols., 2014), se encontró que para la especie *Akkermansia muciniphila* se han reportado hasta 3 copias diferentes del operón ribosomal 16S.

En cuanto al cambio en las especies bacterianas, existe muy poca información acerca del phylum verrucomicrobia tanto de la funcionalidad de estos microorganismos en la MI como sobre su relación en los procesos de salud-enfermedad (Rajilić-Stojanović y cols., 2014). Por lo tanto no se pueden hacer inferencias sobre el significado del aumento de este phylum en los animales transgénicos y el grupo C10M.

Después de realizar un análisis de coordinada principal (PCoA), se encontró que la que el PC1 explica en mayor medida los cambios en la MI como se muestra en la Figura 27. Es de notar como se forman dos grupos bien definidos, el primero con tendencia central correspondiente a los controles y el segundo en los valores inferiores del PC2 formado por las muestras de los animales transgénicos

Aunque en la descripción del modelo 3xTg-AD (Oddoy cols., 2003) se analizó la expresión de las proteínas APP y Tau en diferentes tejidos y se reportó una expresión específica de las mismas en el SNC no se conoce si la fisiología del intestino se encuentra modificada. Por lo tanto también se desconocen los cambios que pudieran haber sufrido los nichos ecológicos de los microorganismos que conforman MI normal en el tracto gastrointestinal. En este sentido, nuestros datos son pioneros en caracterizar la MI en el modelo 3xTg-AD.

En cuanto al cambio de la Mil durante el transcurso de la enfermedad [pre sintomáticos (T5M) vs. Sintomáticos (T10M)], no fue posible diferenciarla de los cambios producidos por la edad.

Durante el análisis filogenético de las secuencias se seleccionaron bandas con distancia de migración similares para poder correlacionar las especies bacterianas encontradas con la distancia de migración en el gel. En este sentido al estudiar la Figura 19, se observa claramente que la secuencia de las bandas seleccionadas que tiene una distancia de migración similar son diferentes y tienden a agruparse por ubicación filogenética. Este evento se ha descrito con anterioridad y es debido a que las secuencias se encuentran muy estrechamente relacionadas (Aguirre-Garrido y cols., 2012).

Adicionalmente, durante esta investigación, se encontró que 5 de las secuencias obtenidas corresponden a bacterias no cultivables que no han sido reportadas hasta la fecha en la base de datos de NCBI.

Conclusiones

Este trabajo se planteó como una primera aproximación a los posibles cambios de la MI que pueden producirse en la EA, y ha cumplido con su objetivo general. Bajo el enfoque experimental utilizado en este trabajo, fue posible por primera vez identificar y caracterizar los cambios en la MI provocados por el modelo murino 3xTg-AD. Sin embargo es de reconocer que el nivel de análisis no es lo suficiente mente robusto y profundo para poder diferenciar los cambios producidos por la edad de los producidos por el curso de la EA.

Es importante resaltar que al estudio de la microbiota intestinal como factor determinante en la aparición de la EA es un tema de frontera y poco investigado. Nuestros datos evidencian el aumento de microorganismos correspondientes al género *akkermansia* en las muestras de los animales transgénicos, lo cual podría ayudar a dilucidar la teoría propuesta por Zhao y colaboradores (2015) ya que se trata de un microorganismo que se adhiere a la capa de moco intestinal por lo que podría regular la permeabilidad de la barrera intestinal.

Por otra parte en ausencia de un modelo animal que imite el desarrollo de la EA esporádica se sugiere que para continuar la investigación y tener un mejor acercamiento a las condiciones de la enfermedad humana, lo más conveniente sería el análisis de muestras fecales o de MI de la parte distal del colon provenientes de humanos.

Cabe mencionar que es necesario realizar estudios de la fisiología intestinal del modelo ya que desconocemos si la adición de genes humanos puede producir la modificación de los nichos normales que ocupa la MI en el tracto gastrointestinal.

Así mismo es necesario complementar estos estudios de la MI con una aproximación funcional, puede ser desde un acercamiento de la genómica funcional que permitiría no solo distinguir los genes que se expresan en la MI y si no que a su vez podrían analizarse los genes que se expresan por parte del huésped. Está documentado que algunas especies bacterianas pueden modificar la expresión de genes humanos (Morgan y cols., 2015). Por lo tanto es deseable que en futuras aproximaciones se estudie a este llamado "órgano adicional" en conjunción con el resto del organismo.

De igual forma el enfoque de la metabolómica resultaría interesante y complementario ya que aunque las especies microbianas se encuentren modificadas no necesariamente significa que las funciones de la microbiota como ecosistema se modifique. Es de mencionarse que por presión evolutiva del huésped a los microorganismos, se seleccionan positivamente aquellos que tienen funciones metabólicas redundantes en comparación con las otras especies en la bacterianas con funciones metabólicas diferentes (Ley y cols., 2006). Por otra parte en la teoría microbiana de la EA el estudio de los metabolitos bacterianos absorbidos al torrente sanguíneo proveería información importante y novedosa acerca de cómo el aumento de la permeabilidad intestinal que se produce durante la senectud podría contribuir con una influencia sistémica y al mismo tiempo permitiría identificar los metabolitos posiblemente neurotóxicos.

Aunque los estudios observacionales descriptivos de la MI en procesos de salud y enfermedad como el presente, aporten información acerca del cómo se modifican las comunidades bacterianas y la posible función estén realizando las especies bacterianas, son incapaces de dilucidar si estos cambios son efecto o etiología de las enfermedades estudiadas. Por lo tanto, un enfoque transdisciplinar y multifacético es necesario para entender a detalle como la MI puede ser modificada para proveernos no solo salud si no también opciones profilácticas.

Perspectivas

Debido a que se trata de un tema de frontera, hay mucho trabajo por hacer, me parece que los estudios que podrían aportar información útil tanto para la ciencia básica como para la aplicada de forma inmediata podrían ser los siguientes:

Estudio	Aporte
Análisis de la MI de pacientes afectados por EA esporádicas	Conocer la firma bacteriana de la enfermedad. Esta podría ser utilizada como una herramienta de diagnóstico temprano para la EA
Comparación de la MI de pacientes afectados por EA esporádicas contra pacientes afectados por EA Familiar	Permitiría determinar si la EA tiene una firma general sin importar la etiología de la enfermedad. Esto puede aportar información sobre posibles blancos terapéuticos en caso de disbiosis.
Trasplante de MI del modelo 3xTg-AD a un modelo murino libre de gérmenes.	Información sobre si la microbiota aumenta la permeabilidad de tracto GI. Estudio del mecanismo de acción de metabolitos posiblemente neurotóxicos.
Suplementación del modelo 3xTg-AD con bacterias probióticas	Análisis de la modificación de las interacciones de la MI propia del modelo por la adición de cepas probióticas. Estudio del efecto de cepas probióticas en la progresión de la enfermedad y tratamiento sintomático

Bibliografía

- Aagaard, K., J. Ma, K. M. Antony, R. Ganu, J. Petrosino y J. Versalovic (2014). "The Placenta Harbors a Unique Microbiome." Science Translational Medicine **6**(237): 237ra265.
- Ackerman, J. (2012). "The ultimate social network." Scientific American **306**: 36-43.
- Aguirre-Garrido, J. F., D. Montiel-Lugo, C. Hernández-Rodríguez, G. Torres-Cortes, V. Millán, N. Toro, F. Martínez-Abarca y H. Ramírez-Saad (2012). "Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico." Antonie van Leeuwenhoek **101**(4): 891-904.
- Ait-Belgnaoui, A., A. Colom, V. Braniste, L. Ramalho, A. Marrot, C. Cartier, E. Houdeau, V. Theodorou y T. Tompkins (2014). "Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice." Neurogastroenterology & Motility **26**(4): 510-520.
- Arrieta, M.-C., L. Stiemsma, N. Amenyogbe, E. Brown y B. Finlay (2014). "The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease." Frontiers in Immunology **5**.
- Asti, A. y L. Gioglio (2014). "Can a Bacterial Endotoxin be a Key Factor in the Kinetics of Amyloid Fibril Formation?" Journal of Alzheimer's Disease **39**(1): 10.
- Atlas, R. M. y R. Bartha (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Madrid, España, Pearson Education S. A.
- Azad, M. B., T. Konya, H. Maughan, D. S. Guttman, M. R. Sears, A. B. Becker, J. A. Scott y A. L. Kozyrskyj (2014). "The Gut Microbiome and the Hygiene Hypothesis of Allergic Disease. Impact of Pets and Siblings on Infant Gut Microbiota." Annals of the American Thoracic Society **11**(Supplement 1): S73-S73.
- Bermudez-Rattoni, F. (2014). "The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation." Neurobiology of Learning and Memory **109**(0): 207-216.
- Bested, A., A. Logan y E. Selhub (2013). "Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: Part I - autointoxication revisited." Gut Pathogens **5**(1): 5.
- Bhattacharjee, S. y W. J. Lukiw (2013). "Alzheimer's disease and the microbiome." Frontiers in Cellular Neuroscience **7**.
- Billings, L. M., S. Oddo, K. N. Green, J. L. McGaugh y F. M. LaFerla (2005). "Intraneuronal A β Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice." Neuron **45**(5): 675-688.
- Bouchard, C. J. (1897). *Lectures on autointoxication in disease*. Philadelphia, F.A. Davis Company.
- Bravo, J. A., P. Forsythe, M. V. Chew, E. Escaravage, H. M. Savignac, T. G. Dinan, J. Bienenstock y J. F. Cryan (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.
- Bravo, J. A., P. Forsythe, M. V. Chew, E. Escaravage, H. M. Savignac, T. G. Dinan, J. Bienenstock y J. F. Cryan (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.

Brenner, S. (2013). "Blue-green algae or cyanobacteria in the intestinal micro-flora may produce neurotoxins such as Beta-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) which may be related to development of amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease and Parkinson-Dementia-Complex in humans and Equine Motor Neuron Disease in horses." Medical Hypotheses **80**(1).

Bromley-Brits, K., Y. Deng y W. Song (2011). "Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice." (53): e2920.

Brookmeyer, R., S. Gray y C. Kawas (1998). "Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset." American Journal of Public Health **88**(9): 1337-1342.

Brower, D. R. (1898). "Auto-intoxication in its relation to the disease of nervous system." The journal of the American Medical Association **30**: 2.

Cash, H. L., C. V. Whitham, C. L. Behrendt y L. V. Hooper (2006). "Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin." Science **313**(5790): 1126-1130.

Cogan, T. A., A. O. Thomas, L. E. N. Rees, A. H. Taylor, M. A. Jepson, P. H. Williams, J. Ketley y T. J. Humphrey (2007). "Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*." Gut **56**(8): 1060-1065.

Consejo Nacional de Población. (2002). "Envejecimiento: índices demográficos para adultos mayores." Estimación de proyecciones del Consejo Nacional de Población
Retrieved 15 Julio, 2014, from <http://www.conapo.gob.mx/en/CONAPO/Envejecimiento>.

Cruz, T. M. M., H. S. P. de Santillana, Z. P. Galíndo, M. T. d. J. Sánchez, S. H. Sánchez, M. M. Zarate y A. L. d. P. Torres (2010). Diagnóstico y tratamiento de la demencia tipo Alzheimer. C. S. General. México D.F., Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud **IMSS-393-10**: 55.

Chang, Y.-T., W.-N. Chang, N.-W. Tsai, C.-C. Huang, C.-T. Kung, Y.-J. Su, W.-C. Lin, B.-C. Cheng, C.-M. Su, Y.-F. Chiang y C.-H. Lu (2014). "The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease: A Systematic Review." BioMed Research International **2014**: 14.

Chin, J., E. D. Roberson y L. Mucke (2008). Molecular aspects of memory dysfunction in Alzheimer's disease. Learning and memory: a comprehensive reference. J. H. Byrne. United States of America Elsevier. **4**: 246-279.

Chow, J., M. S. Lee, Y. Shen, A. Khosravi y Sarkis K. Mazmanian (2010). "Host-Bacterial symbiosis in health and disease." Advances in Immunology **7**: 243-267.

D'Hooge, R. y P. P. De Deyn (2001). "Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory." Brain Research Reviews **36**(1): 60-90.

Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo y D. Posada (2011). "ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution." Bioinformatics **27**(8): 1164-1165.

de la Monte, S. M. y M. Tong (2014). "Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease." Biochemical Pharmacology **88**(4): 548-559.

de la Monte, S. M. y J. R. Wands (2008). "Alzheimer's Disease Is Type 3 Diabetes—Evidence Reviewed." Journal of diabetes science and technology (Online) **2**(6): 1101-1113.

de La Serre, C. B., C. L. Ellis, J. Lee, A. L. Hartman, J. C. Rutledge y H. E. Raybould (2010). "Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation." American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology **299**(2): G440-G448.

den Besten, G., K. van Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D.-J. Reijngoud y B. M. Bakker (2013). "The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism." Journal of Lipid Research **54**(9): 2325-2340.

Di Rienzi, S. C., I. Sharon, K. C. Wrighton, O. Koren, L. A. Hug, B. C. Thomas, J. K. Goodrich, J. T. Bell, T. D. Spector, J. F. Banfield y R. E. Ley (2013). "The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to Cyanobacteria." eLife **2**.

Diario Oficial de la Federación (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. g. Secretaria de agricultura, desarrollo rural, pesca y alimentación. México, Distrito Federal.

Díaz-Ramírez, I. J., E. Escalante-Espinosa, E. Favela-Torres, M. Gutiérrez-Rojas y H. Ramírez-Saad (2008). "Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE." International Biodeterioration & Biodegradation **62**(1): 21-30.

Dinan, T. G., C. Stanton y J. F. Cryan (2013). "Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic." Biological Psychiatry **74**(10): 720-726.

Duthey, B. (2013). Alzheimer Disease and other Dementias Priority Medicines for Europe and the World "A Public Health Approach to Innovation". T. Saloni, World Health Administration: 1-74.

Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson y D. A. Relman (2005). "Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora." Science **308**(5728): 1635-1638.

Farrall, A. J. y J. M. Wardlaw "Blood–brain barrier: Ageing and microvascular disease – systematic review and meta-analysis." Neurobiology of Aging **30**(3): 337-352.

Flint, H. J., K. P. Scott, P. Louis y S. H. Duncan (2012). "The role of the gut microbiota in nutrition and health." Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology **9**(10): 577-589.

Freestone, P. P. E., S. M. Sandrini, R. D. Haigh y M. Lyte (2007). "Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection." Trends in Microbiology **16**(2): 55-64.

Furness, J. B. (2012). "The enteric nervous system and neurogastroenterology." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **9**(5): 286-294.

Gouy, M., S. Guindon y O. Gascuel (2010). "SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building." Molecular Biology and Evolution **27**(2): 221-224.

Grant, W. B., A. Campbell, R. F. Itzhaki y J. Savory (2002). "The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease." Journal of Alzheimer's Disease **4**(3): 179-189.

Grenham, S., G. Clarke, J. F. Cryan y T. G. Dinan (2011). "Brain-Gut-Microbe Communication in Health and Disease." Frontiers in Physiology **2**.

Guo, Q., W. Fu, B. L. Sopher, M. W. Miller, C. B. Ware, G. M. Martin y M. P. Mattson (1999). "Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice." Nature Medicine **5**: 101-106.

Guzmán-Ramos, K., P. Moreno-Castilla, M. Castro-Cruz, J. L. McGaugh, H. Martínez-Coria, F. M. LaFerla y F. Bermúdez-Rattoni (2012). "Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease." Learning & Memory **19**(10): 453-460.

Hornig, M. (2013). "The role of microbes and autoimmunity in the pathogenesis of neuropsychiatric illness." Current Opinion in Rheumatology **25**(4): 488-795.

Hsiao, Elaine Y., Sara W. McBride, S. Hsien, G. Sharon, Embriette R. Hyde, T. McCue, Julian A. Codelli, J. Chow, Sarah E. Reisman, Joseph F. Petrosino, Paul H. Patterson y Sarkis K. Mazmanian (2013). "Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders." Cell **155**(7): 1451-1463.

Hsu, T. M., V. R. Konanur, L. Taing, R. Usui, B. D. Kayser, M. I. Goran y S. E. Kanoski (2015). "Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats." Hippocampus **25**(2): 227-239.

Jost, T., C. Lacroix, C. P. Braegger y C. Chassard (2012). "New insights in gut microbiota establishment in healthy breast feed neonates." PLoS ONE **7**(8): e44595.

Kawahara, M., I. Ohtsuka, S. Yokoyama, M. Kato-Negishi y Y. Sadakane (2011). "Membrane Incorporation, Channel Formation, and Disruption of Calcium Homeostasis by Alzheimer's β -Amyloid Protein." International Journal of Alzheimer's Disease **2011**: 17.

LaFerla, F. M., B. T. Tinkle, C. J. Bieberich, C. C. Haudenschild y G. Jay (1995). "The Alzheimer's A β peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice." Nature Genetics **9**: 21-30.

Langille, M. G. I., C. J. Meehan, J. E. Koenig, A. S. Dhanani, R. A. Rose, S. E. Howlett y R. G. Beiko (2014). "Microbial shifts in the aging mouse gut." Microbiome **2**: 50.

LeBlanc, J. G., C. Milani, G. S. de Giori, F. Sesma, D. van Sinderen y M. Ventura (2013). "Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective." Current Opinion in Biotechnology **24**(2): 160-168.

Ley, R. E., C. A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight y J. I. Gordon (2008). "Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota." Nat Rev Micro **6**(10): 776-788.

Ley, R. E., D. A. Peterson y J. I. Gordon (2006). "Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine." Cell **124**(4): 837-848.

Luna-Muños J., Zamudio S., De la Cruz F., Minjarez-Vega B. y Mena R. (2012). "Acción protectora de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer." Revista Mexicana de Neurociencia **13**(3): 160-1067.

Llibre Rodriguez, J. J., C. P. Ferri, D. Acosta, M. Guerra, Y. Huang, K. S. Jacob, E. S. Krishnamoorthy, A. Salas, A. L. Sosa, I. Acosta, M. E. Dewey, C. Gaona, A. T. Jotheeswaran, S. Li, D. Rodriguez, G. Rodriguez, P. S. Kumar, A. Valhuerdi y M. Prince (2008). "Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey." The Lancet **372**(9637): 464-474.

Mesulam, M. (2004). "The Cholinergic Lesion of Alzheimer's Disease: Pivotal Factor or Side Show?" Learning & Memory **11**(1): 43-49.

Million, M., M. Maraninchi, M. Henry, F. Armougom, H. Richet, P. Carrieri, R. Valero, D. Raccach, B. Vialettes y D. Raoult (2012). "Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*." Int J Obes **36**(6): 817-825.

Mitchell, R. A., N. Herrmann y K. L. Lanctôt (2011). "The Role of Dopamine in Symptoms and Treatment of Apathy in Alzheimer's Disease." CNS Neuroscience & Therapeutics **17**(5): 411-427.

Montiel-Castro, A. J., R. M. González-Cervantes, G. Bravo-Ruiseco y G. Pacheco-Lopez (2013). "The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality." Frontiers in Integrative Neuroscience **7**.

Morgan, X., B. Kabakchiev, L. Waldron, A. Tyler, T. Tickle, R. Milgrom, J. Stempak, D. Gevers, R. Xavier, M. Silverberg y C. Huttenhower (2015). "Associations between host gene expression, the mucosal microbiome, and clinical outcome in the pelvic pouch of patients with inflammatory bowel disease." Genome Biology **16**(1): 67.

Nicholson, J. K., E. Holmes, J. Kinross, R. Burcelin, G. Gibson, W. Jia y S. Pettersson (2012). "Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions." Science **336**(6086): 1262-1267.

O'Mahony, S. M., J. R. Marchesi, P. Scully, C. Codling, A.-M. Ceolho, E. M. M. Quigley, J. F. Cryan y T. G. Dinan "Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses." Biological Psychiatry **65**(3): 263-267.

Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari y F. M. LaFerla (2003). "Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles." Neuron **39**(3): 409-421.

Organización Mundial de la Salud. (2015, March 2015). "Demencia." Nota descriptiva No 362 Retrieved Aug 21, 2005, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>.

Park, D.-Y., Y.-T. Ahn, S.-H. Park, C.-S. Huh, S.-R. Yoo, R. Yu, M.-K. Sung, R. A. McGregor y M.-S. Choi (2013). "Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity." PLoS ONE **8**(3): e59470.

Parks, D. H., G. W. Tyson, P. Hugenholtz y R. G. Beiko (2014). "STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles." Bioinformatics **30**(21): 3123-3124.

Pavel, A. B. y C. I. Vasile (2012). "PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics." BMC Bioinformatics **13**(9): 6.

Pérez Martínez, G., C. Bäuerl y M. C. Collado (2014). "Understanding gut microbiota in elderly's health will enable intervention through probiotics." Beneficial Microbes **5**(3): 235-246.

Pocernich, C. B. y D. A. Butterfield (2012). "Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1822**(5): 625-630.

Rajilić-Stojanović, M. (2007). Diversity of the Human Gastrointestinal Microbiota: Novel Perspectives from High Throughput Analyses, Wageningen Universiteit.

Rajilić-Stojanović, M. y W. M. de Vos (2014). "The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota." FEMS Microbiology Reviews **38**(5): 996-1047.

Ramírez-Saad, H. C., A. Sessitsch, W. M. de Vos y A. D. L. Akkermans (2000). "Bacterial Community Changes and Enrichment of Burkholderia-like Bacteria Induced by Chlorinated Benzoates in a Peat-Forest Soil-Microcosm." Systematic and Applied Microbiology **23**(4): 591-598.

Rescigno, M. (2008). "News & Highlights." Mucosal Immunol **1**(5): 328-329.

Sartor, R. B. (2007). "Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases." Gastroenterology **134**(2): 577-594.

Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn y C. F. Weber (2009). "Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities." Applied and Environmental Microbiology **75**(23): 7537-7541.

Seneff, S., G. Wainwright y L. Mascitelli (2011). "Nutrition and Alzheimer's disease: The detrimental role of a high carbohydrate diet." European Journal of Internal Medicine **22**(2): 134-140.

Smith, P., J. Siddharth, R. Pearson, N. Holway, M. Shaxted, M. Butler, N. Clark, J. Jamontt, R. P. Watson, D. Sanmugalingam y S. J. Parkinson (2012). "Host Genetics and Environmental Factors Regulate Ecological Succession of the Mouse Colon Tissue-Associated Microbiota." PLoS ONE **7**(1): e30273.

Sommer, F. y F. Backhed (2013). "The gut microbiota masters of host development and physiology." Nat Rev Micro **11**(4): 227-238.

Sterniczuk, R., M. C. Antle, F. M. LaFerla y R. H. Dyck (2010). "Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes." Brain Research **1348**(0): 149-155.

Stoddard, S. F., B. J. Smith, R. Hein, B. R. K. Roller y T. M. Schmidt (2014). "rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development." Nucleic Acids Research.

Sudo, N., Y. Chida, Y. Aiba, J. Sonoda, N. Oyama, X.-N. Yu, C. Kubo y Y. Koga (2004). "Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice." The Journal of Physiology **558**(1): 263-275.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." Molecular Biology and Evolution.

Townsend, A. D. (1904). "Mental Depression and Melancholia considered in regard to Auto-intoxication, with special Reference to the presence of Indoxyl in the Urine and its Clinical Significance." The British Journal of Psychiatry **51**(212): 51-62.

Turner, J. R. "Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation." The American Journal of Pathology **169**(6): 1901-1909.

Wall, R., J. Cryan, R. P. Ross, G. Fitzgerald, T. Dinan y C. Stanton (2014). Bacterial Neuroactive Compounds Produced by Psychobiotics. *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*. M. Lyte y J. F. Cryan, Springer New York. **817**: 221-239.

Wang J., Hecimovic S. y Goate A. (2008). Alzheimer's Disease. From molecular basis to disease. . Meyers R. Weinheim, Wilvy-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje y J. R. Cole (2007). "Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy." Applied and Environmental Microbiology **73**(16): 5261-5267.

Wright, E. S., L. S. Yilmaz y D. R. Noguera (2012). "DECIPHER, a Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences." Applied and Environmental Microbiology **78**(3): 717-725.

Yatsunenکو, T., F. E. Rey, M. J. Manary, I. Trehan, M. G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, R. N. Baldassano, A. P. Anokhin, A. C. Heath, B. Warner, J. Reeder, J. Kuczynski, J. G. Caporaso, C. A. Lozupone, C. Lauber, J. C. Clemente, D. Knights, R. Knight y J. I. Gordon (2012). "Human gut microbiome viewed across age and geography." Nature **486**(7402): 222-227.

Zhao, Y. y W. J. Lukiw (2015). "Microbiome-generated amyloid and potential impact on amyloidogenesis in Alzheimer's disease (AD)." Journal of nature and science **1**(7): e138.

Anexos

Anexo 1



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

1

Título

Disección de intestino de ratón para muestra de microbiota intestinal

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 100 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha **Noviembre 2014**

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

1. Objetivo

- 1.1. Obtener el intestino completo (desde el duodeno hasta la sección proximal del ano) de los ratones que formen parte de los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal

2. Alcance

- 2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

- 3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata, lentes de seguridad y guantes)
- 3.2. Este procedimiento debe ser realizado por personal con conocimiento sobre el manejo y uso de animales de laboratorio
- 3.3. Los animales sujetos a este procedimiento deberán ser manipulados conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

4. Materiales

- 4.1. Tubo cónico de 50mL estéril
- 4.2. Etanol 97%
- 4.3. 10ml Buffer PBS pH7.4 estéril (Ver material de apoyo 7.2)
- 4.4. Pentobarbital sódico 1%
- 4.5. Jeringa hipodérmica de 1ml con aguja
- 4.6. Ratones sujetos a los protocolos de estudio de microbiota intestinal.
- 4.7. Contenedor isotérmico con hielo seco (CO₂).

5. Equipo

- 5.1.4 Pinzas hemostáticas
- 5.2. Tijeras de acero inoxidable
- 5.3. Congelador operando a -20°C

6. Procedimiento

- 6.1. Sanitizar el material quirúrgico con una torunda empapada en etanol 97% y permitir que se seque.
- 6.2. Tomar el animal deseado y colocarlo en posición para inyección intraperitoneal.
- 6.3. Administrar de forma intraperitoneal una sobredosis de anestésico (0.1ml de solución de pentobarbital sódico 1%).



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

1

Titulo

Disección de intestino de ratón para muestra de microbiota intestinal

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 101 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

**Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.4. Sujetar al animal mientras “cae” en sedación.
- 6.5. Verificar el estado de sedación con un estímulo doloroso (punción en la cola)
Cuando este confirmado el estado de sedación pasar al siguiente punto, de no ser así esperar 10min, verificar el estado de sedación nuevamente, de ser necesario regresar al punto 6.2.
- 6.6. Sujetar al animal a un área de disección por los miembros anteriores y posteriores dejando la parte ventral de la caja torácica expuesta.
- 6.7. Mojar con etanol 97% y ayuda de una gasa el vientre del animal
- 6.8. Sujetar la piel que cubre la cavidad abdominal a la altura de la última costilla y levantarla en un Angulo de 45°
- 6.9. Hacer una incisión con las tijeras, en dirección al esternón; esta incisión deberá permitir la visualización de las vísceras y la caja torácica.
- 6.10. Extender la incisión por los márgenes del esternón y a través de la caja torácica sin lacerar los órganos.
- 6.11. Colocar pinzas en los pliegues de piel a ambos lados de la cavidad abdominal para evitar la contaminación de los órganos con pelo del animal.
- 6.12. Identificar el duodeno, se encuentra en la parte más baja de la caja torácica (debajo del hígado), colocar una pinza hemostática para proteger el contenido intestinal de contaminación y seccionarlo con unas tijeras. Ver la figura 1 en el punto 7.1.
- 6.13. Identificar la porción más proximal al ano del intestino grueso, se encuentra en la parte inferior del animal, debajo de las gónadas y la vejiga, tener especial cuidado de no rasgar la vejiga cuando se encuentra llena. Colocar una pinza hemostática para proteger el contenido intestinal de contaminación y seccionarlo con unas tijeras. Ver la figura 1 en el punto 7.1.
- 6.14. Tomar ambas pinzas y retirar el intestino, se debe ser cuidadoso con el mesenterio adherido al intestino, es necesario seccionarlo de lado derecho en la porción media del animal para evitar desgarrar el intestino. Ver la figura 1 en el punto 7.1.
- 6.15. Colocar el tejido seccionado en un tubo cónico de 50mL que contenga 10mL de buffer PBS estéril y cerrarlo perfectamente de inmediato.
- 6.16. En caso de ser necesario el transporte de las muestras a otra ubicación, colocar el tubo cónico en un contenedor isotérmico con hielo seco, en caso contrario colocar el tubo en un congelador a -20°C.
- 6.17. Repetir el procedimiento con todos los animales previstos para la sesión y colocar los tubos cónicos en el congelador o contenedor isotérmico según sea necesario.
- 6.18. Mantener en congelación a -20°C durante 24h hasta su procesamiento. (Ver SOP 2: Preparación de muestra proveniente de tejido intestinal).

Título

**Disección de intestino de ratón para muestra de microbiota
intestinal**

Versión
Emisión

01
3-nov-14

Página 102 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha **Noviembre 2014**

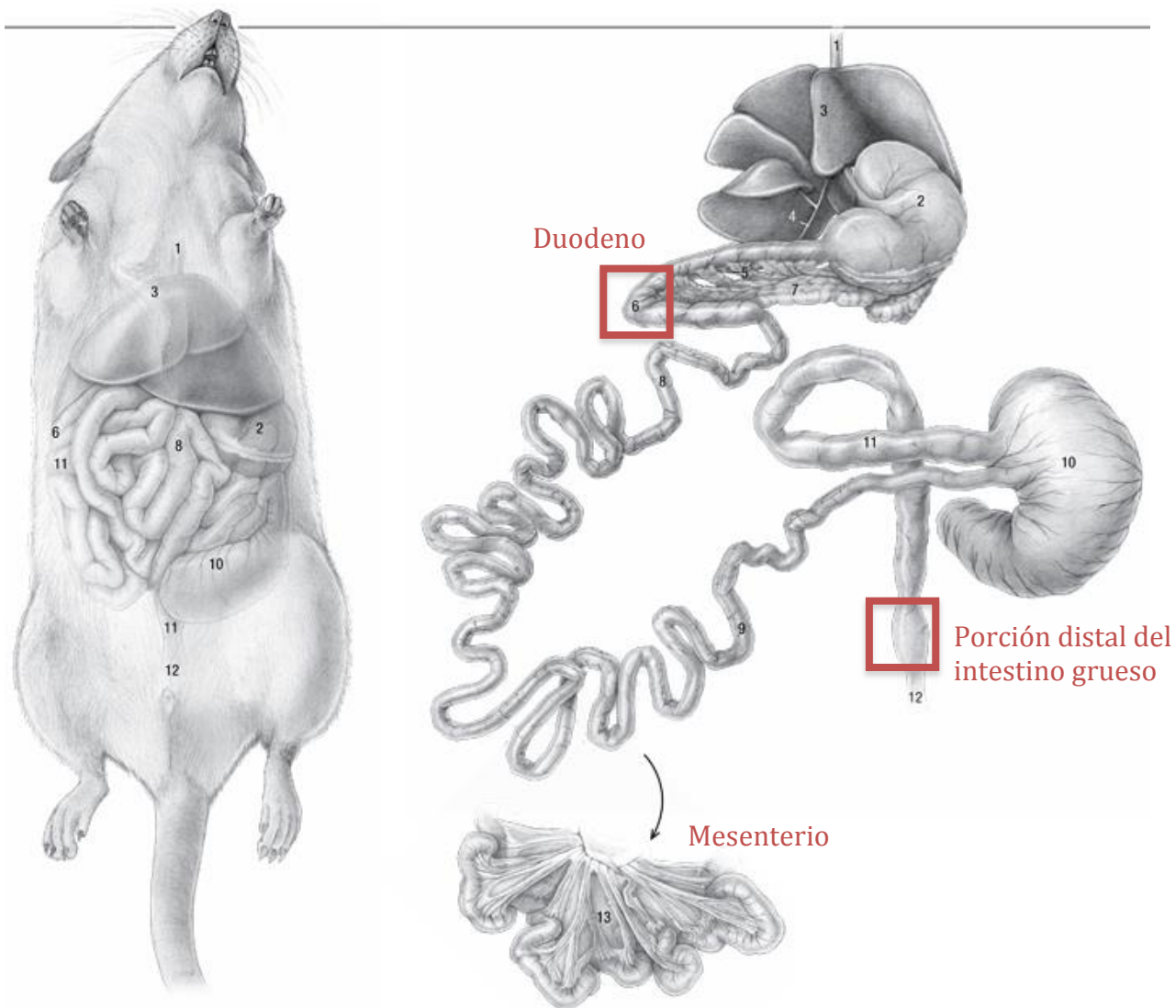
Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

7. Material de apoyo

7.1. Figura 1: Localización de los puntos de corte para la disección del intestino de modelos murinos para el análisis de la microbiota intestinal.



7.2. Preparación de buffer PBS:

- Pesar las sales necesarias descritas en la tabla 1.

Título

**Disección de intestino de ratón para muestra de microbiota
intestinal**

Versión
Emisión

01
3-nov-14

Página 103 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

**Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- b) Disolver las sales en el 80% del volumen de agua destilada total.
- c) Mezclar hasta obtener una solución homogénea.
- d) Medir y ajustar pH a 7.4, usar NaOH 10M o HCl 1M según sea necesario.
- e) Aforar a volumen final
- f) Filtrar la solución con una membrana de 0.45µm.
- g) Esterilizar en autoclave

Tabla 1: Tabla de preparación para buffer salino de fosfatos (PBS)

1X	Conc. final	250mL	500mL	1000mL
NaCl	138mM	2.015g	4.03g	8.06g
KCl	3mM	0.055g	0.11g	0.22g
Na₂HPO₄	8.1mM	0.2875g	0.575	1.15g
KH₂PO₄	1.5mM	0.05g	0.10g	0.20g
dH₂O	-	cbp 250mL	cbp 500mL	cbp 1000mL

8. Bibliografía

- 8.1. Caricilli A.M., Picardi P.K., Abreu L.L., Ueno M., Prada P.O., Ropelle E.R., Massao Hirabara S., Castoldi A., Vieira P., Camara N.O.S., Curi R., Carnevalheira J.B., Saad M.J.A. (2011) Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in RLR2 knockout mice. PLoS Biology. 9;11:e1001212
- 8.2. Costa E., Puhl N.J., Selinger B.L., Inglis D.G. (2009) Characterization of mucosa-associated bacterial communities of the mouse intestines by terminal restriction fragment length polymorphism: Utility of sampling strategies and methods to reduce single-stranded DNA artifacts. Journal of Microbiological Methods. 78:175-180.

Anexo 2



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

2

Título

Preparación de muestra proveniente de tejido intestinal

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 105 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

1. Objetivo

1.1. Obtener el contenido del tejido intestinal par obtener una muestra homogénea del mismo.

2. Alcance

Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y en el Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata, lentes de seguridad y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Tejido intestinal seccionado de animales para análisis de microbiota intestinal en tubos cónicos de 50mL.
- 4.2. Etanol 97%
- 4.3. Solución de cloruro de benzalconio al 1%
- 4.4. Buffer PBS pH7.4 estéril (Ver punto 7.4)
- 4.5. Jeringa hipodérmica de 3ml con aguja
- 4.6. Toallas de papel desechables
- 4.7. Caja Petri de 90X15mm desechable estéril (una por cada muestra)
- 4.8. Puntas para pipeta volumétrica automática de 100-1000µL estériles.
- 4.9. Puntas para pipeta volumétrica automática de 100-1000µL recortadas estériles. (Ver en punto 7.1)
- 4.10. Hielo granizado
- 4.11. Tubos para centrifuga de 25mL
- 4.12. Tubos para microcentrífuga de 1.7mL

5. Equipo

- 5.1. Campana de flujo laminar
- 5.2. Ultra congelador operando a -80°C
- 5.3. Mezclador de vórtice (vortex)
- 5.4. Centrifuga refrigerada de piso con capacidad para operar a 5000rpm, 4°C y rotor para tubos de 25mL
- 5.5. Pipeta volumétrica automática de 100-1000µL

6. Procedimiento



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

2

Titulo

Preparación de muestra proveniente de tejido intestinal

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 106 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

Gustavo Pacheco-López (UAM-L)

Fecha: Noviembre 2014

Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.1. Descongelar las muestras de tejido que se desee procesar, una vez descongeladas deberán permanecer en hielo.
- 6.2. Sanitizar los tubos para centrifuga con etanol 97% y permitir que se seque.
- 6.3. Sanitizar la campana de flujo laminar (primero con la solución de cloruro de benzalconio y después con etanol al 97%)
- 6.4. Llevar a la campana de flujo laminar las muestras de tejido a procesar descongeladas con un número igual de cajas de Petri desechables y jeringas hipodérmicas.
- 6.5. Tomar una muestra de tejido y decantarlo en la base de la caja de Petri con todo el contenido del tubo cónico de 50mL.
- 6.6. Estirar el intestino eliminando el mesenterio. Colocar el tejido desechado en el interior de la tapa de la caja de Petri.
- 6.7. Separar el intestino delgado del grueso por el íleon Ver punto 7.3. Colocar el tejido en un cuadrante de la caja de Petri.
- 6.8. Vaciar el contenido del intestino delgado (mucosidad de color rosa o rojo), presionando desde un extremo hasta el otro como si se exprimiera un tubo de pasta o crema. Colocar la mucosidad en el cuadrante opuesto al tejido del intestino grueso ver punto 7.2. En esta mucosidad se encuentra la microbiota intestinal, es importante evitar producir excesiva fuerza mecánica sobre ella para prevenir la lisis celular hasta la extracción de ADN.
- 6.9. Llenar la jeringa con el buffer que se encuentra en la caja de Petri, intentando no succionar mucosidad.
- 6.10. Colocar la jeringa dentro del intestino delgado vacío, se sugiere hacer una punción en uno de los extremos para llenar el tejido de solución y así producir un lavado para desprender las bacterias que se adhieren al lumen intestinal. Tener cuidado con la aguja, utilizar el bisel de la aguja en dirección del investigador para tener visibilidad y control total sobre el movimiento del mismo.
- 6.11. Llenar la jeringa de nuevo y realizar un segundo lavado del tejido.
- 6.12. Sacar el exceso de solución del tejido de la misma forma que se obtuvo el contenido, presionando desde un extremo hasta el otro como si se exprimiera un tubo de pasta o crema.
- 6.13. Colocar el tejido en la tapa de la caja de Petri.
- 6.14. Vaciar el contenido del intestino grueso (mucosidad de color café y pellets fecales), presionando desde un extremo hasta el otro como si se exprimiera un tubo de pasta o crema. Vaciar primero los pellets y después el resto del contenido, de otra forma se puede rasgar el intestino, dificultando el lavado.
- 6.15. Llenar la jeringa con el buffer que se encuentra en la caja de Petri, intentando no succionar mucosidad.



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

2

Titulo

Preparación de muestra proveniente de tejido intestinal

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 107 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:


Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.16. Colocar la jeringa dentro del intestino grueso vacío, se sugiere hacer una punción en uno de los extremos para llenar el tejido de solución y así producir un lavado. Poner especial atención al lavado del ciego ya que por su forma es necesario voltearlo para que salga todo el contenido.
- 6.17. Llenar la jeringa de nuevo y realizar un segundo lavado del tejido.
- 6.18. Sacar el exceso de solución del tejido de la misma forma que se obtuvo el contenido, presionando desde un extremo hasta el otro como si se exprimiera un tubo de pasta o crema.
- 6.19. Colocar el tejido en la tapa de la caja de Petri. Y desecharla de forma adecuada.
- 6.20. Homogeneizar el contenido sólido con ayuda de la jeringa.
- 6.21. Retirar la aguja de la jeringa y desecharla adecuadamente
- 6.22. Vaciar todo el contenido de la caja Petri (homogenado intestinal) en un tubo para centrifuga de 25ml previamente rotulado con ayuda de la jeringa.
- 6.23. Mantener en hielo el tubo para centrifuga con el contenido intestinal hasta que todas las muestras previstas para la sesión hayan sido procesadas.
- 6.24. Cambiar los guantes por un par nuevo antes de procesar cada una de las muestras
- 6.25. Una vez que todas las muestras se encuentren en tubos para centrifuga, proceder al tarado de los tubos, en caso de necesitar adicionar peso a algún tubo, utilizar buffer PBS estéril, agregarlo con la Pipeta volumétrica automática de 100-1000µL
- 6.26. Centrifugar a 5000rpm a 4°C por 5min
- 6.27. Desechar el sobrenadante.
- 6.28. Agregar 3mL de buffer PBS estéril a los botones celulares.
- 6.29. Mezclar en el vortex hasta homogeneizar. (Mantener en hielo)
- 6.30. Alicuotar con ayuda de las puntas para pipeta volumétrica automática de 100-1000µL recortadas el contenido del tubo de centrifuga de 25mL a 4 tubos para microcentrifuga de 1.7mL.
- 6.31. Congelar las muestras a -80°C y mantener a esta temperatura hasta la extracción de ADN (Ver SOP 3: Extracción de ADN de muestra de contenido intestinal)

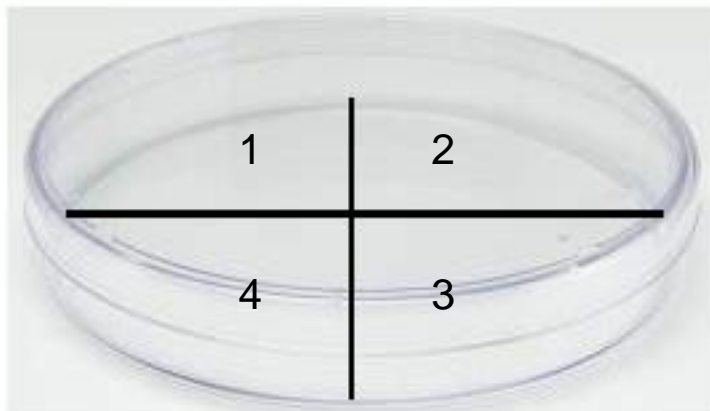
7. Material de apoyo

- 7.1. Puntas recortadas. Se corta la parte que se encuentra en el círculo rojo para permitir el paso de sólidos

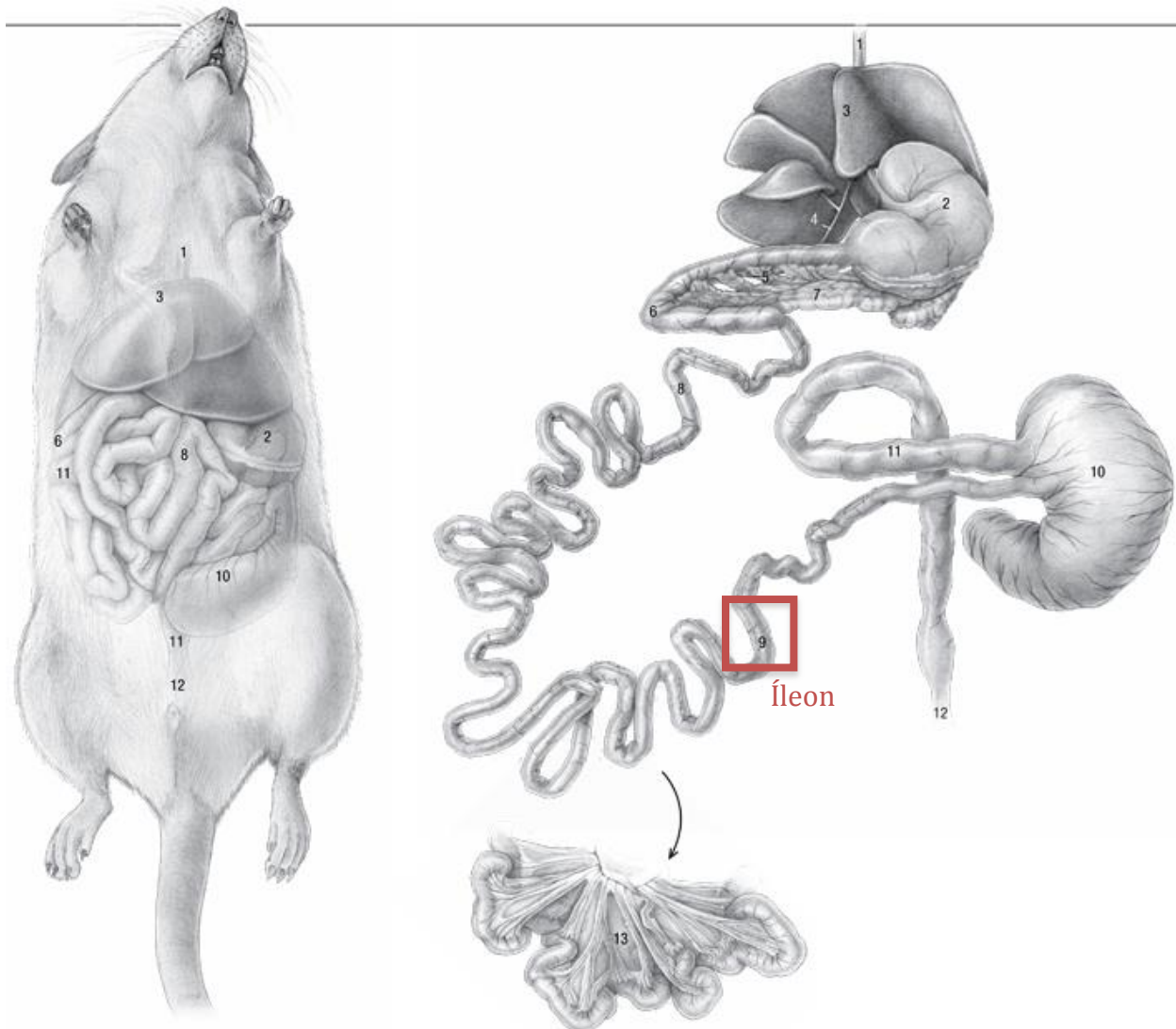
 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	2
		Título Preparación de muestra proveniente de tejido intestinal	Versión Emisión
		Página 108 de 197	
Gabriela Bravo Ruiseco S. Realizado por:	Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X) Aprobado por:	Fecha: Noviembre 2014 Fecha de aprobación	



7.2. Ejemplo de caja Petri. En el cuadrante 1 se coloca el tejido y en el cuadrante 3 se coloca el contenido intestinal.



7.3. Localización del íleon, punto de corte para separar el intestino grueso del delgado para la extracción de contenido intestinal.



8. Bibliografía

8.1. Bravo-Ruiseco G., 2014 Preparación de muestra de contenido intestinal. Laboratorio de Ecología Molecular (Técnicas). UAM Xochimilco

Anexo 3



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

3

Título

Extracción de ADN de muestras de contenido intestinal

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 111 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

1. Objetivo

1.1. Obtener ADN de muestras de contenido intestinal para posterior análisis

2. Alcance

2.1. Este procedimiento aplica a todas las muestras de contenido intestinal que requiera extracción de ADN

3. Responsabilidades

3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata, lentes de seguridad y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Kit de extracción de ADN QIAmp DNA Stool Mini Kit (Ver punto 7.1)
- 4.2. Etanol 97%
- 4.3. Tubos para microcentrífuga 2mL
- 4.4. Puntas para pipeta volumétrica automática de 100-1000µl cortadas estériles. (Ver punto 7.3)
- 4.5. Puntas para pipeta volumétrica automática de 100-1000µl estériles.
- 4.6. Puntas para pipeta volumétrica automática de 20-200µl estériles
- 4.7. Hielo o rack frío (4-0°C)

5. Equipo

- 5.1. Pipeta volumétrica automática de 100-1000µl
- 5.2. Pipeta volumétrica automática de 20-200µl
- 5.3. Microcentrífuga capaz de operar a 14000rpm
- 5.4. Baño de agua o seco capaz de operar a 70°C
- 5.5. Mezclador de vórtice (vortex)

6. Procedimiento

- 6.1. El kit consiste de lo siguiente:
 - 6.1.1. Buffer ASL
 - 6.1.2. Buffer AL
 - 6.1.3. Buffer AW1 (requiere adicción de etanol 97%)
 - 6.1.4. Buffer AW2 (requiere adicción de etanol 97%)
 - 6.1.5. Buffer AE
 - 6.1.6. Solución de proteinasa K
 - 6.1.7. Tabletas inhibidoras
 - 6.1.8. Columnas mini spin.
 - 6.1.9. Tubos colectores



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

3

Título

Extracción de ADN de muestras de contenido intestinal

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 112 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

Gustavo Pacheco-López (UAM-L)

Fecha: Noviembre 2014

Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.2. Descongelar muestras. Siempre mantener en hielo después de descongeladas. Después de usar congelar a -80°C
- 6.3. Homogeneizar la muestra en vortex (30sec)
- 6.4. Con ayuda de una puna cortada tomar $200\mu\text{l}$ de muestra en un tubo para microcentrífuga de 2mL
- 6.5. Adicionar 1.6mL de buffer ASL.
- 6.6. Homogenizar por vortex (1min)
- 6.7. Incubar a 70°C por 5 min.
- 6.8. Centrifugar a 14000rpm (1min). Descartar el pellet.
- 6.9. Transferir 1.4mL de sobrenadante a otro tubo para microcentrífuga de 2mL
- 6.10. Adicionar una tableta inhibidora por tubo.
- 6.11. Homogeneizar por vortex (tiempo necesario para lograr una mezcla homogénea)
- 6.12. Incubar la solución por 1min a temperatura ambiente.
- 6.13. Centrifugar a 14000rpm (6 min). Descartar el pellet.
- 6.14. Transferir $600\mu\text{l}$ de sobrenadante a otro tubo para microcentrífuga de 2mL. El pellet es muy suave, es necesario ser rápido con la transferencia para evitar los sólidos.
Adicionar al mismo tubo a donde se transfirió el sobrenadante:
 - 6.14.1. $600\mu\text{l}$ de buffer AL
 - 6.14.2. $25\mu\text{l}$ de solución de proteinasa K
- 6.15. Incubar a 70°C por 10min
- 6.16. Remover del calor y adicionar $600\mu\text{l}$ de etanol 97%
- 6.17. Centrifugar a 14000rpm por 30seg para homogeneizar. A esta solución se le da el nombre de Lisado.
- 6.18. Tomar $600\mu\text{l}$ de lisado en una columna minispin. Tener cuidado de no derramar el lisado por las paredes exteriores de la columna para prevenir la contaminación de la muestra.
- 6.19. Centrifugar a 14000rpm (1min). Descartar el tubo colector con la solución.
- 6.20. Clocar la columna en otro tubo colector y adicionar $600\mu\text{l}$ de lisado.
- 6.21. Centrifugar a 14000rpm (1min). Descartar el tubo colector con la solución.
- 6.22. Clocar la columna en otro tubo colector y adicionar la porción restante de lisado ($\pm 600\mu\text{l}$).
- 6.23. Centrifugar a 14000rpm (1min). Descartar el tubo colector con la solución.
- 6.24. Clocar la columna en otro tubo colector y adicionar $500\mu\text{l}$ de buffer AW1.
- 6.25. Centrifugar a 14000rpm (1min). Descartar el tubo colector con la solución.
- 6.26. Clocar la columna en otro tubo colector y adicionar $500\mu\text{l}$ de buffer AW2. Esta solución puede causar interferencia en aplicaciones subsecuentes.
- 6.27. Centrifugar a 14000rpm (1min). Descartar el tubo colector con la solución.

Título

Extracción de ADN de muestras de contenido intestinal

Versión
Emisión

1
3-nov-14

Página 113 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.28. Colocar un nuevo tubo colector y centrifugar a 14000rpm (3min). Descartar el tubo colector con la solución.
- 6.29. Colocar la columna en un tubo para microcentrífuga de 1.7mL y adicionar 150µl de buffer AE. Cerrar la tapa e incubar por una hora a temperatura ambiente.
- 6.30. Centrifugar a 14000rpm (1min). Descartar la columna.
- 6.31. Transferir alícuotas de 50µl de AND a un tubos de microcentrífuga de 1.7mL y almacenar a -80°C.
- 6.32. Se recomienda almacenar dos alícuotas a -80°C y utilizar una para el trabajo de rutina.
- 6.33. Verificar la extracción de ADN en un gel de agarosa al 1% (ver punto 7.2)

7. Material de apoyo

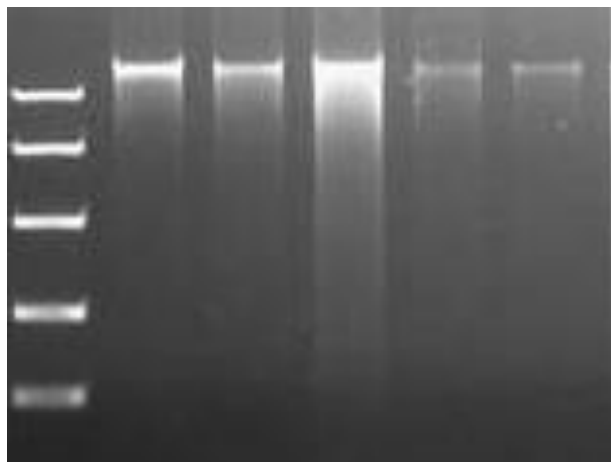
7.1. Kit Para extracción de ADN


En la siguiente dirección se puede encontrar la información completa del producto:

<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-stool-mini-kit>

7.2. Gel de agarosa al 1%

En la imagen se muestra un ejemplo de la extracción de ADN con el kit QUamp DNA Stool Mini Kit.



 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	3
		Título Extracción de ADN de muestras de contenido intestinal	Versión Emisión 1 3-nov-14
Gabriela Bravo Ruiseco S. Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Realizado por: Aprobado por:		Fecha: Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

7.3. Puntas recortadas. Se corta la parte que se encuentra en el círculo rojo para permitir el paso de sólidos



8. Bibliografía

8.1. QIAGEN, 2001 QIAamp DNA Stoll Mini Kit Handbook

Anexo 4



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

4

Título

Preparación de amplicones para DGGE

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 116 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

Gustavo Pacheco-López (UAM-L)

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Aprobado por:

Fecha de aprobación

1. Objetivo

1.1. Preparar amplicones por PCR de la región V6-V8 del gen16s rARN que puedan ser utilizadas para su análisis por DGGE.

2. Alcance

2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Tubos de microcentrífuga de 0.2mL
- 4.2. Tubos de microcentrífuga de 1.5mL
- 4.3. Puntas para pipeta volumétrica automática de 100-1000µl estériles.
- 4.4. Puntas para pipeta volumétrica automática de 20-200µl estériles.
- 4.5. Puntas para pipeta volumétrica automática de 1-10µl estériles.
- 4.6. Taq polimerasa Axygen
- 4.7. Buffer para taq polimerasa 10X Axygen
- 4.8. Solución de cloruro de magnesio 25mM Axygen
- 4.9. dNTP's 100mM
- 4.10. Alícuota de 2ml de agua ultrapura estéril
- 4.11. Primer 1401r
- 4.12. Primer 968GCf
- 4.13. Hielo o rack para tubos de 0.2ml frío (4-0°C)

5. Equipo

- 5.1. Pipeta volumétrica automática de 100-1000µl
- 5.2. Pipeta volumétrica automática de 20-200µl
- 5.3. Pipeta volumétrica automática de 1-10µl
- 5.4. Microcentrífuga con cabezal para tubos de microcentrífuga de 0.2ml
- 5.5. Termociclador punto final
- 5.6. Campana para PCR

6. Procedimiento



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

4

Título

Preparación de amplicones para DGGE

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 117 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:


Fecha de aprobación

- 6.1. Colocar las cajas de puntas, los tubos de microcentrífuga de 0.2ml y las pipetas automáticas dentro de la campana para PCR y prender la luz UV por 15min para sanitizar el material.
- 6.2. Descongelar los reactivos para PCR.
 - 6.2.1. Buffer para taq polimerasa 10X
 - 6.2.2. Solución de cloruro de magnesio 25mM
 - 6.2.3. dNTP's 100mM
 - 6.2.4. Agua ultrapura
 - 6.2.5. Primer 1401r
 - 6.2.6. Primer 968GCf
 - 6.2.7. Muestras
- 6.3. Mantener las muestras y los reactivos para PCR a una temperatura de 4 a 0°C en todo momento.
- 6.4. Preparación de la mezcla de reacción.
 - 6.4.1. En la tabla 1 se describe la cantidad de reactivos necesaria para una reacción de PCR, es necesario multiplicarla por el total de reacciones a preparar. De la misma forma es necesario agregar 2 reacciones a cada corrida de PCR, una para el control positivo a la que se le agregaran 50ng de DNA genómico de la bacteria *E. coli* y una para el control negativo al que se le agregara 1µl de agua ultrapura .
 - 6.4.2. Adicionar a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml los reactivos para la mezcla de reacción en orden consecutivo.

Tabla 1: Mezcla de reacción para la PCR de la región V6-V8 para DGGE

Reactivo	Concentración final	Cantidad (µl)
Agua ultrapura	N.A.	16.75
Buffer	1X	2.5
Cloruro de magnesio	2mM	2
dNTP's	50mM	0.5
Primer 968GCf	1pM	1
Primer 1401r	1pM	1
Taq polimerasa	1 U	0.2
ADN molde	100ng	1
Volumen final	–	25

- 6.5. Homogeneizar la mezcla de reacción por inversión del tubo.
- 6.6. Centrifugar por 10 segundos a 1000rpm para mover el contenido del tubo al fondo del mismo.

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	4
		Título Preparación de amplicones para DGGE	Versión Emisión 1 3-nov-14
Realizado por: Gabriela Bravo Ruiseco S.	Aprobado por: Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X)	Fecha: Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

- 6.7. Colocar el total de tubos de microcentrífuga de 0.2ml a usar en una gradilla y adicionar a cada uno 24µl de la mezcla de reacción.
- 6.8. Rotular los tubos para microcentrífuga de 0.2ml.
- 6.9. Colocar 1µl de muestra a cada tubo.
- 6.10. Centrifugar 10 segundos a 1000rpm para mover el contenido del tubo al fondo del mismo.
- 6.11. Colocar en el termociclador y utilizar las condiciones de PCR que se muestra en la tabla 2.
- 6.12. Una vez terminada la PCR, realizar un gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación de la muestra. (Ver punto 7.1)
- 6.13. Almacenar los amplicones de 4-0°C hasta su uso para DGGE.

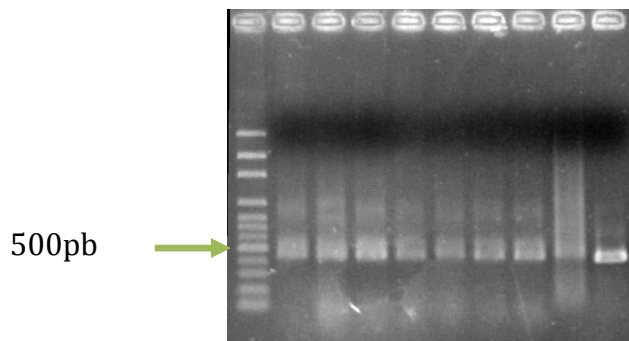
Tabla 2: Condiciones de PCR para obtener los amplicones V6-V8 para DGGE


Paso	Tiempo (min:seg)	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	5:00	94
Desnaturalización	0:30	94
Alineación	0:30	57
Elongación	0:40	72
Elongación final	7:00	72

7. Material de apoyo

7.1. Gel de agarosa al 1%

En la imagen se muestra un ejemplo de amplicones de la región V6-V8 del gen 16s rARN (~450pb), en el carril de extrema izquierda es marcador de peso molecular 100pb Axygen.



 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	4
Título Preparación de amplicones para DGGE	Versión Emisión	1 3-nov-14	
	Página 119 de 197		
Gabriela Bravo Ruiseco S. Realizado por:	Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X) Aprobado por:	Fecha: Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

8. Bibliografía

8.1. http://www.fisherbiotec.com.au/media/axxygenbio_nucleotides.pdf

Anexo 5



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

5

Titulo

Preparación de DGGE para el análisis de microbiota intestinal murina

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 121 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

1. Objetivo

1.1. Realizar geles con gradiente de desnaturizante (DGGE) para el análisis de las comunidades microbianas de la microbiota intestinal de modelos murinos.

2. Alcance

2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades


3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Puntas capilares para cargado de geles de 200µl
- 4.2. GelBond® (Lonza Group, Basel, Suiza).
- 4.3. Soluciones para DGGE
 - 4.3.1. Solución 0% desnaturizante (Ver punto 7.1)
 - 4.3.2. Solución 100% desnaturizante (Ver punto 7.2)
 - 4.3.3. Buffer TAE 1X 8 litros (Ver punto 7.3)
 - 4.3.4. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
 - 4.3.5. Persulfato de amonio (APS) 10% (Ver punto 7.4)
- 4.4. Buffer de carga (Ver punto 7.5)
- 4.5. Soluciones para tinción del gel
 - 4.5.1. Solución de fijado (Ver punto 7.6)
 - 4.5.2. Solución de teñido (Ver punto 7.7)
 - 4.5.3. Solución de revelado (Ver punto 7.8)
 - 4.5.4. Matraz Erlenmeyer de 1000mL
 - 4.5.5. 20g de cloruro de sodio.

5. Equipo

- 5.1. DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad® Laboratories, Hercules, CA). Ver punto 7.9
 - 5.1.1. Tanque
 - 5.1.2. Módulo de control de temperatura
 - 5.1.3. Núcleo
 - 5.1.4. Sándwich del gel

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	5
		Título Preparación de DGGE para el análisis de microbiota intestinal murina	Versión Emisión 1 3-nov-14
Gabriela Bravo Ruiseco S. Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X)		Fecha: Noviembre 2014	
Realizado por:		Fecha de aprobación	

- 5.1.4.1. Vidrio de 16x16cm
- 5.1.4.2. Vidrio de 16x14cm
- 5.1.4.3. 2 Separadores de 1mm
- 5.1.4.4. 2 abrazaderas
- 5.1.5. Soporte para polimerización del gel
- 5.2. Fuente de poder
- 5.3. Formador de gradiente
- 5.4. Bomba peristáltica con tubería
- 5.5. Plato de agitación magnética
- 5.6. Agitador Rocker
- 5.7. Charolas de acero inoxidable

6. Procedimiento

6.1. Preparación del gel.

- 6.1.1. Calentar la solución 100% desnaturizante a no más de 50°C hasta que se disuelvan los cristales de urea.
- 6.1.2. Limpiar con agua destilada y desengrasar con alcohol las partes del sándwich del gel.
- 6.1.3. Sobre el vidrio de 16x16cm colocar una hoja de Gelbond, con la cara hidrofóbica hacia el vidrio y la hidrofílica libre para adherirse al gel.
- 6.1.4. Ajustar la separación de los vidrios con la tarjeta separadora y ajustar las abrazaderas como se muestra en la figura 1.

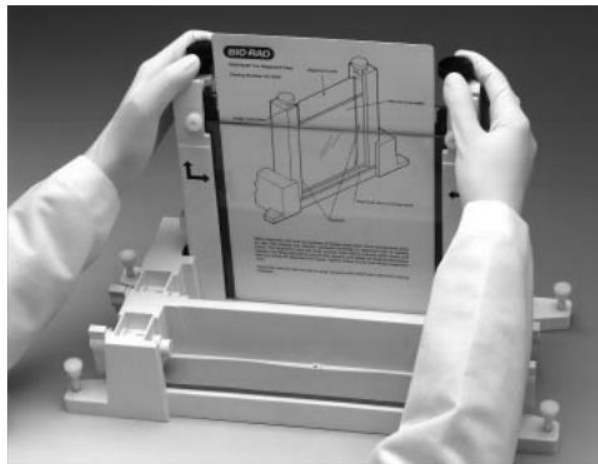



Figura 1: Preparación del sándwich del gel

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	5
		Título Preparación de DGGE para el análisis de microbiota intestinal murina	Versión Emisión 1 3-nov-14
Gabriela Bravo Ruiseco S. Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X)		Fecha: Noviembre 2014	
Realizado por:	Aprobado por:	Fecha de aprobación	

- 6.1.5. Poner una capa de vaselina en la almohadilla del soporte de polimerización y ajustar el sándwich del gel, de forma que no se produzcan fugas durante el vertido del gel.
- 6.1.6. Montar el formador de gradiente acoplado a la bomba peristáltica a 10cm del soporte de polimerización.
- 6.1.7. Preparar la solución alta, baja y cero como se describe en la tabla 1 sin adicionar el APS.
- 6.1.8. Para el análisis de las comunidades bacterianas de las muestras murinas de intestino completo, el gradiente bajo es 30% y el alto es 60%
- 6.1.9. Asegurarse de que las válvulas del formador de gradiente se encuentren cerradas. Adicionar el APS a la solución baja y alta, mezclar bien y colocar las en el formador de gradiente. De lado derecho se colocara la solución alta y de lado izquierdo la baja.
- 6.1.10. Colocar la manguera proveniente de la bomba peristáltica en el centro del sándwich del gel con el bisel de la aguja apuntando hacia el exterior, como se muestra en la figura 2.



Figura 2: Montaje para vertido de gel con bomba peristáltica

- 6.1.11. Accionar la bomba peristáltica a una velocidad de 30rpm, y abrir la válvula de la solución alta. Después de 10 segundos abrir la válvula de la solución baja. Permitir que el contenido del formador de gradiente se vierta en el sándwich del gel.
- 6.1.12. Lavar el formador de gradiente y la tubería de la bomba con dos lavados de agua destilada y secar.
- 6.1.13. Agregar el APS a la solución cero. Colocarlo en el formador de gradiente y abrir la válvula para permitir el paso de la solución.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

5

Título

Preparación de DGGE para el análisis de microbiota intestinal murina

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 124 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.1.14. Una vez vertida toda la solución, colocar el peine en el gel de forma tal que no se modifique el gradiente formado y con cuidado de no desprender el Gelbond.
- 6.1.15. Lavar el formador de gradiente y la tubería de la bomba con dos lavados de agua destilada y secar.
- 6.1.16. Cubrir el gel del sol con paños limpios y permitir que polimerice. Aproximadamente una hora
- 6.2. Llenar el tanque con 7 litros de TAE 1X, o hasta la marca de llenado y precalentar el buffer a 65°C. Esto tarda aproximadamente 1 hora.
- 6.3. Una vez que el gel este polimerizado, retirar del soporte de polimerización y colocar el gel en el núcleo con el vidrio de 16x14cm hacia adentro del mismo.
- 6.4. Colocar como contrapeso en el lado libre del núcleo un par de vidrios sin separadores.
- 6.5. Colocar el núcleo dentro del tanque de electroforesis.
- 6.6. Preparar las muestras con buffer de carga a razón de 1µl de buffer de carga por cada 5µl de muestra.
- 6.7. Centrifugar a 1000rpm por 10 segundos para permitir que el contenido de los tubos se junte en el fondo.
- 6.8. Cargar el gel con las puntas capilares para cargado de geles de 200µl.
 - 6.8.1. Colocar a los flancos y el centro del gel marcador de peso molecular para poder estandarizar el gel en caso de ser necesario.
- 6.9. Colocar el controlador de temperatura y ajustar la temperatura a 65°C.
- 6.10. Conectar el controlador de temperatura a la fuente de poder y correr a 110v por 5 minutos.
- 6.11. Correr el gel a 85v por 960minutos
- 6.12. Sacar del tanque y permitir que el gel se enfríe por 10min antes de retirarlo de los vidrios.
- 6.13. Tomar siempre el gel por las orillas del Gelbond evitando tocar a matriz del gel.
- 6.14. Tinción del gel.
 - 6.14.1. Enjuagar la charola marcada como "fijado" con 30ml de la solución de fijado y desechar la solución.
 - 6.14.2. Colocar la charola en el agitador rocker a 26rpm.
 - 6.14.3. Sumergir el gel en la solución de fijado por 3 minutos, almacenar la solución en un matraz.
 - 6.14.4. Poner en la charola la solución de teñido y sumergir el gel por 10 minutos.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento
No.

5

Título

**Preparación de DGGE para el análisis de microbiota intestinal
murina**

Versión
Emisión

1
3-nov-14

Página 125 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.14.5. Desechar la solución de tinción en un matraz con 20g de cloruro de sodio (matraz de desechos).
- 6.14.6. Lavar el gel 3 veces con 120ml de agua ultrapura por 2 minutos
- 6.14.7. Enjuagar la charola marcada como "revelado" con 30ml de la solución de revelado y desechar la.
- 6.14.8. Poner en la charola la solución de teñido y sumergir el gel por no más de 45 minutos. En este paso hay que vigilar el gel hasta obtener la resolución de las bandas deseadas para detener el proceso de revelado.
- 6.14.9. Desechar la solución de revelado
- 6.14.10. Lavar el gel 2 veces con 120ml de agua ultrapura por 2 minutos
- 6.14.11. Sumergir el gel en la solución de fijado por 5 minutos
- 6.14.12. Lavar el gel con 120ml de agua ultrapura por 2 minutos
- 6.14.13.
- 6.15. Colocar papel celofán sobre el gel y digitalizar la imagen del mismo con un escáner de doble haz.
- 6.16. Cortar las bandas deseadas del gel y colocarlas en tubos de microcentrifuga de 1.5ml.
- 6.17. Mantener las bandas en refrigeración hasta su procesamiento.

7. Material de apoyo

- 7.1. Solución 0% desnaturalizante (250mL)
 - 7.1.1. 50mL de solución de acrilamida-bisacrilamida (37.5:1) al 40%
 - 7.1.2. 2.5mL de TAE 50X
 - 7.1.3. 5mL de glicerol
 - 7.1.4. Aforar a volumen con agua ultrapura
- 7.2. Solución 100% desnaturalizante (250mL)
 - 7.2.1. 50mL de solución de acrilamida-bisacrilamida (37.5:1) al 40%
 - 7.2.2. 2.5mL de TAE 50X
 - 7.2.3. 5mL de glicerol
 - 7.2.4. 105.4g de urea
 - 7.2.5. 100mL de formamida
 - 7.2.6. Aforar a volumen con agua ultrapura
- 7.3. Buffer TAE 1X
 - 7.3.1. Para un litro de TAE 50X: 242g Tris base, 57.1mL de ácido acético glacial, 100mL de EDTA 0.5M (pH8), ajustar a volumen con agua destilada.
 - 7.3.2. Para un litro de TAE 1X, medir 20mL de TAE 50X y llevar a volumen con agua destilada.
- 7.4. Persulfato de amonio (APS) 10%



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

5

Título

Preparación de DGGE para el análisis de microbiota intestinal murina

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 126 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

**Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 7.4.1. Preparar una solución al 10% de persulfato de amonio en agua ultrapura, hacer alícuotas de 500µl.
- 7.5. Buffer de carga
 - 7.5.1. 0.05% azul de bromofenol, 40% sucrosa, 0.5% SDS, preparar en solución de EDTA 0.1M (pH8).
- 7.6. Solución de fijado.
 - 7.6.1. Solución de Carlos 8X (250mL): 200mL de etanol 96%, 10mL de ácido acético, llevar a volumen con agua ultrapura.
 - 7.6.2. La solución de fijado 1X se prepara con 25mL de solución de Carlos 8X, llevar a volumen de 200ml con agua ultrapura.
- 7.7. Solución de teñido.
 - 7.7.1. 0.4g de nitrato de plata diluido en 25mL de solución de Carlos 8X, llevar a volumen de 200ml con agua ultrapura
- 7.8. Solución de revelado
 - 7.8.1. 10mg de borohidruro de sodio (NaBH₄) diluido en una solución de hidróxido de sodio al 1.5%.
 - 7.8.2. Agregar 750µl de formaldehído.
- 7.9. Tabla 1: Gradientes para DGGE

Tabla 1: Gradientes para DGGE					
Gradiente %	Solución 0% (ml)	Solución 100% (ml)	Volumen final (ml)	TEMED (µl)	APS 10% (µl)
0	6	-	6	6	24
30	8.40	3.60	12	12	38
32	8.16	3.84	12	12	38
34	7.92	4.08	12	12	38
36	7.68	4.32	12	12	38
38	7.44	4.56	12	12	38
40	7.20	4.80	12	12	38
42	6.96	5.04	12	12	38
44	6.72	5.28	12	12	38
46	6.48	5.52	12	12	38
48	6.24	5.76	12	12	38
50	6.00	6.00	12	12	38
52	5.76	6.24	12	12	38
54	5.52	6.48	12	12	38
56	5.28	6.72	12	12	38
58	5.04	6.96	12	12	38



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

5

Titulo

Preparación de DGGE para el análisis de microbiota intestinal murina

Versión Emisión

1
3-nov-14

Página 127 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

**Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:


Fecha de aprobación

60	4.80	7.20	12	12	38
----	------	------	----	----	----

8. Bibliografía

- 8.1. Muyzer, G. and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141.
- 8.2. Aguirre-Garrido, J. F. (2005). Seguimiento de la comunidad bacteriana en suelos contaminados por hidrocarburos durante su tratamiento en biorreactores de fase semisólida. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. 34 - 39.

Anexo 6

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	6
		Título Elución de ADN de bandas cortadas	
		Página 129 de 197	
Gabriela Bravo Ruiseco S. Realizado por:	Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X) Aprobado por:	Fecha Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

1. Objetivo

- 1.1. Recuperar el ADN de las bandas escindidas de los geles de DGGE para su posterior análisis.

2. Alcance

- 2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

- 3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Tubo de microcentrífuga con las bandas cortadas de los geles de DGGE.
- 4.2. Buffer de elución (Ver puto 7.1)
- 4.3. Puntas para pipeta volumétrica automática de 20-200µl estériles.

5. Equipo

- 5.1. 4 Baño seco con capacidad de operar a 94°C
- 5.2. Refrigerador
- 5.3. Pipeta volumétrica automática de 20-200µl
- 5.4.

6. Procedimiento

- 6.1. Adicionar a cada banda 50µl de buffer de elución.
- 6.2. Calentar a 95°C en un baño seco por 15 minutos, cerciorarse de que las tapas están bien aseguradas para evitar la evaporación de la muestra.
- 6.3. Tomar el sobrenadante y pasarlo a otro tubo de microcentrífuga de 1.5ml.
- 6.4. Utilizar esta solución como ADN molde para la amplificación de la muestra.
- 6.5. Mantener las muestras en refrigeración.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento
No.

6

Titulo

Elución de ADN de bandas cortadas

Versión
Emisión

01
3-nov-14

Página 130 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Fecha Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

7. Material de apoyo

7.1. Buffer de elusión.

10mM	Tris-HCL
50mM	Cloruro de potasio
1.5mM	Cloruro de magnesio
0.1%	Triton X 100

8. Bibliografía

8.1. Kušar, D. y G. Avguštin (2012). "Optimization of the DGGE band identification method." Folia Microbiologica 57(4): 301-306.

Anexo 7



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

7

Título

Amplificación de bandas cortadas de DGGE

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 132 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

**Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

1. Objetivo

- 1.1. Obtener amplicones de las secuencias obtenidas de las bandas cortadas de DGGE para su posterior secuenciación.

2. Alcance

- 2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

- 3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Tubos de microcentrífuga de 0.2mL
- 4.2. Tubos de microcentrífuga de 1.5mL
- 4.3. Puntas para pipeta volumétrica automática de 100-1000µl estériles.
- 4.4. Puntas para pipeta volumétrica automática de 20-200µl estériles.
- 4.5. Puntas para pipeta volumétrica automática de 1-10µl estériles.
- 4.6. Taq polimerasa Axygen
- 4.7. Buffer para taq polimerasa 10X Axygen
- 4.8. Solución de cloruro de magnesio 25mM Axygen
- 4.9. dNTP's 100mM
- 4.10. Alícuota de 2ml de agua ultrapura estéril
- 4.11. Primer 1401r
- 4.12. Primer 968f
- 4.13. Hielo o rack para tubos de 0.2ml frío (4-0°C)
- 4.14.

5. Equipo

- 5.1. Pipeta volumétrica automática de 100-1000µl
- 5.2. Pipeta volumétrica automática de 20-200µl
- 5.3. Pipeta volumétrica automática de 1-10µl
- 5.4. Microcentrífuga con cabezal para tubos de microcentrífuga de 0.2ml
- 5.5. Termociclador punto final
- 5.6. Campana para PCR

6. Procedimiento

- 6.1. S Colocar las cajas de puntas, los tubos de microcentrífuga de 0.2ml y las pipetas automáticas dentro de la campana para PCR y prender la luz UV por 15min para sanitizar el material.
- 6.2. Descongelar los reactivos para PCR.
 - 6.2.1. Buffer para taq polimerasa 10X
 - 6.2.2. Solución de cloruro de magnesio 25mM
 - 6.2.3. dNTP's 100mM
 - 6.2.4. Agua ultrapura
 - 6.2.5. Primer 1401r
 - 6.2.6. Primer 968f
 - 6.2.7. Muestras
- 6.3. Mantener las muestras y los reactivos para PCR a una temperatura de 4 a 0°C en todo momento.
- 6.4. Preparación de la mezcla de reacción.
 - 6.4.1. En la tabla 1 se describe la cantidad de reactivos necesaria para una reacción de PCR, es necesario multiplicarla por el total de reacciones a preparar. De la misma forma es necesario agregar 2 reacciones a cada corrida de PCR, una para el control positivo a la que se le agregaran 50ng de DNA genómico de la bacteria *E. coli* y una para el control negativo al que se le agregara 1µl de agua ultrapura .
 - 6.4.2. Adicionar a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml los reactivos para la mezcla de reacción en orden consecutivo.

Tabla 1: Mezcla de reacción para la PCR de la región V6-V8 para DGGE

Reactivo	Concentración final	Cantidad (µl)
Agua ultrapura	N.A.	34.8
Buffer	1X	5
Cloruro de magnesio	2mM	4
dNTP's	50mM	1
Primer 968GCf	1pM	2
Primer 1401r	1pM	2
Taq polimerasa	1 U	0.2
ADN molde	100ng	1
Volumen final	–	50

- 6.5. Homogeneizar la mezcla de reacción por inversión del tubo.

- 6.6. Centrifugar por 10 segundos a 1000rpm para mover el contenido del tubo al fondo del mismo.
- 6.7. Colocar el total de tubos de microcentrífuga de 0.2ml a usar en una gradilla y adicionar a cada uno 49µl de la mezcla de reacción.
- 6.8. Rotular los tubos para microcentrífuga de 0.2ml.
- 6.9. Colocar 1µl de muestra a cada tubo.
- 6.10. Centrifugar 10 segundos a 1000rpm para mover el contenido del tubo al fondo del mismo.
- 6.11. Colocar en el termociclador y utilizar las condiciones de PCR que se muestra en la tabla 2.
- 6.12. Una vez terminada la PCR, realizar un gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación de la muestra. (Ver punto 7.1)
- 6.13. Realizar 3 reacciones de PCR de 50µl por cada muestra para tener la cantidad suficiente de AND para realizar la secuenciación.
- 6.14. Almacenar los amplicones de 4-0°C hasta su uso para DGGE.

Tabla 2: Condiciones de PCR para obtener los amplicones V6-V8 para DGGE

Paso	Tiempo (min:seg)	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	5:00	94
Desnaturalización	0:60	94
Alineación	0:60	57
Elongación	0:70	72
Elongación final	7:00	72

7. Material de apoyo

7.1. Gel de agarosa al 1%

En la imagen se muestra un ejemplo de amplicones de la región V6-V8 del gen 16s rARN (~450pb), en el carril de extrema izquierda es marcador de peso molecular 100pb axygen.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

7

Título

Amplificación de bandas cortadas de DGGE

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 135 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)**
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

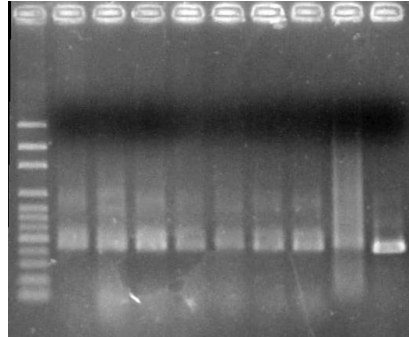
Fecha **Noviembre 2014**

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación


500pb



8. Bibliografía

8.1. http://www.fisherbiotec.com.au/media/axygenbio_nucleotides.pdf

Anexo 8

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	8
		Título Purificación de muestras para secuenciación	Versión Emisión 01 3-nov-14
Gabriela Bravo Ruiseco S. Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Realizado por: Aprobado por:		Fecha Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

1. Objetivo

1.1. Preparar las muestras para el proceso de secuenciación por el método de Sanger.

2. Alcance

2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Tubo de microcentrífuga de 1.5ml
- 4.2. Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System
 - 4.2.1. Mini columnas
 - 4.2.2. Tubos de recolección
 - 4.2.3. Solución de lavado de membrana
 - 4.2.4. Solución de unión a membrana
 - 4.2.5. Agua libre de nucleasas
- 4.3. Puntas para pipeta volumétrica automática de 100-1000µl
- 4.4. Puntas para pipeta volumétrica automática de 20-200µl

5. Equipo

- 5.1. Pipeta volumétrica automática de 100-1000µl
- 5.2. Pipeta volumétrica automática de 20-200µl
- 5.3. Microcentrífuga capaz de operar a 14000rpm

6. Procedimiento

- 6.1. En un tubo de microcentrífuga de 1.5ml hacer un pul de las tres reacciones de PCR de 50µl de cada una de las muestras.
- 6.2. Agregar un volumen igual al de la muestra de solución de unión a membrana (si son 150µl de muestra, agregar 150µl de solución para un volumen final de 300µl).
- 6.3. Colocar una mini columna en un tubo de recolección.
- 6.4. Poner la muestra en la mini columna e incubar por 10 minutos.
- 6.5. Centrifugar por 1 minuto a 14 000rpm.
- 6.6. Descartar el líquido del tubo de recolección y colocar de nuevo la mini columna

Título

Purificación de muestras para secuenciación

Versión
Emisión

01
3-nov-14

Página 138 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha **Noviembre 2014**

Realizado por:

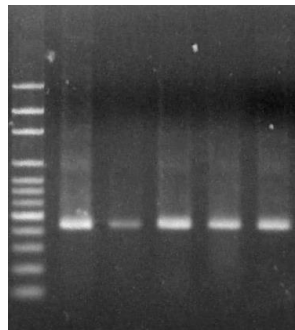
Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.7. Adicionar 700µl de solución de lavado de membrana
- 6.8. Centrifugar por 1 minuto a 14 000rpm.
- 6.9. Descartar el líquido del tubo de recolección y colocar de nuevo la mini columna
- 6.10. Adicionar 500µl de solución de lavado de membrana
- 6.11. Centrifugar por 1 minuto a 14 000rpm.
- 6.12. Descartar el líquido del tubo de recolección y colocar de nuevo
- 6.13. Centrifugar por 2 minutos a 14 000rpm para retirar el líquido restante.
- 6.14. Transferir la mini columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml limpio.
- 6.15. Dejar secar la mini columna temperatura ambiente por 10 minutos para permitir que el etanol se evapore.
- 6.16. Agregar a la membrana 50µl de agua libre de nucleasas y dejar incubar por 10 minutos.
- 6.17. Centrifugar por 1 minuto a 14 000rpm.
- 6.18. Desechar la mini columna.
- 6.19. Realizar un gel de agarosa al 1.5% para la cuantificación del ADN. (ver punto 7.1)
- 6.20. Almacenar el ADN en congelación hasta su secuenciación.

7. Material de apoyo


- 7.1. Gel de agarosa al 1.5% para la cuantificación del producto de PCR purificado. En el pozo de extrema izquierda se muestra el marcador de peso molecular 100pb de Promega.



8. Bibliografía

- 8.1. Technical Bulletin, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Promega Corporation · 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399 USA

Anexo 9

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	9
		Título Entrenamiento para ratones para laberinto de agua de Morris	Versión Emisión 01 3-nov-14
Gabriela Bravo Ruiseco S. Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X)		Fecha Noviembre 2014	
Realizado por:		Aprobado por:	
		Fecha de aprobación	

1. Objetivo

- 1.1. Entrenar a los ratones para realizar la prueba del laberinto de agua de Morris.

2. Alcance

- 2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

- 3.1. Este procedimiento debe ser realizado por personal con conocimiento sobre el manejo y uso de animales de laboratorio
- 3.2. Los animales sujetos a este procedimiento deberán ser manipulados conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.
- 3.3. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata, lentes de seguridad y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Ratones sujetos a la prueba de laberinto de agua de Morris.
- 4.2. Toallas de papel secante.
- 4.3. Bitácora y pluma.
- 4.4. Colorante blanco soluble en agua.

5. Equipo

- 5.1. Laberinto de agua de Morris
- 5.2. Calentadores de agua eléctricos.
- 5.3. Cronometro.

6. Procedimiento

- 6.1. Llenar de agua el laberinto, el agua debe cubrir la plataforma 1cm (32cm de profundidad aproximadamente)
- 6.2. Teñir el agua con el colorante blanco para disimular la plataforma
- 6.3. Calentar el agua a 31°C
- 6.4. Traer a los ratones al área del laberinto y cerrar la puerta para evitar que el ambiente sea contaminado con ruidos, luces u otra interferencia.
- 6.5. Colocar la plataforma en el laberinto.
- 6.6. El entrenamiento se llevará a cabo de la siguiente forma:
 - 6.6.1. Tomar al ratón de su caja



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No. 9

Título
Entrenamiento para ratones para laberinto de agua de Morris

Versión Emisión 01 3-nov-14

Página 141 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.** Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)**
Hugo Ramírez Saad (UAM-X) Fecha: **Noviembre 2014**
Fecha de aprobación


- 6.6.2. Colocarlo en el cuadrante correspondiente del laberinto (Ver punto 7.1)
- 6.6.3. Cronometrar el tiempo que tarda en subir a la plataforma.
 - 6.6.3.1. En caso de no encontrar la plataforma, guiarlo a la misma y mantenerlo en ella 20seg.
 - 6.6.3.2. En caso de que el animal encuentre la plataforma antes de que concluyan los 60 segundos, permitir que el ratón permanezca en la plataforma por 20seg.
- 6.6.4. Retirar al ratón del laberinto y secarlo gentilmente con una toalla de papel.
- 6.6.5. Permitir que descanse por 20seg en una caja con material absorbente.
- 6.6.6. Repetir desde el paso 6.5.1 hasta completar las 4 repeticiones por día.
- 6.7. El entrenamiento se realiza por cinco días antes de la prueba que se considerará para las mediciones finales.
- 6.8. Anotar en la bitácora una tabla similar a la tabla 1 para registrar el tiempo que le toma al animal encontrar la plataforma.
 - 6.8.1. El tiempo se registrará de la siguiente forma: si el animal no encuentra la plataforma se asignará el tiempo máximo (60sec). En caso de que el animal encuentre la plataforma se registrara el tiempo en el que logró la tarea.

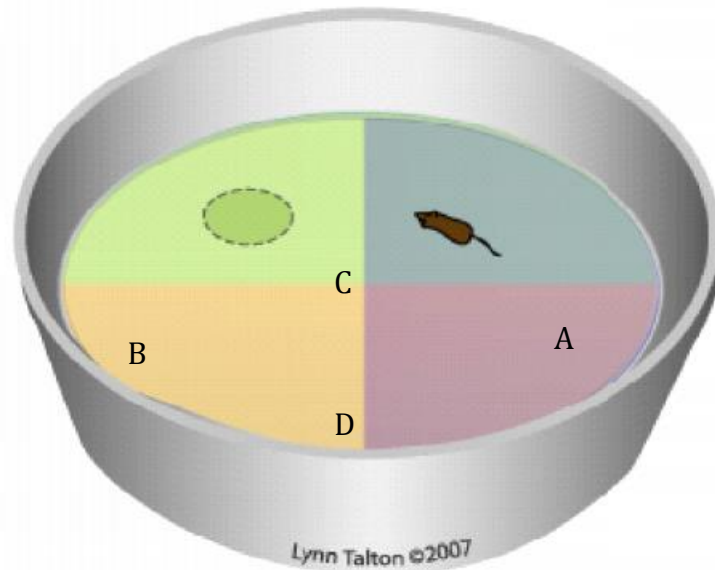
Tabla1: Como registrar el entrenamiento en el laberinto de agua.

Fecha	Día de entrenamiento:				
Animal	Grupo	E1	E2	E3	E4

7. Material de apoyo

- 7.1. Esquema del laberinto de Morris y su uso durante el entrenamiento.
 - 7.1.1. Por día se realizaran 4 entrenamientos
 - 7.1.1.1. En el entrenamiento 1 (E1): el animal se colocará en donde se encuentra la letra A.
 - 7.1.1.2. En el entrenamiento 2 (E2): el animal se colocará en donde se encuentra la letra B.
 - 7.1.1.3. En el entrenamiento 3 (E3): el animal se colocará en donde se encuentra la letra C.
 - 7.1.1.4. En el entrenamiento 4 (E4): el animal se colocará en donde se encuentra la letra D.


 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	9
Título Entrenamiento para ratones para laberinto de agua de Morris	Versión Emisión	01 3-nov-14	
	Página 142 de 197		
Gabriela Bravo Ruiseco S. Realizado por:	Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X) Aprobado por:	Fecha Noviembre 2014 Fecha de aprobación	



8. Bibliografía

- 8.1. Vorhees, C. V. y M. T. Williams (2006). "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory." *Nat. Protocols* 1(2): 848-858

Anexo 10

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	10
		Título Prueba de memoria viso-espacial en laberinto de Morris	Versión Emisión 01 3-nov-14
Gabriela Bravo Ruiseco S. Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Realizado por: Aprobado por:		Fecha Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

1. Objetivo

- 1.1. Obtener información sobre el desempeño de la memoria viso-espacial de los ratones sujetos al estudio de microbiota intestinal

2. Alcance

- 2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

- 3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata, lentes de seguridad y guantes)
- 3.2. Este procedimiento debe ser realizado por personal con conocimiento sobre el manejo y uso de animales de laboratorio
- 3.3. Los animales sujetos a este procedimiento deberán ser manipulados conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

4. Materiales


- 4.1. Ratones sujetos a la prueba de laberinto de agua de Morris.
- 4.2. Toallas de papel secante.
- 4.3. Bitácora y pluma.
Colorante blanco soluble en agua

5. Equipo

- 5.1. Laberinto de agua de Morris
- 5.2. Calentadores de agua eléctricos.
- 5.3. Cronometro.
- 5.4. Cámara de video

6. Procedimiento

- 6.1. Llenar de agua el laberinto, el agua debe cubrir la plataforma 1cm (32cm de profundidad aproximadamente)
- 6.2. Teñir el agua con el colorante blanco para disimular la plataforma
- 6.3. Calentar el agua a 21°C
- 6.4. Colocar la cámara sobre el laberinto para grabar el desempeño de los ratones.
- 6.5. Traer a los ratones al área del laberinto y cerrar la puerta para evitar que el ambiente sea contaminado con ruidos, luces u otra interferencia.

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	10
		Título Prueba de memoria viso-espacial en laberinto de Morris	Versión Emisión 01 3-nov-14
Gabriela Bravo Ruiseco S. Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Realizado por: Aprobado por:		Fecha Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

- 6.6. Antes de colocar el primer ratón en el laberinto accionar la cámara para que comience a registrar el experimento.
- 6.7. Retirar la plataforma en el laberinto.
- 6.8. La prueba se realizara de la siguiente forma:
 - 6.8.1. Tomar al ratón de su caja
 - 6.8.2. Colocarlo en el cuadrante opuesto a la plataforma (ver punto 7.1)
 - 6.8.3. Cronometrar 60 segundos.
 - 6.8.4. Retirar el ratón del laberinto, secarlo gentilmente con una toalla de papel y dejarlo en su caja.
 - 6.8.5. Después de realizar todos los experimentos del día, analizar el video y mediante una tabla similar a la tabla 1 registrar los siguientes datos:
 - 6.8.5.1. Latencia de escape: El tiempo que tarda el ratón en llegar al área donde debería encontrarse la plataforma.
 - 6.8.5.2. Tiempo en el cuadrante blanco: tiempo que pasa el animal nadando en el cuadrante donde debería encontrarse la plataforma
 - 6.8.5.3. Numero de cruces: el número de veces que el animal pasa su cuerpo completo por el área de la plataforma.

Tabla1: Como registrar el desempeño en el laberinto de agua.

Animal	Grupo	Latencia	Tiempo en cuadrante	Cruces

7. Material de apoyo

- 7.1. Esquema del laberinto de Morris y su uso durante la prueba de memoria viso-espacial. Durante la prueba se colocará al ratón en el lugar donde se encuentra la letra A.

Título

Prueba de memoria viso-espacial en laberinto de Morris

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 146 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

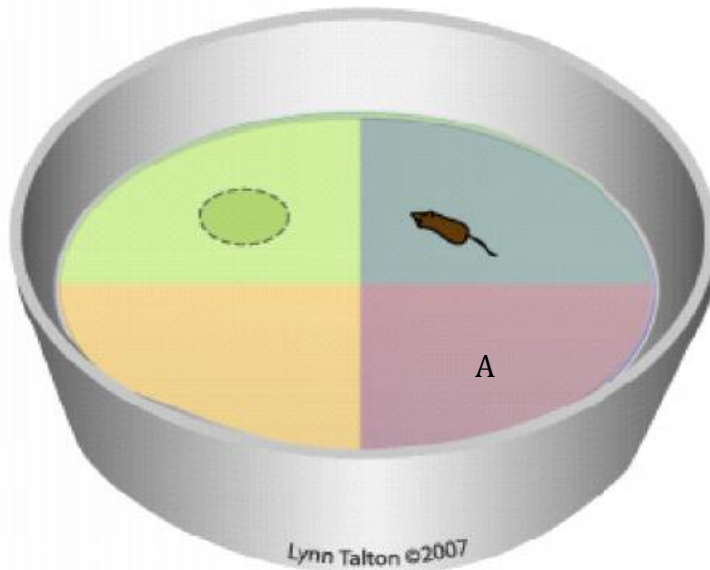
Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)**
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Fecha: **Noviembre 2014**

Realizado por:

Aprobado por:


Fecha de aprobación



8. Bibliografía

8.1. Vorhees, C. V. y M. T. Williams (2006). "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory." *Nat. Protocols* 1(2): 848-858.

Anexo 11

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	11
		Título Genotipificación de ratones 3xTg-AD.	Versión Emisión
Gabriela Bravo Ruiseco S. Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X)		Fecha Noviembre 2014	
Realizado por:		Aprobado por:	
		Fecha de aprobación	

1. Objetivo

1.1. Identificar a los animales transgénicos por la adición de genes humanos.

2. Alcance

2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Tubos de microcentrífuga de 0.2mL
- 4.2. Tubos de microcentrífuga de 1.5mL
- 4.3. Puntas para pipeta volumétrica automática de 100-1000µl estériles.
- 4.4. Puntas para pipeta volumétrica automática de 20-200µl estériles.
- 4.5. Puntas para pipeta volumétrica automática de 1-10µl estériles.
- 4.6. Taq polimerasa Axygen
- 4.7. Buffer para taq polimerasa 10X Axygen
- 4.8. Solución de cloruro de magnesio 25mM Axygen
- 4.9. dNTP's 100mM
- 4.10. Alícuota de 2ml de agua ultrapura estéril
- 4.11. Pool de primers para genotipificación (ver punto 7.1)
- 4.12. Hielo o rack para tubos de 0.2ml frío (4-0°C)
- 4.13.

5. Equipo

- 5.1. Pipeta volumétrica automática de 100-1000µl
- 5.2. Pipeta volumétrica automática de 20-200µl
- 5.3. Pipeta volumétrica automática de 1-10µl
- 5.4. Microcentrífuga con cabezal para tubos de microcentrífuga de 0.2ml
- 5.5. Termociclador punto final
- 5.6. Campana para PCR

6. Procedimiento



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

11

Título

Genotipificación de ratones 3xTg-AD.

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 149 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Fecha Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.1. S Colocar las cajas de puntas, los tubos de microcentrífuga de 0.2ml y las pipetas automáticas dentro de la campana para PCR y prender la luz UV por 15min para sanitizar el material.
- 6.2. Descongelar los reactivos para PCR.
 - 6.2.1. Buffer para taq polimerasa 10X
 - 6.2.2. Solución de cloruro de magnesio 25mM
 - 6.2.3. dNTP's 100mM
 - 6.2.4. Agua ultrapura
 - 6.2.5. Primer 1401r
 - 6.2.6. Primer 968f
 - 6.2.7. Muestras
- 6.3. Mantener las muestras y los reactivos para PCR a una temperatura de 4 a 0°C en todo momento.
- 6.4. Preparación de la mezcla de reacción.
 - 6.4.1. En la tabla 1 se describe la cantidad de reactivos necesaria para una reacción de PCR, es necesario multiplicarla por el total de reacciones a preparar. De la misma forma es necesario agregar 2 reacciones a cada corrida de PCR, una para el control positivo a la que se le agregaran 50ng de DNA genómico de la bacteria *E. coli* y una para el control negativo al que se le agregara 1µl de agua ultrapura .
 - 6.4.2. Adicionar a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml los reactivos para la mezcla de reacción en orden consecutivo.

Tabla 1: Mezcla de reacción para la PCR de la región V6-V8 para DGGE

Reactivo	Concentración final	Cantidad (µl)
Agua ultrapura	N.A.	14.3
Buffer	1X	2.5
Cloruro de magnesio	2mM	2
dNTP's	50mM	1
Pool de primers	1pM	3
Taq polimerasa	1 U	0.2
ADN molde	100ng	1
Volumen final	–	25

- 6.5. Homogeneizar la mezcla de reacción por inversión del tubo.
- 6.6. Centrifugar por 10 segundos a 1000rpm para mover el contenido del tubo al fondo del mismo.



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

11

Título

Genotipificación de ratones 3xTg-AD.

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 150 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha **Noviembre 2014**

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.7. Colocar el total de tubos de microcentrífuga de 0.2ml a usar en una gradilla y adicionar a cada uno 24µl de la mezcla de reacción.
- 6.8. Rotular los tubos para microcentrífuga de 0.2ml.
- 6.9. Colocar 1µl de muestra a cada tubo.
- 6.10. Centrifugar 10 segundos a 1000rpm para mover el contenido del tubo al fondo del mismo.
- 6.11. Colocar en el termociclador y utilizar las condiciones de PCR que se muestra en la tabla 2.
- 6.12. Una vez terminada la PCR, realizar un gel de agarosa al 1.5% para verificar la amplificación de la muestra. (Ver punto 7.2)
- 6.13. Almacenar los amplicones de 4-0°C.

Tabla 2: Condiciones de PCR para obtener los amplicones V6-V8 para DGGE

Paso	Tiempo (min:seg)	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	5:00	94
Desnaturalización	0:30	94
Alineación	0:30	53
Elongación	1:00	72
Elongación final	3:00	72

7. Material de apoyo

7.1. Pool de primers para genotipificación

7.1.1. Mezclar los siguientes primers a concentración 1pM en cantidades iguales.

7.1.1.1. 5taurev

7.1.1.2. APPinternal

7.1.1.3. Thy12.4

7.2. Gel de agarosa al 1.5%

En la imagen se muestra un ejemplo de amplicones de los genes Tau (~350pb) y APP (~500pb), en el carril del centro se presenta el marcador de peso molecular 100pb axygen.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

11

Titulo

Genotipificación de ratones 3xTg-AD.

Versión Emisión

01
3-nov-14

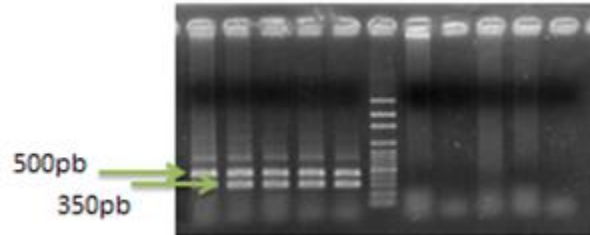
Página 151 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha **Noviembre 2014**

Fecha de aprobación



8. Bibliografía

8.1. http://www.fisherbiotec.com.au/media/axygenbio_nucleotides.pdf

Anexo 12



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

12

Titulo

Perfusión de ratones con paraformaldehido.

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 153 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha **Noviembre 2014**

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

1. Objetivo

- 1.1. Fijar los tejidos para el posterior estudio de las estructuras cerebrales por inmunohistoquímica

2. Alcance

- 2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

- 3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata, lentes de seguridad y guantes)
- 3.2. Este procedimiento debe ser realizado por personal con conocimiento sobre el manejo y uso de animales de laboratorio
- 3.3. Los animales sujetos a este procedimiento deberán ser manipulados conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

4. Materiales


- 4.1. Ratones sujetos a protocolo de estudio de microbiota intestinal de un modelo murino para la enfermedad de Alzheimer
- 4.2. Jeringa de 50mL sin aguja
- 4.3. Manguera de PCV para venoclisis con una aguja de 0.8X40mm.
- 4.4. Solución salina fisiológica (ver punto 7.1)
- 4.5. Solución de fijado (ver punto 7.2)
- 4.6. Agitador magnético.
- 4.7. Material de vidrio para la preparación de soluciones.

5. Equipo

- 5.1.4 Campana de extracción de humos
- 5.2. Plato de agitación y calentamiento
- 5.3. Charola de disección

6. Procedimiento

- 6.1. Una vez que los animales de estudio han sido sujetos al PEO 1: Disección de intestino de ratón para muestra de microbiota intestinal.

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	12
		Título Perfusión de ratones con paraformaldehido.	Versión Emisión 01 3-nov-14
		Página 154 de 197	
Gabriela Bravo Ruiseco S. Realizado por:	Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X) Aprobado por:	Fecha Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

- 6.2. Llevar todo el proceso dentro de la campana de extracción de humos ya que el
- 6.3. Llenar la jeringa con solución salina fisiológica, conectar la manguera a la punta de la jeringa y eliminar el aire de la misma.
- 6.4. Cortar las costillas a ambos lados de la cavidad torácica y levantarlo hacia el rostro del animal para permitir la visualización del corazón.
- 6.5. Colocar la jeringa en el ventrículo derecho del corazón y fijarlo con una pinza como se muestra en la figura 1.



Figura 1: Fijación de la aguja al ventrículo derecho

- 6.6. Cortar la aurícula derecha y comenzar a pasar la solución isotónica a través del cuerpo del animal.
- 6.7. Verificar la coloración del hígado, cuando este se encuentre de color blanquecino está listo para la solución de fijado (esto toma aproximadamente 2 minutos y 20mL de solución salina).
- 6.8. Retirar la jeringa de la manguera y llenarla con solución de fijado.
- 6.9. Acoplar la jeringa nuevamente a la manguera evitando provocar burbujas de aire y comenzar a pasar la solución a través del cuerpo del animal.
- 6.10. Casi inmediatamente se comenzaron a observar temblores en el cuerpo del animal, esta es una señal del correcto fijado de los tejidos.
- 6.11. Pasar 30mL de solución de fijado por el animal
- 6.12. Continuar inmediatamente con el procedimiento PEO 12: Disección de cerebro y almacenamiento.

7. Material de apoyo

- 7.1. Solución salina fisiológica



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

12

Titulo

Perfusión de ratones con paraformaldehido.

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 155 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)**
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Fecha **Noviembre 2014**

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 7.1.1. Solución de hidróxido de sodio al 0.9% en agua destilada
- 7.2. Solución de fijado
 - 7.2.1. Solución A. 40g de paraformaldehíodiluido en 500mL de agua destilada caliente (65°C), agregar 3.2g de hidróxido de sodio y con un gotero agregar una solución de hidróxido de sodio 1M hasta que la solución se aclare.
 - 7.2.2. Solución B: 27.8g de fosfato monobásico de sodio en un litro de agua destilada y 28.4g de fosfato dibásico de sodio en un litro de agua destilada, mezclar 810 mL de la solución monobásica y 190mL de la solución dibásica.
 - 7.2.3. Mezclar a partes iguales la solución A y la solución B.
 - 7.2.4. Esta solución debe ser preparada con no más de 72 horas de anterioridad al procedimiento.

8. Bibliografía

- 8.1. Gage, G. J., Kipke, D. R., Shain, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp.* (65), e3564, doi:10.3791/3564 (2012)

Anexo 13



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

13

Titulo

PEO 12: Disección de cerebro y almacenamiento

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 157 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: **Noviembre 2014**

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

1. Objetivo

1.1. Obtener el tejido cerebral para realizar los cortes histológicos.

2. Alcance

2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Frasco de vidrio de 15mL con tapa (uno por cada muestra)
- 4.2. Tijeras para puntos
- 4.3. Alicates
- 4.4. Buffer de fosfatos 0.2M conteniendo 0.4% formaldehído

5. Equipo

5.1. Refrigerador

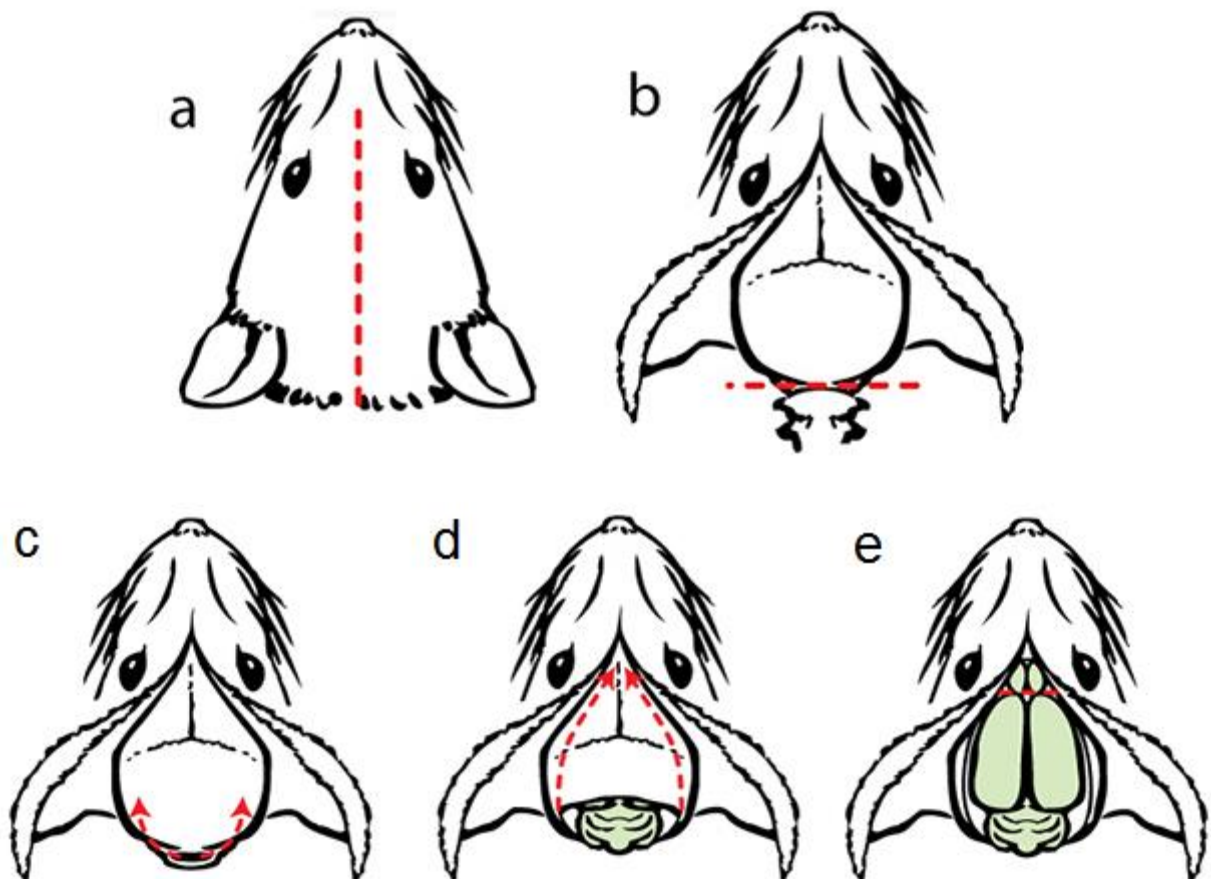
6. Procedimiento


- 6.1. Con los alicates, seccionar la cabeza del cuerpo del animal.
- 6.2. Hacer una incisión en la piel a lo largo de la línea media desde el cuello hasta la nariz y exponer el cráneo. (Ver punto 7.1 A).
- 6.3. Cortar el musculo del cuello restante para que la base del cráneo quede expuesto (Ver punto 7.1 B).
- 6.4. Sostener la cabeza de forma que el foramen magnum (la abertura grande en la superficie del cráneo) sea accesible.
- 6.5. Insertar la punta de las tijeras en el foramen magnum y hacer un corte en el centro.
- 6.6. Con ayuda de los alicates o los dedos romper el cráneo a ambos lados del cerebelo. (Ver punto 7.1 C).
- 6.7. Deslizar cuidadosamente las tijeras a lo largo de la superficie interna del cráneo, levantar la punta para evitar daños en el cerebro, comenzar a remover el cráneo. (Ver punto 7.1 D).

- 6.8. Utilizar la espátula para cortar los bulbos olfatorios y las conexiones nerviosas en la zona anterior de cerebro. (Ver punto 7.1 D).
- 6.9. Verificar que no queden restos de la dura madre que puedan sujetar el cerebro.
- 6.10. Tomar con la espátula el cerebro desde la parte posterior inferior y colocarlo en un frasco de vidrio 10 ml de buffer de fosfatos 0.2M conteniendo 0.4% paraformaldehído
- 6.11. Refrigerar a 4°C por 24h

7. Material de apoyo

7.1. Figura 1: Disección del cerebro de ratón.




 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	13
		Título PEO 12: Disección de cerebro y almacenamiento	Versión Emisión
		Página 159 de 197	
Gabriela Bravo Ruiseco S. Realizado por:	Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X) Aprobado por:	Fecha Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

8. Bibliografía

- 8.1. Gage, G. J., Kipke, D. R., Shain, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp.* (65), e3564, doi:10.3791/3564 (2012)

Anexo 14

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	14
		Título Cortes histológicos de cerebro para la determinación de β -amiloide	Versión Emisión 01 3-nov-14
Gabriela Bravo Ruiseco S. Realizado por:	Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X) Aprobado por:	Fecha Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

1. Objetivo

1.1. Obtener cortes de cerebro de los animales sujetos a los protocolos de la enfermedad de Alzheimer para determinar las agregaciones de β -amiloide.

2. Alcance

2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata y guantes)

4. Materiales


- 4.1. Cerebros disecados y fijados
- 4.2. Portaobjetos
- 4.3. Crio protector (ver punto 7.1)
- 4.4. Compuesto O.C.T.
- 4.5. Moldes de incrustación desechables.
- 4.6. Brochas
- 4.7. Nitrógeno líquido en un contenedor especial

5. Equipo

- 5.1.4 Criotomo
- 5.2. Refrigerador
- 5.3. Ultra congelador

6. Procedimiento

- 6.1. Preparación de la muestra
 - 6.1.1. Retirar el tejido de la solución de para formaldehído y sumergir en 10ml de crio protector.
 - 6.1.2. Refrigerar a 4°C por 24h
 - 6.1.3. Llenar un molde de incrustación con O.C.T.
 - 6.1.4. Retirar el tejido del crio protector y colocar en el molde de incrustación, evitar la incorporación de burbujas.
 - 6.1.5. Marcar el molde y direccionar el tejido dentro del mismo de forma que al fijarlo a la matriz de montaje permita hacer cortes coronales.

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	Procedimiento Estándar de Operación	Procedimiento No.	14
		Título Cortes histológicos de cerebro para la determinación de β -amiloide	Versión Emisión 01 3-nov-14
		Página 162 de 197	
Gabriela Bravo Ruiseco S. Realizado por:	Gustavo Pacheco-López (UAM-L) Hugo Ramírez Saad (UAM-X) Aprobado por:	Fecha Noviembre 2014 Fecha de aprobación	

6.1.6. Congelar rápidamente el molde en nitrógeno líquido para asegurar que la disposición del tejido permanezca como se desea.

6.1.7. Almacenar el molde a -80°C hasta su procesamiento

6.2. Corte del tejido.

6.2.1. Enfriar la escena de montaje del criotomo a -35°C y esperar de 10 a 15 minutos.

6.2.2. Desmoldar el tejido preparado anteriormente y colocar en la escena de montaje.

6.2.3. Colocar una pequeña cantidad de compuesto O.C.T. en la matriz de montaje, aplanar y permitir que se enfríe para formar una plataforma.

6.2.4. Añadir más compuesto O.C.T. a la plataforma para pegar el cubo de tejido preparado y permitir que se congele (5min).

6.2.5. Colocar la matriz en el micrótomos y esperar a que la muestra alcance -15°C (5min).

6.2.6. Comenzar a cortar el bloque de O.C.T. hasta llegar al tejido.

6.2.7. A partir de este momento, realizar cortes de $40\mu\text{m}$.

6.2.8. Verificar cuando el tejido presente características correspondientes a los niveles de corte del 64 al 93 en el atlas de cortes coronales de referencia de Allen para inmunohistoquímica.

6.2.9. Ajustar la placa anti enrollamiento pulsando directamente contra la cara de la cuchilla y ligeramente bajo el margen de la misma.

6.2.10. Rotular una portaobjetos y colocar de 6 a 8 cortes

6.2.11. Dejar el portaobjetos a temperatura ambiente por 30 minutos.

6.2.12. Almacenar a -80°C .

7. Material de apoyo

7.1. Crio protector.

7.1.1. Preparar una solución de sacarosa al 30% en buffer de fosfato 0.1M pH7.2

8. Bibliografía

8.1. Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas [Internet]. Available from: <http://mouse.brain-map.org>.

Anexo 15



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

15

Titulo

Inmunohistoquímica para β -amiloide en cerebro de ratón

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 164 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)**

Fecha: **Noviembre 2014**

Fecha de aprobación

1. Objetivo

1.1. Realizar la inmunohistoquímica para identificar los agregados de β -amiloide en los cerebros de los animales sujetos de estudio.

2. Alcance

2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y personal involucrados en los protocolos para el estudio de la microbiota intestinal del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM Lerma y del Laboratorio de Ecología Molecular en la UAM Xochimilco.

3. Responsabilidades

3.1. Es responsabilidad del personal portar el equipo de seguridad básico para laboratorio (Bata y guantes)

4. Materiales

- 4.1. Portaobjetos con los cortes de cerebro.
- 4.2. Solución de fijado (ver punto 7.1)
- 4.3. Buffer TBS (ver punto 7.2)
- 4.4. Buffer TBS-Tritón 0.1%
- 4.5. Peróxido de hidrogeno al 0.6%
- 4.6. Ácido fórmico 88%
- 4.7. BSA 2% (ver punto 7.3)
- 4.8. Complejo ABC (kit de Diaminobencidina)
- 4.9. Anticuerpo primario: Beta Amyloid, rodent specific monoclonal antibody 1:250
- 4.10. Anticuerpo secundario: Anti mouse IgG del Vectastain ABC Kit 1:250
- 4.11. Diaminobencidina (ver punto 7.4)

5. Equipo

- 5.1. Cámara para inmunohistoquímica
- 5.2. Campana de extracción de humos

6. Procedimiento

- 6.1. Atemperar los portaobjetos a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 6.2. Sumergir los portaobjetos en solución de fijado por 30 minutos.
- 6.3. Realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS.
- 6.4. Secar los portaobjetos (10-20 minutos)
- 6.5. Rehidratar con TBS por 10 minutos.
- 6.6. Adicionar peróxido de hidrogeno por 30 minutos



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

15

Titulo

Inmunohistoquímica para β -amiloide en cerebro de ratón

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 165 de 197

Realizado por: **Gabriela Bravo Ruiseco S.**

Aprobado por: **Gustavo Pacheco-López (UAM-L)**
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Fecha: **Noviembre 2014**

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

- 6.7. Realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS-tritón.
- 6.8. Realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS.
- 6.9. Adicionar ácido fórmico por 5 minutos (dentro de la campana de extracción de humos).
- 6.10. Realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS-tritón.
- 6.11. Realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS.
- 6.12. Bloquear con BSA por 30 minutos.
- 6.13. Incubar anticuerpo primario por 12h.
- 6.14. Realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS-tritón.
- 6.15. Incubar anticuerpo secundario por 2 horas.
- 6.16. Adicionar complejo ABC por dos horas.
- 6.17. Realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS.
- 6.18. Adicionar Diaminobencidina por 5 minutos o hasta obtener el color deseado.
- 6.19. Detener la reacción con agua destilada.
- 6.20. Realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS
- 6.21. Secar toda la noche.
- 6.22. Fijado de portaobjetos
 - 6.22.1. Agregar agua destilada por un minuto
 - 6.22.2. Agregar etanol al 50% por un minuto
 - 6.22.3. Agregar etanol al 70% por un minuto
 - 6.22.4. Agregar etanol al 96% por un minuto
 - 6.22.5. Dejar secar por cinco minutos.
 - 6.22.6. Agregar xilol
 - 6.22.7. Agregar permount y cubrir con cubreobjetos

7. Material de apoyo

- 7.1. Solución de fijado
 - 7.1.1. Solución de paraformaldehído 4% en buffer de fosfatos 0.1M
- 7.2. Buffer TBS
 - 7.2.1. Tris-HCL 50mM, cloruro de sodio 150mM, ajustar a pH 7.5
- 7.3. BSA 2%
 - 7.3.1. Solución al 2% de albúmina sérica bovina en buffer TBS-tritón
- 7.4. Diaminobencidina
 - 7.4.1. 6mg de Diaminobencidina, 750 μ l de ácido clorhídrico 0.1N, 5mL de buffer TBS 2X, 4.2ml de agua destilada, 100 μ l de peróxido de hidrogeno 3%.



Procedimiento Estándar de Operación

Procedimiento No.

15

Titulo

Inmunohistoquímica para β -amiloide en cerebro de ratón

Versión Emisión

01
3-nov-14

Página 166 de 197

Gabriela Bravo Ruiseco S.

Gustavo Pacheco-López (UAM-L)
Hugo Ramírez Saad (UAM-X)

Fecha Noviembre 2014

Realizado por:

Aprobado por:

Fecha de aprobación

8. Bibliografía

- 8.1. <https://vectorlabs.com/data/protocols/SK-4100.pdf>
- 8.2. <http://vectorlabs.com/data/protocols/PK-6200.pdf>

Anexo 16



The microbiota–gut–brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality

Augusto J. Montiel-Castro^{1,2*}, Rina M. González-Cervantes^{2,3}, Gabriela Bravo-Ruiseco² and Gustavo Pacheco-López²

¹ Centro Darwin de Pensamiento Evolucionista and Philosophy Department, Social Sciences and Humanities Division, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

² Health Sciences Department, Biological and Health Sciences Division, Universidad Autónoma Metropolitana Lerma, Lerma, Mexico

³ Biological Systems Department, Biological and Health Sciences Division, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico City, Mexico

Edited by:

Javier Velázquez-Moctezuma,
Universidad Autónoma Metropolitana,
Mexico

Reviewed by:

Toemme Noesselt,
Otto-von-Guericke-University,
Germany
Richard Stevenson, Macquarie
University, Australia

*Correspondence:

Augusto J. Montiel-Castro, Health
Sciences Department, Biological and
Health Sciences Division, Lerma
Campus, Universidad Autónoma
Metropolitana, Av. de las Garzas No.
10, Col. El Panteón Lerma de Villada,
Municipio de Lerma, Estado de
México, C. P. 52005, Mexico
e-mail: a.j.montiel@
centrodarwin-uam.mx

Recent data suggest that the human body is not such a neatly self-sufficient island after all. It is more like a super-complex ecosystem containing trillions of bacteria and other microorganisms that inhabit all our surfaces; skin, mouth, sexual organs, and specially intestines. It has recently become evident that such microbiota, specifically within the gut, can greatly influence many physiological parameters, including cognitive functions, such as learning, memory and decision making processes. Human microbiota is a diverse and dynamic ecosystem, which has evolved in a mutualistic relationship with its host. Ontogenetically, it is vertically inoculated from the mother during birth, established during the first year of life and during lifespan, horizontally transferred among relatives, mates or close community members. This micro-ecosystem serves the host by protecting it against pathogens, metabolizing complex lipids and polysaccharides that otherwise would be inaccessible nutrients, neutralizing drugs and carcinogens, modulating intestinal motility, and making visceral perception possible. It is now evident that the bidirectional signaling between the gastrointestinal tract and the brain, mainly through the vagus nerve, the so called “microbiota–gut–vagus–brain axis,” is vital for maintaining homeostasis and it may be also involved in the etiology of several metabolic and mental dysfunctions/disorders. Here we review evidence on the ability of the gut microbiota to communicate with the brain and thus modulate behavior, and also elaborate on the ethological and cultural strategies of human and non-human primates to select, transfer and eliminate microorganisms for selecting the commensal profile.

Keywords: microbiota–gut–brain axis, neurobiology, psychoneuroimmunology, evolutionary psychology, social bonds, kissing

INTRODUCTION

There is hardly a place on earth without bacteria. They are found in every habitat imaginable: in every leaf in the lush Amazon forests; below scorching deserts’ sands; within the coldest ice of the Antarctica; and even in the inhospitable environment of the ocean depths, under crushing pressures and in streams of boiling water. Not surprisingly, their realm includes the body surfaces and interior of animals, from minute crawlers to those with exceptional cognitive capacities like the human being. Recent genome sequencing projects suggest that most life forms share up to a third of their genes, and that those in humans show up to a 37% homology with those found in Bacteria and Archaea (McFall-Ngai et al., 2013). The sheer quantity of microorganisms inhabiting human bodies is enormous: more than 1000 different species have been found in a single sample (Relman, 2012). Such data have impacted our self-perception; From a viewpoint of the human body as a self-sufficient individual, to a perception of our bodies as super-complex ecosystems. This change of perspective has included a reappraisal of the role of microorganisms within our bodies (i.e., *endosymbionts*). While the popularly-held belief is that any microorganism found within the human body

must have a detrimental effect on its health, emerging research has renewed an emphasis on the fact that many microorganisms have mutually beneficial relationships with their hosts (Archie and Theis, 2011), acting as a *probiotic*: a live microbe with a beneficial effect on the host via modifications of host-associated microbial communities, enhancing the host’s response toward disease, its nutrient-exploitation capacity, or improving its environment (Verschuere et al., 2000). Recent research suggests how *microbiota*, i.e., a microbial community occupying a particular habitat (e.g., the *gut* microbiota), can serve its host by protecting it against pathogens, metabolizing complex lipids and polysaccharides that otherwise would be inaccessible nutrients, neutralizing drugs and carcinogens, modulating intestinal motility, and affecting visceral perception. Across evolution, endosymbionts have established important feedback channels with the central nervous system (CNS), some of which are crucial for maintaining homeostasis. For example, as microbial life was increasingly tolerated across generations of organisms, its presence has shaped the evolution of the immune system (Kelly and Mulder, 2012). The recognition that the gut microbiota influences several signaling pathways led to the suggestion of the concept of a microbiota–gut–brain

(MGB) axis, a topic covered by extensive reviews (Rhee et al., 2009; Cryan and Dinan, 2012; Forsythe et al., 2012). The proposal of a MGB axis suggests that through a dynamic alignment, microbiota inhabiting the intestinal lumen affects its host's CNS activity (including vegetative and cognitive functions), and *vice versa* brain activity impacts microbiota development and composition. Clinical and experimental evidence indicate that this is also the case of human subjects, with such relationship playing a pivotal role in the development of metabolic and mental diseases. According to the World Health Organization, metabolic and mental disorders lead the global burden of disease, urging researchers and clinicians to set research priorities, and to governments, public agencies and private funds to apply urgent actions and investment (Mathers et al., 2008). In this regard, understanding the bidirectional signaling between the microbiota, gut and brain, underlie potential and significant impacts on global health, opening new preventive and therapeutic opportunities. Based on the above, the first section of our work provides an overview of the neurobiology supporting such interactions, focusing on key experimental and clinical data of the MGB axis and its potential impact on relevant metabolic and mental human disorders.

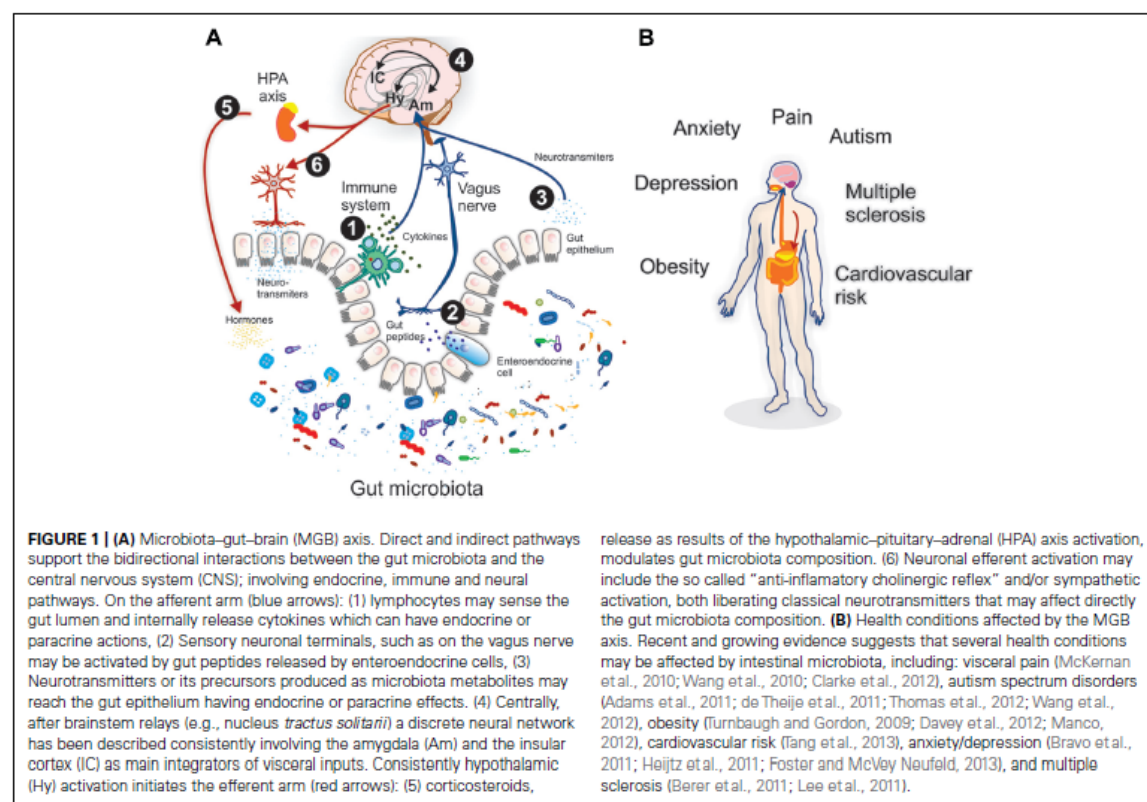
While recent years have witnessed an increasing interest in proximate questions regarding different aspects of microbiota, the coevolutionary interactions of animals and bacteria have been relatively unattended. This, in spite of the possibility that a focus on the evolution of the MGB axis could provide new theoretical frameworks for understanding complex evolutionary relationships involved in mutualisms between hosts and commensal bacteria. This includes the possibility that such mutualisms could influence the evolution of immunological systems, shape higher cognitive functions at the individual level, and work as a selective force promoting socialization and social structures, with an influence on the psychobiological basis of gregariousness, social perception, mate choice, and sexual behavior (Archie and Theis, 2011; Neuberger et al., 2011; Schaller, 2011). Therefore, our review is also aimed at understanding the relationship between the exchange of microbial-life among individuals and sociality. Clear suggestions in this regard have been advanced by Troyer (1984a) and Lombardo (2008). They have championed the hypothesis that social interactions may “tip” the precarious but crucial balance between the costs and benefits of group-living by providing an important but surreptitious benefit in the form of an exchange of mutualistic endosymbiotic microbes (e.g., as a defense against pathogens: Dillon et al., 2005). Thus, the next section, on the relationship between microbial-life and sociality, assumes a comparative viewpoint for evaluating such hypothesis. First, it begins by providing an overview of the evidence of symbioses across different animal taxa. It includes studies that either: (a) focus on the social aspect of endosymbiont-transmission or (b) describe whether an experimental intervention was used to clarify the degree by which the impairment of the vertical or horizontal transmission of endosymbionts may affect an organism's survival and/or reproductive success. Second, we suggest that the premises of Lombardo (2008) and Troyer (1984a) can be tested by means of the hypothesis that *the similarity of microbial communities across individuals is an index of the strength of their social bonds*. In our opinion, testing this hypothesis may add an important analytical

tool to research focused on how social bonds (a social relationship defined by the degree upon which the exchange of any kind of information -or lack of it- has the potential to affect the survival and/or reproductive success of the individuals involved) translate into cooperation and cohesion at the group-level, an approach that could ultimately shed light on the origin and evolution of sociality (Dunbar and Shultz, 2010). We do this via a focus on the association between sociality and direct and indirect means of microbial-transmission in primates, with particular attention to mouth-to-mouth interactions. Finally, by means of an integrative perspective, the last section provides an overview of the different topics covered.

MICROBIOTA–GUT–BRAIN AXIS AND ITS HEALTH IMPACT

Multiple direct and indirect pathways maintain intensive and extensive bidirectional interactions between the gut microbiota and the CNS; involving endocrine, immune and neural pathways (Grenham et al., 2011), and form the basis of the so called MGB axis (Figure 1). For instance, under stress, the brain may influence the composition of the gut microbiota (Bailey and Coe, 1999) via the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis, which regulates cortisol secretion, affecting immune cells activity; both locally in the gut and systemically. When the organism suffers an injury, the first immunological reaction is characterized by redness, pain and heat. These responses are constrained by neuronal regulation of inflammation process, carried out by the HPA axis via catecholamine (Sternberg, 2006) production. The necessary communication processes are based on neurotransmitters, neuropeptides, cytokines, hormones, growth factors (among others), which mediate the relationship between the immune system and the CNS. A feedback process leading to homeostasis (Downing and Miyan, 2000). Yet, disorders like stress (Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005) can impact such equilibrium, leading to disease, allergic reactions, inflammatory disease and predisposition to infection. Additionally, cortisol can alter gut permeability and barrier function, and thus contribute to variations in gut microbiota composition (O'Mahony et al., 2011). *Vice versa*, experimental evidence indicates that the gut microbiota, and pre- and probiotic agents can alter the levels of circulating cytokines, which in turn can have a marked effect on several brain functions (Duerkop et al., 2009; Forsythe and Bienenstock, 2010). Additionally, both the afferent branch of the vagus nerve (Bercik et al., 2011a; Bravo et al., 2011) and modulation of systemic tryptophan, precursor of the neurotransmitter serotonin (Desbonnet et al., 2009), are strongly implicated in relaying the influence of the gut microbiota to the brain.

Experimental approaches on elucidating the MGB axis have so far included, the use of germ-free animals, animals with pathogenic bacterial infections, and animals exposed to probiotic agents or to antibiotics. For instance, germ-free mice have been used to assess neurodevelopmental effects of microbiota loss. Additionally, the administration of probiotic bacteria strains in adult animals or humans has been used to assess the effects of these bacteria on the host. On the other hand, infection studies have been used to assess the effects of pathogenic bacteria on brain and behavior, which are mediated largely through activation of the immune system. Finally, administration of antibiotics can disturb



microbiota composition in a temporally controlled and clinically realistic manner and has therefore been a powerful tool to assess the role of the gut microbiota on behavior.

To date, studies investigating the effects of intestinal microbiota composition on brain function predominantly involve animal models of behavioral disorders such as anxiety, depression and cognitive dysfunction; however, accumulating evidence suggests that the composition of the gut microbiota may also have a role in several other metabolic conditions that involve the CNS (Figure 1). In addition, recent data have revealed that MGB axis has multiple effects on emotions, motivation and other higher and complex cognitive functions; reviewed elsewhere (Mayer, 2011). Such evidence suggests that various forms of subliminal interoceptive inputs from the gut, including those generated by intestinal microbiota, may even influence memory formation, emotional arousal, affective behaviors and decision making processes (Craig, 2002; Berntson et al., 2003). The human insular cortex and related brain networks (including the anterior cingulate cortex, orbitofrontal cortex and amygdala), have emerged as the most plausible brain regions to support this integration (Craig, 2009).

MICROBIAL LIFE AND SOCIALITY

SYMBIOSES ACROSS ANIMAL TAXA

Symbioses have played a substantial role in the development of animal life. In their interaction with the geosphere, they shaped

the ancient biosphere in which multicellularity and animal life emerged (Hickman, 2005). Multicellular organisms may have evolved as new conflict-mediation mechanisms (i.e., genetic codes) restricted lower-level individual fitness, increasing that of new individuals at higher levels of biological organization (Michod, 2003). From such humble beginnings and over extended periods of time, a diverse array of cooperative and organized groups of individuals (i.e., societies), have evolved. Since transmission vectors may originate across both the physical and the social environment, microbial communities found in an organism are dependent on its geocology, physiology, and genotype, but also on the intensity of its social relationships (Archie and Theis, 2011). The following paragraphs provide an overview of selected research describing symbioses between microorganisms and different animal taxa.

Microbial endosymbionts have played an important role in the evolutionary and developmental modification of tissues and organs of several marine or *aquatic invertebrates*, for example in the construction of mineralized exoskeletons (Hickman, 2005). Hickman (2005) points out the example of sponges. This group acquires large symbiotic and diverse bacterial communities through vertical transmission, which perform functions like nutrient acquisition, stabilization of the sponge's skeleton, processing of metabolic waste, and production of important secondary metabolites. The phyla with the largest biomass (e.g., arthropods) are

also those with more symbioses reported (McFall-Ngai, 2005). McFall-Ngai (2005) suggests that a crucial difference between vertebrates and invertebrates is based on the relationship between the immune system and its association with microbial life. On the one hand, invertebrates rely on an “innate immune system” consisting of a germline-encoded receptor system associated to cells like macrophages or epithelia. On the other hand, in addition to the innate immune system, vertebrates possess a “combinatorial” immune response (using T-cells and a major histocompatibility complex) which may have evolved as a more “permissive” form of association with long-term endosymbiont microbial consortia, but also as an improved capacity for distinguishing “friend from foe,” leading to the identification of *specific* pathogens (McFall-Ngai, 2005). However, some recent studies suggest that these differences may be less clear-cut than previously thought. For instance, a study in *Daphnia magna* (an aquatic crustacean), found that, compared to those experimentally challenged with a different strain, individuals exposed to the specific strain of the pathogen to which their mothers had been exposed had better fitness, suggesting that some invertebrates may have some kind of specific adaptive immunity (Little et al., 2003). One of the best examples of a beneficial symbiotic-relationship in an aquatic invertebrate is the case of the mutualism between the squid *Euprymna scolopes* and the luminous, symbiotic bacteria *Vibrio fischeri*. This symbiosis is maintained by means of cyclic transmission, where the bacterial symbionts must be acquired from the environment each generation (McFall-Ngai, 1998). *V. fischeri* is first acquired directly from the environment, but then, the light organ of *E. scolopes* undergoes specific metamorphic changes that maintain the symbiosis (McFall-Ngai, 1994). Such relationship helps *E. scolopes* generating bioluminescence, camouflaging it from both prey and predators by eliminating the projection of its shadow (Ruby and McFall-Ngai, 1992). Finally, a study by Verschuere et al. (2000) suggests that *Artemia* spp. is protected from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* by specific bacterial strains.

Perhaps the best-studied examples of symbioses and transmission of microbiota is found among social insects. The phenomenon received close attention as a model for the study of the origins of sociality, permeating both scientific and popular accounts of the human society during the nineteenth and twentieth centuries (Sleigh, 2002). The niche of the hymenoptera, including a subterranean way of life, large biomass density at the nest, and frequent direct individual contact, can all make them particularly vulnerable to pathogens via a fast-spread of disease among conspecifics (Kaltenpoth and Engl, 2013). Therefore, based on selection at the individual and colony-level, social insects have developed different forms of prophylactic and active responses against some parasite-related costs of social-living, such as: environmental parasite uptake, parasite intrusion (i.e., into a colony), parasite establishment and spread within the colony, and transmission between colonies (Cremer et al., 2007). These responses are referred to as “collective” or “social immunity” by Cremer et al. (2007). Among them is also the possibility for the social-transmission of beneficial microbiota. Recently, Koch and Schmid-Hempel (2011) suggested that both honey and bumble bees present bacterial communities not found among solitary species which, importantly, protect

them against a virulent and naturally occurring parasite (*Crithidia bombi*). In an experimental setting, they demonstrate that in order to observe the protective effect of microbiota, individuals had to be exposed to feces from nest mates after pupal eclosion, providing strong evidence for an important benefit of the transmission of microbiota between individuals. On the other hand, Evans and Lopez (2004) suggest that nonpathogenic bacteria may have a positive effect on honey bee immunity, helping them to survive pathogen-infection across different life-stages. In turn, McFriederick et al. (2012) suggested that beneficial *Lactobacillus* found in bees were acquired by both vertical transmission or by contact with flowers, and that the *Lactobacillus* strains associated to Sweet bees could suppress mold-growth and other spoilage organisms at the nest. Other species of eusocial insects feed each other by regurgitation of liquid secretions originating in the crop or alimentary tract (Wilson, 2000), a phenomenon named *trophallaxis* by Wheeler (1918). In termites, trophallaxis allows for the social transmission of protozoans, which they lose after periodic molting but are crucial for the digestion of cellulose (Wilson, 2000).

Experimental studies focused on the transmission of microbiota have been practiced in a few non-eusocial insects. For example, germ-free desert locusts (*Schistocerca gregaria*) were associated with up to three species of locust gut bacteria and then fed with a pathogen (*Serratia marcescens*) by Dillon et al. (2005). Results of this study showed a negative relationship between the density of *Serratia marcescens* and the number of gut bacterial species present, as well as a negative relationship between bacterial community-diversity and the proportion of locusts harboring *Serratia*. A more recent study (Wang and Aksoy, 2012) investigated the role of *Wigglesworthia glossinidia* as an endosymbiont associated to the nutrition, fecundity, and development of the immune system in Tsetse flies (Diptera: Glossinidae). The study describes how the peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) is found only in adult flies (as an important component of the milk that nourishes developing progeny), and how the experimental reduction of PGRP-LB decreases female fecundity by damaging the transmission of *Wigglesworthia* through induction of an antimicrobial peptide (Attacin). The conclusion of Wang and Aksoy (2012) is that the transmission of PGRP-LB has a major role in the fitness of Tsetse flies by means of protecting such symbiosis.

There are fewer but equally interesting studies on this subject in fishes, amphibians, and reptiles. Coldwater fish appear to acquire their microbiota from the environment after hatching (Hansen and Olafsen, 1999), and there is some indication that different types of probiotic bacteria may have beneficial effects as biological control agents in aquaculture, including immune system improvements (Gómez and Balcázar, 2008) or enhancement of water quality (Verschuere et al., 2000). In the freshwater zebrafish (*Danio rerio*), an experimentally induced lack of microbiota arrests the development of the species' gut at specific points of differentiation, an effect than can, nevertheless, be reversed by the introduction of bacteria (Bates et al., 2006). In the case of amphibians, Walke et al. (2011) found that innate immune defenses with a beneficial effect on the inhibition of the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* can be vertically transmitted. Their work found that both antimicrobial skin peptides

and mutualistic microbiota found in the adult Panamanian “glass-frogs” of the species *Hyalinobatrachium colymbiphellum*, could be transmitted to embryos, with a possible role of different types of physical contact as a means for this transmission, including female-eggs contact during deposition, and/or male urination on the egg-clutch. Another study by Troyer (1984b) focused on the horizontal acquisition of microbiota in reptiles. She investigated how green iguana (*Iguana iguana*) hatchlings employ a significant amount of time in acquiring microbiota before fully exploiting the food resources in their habitat. They do this in a three-step process. First, before having a fully functional digestive activity, they consume soil from within the nest chamber, by which they increase their hindgut microbial populations. Then, up to a week after hatching, they leave the nest and begin eating both plants and soil. Finally, between 2 and 3 weeks after hatching they leave the area around the nest, associate with other conspecifics and eat the feces of older individuals, gaining access to more complex microbial communities.

In comparison, Kohl (2012) presents a thorough review of the many aspects by which microbial communities influence nutrition, development, immunity, and processing of toxins in many species of birds. One interesting aspect observed by Kohl is that the symbiotic relationships between birds and microbiota can be, on some occasions, extraordinarily similar to those found in the relationship between mammals and their endosymbionts, while on other instances, they are just slightly distinguishable, by a few, nevertheless remarkable, aspects. A particularly interesting study (Kyle and Kyle, 1993) described by Lombardo (2008) observed that food-provisioning by itself was insufficient for enhancing the survival of orphan chimney swift nestlings. To achieve this objective, food needed to be coated with the saliva of adults. While all nestlings younger than 6 days receiving food that was not covered by an adult’s saliva died, a high proportion of those that received the saliva-covered food survived.

There is also a vast literature describing the influence of microbiota on a variety of mammals (a portion of it reviewed by Lombardo, 2008). Therefore, as a preface for the following subsection, next we focus solely on aspects of the relationship between kinship, lactation and microbiota in human and non-human primates. Several studies have examined the bacterial microbiota of breast-fed and bottle-fed human infants using both conventional plating and molecular techniques. These studies have shown that the large gut microbiota of breast-fed infants is generally dominated by bifidobacteria and lactic acid bacteria, both considered beneficial (Penders et al., 2006). In contrast, the gut microbiota of formula-fed infants is more diverse, but less stable, often containing more *Bacteroides*, *Clostridium* and *Enterobacteriaceae*. Early start of feeding formula milk changes the composition of the intestinal-microbiota, promoting colonization by obligate anaerobes such as the *Clostridium coccooides* group, the *Clostridium leptum* subgroup, *Prevotella* and *Atopobium* cluster during the 3 months after birth (Tsuji et al., 2012). Human milk is a complex bio-fluid containing mainly lactose, lipids, and protein. However, it is not widely recognized that, after lactose and lipids, oligosaccharides are the third largest solid component of human milk. The majority of this type of sugars is not digestible by human infants, instead, their main function may be related to their interaction or

support of intestinal microbiota. Oligosaccharides in human milk encourage the growth of beneficial bifidobacteria in the colon, while they also bind competitively to cell adhesion receptors. This binding may prevent pathogen-binding to intestinal epithelial cells and thus pathogenesis. Analysis of the oligosaccharides in human milk resulted in 200 different molecules ranging in size from disaccharides up to approximately 22 residues (Ninonuevo et al., 2006). In this sense, through lactation, mothers provide food for both their infants and the bacteria helping assimilating milk’s nutrients, allowing for the continued inoculation and establishment of infant’s microbiota (Hinde and German, 2012). The importance of this “triangled” relationship is highlighted by the seminal work of Bailey and Coe (1999), who observed that due to strong emotional stress, the disruption of the mother-infant bond (i.e., by separation from the mother) in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) altered the composition of infants’ gut microbiota, increasing their vulnerability to disease. The study of Bailey and Coe (1999) represents an important developmental piece of evidence of a health-related cost (i.e., increased vulnerability to disease) observed when the composition of microbiota is altered due to the interruption of microbial-transmission (i.e., by a disruption of the mother-infant bond).

Turnbaugh et al. (2009) found no significant correlations between separation of family members and the degree of similarity between their gut microbiota, as well as no significant differences in the composition of gut microbiota between monozygotic and dizygotic twins, suggesting a likely genetic factor underlying such commonalities. On the other hand, Yatsunenکو et al. (2012), characterized bacterial species in fecal samples from 531 individuals from different nationalities. Groups included healthy children and adults from the Venezuelan Amazonas, rural areas of Malawi and US metropolitan areas, and included mono and dizygotic twins. An effect of kinship on gut microbiota was found across countries, focusing the discussion on how differences in social structures may influence the extent of vertical transmission of the microbiota and the flow of microbes among members of a group of people or family. Importantly, their results showed that the phylogeny of fecal microbiota of monozygotic twins was no more similar than the microbiota of dizygotic twins in all age groups tested. Likewise, there were no significant differences in the degree of similarity between the fecal microbiota of mothers and their teenage offspring, nor between teens and their biological fathers. Moreover, the microbiota of co-habiting couples was more similar to each other than to members of other households (Yatsunenکو et al., 2012). These results, consistent across the populations studied, suggest that, as in other species, endosymbionts may have an important role in kin-recognition in humans.

THE ASSOCIATION BETWEEN MICROBIAL TRANSMISSION AND SOCIAL BONDING IN PRIMATES

In the case of primates, a behaviorally and cognitively complex social life has evolved across a range of group sizes and social structures as a prerequisite for individual’s development, survival, and reproduction (Mitani et al., 2012). Either in the form of predator deterrence (e.g., Zuberbühler et al., 1997), cooperative breeding (e.g., Burkart and van Shaik, 2010) or group hunting (e.g., Watts and Mitani, 2002), primates use group-level cooperative strategies

that in general enhance individual fitness. However, sociality also involves important costs, such as within-group competition for resources (van Schaik and van Noordwijk, 1986) or reduction of reproductive output due to socially induced stress (Dunbar, 1980; Altmann et al., 1988). Thus, a balance between the costs and benefits of social-life is by no means an easy task for primates. By increasing the frequency of contact and proximity between individuals, species living at higher densities, in larger groups, or with promiscuous mating are thought to be the most vulnerable to infection (Altizer et al., 2003). Nonetheless, primates exhibit cohesive and sometimes large groups with strong and long-lasting social bonds (Mitani, 2009) of a kind that, in other animal orders, are almost exclusively found among pair-bonded species (Shultz and Dunbar, 2007). These two observations are somewhat incompatible. However, this apparent paradox could be solved by recognizing the role of partner-choice mechanisms in the structuring of primate societies (Hinde, 1983a). Research suggests that endosymbionts are at the base of different mechanisms for individual recognition and partner selection (Archie and Theis, 2011) underlying social-bonding and the formation of cliques within larger social structures. When partner choice is exerted, not all subjects interact with all other group members, and thus, social bonds (or its absence) may act as a social barrier to pathogen transmission (Loehle, 1995). Hence, if endosymbionts' transmission is of any benefit to sociality, transmission should be facilitated as social bonds between individuals are stronger, and made more difficult as species use more frequent or more complex partner-selection mechanisms. As partner-choice limits the size of each individual's social network (Kudo and Dunbar, 2001), the increasing risk of pathogen transmission associated to large groups may set an upper limit to total group size (Freeland, 1976, 1979; Coté and Poulin, 1995; Bonds et al., 2005), leaving the beneficial link between endosymbionts and complex sociality (*sensu* Lombardo, 2008) intact in the form of bonded relationships. For example, the large social groups of the Hamadryas baboon (*Papio hamadryas*; Schreier and Swedell, 2009), classified as a multi-layered, fission-fusion society (Mitani et al., 2012), is a good example of the way social contact is less intense the larger a social-unit is, providing "borders" to microbial-transmission (Figure 2). Considering the role of social structure as a barrier against parasite transmission may explain why larger but more subdivided groups, tend to slow the spread of infectious diseases (Griffin and Nunn, 2011; Nunn, 2012), and connect the evolution of the MGB axis to primate sociality. This suggests that the *quality* of social relationships between subjects, but not necessarily the size of their social groups, should be associated to more frequent or direct mechanisms underlying endosymbionts' transmission between individuals.

Indirect mechanisms

In indirect mechanisms of microbial transmission, inoculation is somehow mediated (e.g., by either a free-living pathogen, inanimate environmental features or by another infected host species; Cortez and Weitz, 2013). *Coprophagy* and *urine ingestion* are good examples of indirect mechanisms: often considered abnormal behaviors appearing due to stress (e.g., Baker and Easley, 1996; Nash et al., 1999), they promote beneficial

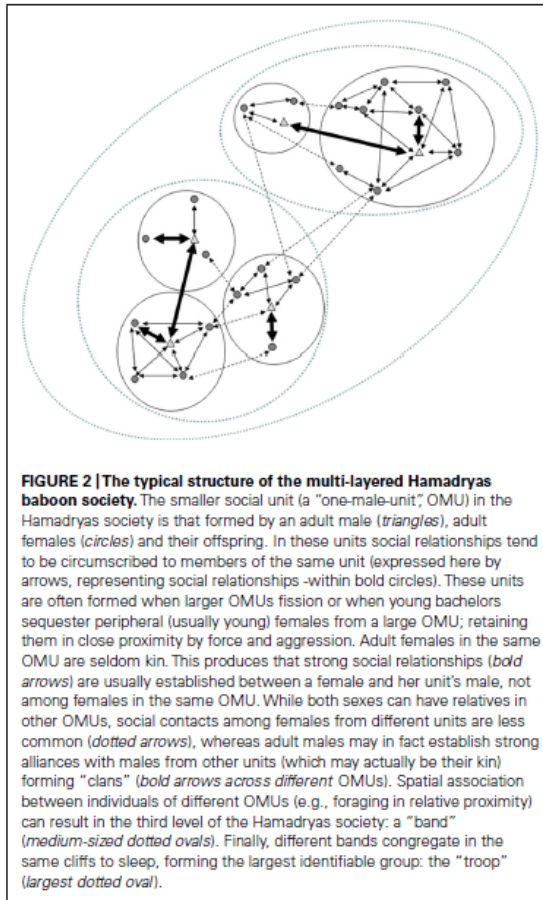


FIGURE 2 | The typical structure of the multi-layered Hamadryas baboon society. The smaller social unit (a "one-male-unit," OMU) in the Hamadryas society is that formed by an adult male (triangles), adult females (circles) and their offspring. In these units social relationships tend to be circumscribed to members of the same unit (expressed here by arrows, representing social relationships -within bold circles). These units are often formed when larger OMUs fission or when young bachelors sequester peripheral (usually young) females from a large OMU; retaining them in close proximity by force and aggression. Adult females in the same OMU are seldom kin. This produces that strong social relationships (bold arrows) are usually established between a female and her unit's male, not among females in the same OMU. While both sexes can have relatives in other OMUs, social contacts among females from different units are less common (dotted arrows), whereas adult males may in fact establish strong alliances with males from other units (which may actually be their kin) forming "clans" (bold arrows across different OMUs). Spatial association between individuals of different OMUs (e.g., foraging in relative proximity) can result in the third level of the Hamadryas society: a "band" (medium-sized dotted ovals). Finally, different bands congregate in the same cliffs to sleep, forming the largest identifiable group: the "troop" (largest dotted oval).

mutualisms required for digestion of plant materials (as in colobus, howler monkeys and gorillas; Milton, 1981; Lambert, 1998; Graczyk and Cranfield, 2003). Even if they exacerbate exposure to parasites, risks can be circumvented by selectively ingesting excretes of relatives while avoiding those of parasitized conspecifics (Lombardo, 2008); two strategies made possible by the widespread individual-recognition capacities of primates (Langergraber, 2012).

Social *traditions* are behaviors maintained and transmitted by social learning that can distinguish between lineages, groups or populations (Avital and Jablonka, 2000). These traditions may represent an important horizontal mechanism for the transfer of microbiota in primates: on the one hand, they can help distinguishing between different chimpanzee communities (Whiten et al., 2001), while on the other, members of contiguous chimpanzee communities can be distinguished based on the contents of their gut microbiota (Degnan et al., 2012). Several social traditions involve the transfer of objects between individuals, such as that observed in *tool-sharing*. For instance, Pruett and Lindshield (2012) describe how female chimpanzees retrieved tools directly

from the mouth of other adults and later used them for their own termite-fishing. In another example, after naïve subjects or infants (both their offspring and other unrelated subjects) approached their tools with their mouths, adult chimpanzees offered them their *previously licked* tools, which were again used and licked (Hirata and Celli, 2003; Hirata, 2006).

Food itself can be another indirect vehicle for microbial transfer. In primates, *food sharing* occurs both among related and non-related individuals (Schaub, 1996; Stevens and Gilby, 2004). However, compared to social insects, food sharing among primates can be a highly selective process of partner choice. In a meta-analysis, Jaeggi and van Schaik (2011) recorded which variables predicted food-sharing among subjects of different primate species. Their results suggested, first, that as greater efforts were required to exploit a particular food-source (i.e., as in tool-use), food sharing between parents and offspring was more common; second, in species with a tendency to share food with infants, sharing between adults was also predicted, although diet-characteristics did not explain food sharing patterns among adults; third, instead, food sharing among *unrelated* adults was predicted by their propensity to exert partner choice, and patterns of *reciprocity* explained interchanges such as “food-for-sex” or “food-for-coalitional-support.” Particularly relevant for our argument is their observation of an indication that, within single-male species, food sharing between sexes was more common in monogamous species.

Direct mechanisms

Direct mechanisms of transmission of microbial life depend on physical contact between conspecifics (Cortez and Weitz, 2013). Among primates, social *grooming* is the most widespread example (Figure 3). During grooming, primates explore their own or other individual’s body surface while removing ectoparasites or debris (e.g., food; Dunbar, 1991), which they often ingest. Primates select their social-partners carefully (Dunbar, 1998). They may exhibit “levels” (Zhou et al., 2005) of acquaintanceship, where those most closely bonded form each other’s immediate “support clique” (Dunbar and Spoons, 1995; Crockford et al., 2008). However, when time available for sociality is scarce or during social instability, they can save social-time by reducing overall sociality, focusing grooming on a few primary partners (Dunbar and Dunbar, 1988; Wittig et al., 2008). Perhaps based on saliva’s healing properties (Gröschl, 2009), different species practice *preening* or *licking* as another form of grooming (Mooring et al., 2004). In primates, this behavior is commonly observed between primate females and their offspring (e.g., apes: Lindburg and Hazell, 1972; *Colobus* sp.: Horwich and Manski, 1975; *Lemur catta*: Nakamichi and Koyama, 2000; *Alouatta palliata*: Duarte-Dias, 2005; *Macaca fuscata*: Turner et al., 2009). While other types of relationship develop through a mutually regulated process of acquaintanceship, as we have described above in detail, the strong bond between primate mothers and their infants is based on important physiological events like lactation (Hinde, 1983b; Figure 3).



FIGURE 3 | Behaviors supporting an association between microbial-transmission and social bonding in primates. The intense sociality of primates provides several different *direct* (i.e., with contact between individuals) and *indirect* (i.e., mediated by any environmental feature) opportunities for the transmission of microbial-life associated to a social-bonding mechanism. Important examples (described in more detail in main text) include: (*upper-left*) mouth-to-mouth contact (in chimpanzees, *Pan troglodytes*): where microbial-life may be directly transmitted in saliva between individuals; (*upper-right*) social grooming (in savannah baboons,

Papio cynocephalus): where groomers may feed on ectoparasites or food-debris, allowing for the transmission of microbiota; (*bottom-right*) lactation (in vervet monkeys, *Chlorocebus aethiops*): where microbiota directly acquired from the mother helps feeding bacterial communities which in turn help offspring assimilating milk’s nutrients; and (*bottom-left*), indirect transmission of microbiota mediated by a social tradition (i.e., touching religious objects), a possible pathway for the homogenization of microbial-life across individuals of a culturally defined human group (all photos by Augusto J. Montiel-Castro).

Mouth-to-mouth interactions

Another means of direct microbial exchange is mouth-to-mouth contact (Figure 3). While this behavior has been reported for many primates (e.g., *Papio anubis*: Bolwig, 1978; *Pan paniscus*: Kuroda, 1980; *Cebus capuchinus*: Manson et al., 1997; *Cebus apella*: de Waal, 2000a; *Pan troglodytes*: Wittig and Boesch, 2003; *Callithrix jacchus*: Kasper et al., 2008; *Homo sapiens*: Hughes et al., 2007; *Pongo abelii*: Hardus et al., 2012), different species perform it at different rates and in different contexts. For instance, the possible relationship between mouth-to-mouth exchange of microbiota and affiliative behavior can also be inferred from the *sociosexual* behavior of bonobos (*Pan paniscus*). Compared to that of common chimpanzees (*Pan troglodytes*) bonobo society is less aggressive, more relaxed or friendlier; sex can be used to repair social relationships, and among bonobos but not chimpanzees, reconciliation often involves sexual contact (Wrangham, 1993). Bonobos can mate several times per day; they manipulate other individuals' genitals with hands or mouth and have more varied forms of copulatory behavior than chimpanzees, including ventro-ventral copulation (i.e., partners facing each other), a sexual position used by bonobo females with their most-trusted partners (Wrangham, 1993). Moreover, bonobos use their tongues intensely (de Waal, 1989), in a way similar to humans, during mouth-to-mouth kissing. Being two concomitant forms of "face-to-face" interaction, ventro-ventral copulation and mouth-to-mouth contacts are particularly relevant for supporting the hypothesis that similarities in the composition of microbiota between individuals could be used as indices of bond-strength. This, given that: (1) they allow for the possibility that facial expression may act as a means for the communication of emotional states (Dobson, 2012), while (2) mutual body-contact can stimulate the production of oxytocin, vasopressin or endorphines: neuropeptide mechanisms underlying social-bonding processes in different species (Young and Wang, 2004; Dunbar, 2010); last but not least, (3) during ventro-ventral contact, mouth-to-mouth kissing can act as a means for the concurrent reciprocal exchange of microbiota between partners. Altogether, the process could provide the basis for the association of conditioned (e.g., mouth-to-mouth contact) and unconditioned stimuli (e.g., production of oxytocin), reinforcing such behavior through associative learning and thus producing a conditioned response (i.e., oxytocin release) even in the absence of copulation.

Kissing: differences across cultures

In humans, mouth-to-mouth kissing is frequently interpreted as the archetypal sign of a strong bond, an index of intimacy and relationship-satisfaction (Gulledge et al., 2003). Eibl-Eibesfeldt (1989, p.138) describes the behavior as follows: "the initiator presses his lips against the partner's and, when the behavior is fully executed, pushes his tongue between the partner's lips, while the recipient opens his lips and (in complete execution) begins suckling." From this archetypal form, some variations can be encountered. While it can be considered a (human) universal sign of affection, there are cultures where, when practiced in public, mouth-to-mouth kissing is considered a taboo (Eibl-Eibesfeldt, 1977). Yet, in the opinion of Eibl-Eibesfeldt (1989), as humans are capable of suppressing innate behaviors, this fact does not

weaken the argument of its universality. Given that Eibl-Eibesfeldt (1975, 1989) offers an illustrative review of the homogeneity of this behavior across traditional cultures, the focus of the following paragraphs is on aspects of its cross-cultural variation.

Mouth-to-mouth kissing is certainly not found across all human cultures, nor it follows the same behavioral sequence where it is recorded (Eibl-Eibesfeldt, 1975). One occurs in some European traditional villages, where young men chew pine-resin and leave some pieces of it protruding from their mouths. Then, with this resin in their teeth, they playfully "dare" the girl of their romantic-interest to approach and try to pick it with their mouths (Eibl-Eibesfeldt, 1975). Another frequent variation is that observed among groups like Amerindians, Polynesians and Japanese, where, instead of a concurrent touching of lips, people smell (Mykytowycz, 1972) one another. Chamberlain (1906) recorded the observations of D'Enjoy (1897), who suggested that European kisses could be distinguished from Mongolian and Malayan ones given that the latter were forms of "sniffs" and "nose-rubbing," respectively. Similar observations on human groups from the arctic regions (i.e., "Eskimos"), have been interpreted as indications that they sniff each other to check their health: not as a sign of affection, but as a preventive gesture against disease (Washburn Hopkins, 1907). Indeed, the term "Eskimo kiss" is still known and used in English, referring to a "touch of noses" but not of lips. Washburn Hopkins (1907) makes an encyclopedic argument with a detailed analysis of ancient Indian literature, based on which he suggests that ancient Indian words for "kissing" were functionally equivalent to those for "smelling," and thus that behaviors were similarly used. Another important source of cultural variation of the behavior revolves around who is, and who is not meant to be kissed. In a contemporary and empirical, cross-cultural study of jealousy, women reported being upset when their partner kissed someone else but not when they danced or hugged others, while men reported greater jealousy when their partners had sexual fantasies about other people, compared to when they hugged or danced with others (Buunk and Hupka, 1987). In a more recent study, significant ethnic differences were found among data on the age at which teenagers of different ethnic groups kissed for the first time. Compared to Asian Americans, more African Americans, Caucasians, and Latino/Hispanic subjects had kissed for the first time at earlier ages (Regan et al., 2004). Another cross-cultural study found no differences in the way Asians, versus American students expressed love: intimate behavior, including kissing, was an indicator of love in marriages but not in friendships (Kline et al., 2008). For Frijhoff (1991), regardless of intense historical and contemporary western influence, and the fact that the gesture is observed in these cultures, Africans and Asians consider the public performance of mouth-to-mouth kissing as disgusting or immoral, relegating it to the sphere of *intimacy*; not because the gesture is absent, but because it is not recognized as a "legitimate public rite." It is in these cultures, Frijhoff (1991) suggests, where greetings commonly involve the use of the "sniff-kiss" or/and a bow of the body, or a hand gesture. Chamberlain (1906) and Frijhoff (1991) also refer to contemporary cultural differences related to the greeting aspect of kissing: common (even among males) in Russia or France (where this gesture's underlying degree of affection may be

indexed by its loudness), but rarer in England, the Netherlands or the USA.

The socio-religious aspect of kissing has been thoroughly analyzed by Frijhoff (1991), who makes interesting conclusions distinguishing the public and private aspects of kissing. On the one hand, he suggests, rituals may have adapted kissing and/or embracing as signals of group-membership, a sign of association and/or fraternity, ruled by cultural standards of public expression that provide a sense of group-identity (e.g., the rite of publicly kissing the feet of the statue of St. Peter in the Vatican, or touching a religious icon: **Figure 3**). On the other hand, Frijhoff (1991) suggests that, in the private sphere, both the experience of a religious person (e.g., when kissing a religious icon), and that of lovers during mouth-to-mouth kissing, appear to separate them from the group, creating a sense of psychological intimacy; a likely reason for why, in some cultures, kissing (i.e., mouth-to-mouth) in public is not considered polite.

Kissing: evolutionary perspective

In view of the previous analysis, it is somewhat surprising that while kissing is found across several cultures and is a topic of strong popular concern (Walter, 2008), its evolution is not yet fully understood. Hypotheses have certainly been suggested. For example, kissing is one of the many different behaviors observed during reconciliation in non-human primates (de Waal, 1989) suggesting its role as a means for appeasement. However, in spite of substantial evidence highlighting the role of kissing in the context of reconciliation (de Waal, 1989, 2000b), one could ask: if grooming can itself produce intrinsic positive reinforcement (i.e., beta-endorphins) in a primate's nervous system (Keverne et al., 1989), why would an additional behavior, one increasing the probability of pathogen-transmission, be used during reconciliation? This is an important consideration. Mouth-to-mouth contact and direct exchange of saliva expose individuals to pathogen transmission. In view of this probable cost and its role as an index of reconciliatory tendencies, one would expect it to provide some intrinsic benefit (Hendrie and Brewer, 2010) and to be a highly selective form of inter-individual interaction. Comparative evidence of mouth-to-mouth feeding in parent-offspring dyads across birds and mammals suggests that kissing could evolve as a form of mouth-to-mouth food exchange between offspring and progenitors (Eibl-Eibesfeldt, 1975). However, common marmosets (*Callithrix jacchus*: a new world monkey that exchanges food often) do not restrict these interactions to mating partners or offspring, and tolerate mouth-to-mouth exchanges with both dominants and subordinates (Kasper et al., 2008). Instead, since tolerating or rejecting a stressful event such as the transgression of personal space may provide information about the quality of a relationship, Kasper et al. (2008) suggest that these “up-close” exchanges may serve as tests of the quality of a relationship. For Nicholson (1984), kissing involves some form of social-bonding by means of semiochemical addiction: a direct and continued exchange of sebum and pheromones facilitating bonding and love. The possibility that chemo-signals have a role in communication, via body-secretions has been recently confirmed in humans by de Groot et al. (2012), observing that chemo-signals of fear and disgust can produce multimodal emotional synchronization between sender and receiver, and thus, that

communication of emotional states is not restricted to language and visual stimuli. However, results showing that women prefer the scent of males' t-shirts with whom they have greater immunological dissimilarity (Wedekind et al., 1995), highlight the role of smell (Penn and Potts, 1998) as an alternative route for the development of a purported semiochemical-addiction.

The research of Hughes et al. (2007) on the relationship between pair bonding strategies and kissing in humans, points out other important aspects of this behavior. While men may use kissing for increasing the likelihood of sexual intercourse, women use it as a form of mate-assessment and a behavioral-monitor of the quality of long-term relationships (Hughes et al., 2007). This affiliative aspect of kissing may also be interpreted as a willingness to sustain close social bonds *at the risk of contracting an illness* (Hughes et al., 2007). Therefore, kissing has also been suggested as a strategy aimed at avoiding contagion by pathogens such as the human cytomegalovirus during infant's gestation, for which testing for such possibility before conception or before the onset of vulnerable periods of fetal development would be highly advantageous (Hendrie and Brewer, 2010). Moreover, since couples sharing previously used, food-related items “contaminated” by their partner (e.g., a licked spoon) are perceived as “more intimate” by third-parties (Alley, 2012), kissing may also function as a group-oriented “advert” or proxy of the strength of the bond between two individuals.

FINAL COMMENTS: INTEGRATIVE PERSPECTIVES

THE MICROBIOTA–GUT–BRAIN AXIS AND ITS IMPACT ON HEALTH

The excitement of emotion, the state of alertness and enhanced activation linking the viscera, in particular heart and gut, to the human mind, as well as the mechanisms for bidirectional signaling between these organs, was among the topics by which Charles Darwin himself advocated evolutionary continuity in *The Expression of Emotions in Man and Animals* (Darwin, 1872). With similar intentions, the present review has suggested how mutualistic endosymbionts may have a crucial role in these processes. Thus, the first integrating ideas emerging from our review are focused on the relevance of the different communication channels between the gut microbiota and the brain. For instance, the crucial relationship described in sections above, that between microbiota, cytokines, short-chain fatty acids, systemic tryptophan and their effect on brain function, signals interesting possibilities for fruitful research. For example, the recognition of the role of microbiota in the modulation of tryptophan and thus serotonin, could complement insights on the social and evolutionary basis of schizophrenia (Burns, 2004), while other fertile approaches should focus on the importance of probiotics as modifiers of health, behavior and mood. Such attempts should provide alternatives in clinical settings, and preventive aspects of some of the most prevalent mental and metabolic disorders of modern human societies, such as depression and obesity.

The reports on the role of gut microbiota as an influence in the formation of memories and emotional arousal suggest the existence of a crucial relationship between interoceptive stimuli and the evolution of higher cognitive processes, one that may be based on a system supporting *empathy*, or a capacity for understanding the feelings of other individuals. On the one hand, results

showing how the anterior insular cortex can be activated by the images of other humans experiencing disgust (Wicker et al., 2003) suggest the action of a mechanism homologous to *mirror neurons* (Gallese, 1998). These neurons, first located in the ventral premotor cortex of macaque brains, activate both when subjects perform a particular action and when they observe similar actions performed by other individuals (Rizzolatti and Fogassi, 2007). Mirror neurons may be crucial for understanding the underlying intentions of actions, which has led some to suggest that they are part of the system upon which empathy is constructed (Ferrari et al., 2003). On the other hand, evidence suggests that another kind of cells, “*Von Economo*” neurons or “spindle cells” in layer five of the anterior cingulate cortex are particularly involved in processes of self-experience, empathy and social bonding (Parr et al., 2005). For Parr et al. (2005), there are at least two important characteristics suggesting the role of such neurons as a neurological basis of sociality. First, these cells have been identified in humans and apes but not in monkeys, suggesting a recent evolutionary origin associated to higher cognition; second, since they seem to be reduced and abnormally located in autistic individuals, they may underlie the lack of empathy characterizing autism. Finally, such system of representation of emotions of others, may be complemented by the action of the vagus (i.e., the “pneumogastric” nerve, according to Darwin, 1872), as a means for activating responses and control of the metabolic output necessary for social interaction. In this regard, the Polyvagal theory (Porges, 2003) suggests that the myelinated branch of the vagus, found only in mammals, is a key for understanding the non-endocrine bases of social behavior. Given that this branch of the parasympathetic system controls facial expression, swallowing, breathing and vocalizing, and has an inhibitory effect upon the sympathetic system innervating the heart, it promotes the calmness and autonomic substrate of effective social interaction (Porges, 1997). Nonetheless, several details regarding such a system remain to be determined. For example, whether intuitive decision making is based on an interoceptive map of gut responses enabling the brain to make gut-based decisions based on interoceptive stimuli (Preusschoff et al., 2008).

MICROBIAL LIFE AND SOCIALITY

Lombardo (2008) has provided suggestions as to how to distinguish between the transmission of microorganisms as a causal benefit of social interactions versus a mere correlate, byproduct or cost of sociality. His first suggestion, primarily revised in the first section of this review, involves using antibiotics to modify microbial communities in an organism and then observing the effects of such intervention. Evidence across our review suggests that type of interventions can result in significant fitness effects in the experimental subjects. The second set of tests suggested by Lombardo (2008) are those impairing group-living individuals from horizontal transmission of microbial life but not from social contact. He suggests that by means of such intervention we would gain knowledge on how hosts may fail to thrive, not because of lack of social contact *per se*, but because of the impairment of endosymbiont-acquisition from conspecifics. In this sense, our review of the variety of symbioses found across different animal taxa was aimed at providing evidence describing the varied benefits due to such

symbioses, and thus suggesting how an interruption of either vertical or horizontal transmission of microbial life could result in significant costs in terms of fitness. Then, based on evidence supporting the idea that “social immunity” is found among several animal taxa, the relationship between intense sociality and the exchange of microbiota was approached by examining the association between direct and indirect patterns of transmission of microbial-life and the intensity of social-partner selection in primates. For this purpose, we suggest that the hypothesis that more similar microbial communities would be found among subjects with stronger social bonds could be used for testing whether primates also obtain benefits associated to microbial transmission. Ultimately, as Dunbar and Shultz (2010) suggest, adding another operational index of sociality to previous, more orthodox, measures of bondedness (e.g., grooming or inter-individual distances), could help expanding our understanding of the evolution social complexity. Thus, we argue that, if endosymbionts’ transmission is of any benefit to primate sociality, direct transmission of microbial life should be associated to stronger social bonds, but not to large group sizes. Such possibility, we suggest, allows for the beneficial exchange of endosymbionts across individuals, while at the same time, permits the necessary partner-choice mechanisms (associated to social-bonding processes) restricting group-size, leading to the formation of social-borders which limit the extent of microbial transmission. Indeed, research on primates suggests that greater modularity or greater structuring of social groups reduces parasite success (Griffin and Nunn, 2011). Moreover, indirect mechanisms of transmission allow subjects to exert at least three strategies for selection of the microbial load transmitted: first, one focused on the conditions or characteristics of the objects exchanged (i.e., the spoilage of food) allows subjects to decide whether a particular item deserves further processing or not (Laska et al., 2007); second, subjects may directly assess the phenotypical-characteristics of the interacting subjects, deciding whether to engage in social interaction or not. For example, by stressing immigrants in order to “test” whether they carry pathogens before allowing their full integration into a group (Freeland, 1976); third, certain species may apply *a posteriori* mechanisms for the elimination of pathogens like zoopharmacognosy (Huffman, 1997). In contrast, direct interaction restricts those mechanisms to the second and third strategies. Hence, individuals with stronger social bonds incur greater risks when interacting with their close associates compared to cases when they interact with “mere acquaintances,” likely leading to an easier transmission of microbial life among strongly bonded subjects. In this sense, another suggestion stated above was that the transmission of microbial life would be increasingly difficult as primates would employ more complex partner selection mechanisms. From this perspective, since the Social Brain Hypothesis (Dunbar, 1998) is focused on the evolution of both sociality and primate neocortex by means of intense partner-selection due to increasing cognitive capacities, we can relate this hypothesis to the ideas of both Troyer (1984a) and Lombardo (2008) and hypothesize that, in primates: (i) other measures of the strength of social bonds will be positively correlated to the similarity of microbial species shared by members of a social group or reproductive pair; (ii) the number of microbial species shared by any two members of a social group will be positively correlated to that species relative

neocortex size; (iii) the number of microbial species common to any two members of a social group and group size will be negatively correlated.

A particular point of concern emerging from this section is the apparent opposition of reports describing the relationship between microbiota and kinship in humans and apes. While both genetically and socially related humans show similar compositions of their gut microbiota (Degnan et al., 2012), the chimpanzees of Gombe showed similarities within sexes, as well as between members of different communities but not between individuals of the same community. This is remarkable, especially when taking into account evidence suggesting that primate females transmit necessary microbiota to their offspring. Such opposing results could imply that, while similarities in microbiota could be a useful index of the strength of social bonds for humans, the index would not be an adequate measure of prosocial tendencies in chimpanzees. In turn, this possibility would reduce the usefulness of the similarity of gut microbiota as a comparative index for examining the strength of social bonds in other species. However, these variations may be explained by pointing out important differences between the social behavior of apes and humans. Despite the fact that the social system of both chimpanzees and humans has been characterized as *fission-fusion* (Aureli et al., 2008), just like the slight differences observed between the socio-sexual behavior of *Pan troglodytes* and *Pan paniscus*, there are also important differences in the kind and degree of direct social contact observed among *Homo sapiens* and *Pan troglodytes*. The fission-fusion pattern of chimpanzee societies is substantially more fluid than that of humans: chimpanzee individuals within the same community can be alternatively found interacting within groups composed by different subjects at different points in time and in different locations (Aureli et al., 2008), whereas in humans, as bonds are stronger, they are generally more spatially, and socially stable. This observation, could explain why, compared to humans, most members of a chimpanzee community would show a similar composition of their gut microbiota (i.e., based on an incapacity to detect differences between its strongly interacting composing members). The second aspect of the discrepancy may be based on the fact that, while males remain within the same community, forming and strengthening their bonds with other relatives, females migrate between communities (Robinson and Janson, 1987).

Interesting lines of research relating social structure and composition of microbiota could develop from comparisons between the degree of similarity in the microbiota of humans (grouped, e.g., by pattern of social organization), and different non-human primate species (e.g., across different reproductive systems). If more frequent and direct contact promotes greater similarities in the composition of microbiota between individuals, we would expect that the most heavily bonded species (e.g., pair-bonded species), would show greater similarity to humans with stronger social bonds (e.g., couples), followed by the results of non-human primates across distinct reproductive patterns and humans in different types of groups. In this regard, Fincher et al. (2008), provide an important study suggesting an association between human group-level cohesion and pathogenicity. In this study, even after controlling for other confounding variables, human groups with

a higher historical pathogen prevalence were also those with the strongest evidence of collectivism-prone *cultural* values, whereas those with a lower historical pathogen prevalence showed stronger cultural values supporting individualism. Therefore, we suggest that in the context of our proposal, this study provides strong evidence suggesting that, in humans, the more cohesive groups (e.g., indexed by more frequent cultural values favoring collectivism, and thus stronger social bonds between subjects) will show stronger similarities in the microbial communities of their individual members.

MOUTH-TO-MOUTH INTERACTIONS

Costly Signaling theory suggests that a possible function of seemingly “pointless” behaviors or traits, may be the conveyance of honest information that can benefit different interactants; both signifiers and observers (Smith and Bird, 2005). In this context, direct means of microbial transmission have higher probabilities of involving potentially costly behaviors that could, nevertheless, provide valuable information to interactants, for example, in the case of mouth-to-mouth kissing (Hughes et al., 2007). In turn, these considerations suggest that the above accounts of the possible function of kissing may be reduced to a single one, in the form of kissing as a social signal or a means of communication. Here, communication may be defined as an action that alters the probability pattern of the behavior of another organism in a way adaptive to either one or both interactants (Wilson, 2000). Thus, either in the form of reconciliation, as a derivative of food sharing, and as a test of the quality of a relationship, kissing can be interpreted as a behavioral signal aimed at increasing the probability of future cooperation. In turn, in the case of the exchange of microbiota via mouth-to-mouth contact, or as a test for the risk of illness, kissing would represent an exchange of potentially costly information (*sensu* Smith and Bird, 2005), again, relating it to communication. The behavior may also be used by group members as an index of the strength of the relationship between two individuals: a group-oriented signal based upon which they can adjust their responses toward the individuals performing it. In the end, perhaps only cross-cultural research investigating the effects of kiss frequency relative to the composition of gut microbiota (to the best of our knowledge, not yet attempted), could bring significant light unto the matter. A comparative approach could focus in the sociosexual behavior of *Pan paniscus*, testing whether partners more often engaged in ventro-ventral copulation, mouth-to-mouth contact, and/or face-to-face interactions, compared to those engaging in other kinds of affiliative behavior, show greater similarities in their gut microbiota.

We cannot be blind to another alternative that may, nevertheless, still lend support to the hypothesis of an association between similar microbial communities and strong social bonds between individuals. Its main distinction lying in the suggestion that sociality does not represent the primary “medium” through which microbial communities across individuals are transmitted or homogenized. From this perspective, instead, given the beneficial effect of focused social contact upon glucocorticoid production (Crockford et al., 2008; Wittig et al., 2008), close social interaction will have a reducing effect on glucocorticoid production, which in turn will improve individual’s capacity for sustaining an effective

immune response. That “improved” resistance (e.g., byproduct of intense social support), would allow subjects to remain in close proximity without turning increasingly susceptible to the pathogens transmitted by the social-partner. Again, this possibility would still result in similarities in the microbial communities of closely bonded individuals. Further research should be focused into determining the effects of impairing microbial transmission between subjects while still allowing normal social interactions. For example, this suggestion could be approached by creating social groups where all but one of its members are kept under germ-free conditions by means of antibiotics and then evaluating the survival and reproductive success of the “non-germ free” individuals across groups. While such research design may be difficult, ethically and pragmatically, it could provide a way of discriminating between the alternatives at hand.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Augusto J. Montiel-Castro, conceived the main premises and relationships that are the focus of this review; wrote the largest portion of the paper; identified the theoretical relevance of the paper; edited the final version of the paper; designed Figures 2 and 3. Rina M. González-Cervantes, conceived some of the relationships that are discussed in the review; helped in the theoretical analysis

of the premises of the review; wrote one important subsection of the paper; Gabriela Bravo-Ruiseco, wrote specific portions of the review; helped in the suggestion of specific relationships reviewed. Gustavo Pacheco-López, conceived the main premises and relationships that are the focus of this review; identified the theoretical relevance of the paper; designed the structure of the paper; wrote a large portion of the paper; edited the final version of the paper; designed Figure 1.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was possible thanks to a postdoctoral scholarship, granted to Augusto J. Montiel-Castro by Iztapalapa Campus, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I). Gustavo Pacheco-López was funded by a SEP-PROMEP grant No. 54510017 and by a Lerma Campus, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-L) institutional funding for publication. Authors would also like to thank the Centro Darwin de Pensamiento Evolucionista (CEDAR) for the support and efforts during the organization of the series of conferences and seminars between UAM-I and UAM-L that made this work possible. The suggestions of referees resulted in substantial improvements in the contents and clarity of the final version.

REFERENCES

- Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D., and Rubin, R. A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism – comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* 11:22. doi: 10.1186/1471-230X-11-22
- Alley, T. R. (2012). Contaminated and uncontaminated feeding influence perceived intimacy in mixed-sex dyads. *Appetite* 58, 1041–1045. doi: 10.1016/j.appet.2012.02.049
- Altizer, S., Nunn, C. L., Thrall, P. H., Gittleman, J. L., Antonovics, J., Cunningham, A. A., et al. (2003). Social organization and parasite risk in mammals: integrating theory and empirical studies. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34, 517–547. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.030102.151725
- Altmann, J., Altmann, S., and Hausfater, G. (1988). “Determinants of reproductive success in Savannah baboons (*Papio cynocephalus*),” in *Reproductive Success*, ed. T. H. Clutton-Brock (Chicago: University of Chicago Press), 403–418.
- Archie, E. A., and Theis, K. R. (2011). Animal behavior meets microbial ecology. *Anim. Behav.* 82, 425–436. doi: 10.1016/j.anbehav.2011.05.029
- Aureli, F., Schaffner, C. M., Boesch, C., Bearder, S. K., Call, J., Chapman, C. A., et al. (2008). Fission-fusion dynamics. *Curr. Anthropol.* 49, 627–654. doi: 10.1086/586708
- Avital, E., and Jablonka, E. (2000). *Animal Traditions. Behavioral Inheritance in Evolution*. New York: Cambridge University Press.
- Bailey, M. T., and Coe, C. L. (1999). Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Dev. Psychobiol.* 35, 146–155. doi: 10.1002/(SICI)1098-2302(199909)35:2<146::AID-DEV7>3.0.CO;2-G
- Baker, K. C., and Easley, S. P. (1996). An analysis of regurgitation and reingestion in captive chimpanzees. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 49, 403–415. doi: 10.1016/0168-1591(96)01061-1
- Bates, J. M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K. N., Cheesman, S. E., and Guillemin, K. (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev. Biol.* 297, 374–386. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.05.006
- Bercik, P., Park, A. J., Sinclair D. Khoshdel, A., Lu J. Huang, X., Deng, Y., Belnerhasset, P. A., et al. (2011a). The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, 1132–1139. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x
- Berer, K., Mues, M., Koutrosos, M., Al Rasbi, Z., Boziki, M., Johner, C., et al. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479, 538–541. doi: 10.1038/nature10554
- Bernton, G. G., Sarter, M., and Cacioppo, J. T. (2003). Ascending visceral regulation of cortical affective information processing. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2103–2109. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02967.x
- Bolwig, N. (1978). Communicative signals and social behaviour of some African monkeys: a comparative study. *Brain* 101, 61–99. doi: 10.1093/brain/101.1.61
- Bonds, M. H., Keenan, D. C., Leidner, A. J., and Rohani, P. (2005). Higher disease prevalence can induce greater sociality: a game theoretic coevolutionary model. *Evolution* 59, 1859–1866. doi: 10.1111/j.0014-3820.2005.tb01056.x
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., et al. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16050–16055. doi: 10.1073/pnas.1102999108
- Buunk, B., and Hupka, R. B. (1987). Cross-cultural differences in the elicitation of sexual jealousy. *J. Sex. Res.* 23, 12–22. doi: 10.1080/00224498709551338
- Burkart, M. J., and van Shaik, C. P. (2010). Cognitive consequences of cooperative breeding in primates? *Anim. Cogn.* 13, 1–19. doi: 10.1007/s10071-009-0263-7
- Burns, J. K. (2004). An evolutionary theory of schizophrenia: cortical connectivity, metarepresentation, and the social brain. *Behav. Brain Sci.* 27, 831–854. doi: 10.1017/S0140525X04000196
- Chamberlain, A. F. (1906). Variation in early human culture. *J. Am. Folk* 19, 177–190. doi: 10.2307/534565
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, E., et al. (2012). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatry* 18, 666–673. doi: 10.1038/mp.2012.77
- Cortez, M. H., and Weitz, J. S. (2013). Distinguishing between indirect and direct modes of transmission using epidemiological time series. *Am. Nat.* 181, E43–E52. doi: 10.1086/668826
- Coté, I. M., and Poulin, R. (1995). Parasitism and group size in social animals: a meta-analysis. *Behav. Ecol.* 6, 159–165. doi: 10.1093/beheco/6.2.159
- Craig, A. D. (2002). How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 655–666. doi: 10.1038/nrn894
- Craig, A. D. (2009). A rat is not a monkey is not a human: comment on Mogil (Nature Rev. Neurosci. 10,

- 283–294 (2009)). *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 466–466. doi: 10.1038/nrn2606-c1
- Cremer, S., Armitage, S. A., and Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Curr. Biol.* 17, R693–R702. doi: 10.1016/j.cub.2007.06.008
- Crockford, C., Wittig, R. M., Whitten, P. L., Seyfarth, R. M., and Cheney, D. L. (2008). Social stressors and coping mechanisms in wild female baboons (*Papio hamadryas ursinus*). *Horm. Behav.* 53, 254–265. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.10.007
- Cryan, J. F., and Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 701–712. doi: 10.1038/nrn3346
- Darwin, C. (1872). *The Expression of Emotions in Man and Animals*. London: John Murray. doi: 10.1037/1001-000
- Davey, K. J., O'Mahony, S. M., Schellekens, H., O'Sullivan, O., Bienenstock, J., Cotter, P. D., et al. (2012). Gender-dependent consequences of chronic olanzapine in the rat: effects on body weight, inflammatory, metabolic and microbiota parameters. *Psychopharmacology* 221, 155–169. doi: 10.1007/s00213-011-2555-2
- Degnan, P. H., Pusey, A. E., Lonsdorf, E. V., Goodall, J., Wroblewski, E. E., Wilson, M. L., et al. (2012). Factors associated with the diversification of the gut microbial communities within chimpanzees from Gombe National Park. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 13034–13039. doi: 10.1073/pnas.1110994109
- de Groot, J. H. B., Smeets, M. A. M., Kaldewaij, A., Duijndam, M. J. A., and Semin, G. R. (2012). Chemosignals communicate human motions. *Psychol. Sci.* 23, 1417–1424. doi: 10.1177/0956797612445317
- D'Enjoy, P. (1897). *Le baiser en Europe et en Chine*. Paris: Bulletin de la Société d'Anthropologie, 181–185. doi: 10.3406/bmsap.1897.5692
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., and Dinan, T. G. (2009). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J. Psychiatr. Res.* 43, 164–174. doi: 10.1016/j.jpsychires.2008.03.009
- de Theije, C. G., Wu, J., da Silva, S. L., Kamphuis, P. J., Garssen, J., Korte, S. M., et al. (2011). Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur. J. Pharmacol.* 668, S70–S80. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.07.013
- de Waal, F. B. M. (1989). *Peacemaking Among Primates*. USA: Harvard University Press.
- de Waal, F. B. M. (2000a). Attitudinal reciprocity in food sharing among brown capuchin monkeys. *Anim. Behav.* 60, 253–261. doi: 10.1006/anbe.2000.1471
- de Waal, F. B. M. (2000b). Primates a natural heritage of conflict resolution. *Science* 289, 586–590. doi: 10.1126/science.289.5479.586
- Dillon, R. J., Vennard, C. T., Buckling, A., and Charnley, A. K. (2005). Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett.* 8, 1291–1298. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00828.x
- Dobson, S. (2012). Face to face with the social brain. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 1901–1908. doi: 10.1098/rstb.2011.0224
- Downing, J. E., and Miyan, J. A. (2000). Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol. Today* 21, 281–289. doi: 10.1016/S0167-5699(00)01635-2
- Duarte-Dias, P. A. (2005). Observation of parturition in the Mexican mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*) on the Island of Agaltepec, Veracruz State, Mexico. *Am. J. Primatol.* 65, 93–98. doi: 10.1002/ajp.20100
- Duerkop, B. A., Vaishnav, S., and Hooper, L. V. (2009). Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 31, 368–376. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.009
- Dunbar, R. I. M. (1980). Determinants and evolutionary consequences of dominance among female gelada baboons. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 7, 253–265. doi: 10.1007/BF00300665
- Dunbar, R. I. M. (1991). Functional significance of social grooming in primates. *Folia Primatol.* 57, 121–131. doi: 10.1159/000156574
- Dunbar, R. I. M. (1998). The social brain hypothesis. *Evol. Anthropol.* 36, 562–572. doi: 10.1080/03014460902960289
- Dunbar, R. I. M. (2010). The social role of touch in humans and primates: behavioural function and neurobiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 260–268. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.07.001
- Dunbar, R. I. M., and Dunbar, P. (1988). Maternal time budgets of gelada baboons. *Anim. Behav.* 36, 970–980. doi: 10.1016/S0003-3472(88)80055-1
- Dunbar, R. I. M., and Shultz, S. (2010). Bondedness and sociality. *Behaviour* 147, 775–803. doi: 10.1163/000579510X501151
- Dunbar, R. I. M., and Spoor, M. (1995). Social networks, support cliques, and kinship. *Hum. Nat.* 6, 273–290. doi: 10.1007/BF02734142
- Eibl-Eibesfeldt, I. (1975). *Ethology: The Biology of Behavior*. US: Holt, Rinehart and Winston.
- Eibl-Eibesfeldt, I. (1977). The biological unity of mankind: human ethology, concepts and implications. *Prospects* 7, 163–183. doi: 10.1007/BF02196076
- Eibl-Eibesfeldt, I. (1989). *Human Ethology*. New York: Aldine De Gruyter.
- Evans, J. D., and Lopez, D. L. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 97, 752–756. doi: 10.1603/0022-0493(2004)097[0752:BPIAIR]2.0.CO;2
- Ferrari, P. F., Gallese, V., Rizzolatti, G., and Fogassi, L. (2003). Mirror neurons responding to the observation of ingestive and communicative mouth actions in the monkey ventral premotor cortex. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1703–1714. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02601.x
- Fincher, C. L., Thornhill, R., Murray, D. R., and Schaller, M. (2008). Pathogen prevalence predicts human cross-cultural variability in individualism/collectivism. *Proc. Biol. Sci.* 275, 1279–1285. doi: 10.1098/rspb.2008.0094
- Forsythe, P., and Bienenstock, J. (2010). Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol. Invest.* 39, 429–448. doi: 10.3109/08820131003667978
- Forsythe, P., Kunze, W. A., and Bienenstock, J. (2012). On communication between gut microbes and the brain. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 28, 557–562. doi: 10.1097/MOG.0b013e3283572ffa
- Foster, J. A., and McVey Neufeld, K. A. (2013). Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trend. Neurosci.* 36, 305–312. doi: 10.1016/j.tins.2013.01.005
- Freeland, W. J. (1976). Pathogens and the evolution of primate sociality. *Biotropica* 8, 12–24. doi: 10.2307/2387816
- Freeland, W. J. (1979). Primate social groups as biological islands. *Ecology* 60, 719–728. doi: 10.2307/1936609
- Frijhoff, W. (1991). “The kiss sacred and profane: reflections on a cross-cultural confrontation,” in *A Cultural History of Gesture: From Antiquity to the Present Day*, eds J. Bremner and H. Roodenburg (Cambridge: Cambridge University Press), 210–236.
- Gallese, V. (1998). Mirror neurons: from grasping to language. *Conscious. Bull.* 2, 3–4.
- Glaser, R., and Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 243–251. doi: 10.1038/nri1571
- Gómez, G. D., and Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 52, 145–154. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x
- Graczyk, T. K., and Cranfield, M. R. (2003). Coprophagy and intestinal parasites: implications to human-habituated mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Virunga Mountains and Bwindi impenetrable forest. *Prim. Conserv.* 19, 58–64.
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F., and Dinan, T. G. (2011). Brain–gut–microbe communication in health and disease. *Front. Physiol.* 2, 1–15. doi: 10.3389/fphys.2011.00094
- Griffin, R. H., and Nunn, C. L. (2011). Community structure and the spread of infectious disease in primate social networks. *Evol. Ecol.* 26, 779–800. doi: 10.1007/s10682-011-9526-2
- Gröschl, M. (2009). The physiological role of hormones in saliva. *BioEssays* 31, 843–852. doi: 10.1002/bies.200900013
- Gulledge, A. K., Gulledge, M. H., and Stahmann, R. F. (2003). Romantic physical affection types and relationship satisfaction. *Am. J. Fam. Ther.* 31, 233–242. doi: 10.1080/01926180390201936
- Hansen, G. H., and Olafsen, J. A. (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38, 1–26. doi: 10.1007/s002489900158
- Hardus, M. E., Lameira, A. R., and Wich, S. A. (2012). Behavioral, ecological, and evolutionary aspects of meat-eating by sumatran orangutans (*Pongo abelii*). *Int. J. Primatol.* 33, 287–304. doi: 10.1007/s10764-011-9574-z
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., et al. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 3047–3052. doi: 10.1073/pnas.1010529108
- Hendrie, C. A., and Brewer, G. (2010). Kissing as an evolutionary adaptation to protect against

- human cytomegalovirus-like teratogenesis. *Med. Hyp.* 74, 222–224. doi: 10.1016/j.mehy.2009.09.033
- Hickman, C. S. (2005). “How have bacteria contributed to the evolution of multicellular animals?” in *The Influence of Cooperative Bacteria on Animal Host Biology*, eds M. J. McFall-Ngai, B. Henderson, and E. G. Ruby (New York: Cambridge University Press), 3–33.
- Hinde, R. (1983a). “Description and proximate factors influencing social structure,” in *Primate Social Relationships: An Integrated Approach*, ed. Robert Hinde (Oxford: Blackwell Scientific Publications), 65–120.
- Hinde, R. (1983b). “Development and dynamics of relationships,” in *Primate Social Relationships: An Integrated Approach*, ed. R. Hinde (Oxford: Blackwell Scientific Publications), 176–230.
- Hinde, K., and German, J. B. (2012). Food in an evolutionary context: insights from mother’s milk. *J. Sci. Food. Agric.* 92, 2219–2223. doi: 10.1002/jsfa.5720
- Hirata, S. (2006). “Chimpanzee learning and transmission of tool use to fish for honey,” in *Cognitive Development in Chimpanzees*, eds T. Matsusawa, M. Tomonaga, and M. Tanaka (Tokyo: Springer Verlag), 201–213. doi: 10.1007/4-431-30248-4_13
- Hirata, S., and Celli, M. L. (2003). Role of mothers in the acquisition of tool-use behaviours by captive infant chimpanzees. *Anim. Cogn.* 6, 235–244. doi: 10.1007/s10071-003-0187-6
- Horwich, R. H., and Manski, D. (1975). Maternal care and infant transfer in two species of colobus monkeys. *Primates* 16, 49–73. doi: 10.1007/BF02381799
- Huffman, M. A. (1997). Current evidence for self-medication in primates: a multidisciplinary perspective. *Am. J. Phys. Anthropol.* 200, 171–200. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(1997)25<171::AID-AJPA7>3.0.CO;2-7
- Hughes, S., Harrison, M., and Gallup, G. G. Jr. (2007). Sex differences in romantic kissing among college students: an evolutionary perspective. *Evol. Psychol.* 5, 612–631.
- Jaeggi, A. V., and van Schaik, C. P. (2011). The evolution of food sharing in primates. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 65, 2125–2140. doi: 10.1007/s00265-011-1221-3
- Kaltenpoth, M., and Engl, T. (2013). Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Func. Ecol.* doi: 10.1111/1365-2435.12089 [Epub ahead of print].
- Kasper, C., Voelkl, B., and Huber, L. (2008). Tolerated mouth-to-mouth food transfers in common marmosets. *Anim. Behav.* 49, 153–156. doi: 10.1007/s10329-007-0069-7
- Kelly, D., and Mulder, I. E. (2012). Microbiome and immunological interactions. *Nutr. Rev.* 70, S18–S30. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00498.x
- Keverne, E. B., Martensz, N., and Tuite, B. (1989). Beta-endorphin concentrations in cerebrospinal fluid of monkeys are influenced by grooming relationships. *Psychoneuroendocrinology* 14, 155–161. doi: 10.1016/0306-4530(89)90065-6
- Kline, S. L., Horton, B., and Zhang, S. (2008). Communicating love: comparisons between American and East Asian university students. *Int. J. Intercult. Relat.* 32, 200–214. doi: 10.1016/j.ijintrel.2008.01.006
- Koch, H., and Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 19288–19292. doi: 10.1073/pnas.1110474108
- Kohl, K. D. (2012). Diversity and function of the avian gut microbiota. *J. Comp. Physiol. B* 182, 591–602. doi: 10.1007/s00360-012-0645-z
- Kudo, H., and Dunbar, R. I. M. (2001). Neocortex size and social network size in primates. *Anim. Behav.* 61, 1–12. doi: 10.1006/anbe.2001.1808
- Kuroda, S. (1980). Social behavior of the pygmy chimpanzees. *Primates* 21, 181–197. doi: 10.1007/BF02374032
- Kyle, P. D., and Kyle, G. Z. (1993). An evaluation of the role of microbial flora in the salivary transfer technique for hand-rearing Chimney Swifts. *Wildl. Rehabil.* 8, 65–71.
- Lambert, J. E. (1998). Primate digestion: interactions among anatomy, physiology, and feeding ecology. *Evol. Anthropol.* 7, 8–20. doi: 10.1002/(SICI)1520-6505(1998)7:1<8::AID-EV-AN3>3.0.CO;2-C
- Langergraber, K. E. (2012). “Cooperation among kin,” in *The Evolution of Primate Societies*, eds J. C. Mitani, J. Call, P. M. Kappeler, R. A. Palombit, and J. B. Silk (Chicago: The University of Chicago Press), 491–513.
- Laska, M., Bautista, R. M. R., Höfelmann, D., Sterlemann, V., and Salazar, L. T. H. (2007). Olfactory sensitivity for putrefaction-associated thiols and indols in three species of non-human primate. *J. Exp. Biol.* 210, 4169–4178. doi: 10.1242/jeb.012237
- Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., and Masmanian, S. K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4615–4622. doi: 10.1073/pnas.100082107
- Lindburg, D. G., and Hazell, L. D. (1972). Licking of the neonate and duration of labor in great apes and man. *Am. Anthropol.* 74, 318–325. doi: 10.1525/aa.1972.74.3.02.a00040
- Little, T. J., O’Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., and Read, A. F. (2003). Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Curr. Biol.* 13, 489–492. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00163-5
- Loehle, C. (1995). Social barriers to pathogen transmission in wild animal populations. *Ecology* 76, 326–335. doi: 10.2307/1941192
- Lombardo, M. P. (2008). Access to mutualistic endosymbiotic microbes: an underappreciated benefit of group living. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 479–497. doi: 10.1007/s00265-007-0428-9
- Manco, M. (2012). Gut microbiota and developmental programming of the brain: from evidence in behavioral endophenotypes to novel perspective in obesity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:109. doi: 10.3389/fcimb.2012.00109
- Manson, J. H., Perry, S., and Parish, A. R. (1997). Nonconceptive sexual behavior in bonobos and capuchins. *Int. J. Primatol.* 18, 767–786. doi: 10.1023/A:1026395829818
- Mathers, C., Fat, D. M., and Boerma, J. T. (2008). *The Global Burden of Diseases: 2004 Update*. Geneva: World Health Organization.
- Mayer, E. A. (2011). Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 453–466. doi: 10.1038/nrn3071
- McFall-Ngai, M. J. (1994). Animal-bacterial interactions in the early life history of marine invertebrates: the Euprymna scolopes/Vibrio fischeri symbiosis. *Am. Zool.* 34, 554–561. doi: 10.1093/icb/34.4.554
- McFall-Ngai, M. J. (1998). The development of cooperative associations between animals and bacteria: establishing détente among domains. *Am. Zool.* 38, 593–608. doi: 10.1093/icb/38.4.593
- McFall-Ngai, M. J. (2005). “The interface of microbiology and immunology: a comparative analysis of the animal kingdom,” in *The Influence of Cooperative Bacteria on Animal Host Biology*, eds M. J. McFall-Ngai, B. Henderson, and E. G. Ruby (New York: Cambridge University Press), 35–56.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Loso, T., Douglas, A. E., et al. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 3229–3236. doi: 10.1073/pnas.1218525110
- McFrederick, Q. S., Wcislo, W. T., Taylor, D. R., Ishak, H. D., Dowd, S. E., and Mueller, U. G. (2012). Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Mol. Ecol.* 21, 1754–1768. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05496.x
- McKernan, D. P., Fitzgerald, P., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2010). The probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 displays visceral antinociceptive effects in the rat. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 1029–1035. e268. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01520.x
- Michod, R. E. (2003). “Cooperation and conflict mediation during the origin of multicellularity,” in *Genetic and Cultural Evolution of Cooperation*. Report of the 90th Dahlem Workshop on Genetic and Cultural Evolution of Cooperation, Berlin, June 23–28, 2002, ed. P. Hammerstein (Cambridge, MA: MIT Press), 291–308.
- Milton, K. (1981). Food choice and digestive strategies of two sympatric primate species. *Am. Nat.* 117, 496–505. doi: 10.1086/283730
- Mitani, J. C. (2009). Male chimpanzees form enduring and equitable social bonds. *Anim. Behav.* 77, 633–640. doi: 10.1016/j.anbehav.2008.11.021
- Mitani, J. C., Call, J., Kappeler, P. M., Palombit, R. A., and Silk, J. B. (2012). *The Evolution of Primate Societies*. Chicago: The University of Chicago Press. doi: 10.7208/chicago/9780226531731.001.0001
- Mooring, M. S., Blumstein, D. T., and Stoner, C. J. (2004). The evolution of parasite-defence grooming in ungulates. *Biol. J. Linn. Soc.* 81, 17–37. doi: 10.1111/j.1095-8312.2004.00273.x
- Mykytowycz, R. (1972). The behavioural role of the mammalian skin glands. *Naturwissenschaften* 59, 133–139. doi: 10.1007/BF00637350
- Nakamichi, M., and Koyama, N. (2000). Intra-troop affiliative relationships of females with newborn infants in wild ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Am. J. Primatol.* 50, 187–203. doi: 10.1002/(SICI)1098-2345(200003)50:3<187::AID-AJP2>3.0.CO;2-Q
- Nash, L. T., Fritz, J., Alford, P. A., and Brent, L. (1999). Variables influencing the origins of diverse

- abnormal behaviors in a large sample of captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am. J. Primatol.* 48, 15–29. doi: 10.1002/(SICI)1098-2345(1999)48:1<15::AID-AJP2>3.0.CO;2-R
- Neuberg, S. L., Kenrick, D. T., and Schaller, M. (2011). Human threat management systems: self-protection and disease avoidance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1042–1045. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.08.011
- Nicholson, B. (1984). Does kissing aid human bonding by semiochemical addiction? *Br. J. Dermatol.* 111, 623–627. doi: 10.1111/j.1365-2133.1984.tb06635.x
- Ninonuevo, M. R., Park, Y., Hongfeng, Y., Zhang, J., Ward, R. E., Clowers, B. H., et al. (2006). A strategy for annotating the human milk glycome. *J. Agric. Food. Chem.* 54, 7471–7480. doi: 10.1021/jf0615810
- Nunn, C. L. (2012). Primate disease ecology in comparative and theoretical perspective. *Am. J. Primatol.* 509, 497–509. doi: 10.1002/ajp.21986
- O'Mahony, S. M., Hyland, N. P., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2011). Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology* 214, 71–88. doi: 10.1007/s00213-010-2010-9
- Parr, L. A., Waller, B. M., and Pugate, J. (2005). Emotional communication in primates: implications for neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 716–720. doi: 10.1016/j.conb.2005.10.017
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Sterma, F. F., Snijdes, B., Kummeling, I., et al. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511–521. doi: 10.1542/peds.2005-2824
- Penn, D., and Potts, W. K. (1998). Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Tree* 13, 391–396. doi: 10.1016/S0169-5347(98)01473-6
- Porges, S. W. (1997). Emotion: an evolutionary by-product of the neural regulation of the autonomic nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 807, 62–77. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb51913.x
- Porges, S. W. (2003). The Polyvagal theory: phylogenetic contributions to social behavior. *Phys. Behav.* 79, 503–513. doi: 10.1016/S0031-9384(03)00156-2
- Preuschhoff, K., Quartz, S. R., and Bossaerts, P. (2008). Human insula activation reflects risk prediction errors as well as risk. *J. Neurosci.* 28, 2745–2752. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4286-07.2008
- Pruetz, J. D., and Lindshield, S. (2012). Plant-food and tool transfer among savanna chimpanzees at Fongoli, Senegal. *Primates* 53, 133–145. doi: 10.1007/s10329-011-0287-x
- Regan, P. C., Durvasula, R., Howell, L., Ureno, O., and Rea, M. (2004). Gender, ethnicity, and the developmental timing of first sexual and romantic experiences. *Soc. Behav. Pers.* 32, 667–676. doi: 10.2224/sbp.2004.32.7.667
- Relman, D. A. (2012). The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutr. Rev.* 70, S2–S9. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00489.x
- Rhee, S. H., Pothoulakis, C., and Mayer, E. A. (2009). Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 306–314. doi: 10.1038/nrgastro.2009.35
- Rizzolatti, G., and Fogassi, L. (2007). “Mirror neurons and social cognition”, in *The Oxford Handbook of Evolutionary Psychology*, eds R. I. M. Dunbar and L. Barrett (Oxford: Oxford University Press), 179–195.
- Robinson, J. G., and Janson, C. H. (1987). “Capuchins, squirrel monkeys, and atelines: socioecological convergence with old world primates,” in *Primate Societies*, eds B. B. Smuts, D. L. Cheney, R. M. Seyfarth, R. W. Wrangham, and T. Struhsaker (Chicago: The University of Chicago Press), 69–82.
- Ruby, E. G., and McFall-Ngai, M. J. (1992). A squid that glows in the night: development of an animal-bacterial mutualism. *J. Bacteriol.* 174, 4865–4870.
- Schaller, M. (2011). The behavioural immune system and the psychology of human sociality. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 3418–3426. doi: 10.1098/rstb.2011.0029
- Schaub, H. (1996). Testing kin altruism in long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) in a food-sharing experiment. *Int. J. Primatol.* 17, 445–467. doi: 10.1007/BF02736631
- Schreier, A. L., and Swedell, L. (2009). The fourth level of social structure in a multi-level society: ecological and social functions of clans in Hamadryas baboons. *Am. J. Primatol.* 71, 948–955. doi: 10.1002/ajp.20736
- Shultz, S., and Dunbar, R. I. M. (2007). The evolution of the social brain: anthropoid primates contrast with other vertebrates. *Proc. Biol. Sci.* 274, 2429–2436. doi: 10.1098/rspb.2007.0693
- Sleigh, C. (2002). Brave new worlds: trophallaxis and the origin of society in the early twentieth century. *J. Hist. Behav. Sci.* 38, 133–156. doi: 10.1002/jhbs.10033
- Smith, E. A., and Bird, B. (2005). “Costly signaling and cooperative behavior,” in *Moral Sentiments and Material Interests: The Foundations of Cooperation in Economic Life*, eds H. Gintis, S. Bowles, R. Boyd, and E. Fehr (Cambridge, MA: The MIT Press), 115–148.
- Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 318–328. doi: 10.1038/nri1810
- Stevens, J. R., and Gilby, I. C. (2004). A conceptual framework for nonkin food sharing: timing and currency of benefits. *Anim. Behav.* 67, 603–614. doi: 10.1016/j.anbehav.2003.04.012
- Tang, W. W., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., et al. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 368, 1575–1584. doi: 10.1056/NEJMoa1109400
- Thomas, R. H., Meeking, M. M., Mephum, J. R., Tichenoff, L., Possmayer, F., Liu, S., et al. (2012). The enteric bacterial metabolite propionic acid alters brain and plasma phospholipid molecular species: further development of a rodent model of autism spectrum disorders. *J. Neuroinflammation* 9, 153. doi: 10.1186/1742-2094-9-153
- Troyer, K. (1984a). Microbes, herbivory and the evolution of social behavior. *J. Theor. Biol.* 106, 157–169. doi: 10.1016/0022-5193(84)90016-X
- Troyer, K. (1984b). Behavioral acquisition of the hindgut fermentation system by hatchling Iguana iguana. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 14, 189–193. doi: 10.1007/BF00299618
- Tsuji, H., Oozeer, R., Matsuda, K., Matsuki, T., Ohta, T., Nomoto, K., et al. (2012). Molecular monitoring of the development of intestinal microbiota in Japanese infants. *Benef. Microbes* 3, 113–125. doi: 10.3920/BM2011.0038
- Turnbaugh, P. J., and Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J. Physiol.* 587, 4153–4158. doi: 10.1113/jphysiol.2009.174136
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., et al. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484. doi: 10.1038/nature07540
- Turner, S. E., Fedigan, L. M., Nakamichi, M., Matthews, H. D., McKenna, K., Nobuhara, H., et al. (2009). Birth in free-ranging *Macaca fasciata*. *Int. J. Primatol.* 31, 15–37. doi: 10.1007/s10764-009-9376-8
- van Schaik, C. P., and van Noordwijk, M. A. (1986). The hidden costs of sociality: intra-group variation in feeding strategies in Sumatran long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Behaviour* 99, 296–315. doi: 10.1163/156853986X00595
- Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Dafnis, S., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (2000). Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1139–1146. doi: 10.1128/AEM.66.3.1139-1146.2000
- Walke, J. B., Harris, R. N., Reinert, L. K., Rollins-Smith, L. A., and Woodhams, D. C. (2011). Social immunity in amphibians: evidence for vertical transmission of innate defenses. *Biotropica* 43, 396–400. doi: 10.1111/j.1744-7429.2011.00787.x
- Walter, B. C. (2008). Affairs of the lips: why we kiss. *Sci. Am. Mind.* 19, 24–29. doi: 10.1038/scientificamericanmind0208-24
- Wang, B., Mao, Y., Diorio, C., Wang, L., Huizinga, J. D., Bienenstock, J., et al. (2010). *Lactobacillus reuteri* ingestion and IKCa channel blockade have similar effects on rat colon motility and myenteric neurones. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 98–e33. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01384.x
- Wang, J., and Aksoy, S. (2012). PGRP-LB is a maternally transmitted immune milk protein that influences symbiosis and parasitism in tsetse's offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10552–10557. doi: 10.1073/pnas.1116431109
- Wang, L., Christophersen, C. T., Soric, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., and Conlon, M. A. (2012). Elevated faecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Dig. Dis. Sci.* 57, 2096–2102. doi: 10.1007/s10620-012-2167-7
- Washburn Hopkins, E. (1907). The Sniff-kiss in ancient India. *J. Am. Oriental Soc.* 28, 120–134. doi: 10.2307/592764
- Watts, D. P., and Mitani, J. C. (2002). Hunting behavior of chimpanzees at Ngogo, Kibale National Park, Uganda. *Int. J. Primatol.* 23, 1–28. doi: 10.1023/A:1013270606320
- Wedekind, C., Seebeck, T., Betens, F., and Paepke, A. J. (1995). MHC-dependent mate preferences in humans. *Proc. Biol. Sci.* 260, 245–249. doi: 10.1098/rspb.1995.0087
- Wheeler, W. (1918). A study of some young ant larvae with a consideration of the origin and meaning of social habits among insects. *Proc. Am. Philos. Soc.* 57, 293–343.

- Whiten, A., Goodall, J., McGrew, W. C., Nishida, T., Reynolds, V., Sugiyama, Y., et al. (2001). Charting cultural variation in chimpanzees. *Behaviour* 138, 1481–1516. doi: 10.1163/156853901317367717
- Wicker, B., Keysers, C., Plailly, J., Royet, J. P., Gallese, V., and Rizzolatti, G. (2003). Both of us disgusted in my insula: the common neural basis of seeing and feeling disgust. *Neuron* 40, 655–664. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00679-2
- Wilson, E. O. (2000). *Sociobiology. The New Synthesis*, 25th anniversary Edn. Cambridge, MA: The Belknap Press of Harvard University Press.
- Wittig, R. M., and Boesch, C. (2003). The choice of post-conflict interactions in wild chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Behaviour* 140, 1527–1559. doi: 10.1163/156853903771980701
- Wittig, R. M., Crockford, C., Lehmann, J., Whitten, P. L., Seyfarth, R. M., and Cheney, D. L. (2008). Focused grooming networks and stress alleviation in wild female baboons. *Horm. Behav.* 54, 170–177. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.02.009
- Wrangham, R. W. (1993). The evolution of sexuality in chimpanzees and bonobos. *Hum. Nat.* 4, 47–79. doi: 10.1007/BF02734089
- Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, L., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–228. doi: 10.1038/nature11053
- Young, L. J., and Wang, Z. (2004). The neurobiology of pair bonding. *Nat. Neurosci.* 7, 1048–1054. doi: 10.1038/nn1327
- Zhou, W., Sornette, D., Hill, R. A., and Dunbar, R. I. M. (2005). Discrete hierarchical organization of social group sizes. *Proc. Biol. Sci.* 272, 439–444. doi: 10.1098/rspb.2004.2970
- Zuberbühler, K., Noë, R., and Seyfarth, R. M. (1997). Diana monkey long-distance calls: messages for conspecifics and predators. *Anim. Behav.* 53, 589–604. doi: 10.1006/anbe.1996.0334
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Received: 31 May 2013; paper pending published: 26 June 2013; accepted: 04 September 2013; published online: 07 October 2013.
- Citation:* Montiel-Castro AJ, González-Cervantes RM, Bravo-Ruiseco G, and Pacheco-López G (2013) The microbiota–gut–brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Front. Integr. Neurosci.* 7:70. doi: 10.3389/fnint.2013.00070
- This article was submitted to the journal *Frontiers in Integrative Neuroscience*. Copyright © 2013 Montiel-Castro, González-Cervantes, Bravo-Ruiseco and Pacheco-López. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.