

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE  
AGENTES INFECCIOSOS EN TEJIDO ENCEFÁLICO *POST MORTEM*  
PROVENIENTE DE PERSONAS AFECTADAS Y NO AFECTADAS POR LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**JOHANA GÓMEZ RAMÍREZ  
MICROBIÓLOGA Y BIOANALISTA**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER EN  
CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
ÉNFASIS EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**TUTORA  
ANA CECILIA MESA ARANGO, DSC  
COTUTOR  
CARLOS ANDRÉS VILLEGAS LANAU, DSC**

**COMITÉ TUTORIAL  
WILDEMAN ZAPATA BUILES, PhD  
JUAN CARLOS ZAPATA, PhD  
MARIA JOSE BUITRAGO, PhD**

**CORPORACIÓN ACADÉMICA  
CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
GRUPO DE NEUROCIENCIAS DE ANTIOQUIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
ENERO DE 2021**

## **AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto fue realizado en el marco del proyecto: “Riesgo asociado a infecciones persistentes por diferentes agentes infecciosos y el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer” financiado por Minciencias código 111577756935 en colaboración con la Universidad de Antioquia y la Universidad Cooperativa de Colombia. Además, fue ejecutado en el grupo de Neurociencias de Antioquia, facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

En agradecimiento a los profesores, amigos y compañeros de trabajo que con sus conocimientos, consejos y apoyo incondicional participaron directa e indirectamente en la elaboración de este trabajo. Igualmente, al biobanco del grupo de Neurociencias de Antioquia por permitirme hacer lo que más me gusta hacer, CIENCIA.

Especial agradecimiento a Alexandra Elbakyan, desarrolladora web y creadora del primer sitio web del mundo en proporcionar acceso masivo y público a artículos de investigación. De nada sirve investigar si los colegas en otros lugares no pueden tener conocimiento y acceso a nuestros hallazgos.

Finalmente, por siempre agradecida con Bibiana Ramírez Estrada, mi madre y motor de vida.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	5
1. LISTA DE FIGURAS	7
2. LISTA DE TABLAS	8
3. GLOSARIO DE TÉRMINOS	9
4. INTRODUCCIÓN	9
4.1 Aspectos generales de la enfermedad de Alzheimer	9
4.2 Etiología de la enfermedad de Alzheimer.....	11
4.3 Toxicidad neuronal mediada por el péptido $\beta$ amiloide y por la proteína hiperfosforilada TAU y el papel en la etiología de la enfermedad de Alzheimer .....	12
4.4 Hipótesis sobre la etiología de la enfermedad de Alzheimer .....	13
4.4.1 Hipótesis amiloidea	13
4.4.2 Hipótesis infecciosa	14
4.5 Participación de agentes infecciosos con la enfermedad de Alzheimer .....	15
4.5.1 Priones	15
4.5.2 Virus	16
4.5.3 Bacterias	18
4.5.4 Hongos	20
4.5.5 Parásitos	20
4.6 Actividad antimicrobiana del péptido $\beta$ -Amiloide.....	21
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	22
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
7. OBJETIVOS	25
7.1 General.....	25
7.2 Específicos .....	25
8. MATERIALES Y MÉTODOS	25
8.1 Tipo de estudio y diseño muestral .....	25
8.2 Criterios de inclusión.....	25
8.3 Análisis de datos clínicos .....	25
8.4 Diagnóstico neuropatológico de la enfermedad de Alzheimer.....	26
8.5 Búsqueda e identificación de agentes infecciosos en tejido cerebral .....	27
8.5.1 Obtención de las muestras de ADN	27
8.5.2 Detección e identificación de agentes infecciosos por la tecnología de microarreglos	27

8.5.3 Detección de hongos por PCR en tiempo real	27
8.5.4 Detección de virus por PCR multiplex en tiempo real	28
8.6 Aislamiento e identificación de bacterias aerobias y hongos .....	28
8.6.1 Bacterias aerobias	28
8.6.2 Hongos	28
8.7 Colocalización de bacterias con placas seniles. ....	28
8.8 Análisis estadístico .....	29
8.9 Consideraciones éticas .....	30
9. RESULTADOS	30
9.1 Características clínicas de las personas afectadas y no afectadas por la enfermedad de Alzheimer.....	30
9.2 Evaluación macroscópica de los encéfalos .....	32
9.3 Evaluación microscópica de los encéfalos.....	33
9.4 Identificación de agentes infecciosos por métodos moleculares .....	35
9.5 Cultivos <i>in vitro</i> para el aislamiento de <i>hongos</i> y bacterias .....	36
9.6 Colocalización de bacterias con placas seniles .....	38
10. DISCUSIÓN	42
11. CONCLUSIONES	51
12. REFERENCIAS	53

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA), es un trastorno neurológico que se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria. Su etiología aún no es muy clara, pero se ha considerado un origen infeccioso para este tipo de demencia debido a la detección directa de diferentes agentes infecciosos (priones, virus, hongos, o bacterias) o indirecta mediante la detección de anticuerpos contra alguno de ellos, en diferentes especímenes biológicos de pacientes con la EA. Este estudio pretende describir las características clínicas de un grupo de personas con enfermedad de Alzheimer y los hallazgos neuropatológicos, la presencia de agentes infecciosos y la colocalización con placas seniles en tejido encefálico *post mortem*. Para esto, se realizó un muestreo a conveniencia con un total 32 casos incluyendo tejido con y sin EA. A partir de la información clínica disponible, se realizó un análisis retrospectivo para relacionar los hallazgos en el tejido encefálico, los agentes infecciosos con los signos o síntomas sugestivos de infección. La búsqueda de agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos o parásitos) se realizó por la técnica de microarreglos, PCR multiplex para la detección de virus de la familia *Herpesviridae* y un ensayo de PCR panfúngico; además, se realizaron cultivos microbiológicos para la búsqueda de bacterias y hongos. A partir de colonias bacterianas aisladas se realizó identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF. Finalmente, se indujo la colonización de tejido cerebral por bacterias durante 24 y 48 horas y se observó y cuantificó la cantidad de acúmulos bacterianos colocalizados con el péptido  $\beta$ A. En ninguna de las muestras de pacientes con EA analizadas con los microarreglos, se detectaron agentes infecciosos, sólo se detectaron en dos muestras control, bacterias ambientales, enterobacterias o microbiota de piel. Ninguna muestra fue positiva para hongos por los microarreglos o por PCR panfúngica. Con respecto a los virus, tres casos con EA fueron positivos para Virus Herpes Simple 1 y 2 (VHS-1 y 2), concomitantes con el virus Epstein Bar (VHH-4) o el virus de la varicela Zóster (VHH-3); un caso del grupo control fue positivo para VHH-4 por la PCR multiplex. Además, se aislaron bacterias gram negativas y gram positivas a partir de los tejidos cerebrales en ambos grupos de estudio. Adicionalmente, se observaron acúmulos bacterianos que colocalizaban con el péptido  $\beta$ -Amiloide *in situ* y el área de estos fue menor en comparación con los que no colocalizaron. Contrario a lo reportado por otros investigadores, no se detectó ADN de origen fúngico ni bacteriano en las muestras analizadas con EA; tampoco se aislaron bacterias descritas en la literatura asociadas a la etiología de esta demencia. Adicionalmente, la presencia de ADN viral se confirmó tanto en casos con EA como en controles. Estos resultados difieren de otros estudios en los cuales la presencia de virus de la familia *Herpesviridae* es mayor en los casos de EA. Sin embargo, sí se observó la inducción de aglutinación de bacterias *in situ* por el péptido  $\beta$ -Amiloide como se ha reportado *in vitro*. La conclusión que se puede sacar con base en los resultados obtenidos puede sugerir la necesidad de replantear la hipótesis de la etiología infecciosa de la EA o de proponer otro mecanismo dado que la búsqueda de agentes infecciosos se realizó en una etapa tardía de la enfermedad (*post mortem*). Asimismo, el péptido  $\beta$ -Amiloide tiene reconocida actividad antimicrobiana, lo que puede sugerir que la asociación entre la EA y los agentes infecciosos pueda presentarse en etapas tempranas de la

enfermedad o secundario a la reacción inflamatoria producto de una infección en un sitio anatómico diferente al sistema nervioso central.

## 1. LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Placas seniles, angiopatía cerebral amiloidea, ovillos neurofibrilares y placas neuríticas .....	33
<b>Figura 2.</b> Cultivos de muestras de tejido cerebral. ....	35
<b>Figura 3.</b> Depósitos PAS positivos en el encéfalo .....	37
<b>Figura 4.</b> Acúmulos bacterianos colocalizados con el péptido $\beta$ amiloide .....	38
<b>Figura 5.</b> Acúmulos bacterianos sin colocalización con el péptido $\beta$ amiloide .....	39
<b>Figura 6.</b> Acúmulos bacterianos con y sin colocalización con el péptido $\beta$ amiloide.....	40

## 2. LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de los casos con colonización por bacterias .....	28
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas del grupo control y con enfermedad de Alzheimer .....	29
<b>Tabla 3.</b> Antecedentes de hábitos tóxicos y patológicos en el grupo control y con enfermedad de Alzheimer .....	30
<b>Tabla 4.</b> Factores predisponentes o infecciones en el grupo control y con enfermedad de Alzheimer .....	31
<b>Tabla 5.</b> Hallazgos macroscópicos de los encéfalos del grupo control y con enfermedad de Alzheimer .....	32
<b>Tabla 6.</b> Microorganismos detectados por métodos moleculares en muestras de encéfalos del grupo control y con enfermedad de Alzheimer .....	34
<b>Tabla 7.</b> Identificación de agentes infecciosos por microarreglos y PCR .....	34
<b>Tabla 8.</b> Especies de bacterias aisladas a partir de tejido encefálico del grupo control y con enfermedad de Alzheimer .....	35
<b>Tabla 9.</b> Total de acúmulos bacterianos en tejido cerebral .....	39
<b>Tabla 10.</b> Análisis del área de los acúmulos bacterianos en tejido cerebral con enfermedad de Alzheimer .....	40
<b>Tabla 11.</b> <i>Herpesviridae</i> detectados en tejido encefálico con enfermedad de Alzheimer .....	44

### 3. GLOSARIO DE TÉRMINOS

**ADN:** Por sus siglas ácido desoxirribonucleico, es una molécula de doble hélice compuesto por azúcar, fosfato y bases nitrogenadas, que codifican la información genética de un organismo.

**Agente infeccioso:** Organismo (virus, bacteria, hongo, parásito) con capacidad para infectar y producir una enfermedad.

**Barrera Hematoencefálica (BHE):** estructura histológica compuesta principalmente por células endoteliales, pericitos y astrocitos, la cual aísla el encéfalo de la circulación sistémica, permitiendo la homeostasis del microambiente celular, debido a su permeabilidad selectiva a ciertas sustancias.

**Demencia:** Trastorno neurológico caracterizado por la pérdida de por lo menos dos de las funciones cognitivas, como por ejemplo la memoria o el lenguaje.

**Microarreglos:** Técnica molecular que permite cuantificar la expresión génica o la detección de diferentes genes, simultáneamente por medio del uso de sondas con secuencias específicas adheridas en un chip y que se unen por complementariedad de bases a la secuencia blanco del ARN/ADN de interés.

**Trastorno neurodegenerativo:** Pérdida progresiva e irreversible de las células del sistema nervioso central a causa de factores ambientales o genéticos.

**Ácido periódico de Schiff (PAS):** es un colorante incoloro que oxida a los glicoles, los cuales forman grupos aldehídos que reaccionan dando un color rojo/rosa intenso. Evidencia algunos polisacáridos (particularmente, glucógeno). Se usa para visualizar depósitos de fibrina, parásitos, hongos, entre otros.

**PCR:** del inglés *polymerase chain reaction*, es una técnica molecular que permite detectar un fragmento de material genético de interés por medio de una amplificación en el número de copias a partir de un ADN molde por acción de una enzima con función de polimerasa.

**PCR Multiplex:** Variante de la PCR que permite una detección de diferentes fragmentos de genoma simultáneamente por medio de cebadores específicos y emisión de fluorescencia para su detección.

**Sistema nervioso central:** Compuesto por el encéfalo y la médula espinal, responsable de recibir, traducir y emitir una respuesta, con base a los estímulos internos o externos de un organismo. Las neuronas, son las unidades funcionales de este tejido.

### 4. INTRODUCCIÓN

#### 4.1 Aspectos generales de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) se describe, en el Manual de diagnóstico y estadística de desórdenes mentales (DSM-5) de la Asociación psiquiátrica americana, como un trastorno neurocognitivo mayor, que afecta los dominios de atención, aprendizaje, memoria, lenguaje, cognición social y funciones ejecutivas, visoperceptivas y visoconstructivas que finalmente, comprometen la funcionalidad de las personas afectadas (1).

Actualmente, la EA se clasifica de acuerdo con: 1) la edad de aparición de los síntomas (antes de los 65 se considera de inicio temprano o precoz y si es posterior se nombra como de inicio tardío); 2) la presencia o ausencia de mutaciones en los genes asociados a la enfermedad (genes que codifican para la presinilina 1 (PSEN1), para la presinilina 2 (PSEN2) o para la proteína precursora amiloide (PPA) o la afectación en más de un caso en un grupo familiar. Se considera EA familiar (EAF) cuando en más de un miembro de una familia se identifican mutaciones en genes asociados a la enfermedad, en caso contrario, se considera de origen esporádico (EAE) (2,3).

De la misma manera que sucede con otras enfermedades neurodegenerativas, la EA se caracteriza por una progresión lenta de los síntomas y pérdida progresiva de la funcionalidad (3). Inicialmente, se presentan problemas de memoria reciente de forma exclusiva o con afección de otro proceso cognitivo; se evidencia disminución del rendimiento en el desarrollo de actividades complejas sin que esto, necesariamente, afecte el desempeño en las actividades que realiza de manera habitual; esta fase se conoce como trastorno neurocognitivo menor o Deterioro Cognitivo Leve (DCL). Con el progreso de la enfermedad, los pacientes presentan mayor compromiso en sus quejas de memoria y alteración en otros procesos cognitivos como orientación, praxias, lenguaje, conducta, entre otros, para este momento, los pacientes requieren apoyo o supervisión para llevar a cabo actividades instrumentales de la vida diaria con impacto en su funcionalidad e independencia que corresponde a un trastorno neurocognitivo mayor o demencia debido a EA. La progresión de la demencia finalmente lleva a una pérdida de la capacidad para realizar actividades básicas e instrumentales de la vida diaria, generando una dependencia completa de un cuidador (4).

El diagnóstico presuntivo de la EA, según el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer, se lleva a cabo con pruebas *pre mortem* que incluyen exámenes neuropsicológicos, imagenología diagnóstica y detección del péptido  $\beta$  amiloide ( $\beta$ A) o de la proteína hiperfosforilada TAU (pTAU) en líquido cefalorraquídeo (LCR) o acumuladas a nivel cerebral (4). Sin embargo, el diagnóstico definitivo continúa siendo *post mortem* mediante la evaluación macroscópica y microscópica del encéfalo: Macroscópicamente los principales hallazgos son atrofia cerebral, ventriculomegalia, atrofia hipocámpal y adelgazamiento de la corteza cerebral. Microscópicamente, las principales características son: la acumulación extracelular y en la pared de los vasos sanguíneos del péptido  $\beta$ A (angiopatía amiloidea cerebral-AAC-), la acumulación intracelular de la proteína pTAU y la activación microglial y astrocitaria. Estos hallazgos pueden ser leves, moderados o graves, dependiendo del estadio de la enfermedad (5).

## 4.2 Etiología de la enfermedad de Alzheimer

La EA es una patología compleja con una presentación fenotípica variable que impide, en parte, dilucidar completamente los mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo y evolución. Factores como la edad, la genética, el estilo de vida, la presencia de otras enfermedades (comorbilidades), en especial afectaciones vasculares, la exposición a tóxicos y a diferentes agentes infecciosos, se han asociado a la etiología de esta demencia, principalmente a la forma tardía o a la EA (6,7). De todos estos factores, la edad es considerada el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EA porque a mayor edad menor facilidad del organismo para adaptarse a cambios y la respuesta celular a moléculas que pueden causar daño es más débil (8).

Entre los factores genéticos, además de las mutaciones causales en los genes PSEN1, PSEN2 o PPA, se ha demostrado que el alelo  $\epsilon 4$  del gen que codifica *ApoE* (*ApoE $\epsilon 4$* ) confiere susceptibilidad por lo que se considera un factor de riesgo y modificador de la edad de inicio en EA tardía (9). Esta asociación se ha establecido con base en los valores de Odds Ratio (OR) en estudios con individuos heterocigotos (OR 3) y en homocigotos (OR 8-12) (9). Asimismo, en la búsqueda de la etiología de la EA se han estudiado otros genes vinculados al metabolismo de lípidos, en el mecanismo de la endocitosis y a la respuesta inmune, pero a diferencia de lo observado con *ApoE $\epsilon 4$* , los valores de OR (1.1-1.2) no indican asociación con la EA (7).

El gen *ApoE* codifica la apolipoproteína E (APOE), la cual cumple funciones celulares importantes en el transporte de lípidos, en la integridad y plasticidad sináptica y en el metabolismo de la glucosa a nivel cerebral (10). Además, se ha demostrado que la isoforma APOE4 incrementa la acumulación del  $\beta A$  en forma de placa tanto en el interior de la neurona como en el parénquima cerebral con el consecuente incremento de la AAC (11,12).

Adicionalmente, en el estudio llevado a cabo por Carmona y col. (13), se sugiere que las variantes *Trem 2*, un gen importante en la respuesta inmune innata y en vías inflamatorias, participan en la patogénesis de la EA (OR 3-4). Por otro lado, estilos de vida con malos hábitos alimenticios, baja actividad física, o consumo de sustancias psicoactivas, entre otros, pueden convergir en la afectación del sistema vascular y como consecuencia, afectar la barrera hematoencefálica (BHE), el tono muscular de la pared vascular, la unidad neurovascular y alterar la homeostasis del microambiente cerebral presente en la EA (14).

También se ha sugerido que la exposición a metales como el aluminio o a la polución del aire, a producto de procesos industriales o biológicos, pueden participar en la patogénesis de esta enfermedad (6). Sin embargo, la evidencia científica no es suficiente para establecer una relación de estos factores con la etiología de la EA.

En las últimas décadas, se ha propuesto que las infecciones crónicas, por diferentes agentes, pudieran ser la causa o participar en el desarrollo de la EA (15).

Es posible que todos los factores descritos anteriormente, pueden estar actuando como “estresores celulares”, que afectan las vías moleculares y metabólicas de la célula, para terminar en muerte celular y neurodegeneración.

#### **4.3 Toxicidad neuronal mediada por el péptido $\beta$ amiloide y por la proteína hiperfosforilada TAU y el papel en la etiología de la enfermedad de Alzheimer**

El péptido  $\beta$ A (36-43 aminoácidos) es un derivado del procesamiento sucesivo de la PPA por acción de las enzimas del complejo presinilina 1, siendo las isoformas  $\beta$ -40 y  $\beta$ -42 las más tóxicas para la célula (16).

La PPA es una glicoproteína transmembranal tipo 1 cuyo extremo N-terminal se encuentra en la parte externa de la célula y el C-terminal en el citosol. Durante el procesamiento, las enzimas  $\alpha$ -secretasa y  $\beta$ -secretasa (BACE1) hacen un corte en el extremo N-terminal y como resultado se forman los fragmentos sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  respectivamente. Posteriormente, ocurre un segundo corte en la región transmembranal mediado por el complejo  $\gamma$ -secretasa (compuesto por presinilina 1, nicastrina, Aph1 y Pen2) y se libera el extremo C-terminal (AICD) al citoplasma. Este último producto, es rápidamente degradado, y parece tener una acción tóxica en la célula (16).

En condiciones normales, el procesamiento de la PPA se da principalmente por la vía no amiloidogénica (mediada por  $\alpha$ -secretasa). Sin embargo, cuando existen mutaciones en *Psen1* o en PPA, el procesamiento se da por la vía amiloidogénica (mediada por  $\beta$ -secretasa) dando origen al péptido  $\beta$ A, que posteriormente se acumulará en el parénquima cerebral (16). En los casos de EAE, donde no existen mutaciones asociadas, se cree que la acumulación de  $\beta$ A se da por defectos en la eliminación a través del sistema linfático, con la participación de las proteínas responsables del transporte de lípidos como APOE y CLU (17), responsables del transporte de lípidos. Además, la proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol (PICALM del inglés phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein), presente en las células endoteliales de la BHE, facilita el transporte de  $\beta$ A, mediado por la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad-1 (LRP1), hacia el espacio intersticial (18). El  $\beta$ A que no se elimina, se pliega de forma anómala formando dímeros, trímeros, oligómeros, fibras y finalmente placas; las dos primeras formas son las más tóxicas para las neuronas porque pueden interferir con la sinapsis y dada su naturaleza soluble, pueden propagarse hacia otras regiones cerebrales no afectadas (16).

Por su parte, la proteína TAU tiene funciones importantes en el citoesqueleto como el tráfico vesicular, el ensamblaje y la estabilidad (16). En condiciones normales TAU es fosforilada por las kinasas, glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK-3) y kinasa dependiente de ciclina 5 (CDK-5) pero cuando es hiperfosforilada (pTAU), se produce pérdida de la afinidad de la proteína por los microtúbulos con la consecuente pérdida de la estabilidad del citoesqueleto y afectación de la movilidad vesicular intracelular. Las formas hiperfosforiladas de TAU y del  $\beta$ A, se autoagregan, de forma anómala y crónica, en filamentos helicoidales e inclusiones

filamentosas al interior de las neuronas alterándolas estructural, funcional y energéticamente lo que resulta en un desbalance entre la generación y la eliminación de estos péptidos, contribuyendo al desarrollo de la EA (16,19).

Tanto el  $\beta$ A como la pTAU afectan el metabolismo energético de la célula e inducen disfunción mitocondrial. La mitocondria es una organela afectada tanto por el  $\beta$ A como por pTAU; en el primer caso, se induce una sobrecarga de calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) en la membrana interna afectando la cadena transportadora de electrones y activando la producción de especies reactivas del oxígeno pTAU se asocia con alteraciones cualitativas y cuantitativas (16,20,21).

La pérdida neuronal de modulación del  $\text{Ca}^{++}$  mediada por el  $\beta$ A, produce un aumento en las reservas celulares de este catión dentro el retículo endoplasmático, lo cual activa los receptores iónicos excitatorios que conducen a estados de excitotoxicidad e hiperexcitabilidad afectando procesos involucrados en el aprendizaje y en la memoria en etapas tempranas de la EA (22,23).

Los procesos sinápticos también se ven afectados desde el inicio de la EA evidenciado por una reducción en la cantidad de vesículas sinápticas, por la afectación de la potenciación de la sinapsis a largo plazo y por el aumento en la disponibilidad de receptores postsináptico (24). Estos mecanismos en conjunto conducen a la neurodegeneración y muerte neuronal.

#### **4.4 Hipótesis sobre la etiología de la enfermedad de Alzheimer**

Con base en los diferentes mecanismos de daño celular expuestos anteriormente, se han propuesto varias hipótesis que buscan explicar el origen de esta demencia.

##### **4.4.1 Hipótesis amiloidea**

Después de haberse demostrado que el  $\beta$ A era el principal componente de las placas seniles presentes en el tejido cerebral de personas con EA, se plantea que el depósito de  $\beta$ A es el elemento “central” en la etiología de la EA, no solo por los daños celulares asociados a los acúmulos, sino que activa el sistema kinasas/fosfatas que hiperfosforila a TAU, condición que favorece la agregación (25). En un estudio longitudinal de pacientes con EAF, se demostró por tomografía por emisión de positrones (PET del inglés positron emission tomography) que, durante la evolución natural de la enfermedad, la acumulación de  $\beta$ A precede a la acumulación de TAU (23).

Aunque esta hipótesis es la más aceptada por la comunidad académica, tiene fuertes detractores que cuestionan la “causalidad” del  $\beta$ A basados en argumentos como los siguientes:

1. Los primeros modelos murinos creados para el estudio de la EA, si bien desarrollan amiloidosis, no necesariamente desarrollan los síntomas clínicos característicos ni la acumulación de pTAU (26).

Sólo hasta el desarrollo de un modelo murino triple transgénico (3xtgAD), el cual presenta dos mutaciones que generan amiloidosis y acumulación de pTAU (APP<sup>swe</sup>, PS1<sup>m146v</sup>

(PS1-K) y TAU p301L), se pudo obtener un modelo de estudio “idóneo” para la enfermedad, debido a que estos ratones desarrollan en primera instancia placas seniles y posteriormente los ovillos neurofibrilares, tal y como se ha descrito en humanos, a la vez que, los síntomas cognitivos se van presentando de forma progresiva muy similar a como se presentan en los humanos (27). Debido a lo anterior, se sugiere que no es suficiente la amiloidosis para la aparición de la EA, y se cuestiona el papel central del  $\beta$ A en la etiología de esta enfermedad.

2. Las diferentes terapias farmacológicas evaluadas en ensayos clínicos en fase 3, con el objetivo de remover el  $\beta$ A del cerebro usando inhibidores de  $\beta$ -secretasa o  $\gamma$ -secretasa o anticuerpos monoclonales o policlonales contra diferentes regiones del  $\beta$ A, no han sido eficaces en el control de la progresión de los síntomas (25).

Sin duda, la acumulación de estos péptidos causa daño e inflamación crónica en cerebros de pacientes con la EA, especialmente en etapas iniciales de la enfermedad para el caso del  $\beta$ A, pero es necesario dilucidar el origen del desbalance entre la producción y la eliminación de estos péptidos.

#### **4.4.2 Hipótesis infecciosa**

Debido a que la hipótesis amiloidea ha sido cuestionada por algunos investigadores, se ha propuesto la existencia de eventos que presiden el acúmulo o la oligomerización-del  $\beta$ A; con esta premisa, en la década de los 50's surgió la hipótesis de un posible origen infeccioso de esta demencia, postulando que agentes infecciosos no convencionales como los priones, pudieran estar implicados en el desarrollo de demencia (28). Posteriormente, esta idea se reforzó con el hallazgo del ácido nucleico del virus Herpes Simplex en el lóbulo temporal de personas que fallecieron a causa de la EA (29). Desde entonces, esta hipótesis se ha fundamentado en hallazgos directos de diferentes agentes infecciosos o alguno de sus componentes (ácidos nucleicos, proteínas o carbohidratos) o indirectos como anticuerpos tipo IgG o IgM contra virus, bacterias u hongos en tejido cerebral, suero o LCR (15).

Los agentes infecciosos pueden alcanzar el parénquima cerebral por diferentes vías (mucosa olfatoria, cavidad oral o alteración de la BHE) y permanecer allí evadiendo la respuesta inmune. Una vez el sistema inmune se altere, por el envejecimiento o el estrés, estos pueden reactivarse causando directamente la muerte neuronal o indirectamente por la activación de la respuesta inflamatoria para contener dicha infección llevando a disfunción sináptica, muerte neuronal y demencia (30).

La EA cursa con un proceso neuroinflamatorio crónico caracterizado por la presencia de citoquinas de la familia tipo I (IL-2, IL-6 e IL-12), familia de la IL-1, superfamilia de TNF- $\alpha$  y otras citoquinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$  e IL-10, junto con la presencia de células de la microglia activadas y astrocitos reactivos (24,31). Este perfil inflamatorio, se cree que es inducido por el  $\beta$ A y la pTAU; sin embargo, se desconoce específicamente, si la respuesta inmune se activa en respuesta a un agente externo o por la acumulación del  $\beta$ A y de pTAU (32).

La mayoría de los casos de EA se presentan en la vejez. En esta etapa de la vida se activa el sistema inmune innato a nivel sistémico, con la consecuente circulación en sangre periférica de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6, las cuales alcanzan el parénquima cerebral vía hematogena y activan la microglia, induciendo la producción *in situ* de estas citoquinas; lo que conlleva a la neuroinflamación y al desarrollo de la neurodegeneración que conduce al desarrollo de la EA (33–35).

A pesar de que la mayoría de los estudios se han enfocado en tratar de establecer una relación entre la EA y algún agente infeccioso (monoinfección). Bu y col. (29), observaron que personas seropositivas para más de un microorganismo (bacterias y virus), sufrieron mayor deterioro cognitivo y desarrollaron la EA. De acuerdo con lo anterior, se ha propuesto no considerar un único agente causal, sino pensar en un conjunto de infecciones crónicas que estarían induciendo la neuroinflamación.

#### **4.5 Participación de agentes infecciosos con la enfermedad de Alzheimer**

Dentro de los agentes infecciosos relacionados con la etiología de la EA se han propuesto: priones, virus, hongos, bacterias y parásitos

##### **4.5.1 Priones**

La proteína priónica (PrP<sup>sc</sup>) se considera el agente causal de las encefalitis espongiformes, luego de ser aislada por Stanley Prusiner, del tejido cerebral con esta patología. La PrP<sup>sc</sup> tiene diferentes tamaños, es autoreplicativa, transmisible (como otros agentes infecciosos), resistente a las proteasas y a los métodos convencionales de inactivación de ácidos nucleicos (36).

La enfermedad por priones comparte características clínicas, neuropatológicas y celulares con otras amiloidosis como la EA. En condiciones normales, la proteína priónica celular (PrP<sup>c</sup>) tiene funciones celulares importantes relacionadas con la protección frente a estrés oxidativo y ambiental, señalización transmembranal, procesos sinápticos o de adhesión celular (37). Cuando esta proteína cambia a la isoforma patogénica (PrP<sup>sc</sup>), se autoagrega formando placas priónicas, características de enfermedades humanas tales como el kurú y otras encefalopatías espongiformes como la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (38).

Ambas isoformas de la proteína priónica, PrP<sup>c</sup> y PrP<sup>sc</sup>, se han relacionado con la EA. La PrP<sup>c</sup> es una proteína fosfatidilinositol anclada a membrana (39) que se une a  $\beta$ A-42 en el tejido cerebral de pacientes con EA y como consecuencia, se activan cascadas de señalización implicadas en la interrupción súbita de la plasticidad sináptica (40,41), mientras que PrP<sup>sc</sup> se ha encontrado acumulada en forma de placas amiloides, microscópicamente similares a las placas seniles presente en pacientes con EA, lo que ha llevado a proponer que PrP<sup>sc</sup> y  $\beta$ A-42 posiblemente compartan vías involucradas en la generación y propagación de ambas proteínas (42).

Aunque el  $\beta$ A no es una proteína priónica, se acumula como ella, formando agregados resistentes a la degradación microglial y la transmisión entre células. En un modelo murino transgénico portador de la mutación E22G (mutación del ártico), al cual se le inoculó homogenizado de tejido cerebral de pacientes con EA, se observó el desarrollo de la angiopatía cerebral amiloidea, histopatológicamente similar a la observada en el tejido de pacientes con EA que portaban la misma mutación (43).

Se cree que la capacidad infecciosa del  $\beta$ A, es dependiente de la concentración de proteína soluble y agregada, así como de la cantidad y agregación en fibras; sugiriendo que la alteración en cualquiera de estas características, podría transformar cualquier amiloide en un prión (44).

Otra característica que comparten las enfermedades priónicas con algunos casos de EA es la progresión clínica rápida (entre 12 y 36 meses) (38). Adicionalmente, en otros organismos como bacterias y levaduras, la PrP<sup>c</sup> tiene un plegamiento estructural de láminas- $\beta$  similar al  $\beta$ A (45).

#### 4.5.2 Virus

Diferentes virus, principalmente de la Familia *Herpesviridae*, se han asociado a la etiología de la EA. Este grupo de virus son ubicuos y de doble cadena de ADN; tras la primoinfección, pueden permanecer de por vida en el hombre en forma latente. En general, no causan enfermedad severa en individuos inmunocompetentes a diferencia de lo que sucede en los inmunocomprometidos. Esta familia se subdivide en  $\alpha$ -*Herpesviridae* (VHS-1, VHS-2 y Varicella-Zoster -VHH-3),  $\beta$ -*Herpesviridae* (Citomegalovirus-VHH-5, VHH-6 y VHH-7) y  $\gamma$ -*Herpesviridae* (Eipstein-Barr (VHH4) y VHH-8). Si bien estos virus tienen diferentes células blanco (células epiteliales o monocitos), todos pueden tener tropismo por las células neuronales y causar muerte (46).

El VHS-1 ha sido el más estudiado en la búsqueda de su relación con la EA, posiblemente por una o varias de las siguientes características: i) la alta frecuencia de la infección en la población mundial; ii) la evasión de la respuesta inmune y permanencia en estado de latencia en las neuronas; iii) la frecuencia de la reactivación de las infecciones debido al deterioro del sistema inmune en adultos mayores (47–49).

La relación entre la infección por el VHS-1 y la EA se ha sugerido desde 1991 con el estudio realizado por Jamieson y col. (48) en el cual se detectó la presencia de ADN viral, en tejido cerebral de pacientes con EA. En estudios posteriores, se ha demostrado tanto la presencia de ADN viral en las cortezas temporales y frontales como anticuerpos tipo IgG en LCR o en suero de personas con la EA (49). En un metaanálisis realizado por Steel y col. (50), se determinó que existe un aumento en el riesgo de desarrollar EA cuando VHS-1 está presente en el tejido cerebral [OR 1.38; 95% CI 1.14–1.66] o cuando la infección se reactiva (HR 1.959, P 5.012) (34).

Los mecanismos que pudieran explicar la participación del VHS-1 en la patogénesis de la EA están relacionados con la interacción con proteínas celulares que se han implicado en el

desarrollo de la enfermedad. En un subanálisis realizado por Steel y col. (50), se demostró que la presencia del alelo *ApoEε4* y del VHS-1, incrementa el riesgo de desarrollar la EA [OR 2.71; 95% CI 1.08–6.80]. Además, el sinergismo entre *ApoEε4* y VHS-1 se demostró en un estudio con ratones transgénicos para *ApoEε4* que al ser infectados con el VHS-1 presentaron mayor expresión de genes de latencia del virus y mayor cantidad de genoma viral/genoma total en comparación con ratones *knockout* o portadores del genotipo *ApoEε3* (51). Es posible que la susceptibilidad a la infección por el VHS-1 en presencia del alelo *ApoEε4*, pueda explicarse por menor afinidad de la APOE4 por el receptor heparán sulfato en comparación con el VHS-1, favoreciendo así el ingreso del virus a la célula (52).

Por otro lado, se ha demostrado que la infección por VHS-1 induce disfunción sináptica por disminución en las proteínas presinápticas (sinapsina-1 y sinaptofisina) y en la transmisión sináptica en neuronas corticales (51). Otro mecanismo que se ha descrito y que puede explicar la pérdida de la función sináptica que ocurre en la EA es la interacción de la proteína US11 del VHS-1 con el extremo C-terminal de la PPA afectado el tráfico vesicular dentro de la neurona (53). El VHS-1 también parece promover la acumulación de  $\beta$ A intracelular por medio de su acción sobre GSK3 (kinasa que fosforila a TAU) (51).

Otro de los hallazgos que involucra al VHS-1 en la etiología de la EA, es la activación de la vía amiloidogénica de hidrólisis de PPA mediado por un aumento en los niveles de las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa (53). También se ha demostrado que  $\gamma$ -secretasa tiene actividad sobre la nectina-1, un co-receptor celular que se une a la glicoproteína D de VHS-1; es posible que esta unión afecte la función de la enzima y en consecuencia haya mayor producción de  $\beta$ A (54). Asimismo, el hecho de que VHS-1 se una a las apolipoproteínas APOE y APOA1 y a la vez este complejo al receptor LRP1, puede interferir en una de las rutas de eliminación de  $\beta$ A (55).

Es importante tener presente que la secuencia interna de la glicoproteína B del VHS-1, estructuralmente es similar a la región C terminal del  $\beta$ A, lo que le confiere la propiedad de agregarse formando fibrillas y placas, similares a las que se observan en la EA (55).

Otros virus de la familia *Herpesviridae* como VHS-2, VHS-6 y VHS-7 también se han involucrado en la etiología de la EA. De acuerdo con el estudio llevado a cabo por Kristen y col. (56), el VHS-2 estimula la acumulación de  $\beta$ A y pTAU en células de neuroblastoma SK-N-MC e inhibe la vía no amiloidogénica de procesamiento de la PPA. Asimismo, Ben Readhead y col. (57), mediante un análisis de asociación de genes (GWAS del inglés Genome-wide association study) en cohortes independientes, encontraron una mayor prevalencia de los virus VHS-6 y VHS-7 en tejido cerebral de pacientes con EAE en comparación con los controles; específicamente el VHS-6A se asoció con moléculas que participan en el desarrollo y la progresión de la EAE.

Así como sucede con VHS-1, proteínas de los virus VHS-8 y VHH-4, interaccionan con proteínas implicadas en el metabolismo de TAU y  $\beta$ A como AKT1, APP, MAPT y APOE. Esta coexistencia aumenta la probabilidad de desarrollar la EA (58).

La relación del Citomegalovirus (CMV) con la EA, sólo se ha basado en la detección de anticuerpos tipo IgG en pacientes con deterioro cognitivo y demencia. Barnes y Col. (59), en

un estudio de cohorte en el cual se determinó la presencia IgG anti-HSV1 y anti-CMV en suero de 849 participantes, observaron que hay un incremento del riesgo de padecer EA (riesgo relativo: 2.15;[1.42–3.27]) luego de una infección por CMV.

La participación del Virus de Epstein-Barr (VHH-4) se ha sugerido por la capacidad para activar la producción de proteínas amiloidogénicas (amilina, PPA y  $\beta$ A) en cultivos de astrocitos primarios de médula espinal (52).

### 4.5.3 Bacterias

Se ha propuesto que diferentes especies bacterianas, en particular las que causan infecciones crónicas como *Chlamydomphila pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori*, Actinomycetes y *Cutibacterium acnes*, participan en la fisiopatología de la EA posiblemente por la activación de una respuesta inmune local o sistémica (60). *Chlamydomphila pneumoniae* es una bacteria intracelular que causa neumonía atípica con capacidad de infectar células del sistema nervioso como astrocitos, neuronas y microglia (61). Esta bacteria puede diseminarse por vía hematogena y alcanzar el parénquima cerebral a través de un mecanismo paracelular, infectando células endoteliales que conforman la BHE o mediante la infección de monocitos, utilizándolos como vehículo, también conocido como “caballo de Troya” (62). Además, en tejido cerebral de pacientes con la EAE tardío, se han detectado tanto genes como formas bacterianas viables o metabólicamente activas de *C. pneumoniae* (61). Asimismo, esta bacteria afecta la expresión de la proteína ocludina, un componente principal de las uniones de las células endoteliales, generando una afectación de la permeabilidad paracelular (62), situación que se presenta en la EA. Adicionalmente, Lim y col. (63), mediante la infección de monocitos *in vitro* con *C. pneumoniae*, demostraron que la bacteria induce aumento en la expresión de genes y secreción de citoquinas, implicados en respuesta inflamatoria. La infección por esta bacteria aumenta 5 veces el riesgo de desarrollar EA (OR: 5.66; 95% CI: 1.83-17.51) (60).

*Treponema pallidum*, es una bacteria intracelular neurotrópica que además de ser el agente etiológico de la sífilis, persiste en el tejido cerebral en donde causa infección crónica e inflamación que progresivamente desencadena demencia y manifestaciones neuropsiquiátricas (neurosífilis) (64). En este estado de la sífilis, se han descrito cambios neuropatológicos como amiloidosis y placas seniles corticales, similares a los que se observan en la EA (65). Así como sucede con otras bacterias, *T. pallidum* degrada la matriz extracelular y daña uniones estrechas del endotelio afectando la integridad de la BHE, como sucede en la EA (66). La infección por *T. pallidum* representa un riesgo 10 veces mayor de deterioro cognitivo y de padecer EA (OR: 10.61; 95% CI: 3.38-33.29) (60). Otras especies de *Treponema* que causan enfermedades periodontales como *T. denticola*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum* y *T. medium* también se han detectado o aislado de cerebros de pacientes con esta enfermedad neurodegenerativa (67).

*Borrelia burgdorferi*, así como sucede con *T. pallidum*, causa atrofia cortical en etapas tardías de la enfermedad de Lyme. La relación entre *B. burgdorferi* y la EA, al igual que con otros agentes infecciosos, se ha basado tanto en la detección de ADN, de proteínas bacterianas y de bacterias colocalizadas con las placas seniles y ovillos neurofibrilares en tejido cerebral

de personas que padecieron la EA, como con la detección de anticuerpos en suero y en LCR (67).

Finalmente, las espiroquetas forman biopelículas *in vitro* con características morfológicas y bioquímicas similares a las placas seniles que se observan en la EA (68). Además, estas bacterias expresan una forma de PPA similar a la que se encuentra en humanos, sugiriendo que podrían participar en la acumulación amiloidea en la EA (68). Por su parte, Allen y col. (69), demostraron *in vivo* colocalización de biopelículas bacterianas y el  $\beta$ A, así como presencia de ADN bacteriano en las placas seniles.

Debido a la proximidad anatómica de la cavidad oral con el cerebro, se ha sugerido la posibilidad de que algunas especies bacterianas implicadas en infecciones periodontales puedan relacionarse con la etiología de la EA (70). En una revisión sistemática con metaanálisis, Leira y col. (71), encontraron asociación entre la enfermedad periodontal y la EA (OR 1.69, 95% CI 1.21-2.35) y un incremento del riesgo cuando la infección es severa (OR 2.98, 95% CI 1.58-5.62). Asimismo, en un estudio retrospectivo realizado por Chen y col. (72) en Taiwan, con 9291 pacientes, se demostró que la infección periodontal crónica incrementa el riesgo de padecer la EA (HR ajustado de 1.707, 95% CI 1.152–2.528,  $p = 0.0077$ ). En otro estudio llevado a cabo por Laugisch y col. (70) con pacientes con EA temprano y tardío, se observó que las personas que tuvieron infección oral por *Treponema* spp, *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, presentaron tanto niveles elevados de anticuerpos contra estas bacterias como la presencia de TAU y  $\beta$ A en LCR.

Específicamente *P. gingivalis* o sus toxinas pueden alcanzar el tejido cerebral a través del nervio trigémino o del nervio olfatorio, activar la respuesta inmune y causar daño a la BHE (66). La pérdida de integridad de la BHE facilita la colonización de los lóbulos frontal y temporal por *P. gingivalis* (68). La asociación entre *P. gingivalis* y desórdenes cognitivos, demencia y EA también fue respaldada por el estudio de Carter y Col. (73), en el cual se demostró interacción génica entre genes de *P. gingivalis* y genes asociados a desórdenes cognitivos, demencia y EA.

Aunque *H. pylori* es una bacteria que se suele encontrar en la capa mucosa del estómago y es un factor de riesgo para el desarrollo de gastritis crónica, úlceras gástricas y neoplasias (64); también se ha relacionado con la etiología de la EA (OR:1.71 (95% CI 1.17-2.49)) (74). Sin embargo, con los resultados del estudio de Fani y Col. (75), que consistió en la cuantificación de IgG contra *H. pylori* a 4125 participantes, durante 13 años, no fue posible confirmar asociación entre el título de anticuerpos y el desarrollo de la EA (HZ: 1.04 [0.90-1.21]). Las bacterias a las cuales se les ha atribuido algún papel en la etiología de la EA, con excepción de *H. pylori*, tienen alguna relación directa con las neuronas. Sin embargo, se ha demostrado que infecciones bacterianas periféricas o sistémicas también pudieran ser la causa de la EA. Por ejemplo, McManus y Col. (76), indujeron una infección respiratoria por *Bordetella pertussis* en ratones APP/PS1 y ocho semanas después de la infección, se observó infiltración de células T, activación de células gliales y aumento en el depósito de  $\beta$ A en el

parénquima cerebral. Asimismo, Zhan y col. (77), detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre la cantidad de proteína del pili (K99) de *Escherichia coli* en muestras de cerebro de personas con la EA y sin esta demencia. Además, encontraron lipopolisacárido (LPS) colocalizado con placas seniles. Otro estudio con el que se pudo demostrar asociación entre la infección bacteriana periférica y la EA fue el de Wendeln y col. (78), en el cual se inocularon ratones transgénicos, con la mutación APP23, con LPS; en el tejido cerebral de los ratones, se observó mayor cantidad del  $\beta$ A y de muerte neuronal que en grupo control. Además, se observó que el LPS incrementa la acumulación de pTAU a través de la vía de señalización de ciclina dependiente de kinasa 5 (cdk5).

Otros hallazgos bacterianos han permitido sugerir la asociación de estos microorganismos con la EA como es el caso de producción de curli por enterobacterias. Curli corresponde a una fibra de tipo amiloide extracelular que además de estar implicada en producción de biopelícula y participar en la adhesión bacteriana a la célula hospedera, estructuralmente se compone de 20 residuos de aminoácidos dispuestos en forma de lámina  $\beta$  perpendicular al eje de la fibra de manera similar al  $\beta$ A (79). *Streptomyces coelicolor* es otra bacteria que usa las fibras de tipo amiloide para disminuir la tensión superficial del agua y permitir el crecimiento del filamento aéreo (79).

#### 4.5.4 Hongos

Diferentes estudios han sugerido asociación entre la EA e infecciones por hongos por la detección de estructuras fúngicas (hifas y/o blastoconidias) en tejido cerebral y por la detección de anticuerpos en sangre periférica y LCR, así como de componentes celulares fúngicos como quitina, enolasa o  $\beta$ -tubulina en pacientes con EA (80,81). Lomiguen y col. (82), detectaron niveles elevados de quitina en el SNC de pacientes con EA. Este polisacárido es tóxico para las neuronas por lo que se cree que puede participar en el desarrollo de la EA. En estudios histológicos de cerebros de personas con EA, además de los marcadores típicos de la demencia, se han encontrado cuerpos amiláceos, que de acuerdo con Pisa y Col. (83), podrían estar compuestos de proteínas fúngicas.

Entre los hongos implicados se encuentran especies de la microbiota residente o transitoria de la piel o mucosas como *Candida glabrata*, *C. famata*, *C. albicans*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*, *Malassezia globosa*, *M. restricta*, *Saccharomyces cerevisiae* o especies de hongos ambientales como *Phoma betae*, *Syncephalastrum racemosum*, *Cladosporium* spp, *Neosartorya hiratsukae* y *Sclerotinia borealis* (84). Sin embargo, llama la atención que en los estudios que han tenido como objetivo justificar un origen micótico de la EA, no han encontrado especies como *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus* o *Cryptococcus* spp que causan infecciones en el sistema nervioso central (85).

#### 4.5.5 Parásitos

Hasta la fecha, el único parásito que se ha asociado con la EA es *Toxoplasma gondii*, sin embargo, la evidencia experimental no es lo suficientemente sólida para establecer su relación con la enfermedad (86).

#### 4.6 Actividad antimicrobiana del péptido $\beta$ -Amiloide

El  $\beta$ A es un péptido altamente conservado a través de la evolución de las especies, por lo que se ha propuesto que podría participar en funciones vitales (87). El  $\beta$ A es una fibra proteica, no ramificada, con una subestructura repetitiva de láminas  $\beta$  que se extienden de manera perpendicular al eje de la fibra. Su estructura secundaria, generalmente, está formada por residuos de 5-10 aminoácidos unidos entre sí por puentes de hidrógenos entre los extremos amino y carboxilo terminal (45). Esta conformación o motivo estructural de láminas  $\beta$  entrecruzadas, altamente conservadas, se conoce como plegamiento tipo amiloide, y corresponde a la estructura supersecundaria que adopta una proteína; dicha conformación dependerá entonces de las interacciones específicas de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, de la secuencia específica del polipéptido y las características físico-químicas (pH, concentración de sales, temperatura o algunas condiciones patológicas), que las hacen auto agregarse para adoptar este motivo estructural de lámina  $\beta$  (estructura supersecundaria) (45).

Las fibras amiloides también se han observado en las trampas extracelulares de neutrófilos o NETs (del inglés “Neutrophil extracellular traps”), los cuales son una red de cromatina que liberan los neutrófilos para atrapar los microorganismos patógenos; sugiriendo que el amiloide puede tener una participación en la respuesta inmune (79).

La organización en forma de láminas  $\beta$ , se ha observado también en algunas familias de péptidos antimicrobianos (AMPs del inglés “*antimicrobial peptides*”). Péptidos de este tipo son la primera línea de defensa, de amplio espectro, del hospedero contra invasiones microbianas. Algunos AMPs, tienen similitudes estructurales y químicas (hidrofobicidad) con el  $\beta$ A (88).

Una vez los AMPs se unen a una membrana celular, inicia un proceso de auto agregación o multimerización, gracias a las interacciones proteína-proteína o proteína-lípido (88). Si bien este mecanismo molecular de unión a la membrana celular no se conoce de forma detallada, se infiere que la secuencia de eventos es: i) Atracción e interacción inicial hacia la superficie de la membrana, ii) plegamiento en su forma activa, iii) acumulación en la superficie de la membrana y iv) autoensamblaje u oligomerización (89). Este autoensamblaje u oligomerización puede ser en forma de  $\alpha$ -hélice (catelicidina (LL-37)), lámina- $\beta$  ( $\alpha$ -defensina (HD6), proteína sérica amiloide A, familia de apolipoproteínas, protegrina 1 y las lisozimas)) o ambos, péptidos  $\alpha\beta$  ( $\beta$ -defensinas (HD2 y 3)) (90). El propósito de estos cambios conformacionales es aglutinar e impedir la invasión por microorganismos, demostrando que la eficiencia de la actividad biológica es dependiente de la estructura (89,91).

Considerando las similitudes biológicas entre el  $\beta$ A y algunos AMPs (estructura y unión a membranas celulares) y los resultados de estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha propuesto que el  $\beta$ A tiene una función biológica relacionada con la respuesta inmune de tipo innata (90). Soscia y col. (92), encontraron mayor actividad anti *C. albicans* y antibacteriana del  $\beta$ A en comparación con el AMP LL-37. De igual forma, Spitzer y Col. (93), comprobaron que entre las variantes amiloidogénicas del  $\beta$ A, el  $\beta$ A-42 tiene mayor actividad contra *C. albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) y *Staphylococcus aureus*. Asimismo, Kumar y col. (94), demostraron que el  $\beta$ A se une a los carbohidratos de la pared de *Salmonella typhimurium* impidiendo la adhesión bacteriana a la célula blanco y que, homogenizados de tejido cerebral de pacientes con EA, fueron más activos *in vitro* contra bacterias y levaduras que el  $\beta$ A sintético y el AMP LL-37.

Un estudio *in vivo* realizado en ratones 5XFAD y *C. elegans*, un modelo usado para el estudio de la EA demostró que la oligomerización del  $\beta$ A es necesaria para su acción antimicrobiana y que las fibras de  $\beta$ A inhiben la adhesión a la célula hospedera y median la aglutinación en *Candida albicans* y *Salmonella entérica* serotipo *Typhimurium* (93)

Estudios *in vitro* han permitido identificar que el  $\beta$ A tiene actividad anti-VHS-1 y reacciona contra las proteínas H3N2 y H1N1 del virus de la influenza. En el primer modelo viral afecta el ingreso del virus a fibroblastos, células epiteliales y células neuronales posiblemente por la competencia por los receptores celulares determinada por la homología del péptido con la secuencia de la región transmembranal de la glicoproteína B viral (94), en el caso del virus de la influenza, se ha demostrado que  $\beta$ A 40 y  $\beta$ A 42: i) inhiben el ingreso de los virus a la célula; ii) disminuyen el número de partículas virales en el sobrenadante de los cultivos y iii) inducen la agregación de los virus (95).

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La proporción de pacientes con 60 años o más que tienen algún tipo de demencia es del 5-8 % (96), por lo que, a medida que aumenta la expectativa de vida en el mundo, la aparición de este tipo de enfermedades será más común. En el año 2019, aproximadamente 50 millones de personas a nivel mundial fueron diagnosticadas con demencia y para el año 2050 se espera que los casos se tripliquen (97). La mayoría de estos pacientes viven en países de ingresos bajos y medios, convirtiéndose en uno de los principales problemas sanitarios y sociales para los gobiernos (98). En este sentido, el informe ADI/Bupa (2013) (99), indicó que para el año 2010, 3.429.000 personas tuvieron esta patología en Latinoamérica y el Caribe, con una proyección de un aumento hasta del 368% para el año 2050.

Colombia no es ajena a este panorama mundial, las encuestas nacionales revelaron una prevalencia de demencia de 13.1/1000 habitantes (IC95%:8,5-19,3) (100). Posteriormente, se estimó una prevalencia global de 17.6 % de deterioro cognitivo leve en el 2015 (101).

La EA se encuentra entre las 10 causas de mortalidad a nivel mundial. Sin embargo, la etiología aún se desconoce y por lo tanto no se dispone de un tratamiento eficaz (102). En

Colombia a pesar de la presencia del grupo más grande a nivel mundial de EA familiar (EAF) asociado a mutaciones en el gen de presinilina 1 (23,103), no se tienen datos poblacionales actualizados que muestren el comportamiento epidemiológico específico de la demencia tipo Alzheimer en el país.

El aumento esperado en el número de casos nuevos de pacientes con demencia en los próximos años, genera una alarma en los sistemas de salud a nivel mundial, también lo hace en los sistemas financieros, ya que estos pacientes dejan de ser productivos económicamente y este hecho se suma a que se vuelven completamente dependientes del cuidado de un tercero (familiar o personal de salud), impidiendo en la mayoría de los casos, que la persona responsable del cuidado pueda trabajar y generar ingresos. Según la Asociación mundial de Alzheimer, en el 2016 el costo del cuidado de estos pacientes fue de \$236 billones de dólares (104).

El aumento esperado en el número de casos de EA y los costos de su cuidado, han obligado a la comunidad científica a reforzar los esfuerzos en la búsqueda de opciones terapéuticas que impidan la aparición y la progresión de los síntomas. A la fecha el tratamiento se ha orientado a la eliminación del  $\beta$ A y no ha tenido éxito en el control de la progresión clínica de la EA (25). Estos resultados han llevado a replantear el origen de esta demencia y a proponer que puede existir un evento previo que induce agregación de  $\beta$ A y TAU.

Desde el punto de vista neuropatológico, en este tipo de demencia se han descrito tres marcadores: la acumulación de  $\beta$ A, la acumulación de pTAU y la inflamación crónica. En el caso de la EA de origen familiar por mutación PSEN1-E280A, desde el nacimiento se presenta bajos niveles de acumulación, del péptido  $\beta$  (105); posteriormente éste se detecta en LCR o en el tejido cerebral por medio PET-Amiloide. A partir de la cuarta década de la vida, aproximadamente, se presenta la acumulación de pTAU, neuroinflamación y la aparición de primeros síntomas cognitivos (alteración de la memoria, lenguaje, entre otros), lo que finalmente progresará a un estado de demencia (23,103). Sin embargo, a la fecha, esta progresión de la enfermedad no es equiparable en los pacientes con EAE, debido a que aún no es posible determinar el factor detonante de la acumulación de estas proteínas y la inflamación asociada ni el momento en el que se presentan.

La detección directa o indirecta de agentes infecciosos en pacientes con EA y las propiedades antimicrobianas, principalmente del  $\beta$ A, han servido de base para pensar que la exposición a lo largo de la vida a diferentes agentes infecciosos o a sus metabolitos, podría ser el evento inicial en la EA y que los agregados proteicos observados en el tejido cerebral y la neuroinflamación, sean la consecuencia de la activación prolongada del sistema inmune.

En Colombia y a nivel mundial, la investigación en la EA se ha dirigido principalmente a comprender los mecanismos fisiopatológicos de las proteínas  $\beta$ A y pTAU en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, no se ha estudiado sobre la posible etiología infecciosa de la EA y si puede o no tener un impacto en el manejo terapéutico de estos pacientes. Por lo

anterior, este trabajo pretende indagar sobre la posible asociación de la EA y agentes infecciosos en personas que murieron por la EA en Colombia.

Según la hipótesis sobre el origen infeccioso de la EA, esta demencia se produce por (32), daño neurológico directo, por agentes infecciosos neurotrópicos o que llegan al parénquima cerebral desde otro sitio del cuerpo, o indirecto a través de metabolitos que estimulan la respuesta inmune (106). Otra propuesta para la etiología infecciosa de la EA es la ocurrencia de infecciones crónicas o recurrentes que activan la respuesta inmune a través de los diferentes receptores de reconocimiento de patrones que activan vías de señalización que llevan a la producción de citoquinas proinflamatorias, activación permanente de la microglia y migración de monocitos y células T hacia el parénquima cerebral dando como resultado un estado inflamatorio (107).

Los agentes infecciosos también podrían estar propiciando la acumulación de  $\beta$ A y pTAU (marcadores típicos de la EA), posiblemente ejerciendo una función antimicrobiana, en especial al  $\beta$ A (92,94,108). La consecuencia de este evento podría ser la disrupción en la homeostasis del microambiente celular y la neurodegeneración.

Por lo anterior, se hace necesario dilucidar la participación directa o indirecta de los agentes infecciosos en el desarrollo de la EA, debido a que, si se tiene en consideración que la mayoría de los individuos mayores de 50 años, presentan infecciones crónicas por lo menos de un agente infeccioso como el VHS-1 (96) y sumado a la edad avanzada, significaría que más de la mitad de la población mayor tendría alto riesgo de padecer este tipo de demencia. Además, a la fecha no existen estudios publicados que busquen de forma simultánea, la presencia de diferentes agentes infecciosos directamente en el tejido encefálico. Por esto y gracias a la disponibilidad de tejido encefálico con EA almacenado en el biobanco del grupo de Neurociencias de Antioquia, lo cual asegura contar con un tamaño de muestra aceptable, este estudio busca contribuir con la investigación sobre el origen infeccioso de la EA y la posible acción biológica del péptido  $\beta$ A como péptido antimicrobiano. Adicionalmente, se podría aportar con evidencia científica que promueva el diseño de terapias enfocadas a la eliminación temprana de los agentes infecciosos o hacia la modulación de la respuesta inmune que pudieran estar generando la neurodegeneración propia de la EA.

## **6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué agentes infecciosos pueden ser detectados en tejido encefálico *post mortem* en personas afectadas con enfermedad de Alzheimer en comparación con un grupo no afectado?

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 General**

Describir las características clínicas de un grupo de personas con enfermedad de Alzheimer y los hallazgos neuropatológicos, la presencia de agentes infecciosos y su colocalización con placas seniles en tejido encefálico *post mortem*.

### **7.2 Específicos**

1. Analizar los datos clínicos de los casos y controles incluidos en el estudio.
2. Detectar e identificar agentes infecciosos en tejido encefálico *post mortem* proveniente de personas afectadas y no afectadas por la EA.
3. Describir la colocalización de bacterias con placas seniles en tejido encefálico.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Tipo de estudio y diseño muestral**

Este es un estudio descriptivo, de casos y controles. El tamaño de la muestra se seleccionó por conveniencia, teniendo en cuenta la disponibilidad de encéfalos almacenados en el biobanco del grupo de Neurociencias de Antioquia (GNA). Se seleccionaron 22 encéfalos en los cuales se confirmó la EA (10 casos con EAE y 12 casos con EAF tardío), además se incluyeron 10 encéfalos de personas que murieron sin afectación neurológica (controles).

### **8.2 Criterios de inclusión**

Se seleccionaron, para cada caso, muestras de hemisferio cerebral conservado en formaldehído al 10% para el diagnóstico neuropatológico y congelado a -80 °C para realizar la búsqueda de los agentes infecciosos, de personas con diagnóstico clínico y neuropatológico, de EA. Los controles correspondieron a pacientes que *pre mortem* no presentaron afectación neurológica ni enfermedad de origen infeccioso.

### **8.3 Análisis de datos clínicos**

Se realizó un análisis retrospectivo de las historias clínicas disponibles en el GNA de los casos con y sin EA, para la creación de una base de datos con las siguientes variables:

- Sociodemográficas: Sexo y edad al momento del deceso
- Clínicas asociadas a la EA: Tiempo de evolución (años) de la enfermedad, síntomas cognitivos reportados en el momento del diagnóstico, evaluación neuropsicológica

(FAST score, del inglés “*Functional Assessment Staging*”) (121). Esta herramienta neuropsicológica clasifica la progresión de la enfermedad en siete estadios (1-7) y subestadios (a-f) del deterioro cognitivo de los pacientes y causa probable de muerte.

- Hallazgos macroscópicos del encéfalo: Peso global del encéfalo, peso de hemisferio cerebral izquierdo, peso de hemisferio cerebral derecho, peso de contenido de fosa posterior, región o regiones cerebrales con predominio de atrofia y alteraciones morfológicas en sistema vascular.
- Antecedentes:  
Tóxicos: Consumo de licor, cigarrillo y sustancias alucinógenas.  
Patológicos: Neoplasias, diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades reumatológicas y antecedente de trauma craneoencefálico.
- Infecciones o hallazgos sugestivos previo al momento del deceso: Reporte de infección urinarias u otras pruebas microbiológicas, estado de piezas dentales, tratamiento con antibióticos, cefalea, fiebre, signos de irritación meníngea, alucinaciones, *delirium*, síntomas respiratorios.
- Otros hallazgos relacionados con infección: Presencia en el cadáver de gastrostomía, escaras o sonda vesical.

#### **8.4 Diagnóstico neuropatológico de la enfermedad de Alzheimer**

El diagnóstico de la EA se basó en el protocolo estandarizado en el biobanco del GNA cual se basa en los criterios internacionales del Consenso de Recomendaciones para el diagnóstico *post mortem* de la enfermedad de Alzheimer (CERAD del inglés Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease) (110), del grupo de trabajo del instituto Regan (111) y en los publicados por H. Braak y E. Braak (112).

Todos los cerebros fueron pesados y se realizó una descripción de los principales hallazgos observados en forma macroscópica en las estructuras cerebrales. Posteriormente, de acuerdo al protocolo del biobanco del GNA: de cada encéfalo se obtuvieron 13 fragmentos de tejido de las siguientes regiones cerebrales: giro frontal medio, giro temporal superior, giro temporal medio, lobulillo parietal inferior, corteza occipital con corteza visual primaria, hipocampo en uncus, hipocampo a nivel de cuerpo geniculado lateral, tálamo/hipotálamo, núcleo caudado, amígdala, mesencéfalo, puente en locus coeruleus y corteza cerebelar. Los tejidos se incluyeron en parafina, se obtuvieron cortes de 4  $\mu\text{m}$  y se realizó inmunohistoquímica con los anticuerpos monoclonales clon BAM10 (1:100) y clon AT8 (1:200) (Invitrogen, EE. UU) para  $\beta\text{A}$  y pTAU, respectivamente. La detección, se realizó con el estuche UltraView Universal DAB Detection: 760-500 (Roche, EE. UU) IRefy el sistema automatizado BenchMark GX Ventana (Roche, EEUU), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El diagnóstico de la EA se basó en la detección de placas seniles y de ovillos neurofibrilares en el tejido cerebral.

## **8.5 Búsqueda e identificación de agentes infecciosos en tejido cerebral**

### **8.5.1 Obtención de las muestras de ADN**

En primera instancia, se utilizaron 12 muestras (3 controles y 9 casos con EA) las cuales correspondían a un “pool” de ADN obtenido de diferentes regiones cerebrales (corteza frontal, temporal, parietal y occipital, hipocampo y corteza cerebelar) previamente obtenidas y almacenadas en el biobanco del GNA. Considerando que los resultados de estas 12 muestras fueron negativos, se decidió extraer ADN específicamente de corteza temporal de las 22 muestras restantes. Se seleccionó corteza temporal debido a que es una de las regiones cerebrales más afectada por la enfermedad y de las primeras en verse afectadas (110,112).

La extracción de las muestras se llevó a cabo con el estuche Invisorb® Spin Tissue (Strattec Molecular, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

El ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo scientific, EE.UU.). La pureza y calidad se verificaron calculando la relación entre absorbancias (A260/A280) y por electroforesis en gel de agarosa. A partir del ADN obtenido se procedió a realizar la búsqueda de los agentes infecciosos por microarreglos y PCR.

### **8.5.2 Detección e identificación de agentes infecciosos por la tecnología de microarreglos**

Las muestras de ADN (50-500 ng/μL), se enviaron al laboratorio Lawrence Livermore National Laboratory (EE. UU) para la detección de virus, bacterias, hongos y parásitos usando la plataforma Axiom™ Microbiome Array (Thermo scientific, EEUU). La plataforma contiene sondas específicas para identificar aproximadamente 12.000 especies. El límite de detección es de 1.000-10.000 copias de ADN microbiano en una cantidad de ADN total humano de 1-10 ng.

### **8.5.3 Detección de hongos por PCR en tiempo real**

Usando una PCR panfúngica, las 32 muestras de DNA fueron procesadas para la amplificaron de la región ITS1 del ADN ribosomal empleando iniciadores universales (113). Esta técnica utiliza iniciadores universales que permiten detectar cualquier hongo presente en la muestra. Se amplifica la región ITS1, empleando los iniciadores ITS1 e ITS2, mediante PCR en Tiempo Real. El equipo utilizado fue CFX96 (Bio Rad, Madrid, Spain). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 μL y contenía: 0,8 μM de cada primer, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub> y SYBR Green I binding dye (Ecogen, Bioline, Madrid, España). Se realizó también un programa de melting desde 65°C hasta 97°C. Se emplearon 2 μL de ADN de cada muestra. En cada experimento se incluyó ADN de *Aspergillus fumigatus* como control positivo del experimento incluyendo diferentes concentraciones de ADN (1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg) y 2 μL de agua como control negativo.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un paso inicial de 10 minutos a 95 °C, luego 50 ciclos a 95 °C por 10 segundos, 54 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, finalmente una fase de 30 segundos a 40 °C. Los resultados se consideraron positivos cuando la señal fluorescente fue superior a la señal basal, obteniéndose un ciclo de amplificación (Cq). Se analizó la curva de melting generada se verificó la calidad de los productos amplificados en un gel de agarosa al 2% (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).

#### **8.5.4 Detección de virus por PCR multiplex en tiempo real**

Treinta y dos muestras de ADN fueron analizadas para la detección de VHS-1 o VHS-2, VHH3, VHH-4, VHH-5, VHH-6, VHH-7, VHH-8 y Enterovirus usando una PCR multiplex en tiempo real en equipo Rotor-Gene Q MDx (US) (QIAGEN, España), siguiendo el protocolo usado del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

### **8.6 Aislamiento e identificación de bacterias aerobias y hongos**

#### **8.6.1 Bacterias aerobias**

Con el objetivo de aislar bacterias aerobias, se tomó un gramo de tejido cerebral, a partir de la misma zona en donde se obtuvieron las muestras para la extracción del ADN, en 13 casos y siete controles, se maceraron y cultivaron en el medio líquido Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C durante 24, 48 o 72 h. Posteriormente, las muestras en las que se observó turbidez se cultivaron en agar sangre y agar MacConkey (2 cultivos por muestra) e incubadas a 37 °C por 24 h. Las colonias que predominaron en los cultivos fueron identificadas por espectrometría de masas por ionización/desorción mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, acrónimo del inglés “*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight*”).

#### **8.6.2 Hongos**

A partir de los macerados, indicados anteriormente se realizaron cultivos en agar Sabouraud (MDM, Colombia) y se incubaron a 25 °C durante 5 días. Los cultivos se revisaron diariamente en los que se observó crecimiento de colonias con las mismas características, por lo menos en tres sitios de cinco inoculados, se procedió al aislamiento de las colonias y a la identificación por MALDI-TOF,

### **8.7 Colocalización de bacterias con placas seniles.**

En el transcurso del estudio, se encontraron dos casos con diagnóstico de EAF de origen temprano asociados a mutaciones en PSEN1 (Tabla 1), los cuales por defectos de fijación en formaldehído al 10% presentaron múltiples cavitaciones macroscópicas secundario a colonización por bacilos Gram positivos. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se decidió

tratar de replicar el evento en tejido cerebral *in vitro*. Para esto, se seleccionaron tres casos adicionales con EAF de origen temprano, de los que se contaba con información en la historia clínica de acumulación de  $\beta$ A en el tejido encefálico *pre mortem* mediante PET-amiloide o por la confirmación de la presencia de la mutación E280A, la cual es una variante genética patogénica para EAF precoz (Tabla 1). El índice post mortem (período comprendido entre el momento del fallecimiento y la extracción del encéfalo) en estos casos fue menor a seis horas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de los casos con colonización por bacterias.

	Caso											
	1		2		3		4		5			
Mutación	PSEN1-E280A		PSEN1-I152L		PSEN1-E280A		PSEN1-E280A		PSEN1-E280A			
Índice <i>post mortem</i> (h)	14.6		17		3.2		6		4			
Bacteria	NI*		NI*		<i>L.</i> <i>rhamnosus</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>L.</i> <i>rhamnosus</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>L.</i> <i>rhamnosus</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>		
Tiempo de infección (h)	No aplica		No aplica		24	48	24	48	24	48	24	48

\*No identificada.

En los otros tres casos, se tomó un fragmento de la corteza frontal de cada caso y estos fueron inoculados en las superficies corticales y subcorticales con 200  $\mu$ L de una suspensión bacteriana al 0.5 McFarland de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 por separado. Luego, las muestras fueron incubadas en medio DMEM (“*Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium*”) a 37 °C por 12, 24 o 48 h. Finalmente, las muestras se incluyeron en parafina y se realizaron cortes con los cuales se realizó doble tinción: inmunohistoquímica para la detección del  $\beta$ A y coloración de Gram (Cristal violeta al 1% por 3 min, lugol por 3 min, alcohol absoluto por inmersión) para visualizar las bacterias, esto con el fin de evaluar si las bacterias se observaban de forma aledaña a las placas seniles.

Las placas histológicas fueron escaneadas usando el escáner VENTANA DP 200 (Roche, EE. UU). Se cuantificó el número de acúmulos bacterianos con y sin  $\beta$ A en toda la lámina usando el software Quantitative Pathology & Bioimage Analysis (QuPath) versión 0.2.3 (Reino Unido). Luego se tomaron hasta 15 capturas de dichos acúmulos con y sin  $\beta$ A por cada caso y se determinó el área usando el software Fiji Is Just ImageJ (FIJI) (EE. UU).

## 8.8 Análisis estadístico

Todos los datos recolectados fueron tabulados en MS Excel Office para su posterior análisis usando JAMOVI versión 1.8. Se realizó un análisis univariado usando medidas de frecuencia (media y porcentaje) para la descripción de la población. Adicionalmente, se realizó un análisis de correspondencia múltiple para establecer el porcentaje de acuerdo con la detección de agentes infecciosos entre microarreglos, PCR y aislamiento microbiológico e

identificación por MALDI-TOF, mediante una tabla de 3x2. Además, se realizó un análisis bivariado con las áreas de los acúmulos bacterianos y el  $\beta$ A, utilizando U de Mann Whitney y una correlación de Spearman para las variables, que al aplicar la prueba de Shapiro Wilk, se confirmó que no tenían distribución normal.

### **8.9 Consideraciones éticas**

Este estudio evaluó procesos biológicos, en búsqueda de obtener un vínculo entre causa-enfermedad y por esto se ajusta a la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud. Por la cual se establecen las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Además, se acoge al comité de ética de la Sede de Investigación Universitaria SIU, el cual resuelve que no es necesario presentar un aval ético debido a que no se trabaja con seres vivos (humanos) o material a ser usado en humanos, por lo cual no aplica los Códigos de ética médica de Núremberg ni de Helsinki.

## **9. RESULTADOS**

### **9.1 Características clínicas de las personas afectadas y no afectadas por la enfermedad de Alzheimer**

En la Tabla 2 se presentan los resultados del análisis retrospectivo de los datos clínicos de los casos y de los controles incluidos en el estudio, obtenidos de las historias clínicas. En los casos con diagnóstico histológico de EA se observó un predominio del sexo femenino (90.9%) mientras que en los controles fue el masculino (60%). La edad promedio de ambos grupos fue superior a los 75 años. La causa de muerte para el grupo control estuvo asociada principalmente a falla cardíaca o respiratoria, mientras que la mayoría de los casos del grupo con EA, (40.91%) fallecieron por sepsis (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características clínicas del grupo control y con enfermedad de Alzheimer.

<b>Característica</b>	<b>Control (N=10)</b>	<b>EA (N=22)</b>
Masculino <b>n (%)</b>	6 (60)	2 (9.1)
Femenino <b>n (%)</b>	4 (40)	20 (90.9)
edad de muerte $\bar{X}$ ( <b>DS</b> )	78.24 (14.39)	81.93 (12.17)
FAST $\bar{X}$ ( <b>DS</b> )	1.5 (0.71)	7.58 (5.20)
Tiempo (años) de evolución de EA $\bar{X}$ ( <b>DS</b> )	No aplica	9.38 (4.42)
<b>Síntomas asociados al momento de diagnóstico <b>n (%)</b></b>		
Quejas de memoria	0	3 (13.63)
Quejas de memoria y otro	0	9 (40.63)
Problemas de lenguaje o conducta	0	1 (4.54)
Sano	10 (100)	No aplica
<b>Causa probable de la muerte <b>n (%)</b></b>		
Falla cardíaca	2 (20)	2 (9.09)
Falla respiratoria	2 (20)	3 (13.63)
Falla renal	1 (10)	0 (0.0)
Shock metabólico	1 (10)	1 (4.54)
Sepsis	0	9 (40.91)
Neumonía	0	0
Meningitis	1 (10)	0
Trauma	1 (10)	0
No definido o sin dato	2 (20)	7 (31.82)

En total se analizaron 32 encéfalos: 22 de casos con EA (10 con EAE y 12 con EAF tardío) y 10 de controles (sin EA); los casos seleccionados contaron con diagnóstico clínico y neuropatológico. Diez casos confirmados con la EA, a los cuales se les había realizado el FAST, obtuvieron un puntaje promedio de 7.58 (DS: 5.20) (Tabla 2), lo que corresponde a una fase moderadamente grave. Solo se obtuvo información de un caso (sin EA), con un puntaje de 2, es decir la funcionalidad era normal para la edad.

El tiempo de evolución de la enfermedad fue en promedio de 9.38 (DS:4.42) años. Al momento del diagnóstico clínico, nueve casos presentaron además de quejas de memoria, otros problemas asociados al lenguaje, comportamiento o alteraciones motoras (Tabla 2).

Dentro de ambos grupos el porcentaje de fumadores fue del 27.28% y 30% para los casos y los controles, respectivamente. El consumo de alcohol fue del 4.54% y 20 % para los casos y los controles, respectivamente. Es de destacar el alto porcentaje de pacientes con neoplasias en el grupo control, distribuidas entre adenocarcinoma gástrico, cáncer de próstata o de piel (Tabla 3). En el grupo de EA se observó predominio de hipertensión arterial (50%), trauma craneoencefálico (13.64%) y enfermedad reumatológica (9.1%) (principalmente artritis) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Antecedentes de hábitos tóxicos y patológicos en el grupo control y con enfermedad de Alzheimer.

<b>Antecedente</b>	<b>Control (N=10)</b>	<b>EA (N=22)</b>
<b>Hábitos tóxicos n (%)</b>		
Cigarrillo	3 (30)	6 (27.28)
Alcohol	2 (20)	1 (4.54)
Sustancias alucinógenas	1 (10)	0 (0.0)
<b>Patológicos n (%)</b>		
Neoplasia	5 (50)	10 (9.1)
Enfermedad reumatológica	1 (10)	10 (9.1)
Hipertensión Arterial	4 (40)	11 (50)
Diabetes Mellitus tipo II	1 (10)	3 (13.63)
Trauma Craneoencefálico	0 (0)	3 (13.63)

Con relación a la información sobre factores predisponentes para infecciones, síntomas sugestivos de infección o infecciones confirmadas en el último año antes del deceso, fue evidente un predominio de síntomas respiratorios en los casos de EA (50%) infección en tracto urinario (45.46%) y de úlceras por presión (45.46%). Ambos grupos compartieron algunos hallazgos (fiebre, síntomas respiratorios, tratamiento antimicrobiano y piezas dentales en mal estado) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Factores predisponentes o infecciones en el grupo control y con enfermedad de Alzheimer.

<b>Característica</b>	<b>Control n(%)</b>	<b>EA n(%)</b>
Cefalea	0 (0.0)	10 (9.1)
Fiebre	1 (10)	3 (13.63)
Alucinaciones	0 (0.0)	4 (18.19)
Delirium	0 (0.0)	0 (0.0)
Síntomas respiratorios	4 (40)	11 (50)
Infección en tracto urinario	0 (0.0)	10 (45.46)
Presencia de gastrostomía	1 (10)	5 (22.73)
Presencia de úlceras por presión	0 (0.0)	10 (45.46)
Presencia de sonda vesical	0 (0.0)	1 (4.54)
Tratamiento antimicrobiano	3 (30)	3 (13.63)
Piezas dentales en mal estado	10 (100)	18 (82.61)

## 9.2 Evaluación macroscópica de los encéfalos

El peso promedio de los encéfalos fue de 1033.09 g para los controles y 978.18 g para los casos. En ambos grupos, el hemisferio cerebral izquierdo pesó menos que el derecho. La atrofia fue una característica que predominó en los encéfalos de los casos con EA. Asimismo, en los dos grupos se observó alteración en el polígono de Wills lo que indica afectación en

el sistema vascular (Tabla 5). Los principales hallazgos a nivel vascular fueron ateromas. En la mayoría de los casos con EA, se observó ventriculomegalia de moderada a grave, atrofia hipocampal y afectación de la corteza cerebral.

**Tabla 5.** Hallazgos macroscópicos de los encéfalos del grupo control y con enfermedad de Alzheimer.

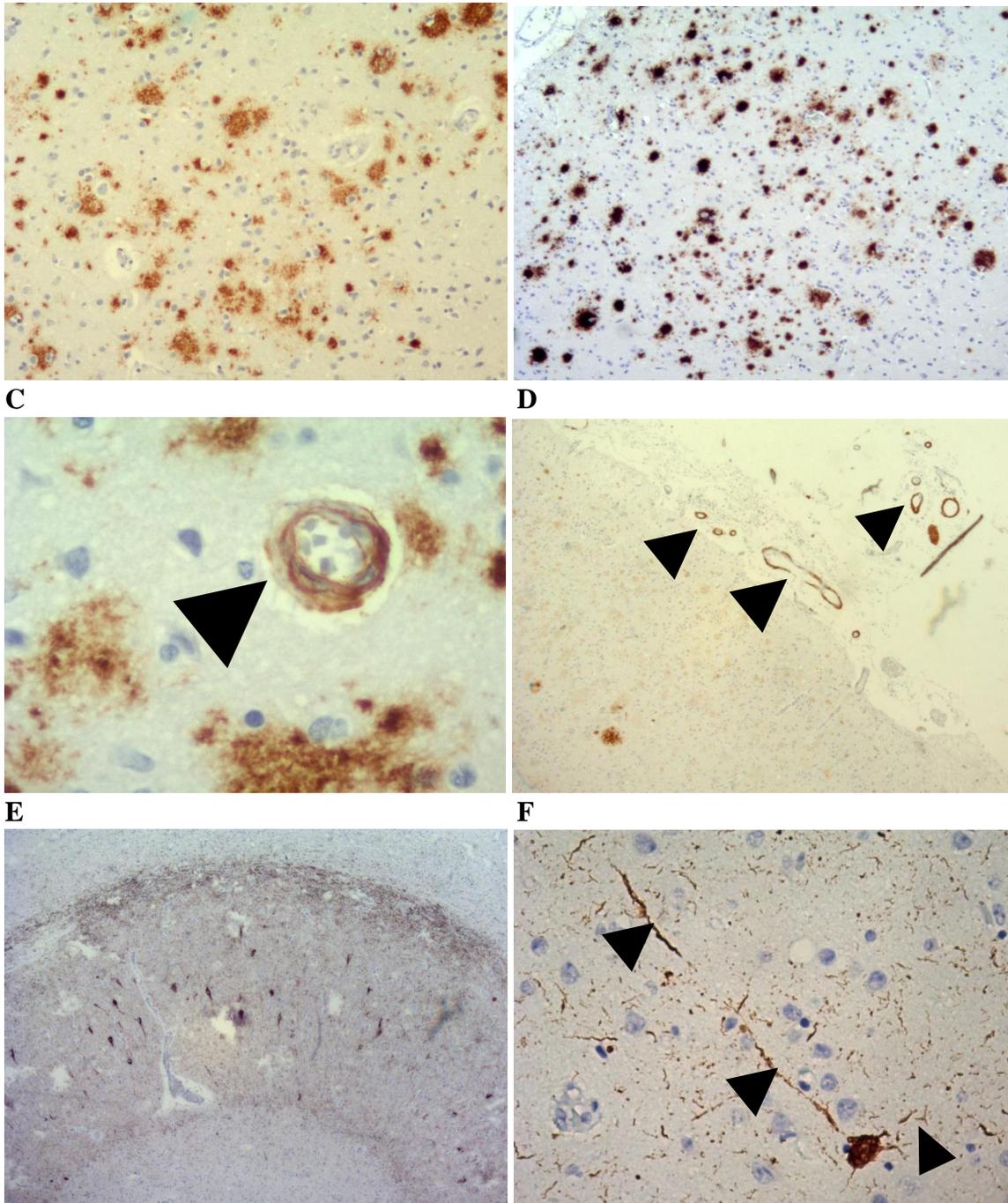
	<b>Control (N=10)</b>	<b>EA (N=22)</b>
Peso (g) global del encefalo $\bar{X}$ (DS)	1033.09 (132.03)	978.18 (135.01)
Peso (g) de fosa posterior $\bar{X}$ (DS)	144.43 (20.89)	142.08 (20.32)
Peso (g) Hemisferio cerebral izquierdo $\bar{X}$ (DS)	437.43 (68.80)	408.70 (62.29)
Peso (g) Hemisferio cerebral derecho $\bar{X}$ (DS)	441.14 (61.99)	412.45 (63.09)
Región cerebral con predominio de atrofia n (%)		
Global	2 (20)	7 (31.82)
Frontal	2 (20)	4 (18.19)
Frontotemporal	0	4 (18.19)
Frontoparietotemporal	0	5 (22.73)
Parietal	0	1 (4.55)
Occipital	1 (10)	0
Sin atrofia	5 (50)	0
Alteración en Polígono de Willis n (%)	6 (60)	20 (90.91)

### 9.3 Evaluación microscópica de los encéfalos

Los casos con diagnóstico clínico de EA (22) se confirmaron con la detección de  $\beta$ A y pTAU mientras que los controles, a excepción de un caso, fueron negativos para los dos marcadores. Los casos con EA presentaron más de 20 placas seniles por  $\text{mm}^2$  con diferentes morfologías (difusas, maduras y placas neuríticas) y AAC en el parénquima cerebral y meninges. También, se observó la presencia de ovillos neurofibrilares (Figura 1). Sólo en un caso, se observaron escasas placas seniles y ovillos neurofibrilares en el hipocampo y en la corteza occipital y frontal. Este último caso, clínicamente se encontraba en una fase temprana de la enfermedad (deterioro cognitivo leve). En la Figura 1 se muestran fotografías de diferentes hallazgos (Placas seniles, angiopatía amiloidea cerebral, ovillos neurofibrilares y placas neuríticas) obtenidos por inmunohistoquímica para  $\beta$ A o pTAU, en cortes de tejido cerebral de casos con EA.

**A**

**B**



**Figura 1. Placas seniles, angiopatía cerebral amiloidea, ovillos neurofibrilares y placas neuríticas.** Placas seniles en giro temporal superior y medio 10X (A) y 5X (B) respectivamente. Angiopatía cerebral amiloidea en parénquima cerebral y en meninges (40X (C) y 2.5X (D) respectivamente (se indica con cabeza de flecha). Ovillos neurofibrilares en hipocampo en cuerpo geniculado lateral 2.5X (E) y placas neuríticas en giro temporal superior 40 X (F) (se indica con cabeza de flecha). Inmunohistoquímica para  $\beta$ A o pTAU.

#### 9.4 Identificación de agentes infecciosos por métodos moleculares

En dos casos del grupo control se identificaron virus y bacterias mientras que en tres casos del grupo con EA se identificaron solo virus de la Familia *Herpesviridae* (Tabla 6). En ninguna de las muestras se detectaron hongos con la PCR panfúngica.

**Tabla 6.** Microorganismos detectados por métodos moleculares en muestras de encéfalos del grupo control y con enfermedad de Alzheimer.

<b>Controles</b>	<b>Técnica molecular</b>	<b>Casos con EA</b>	<b>Técnica molecular</b>
Caso 1		Caso 1	
VHH-4 (6.22 x 10E3 copias)	PCR multiplex	VHS-1,2	PCR multiplex
<i>Escherichia coli</i>	Microarreglos	VHH-4 (1.04 x 10E3 copias)	
<i>Shigella sonnei</i>		Caso 2	
<i>Shigella flexneri</i>		VHS-1,2	PCR multiplex
<i>Salmonella enterica</i>		Caso 3	
Caso 2		VHH-3	PCR multiplex
<i>Geobacillus</i>	Microarreglos		
<i>stearothermophilus</i>			
<i>Propionibacterium sp.</i>			
<i>Geobacillus</i>			
<i>kaustophilus</i>			
<i>Escherichia coli</i>			

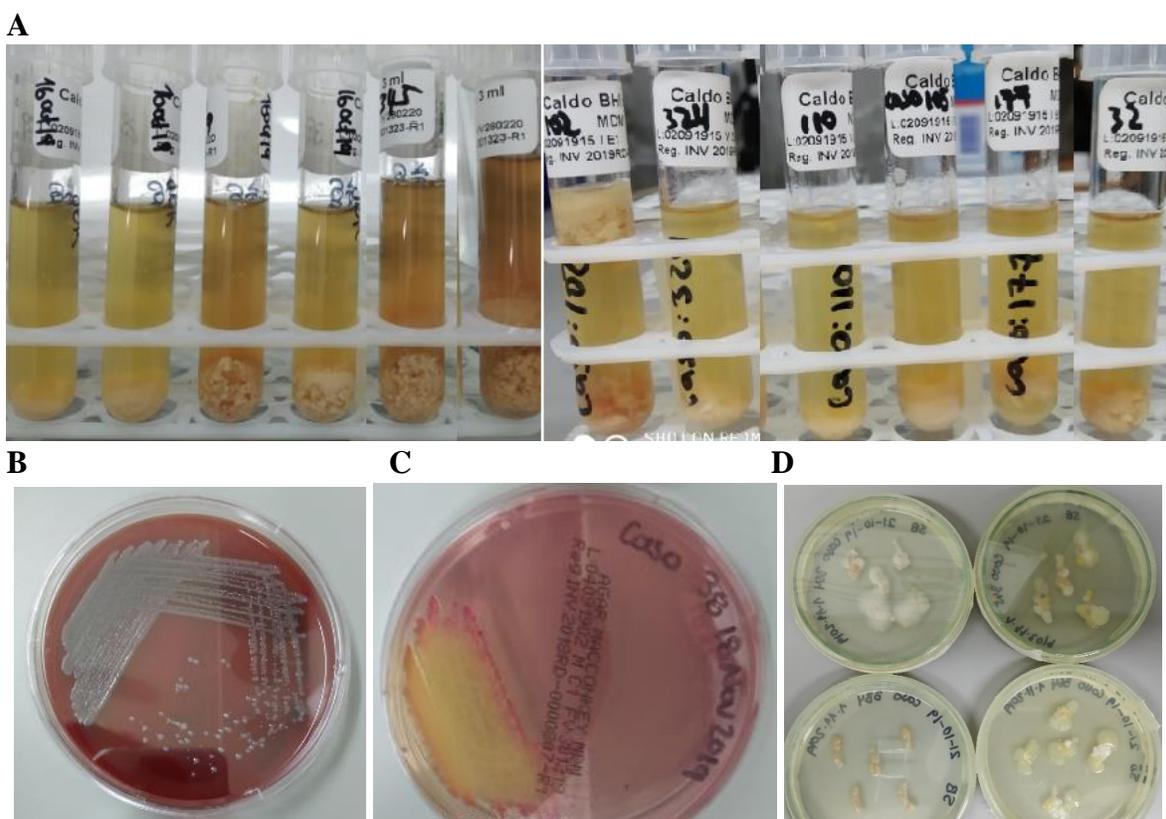
En la Tabla 7 se muestra la comparación de los resultados obtenidos por microarreglos y por la PCR para la detección de ADN de agentes infecciosos, observándose que en tres casos con EA en los que se detectó virus Herpes por medio de PCR no fueron detectados por los microarreglos.

**Tabla 7.** Identificación de agentes infecciosos por microarreglos y por PCR.

		Resultado	Microarreglos					
			Control (n)			EA (n)		
PCR	Virus (n)		+	-	Total	+	-	Total
		+	0	0	0	0	3	3
		-	0	10	10	0	19	19
	<b>Total</b>	0	10	10	0	22	22	
	Hongos (n)	+	0	0	0	0	0	0
		-	0	10	10	0	22	22
<b>Total</b>		0	10	10	0	22	22	

## 9.5 Cultivos *in vitro* para el aislamiento de hongos y bacterias

Además de las técnicas moleculares usadas con el fin de buscar e identificar agentes infecciosos en las muestras de encéfalo, se realizaron cultivos para el aislamiento de hongos y bacterias. Se cultivaron muestras de siete casos controles y trece casos con EA en el medio BHI líquido, posteriormente se realizaron subcultivos en los medios Sabouraud para el aislamiento de hongos y en agar sangre y MacConkey para las bacterias. En la Figura 2 se muestran cultivos de algunas de las muestras. En los cultivos para el aislamiento de hongos, se obtuvo crecimiento de diferentes especies ambientales (Figura 2D).



**Figura 2. Cultivos de muestras de tejido cerebral.** Cultivos en BHI líquido (48 h a 37 °C) de muestras de cerebros (A). Colonias  $\gamma$ -hemolíticas en agar sangre (24 h a 37 °C) (B). Colonias no fermentadoras de lactosa en agar MacConkey (24 h a 37 °C) (C). Colonias bacterianas y fúngicas en agar Sabouraud (5 días a 25 °C) (D).

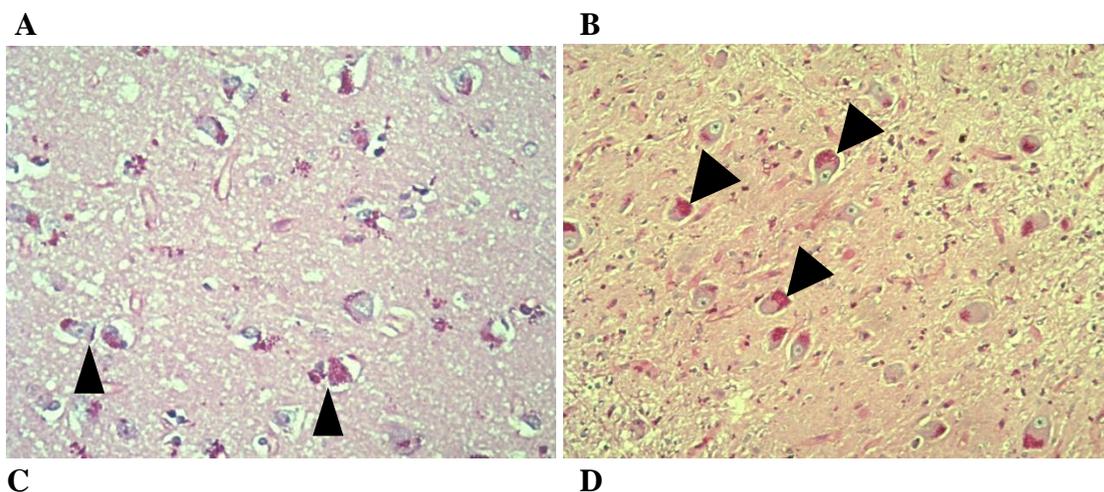
En todas las muestras de ambos grupos, se obtuvo crecimiento bacteriano. Entre las bacterias aisladas, se encontraron especies de diferentes características; unas que hacen parte de la microbiota de piel, intestinal y ambiental y otras patógenas. En la Tabla 8 se indican las especies aisladas.

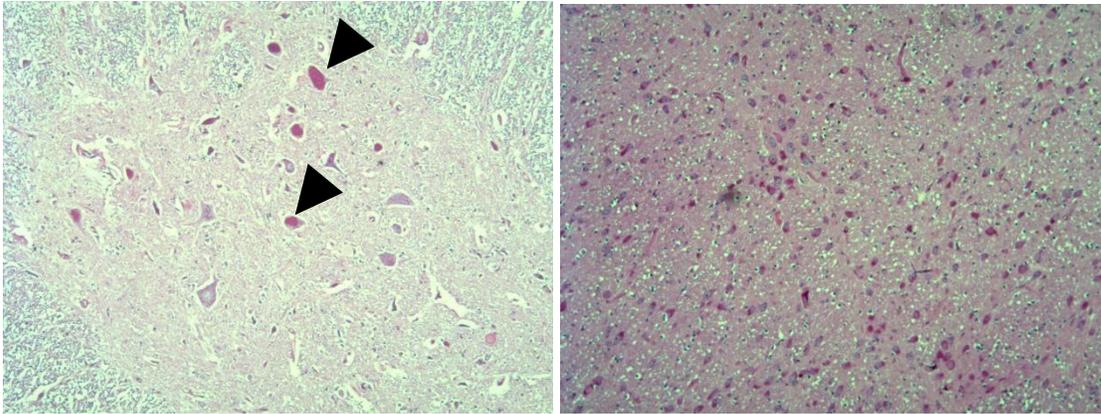
**Tabla 8.** Especies de bacterias aisladas a partir de tejido encefálico del grupo control y con enfermedad de Alzheimer.

Control (n=7)	EA (n=13)
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Leclercia</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>adecarboxylata</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Lactobacillus garvieae</i>	<i>epidermidis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Enterococcus Faecalis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	

En los cultivos para el aislamiento de hongos, se obtuvo crecimiento de diferentes especies ambientales (Figura 2D).

Basados en la información de las historias clínicas de dos casos de EA que tenían reporte de VDRL reactivo o anormal, y considerando la asociación que se ha establecido entre la neurosífilis y la EA (73), se procedió a realizar una tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff), con el fin de buscar depósitos de hidratos de carbono siguiendo las recomendaciones de Allen y col., (127), quienes afirman que estos depósitos corresponden a colonias bacterianas. En estos casos se observaron depósitos intra y extracelulares PAS positivos en todo el encéfalo (Figura 3) pero no lesiones histológicas compatibles con neurosífilis.





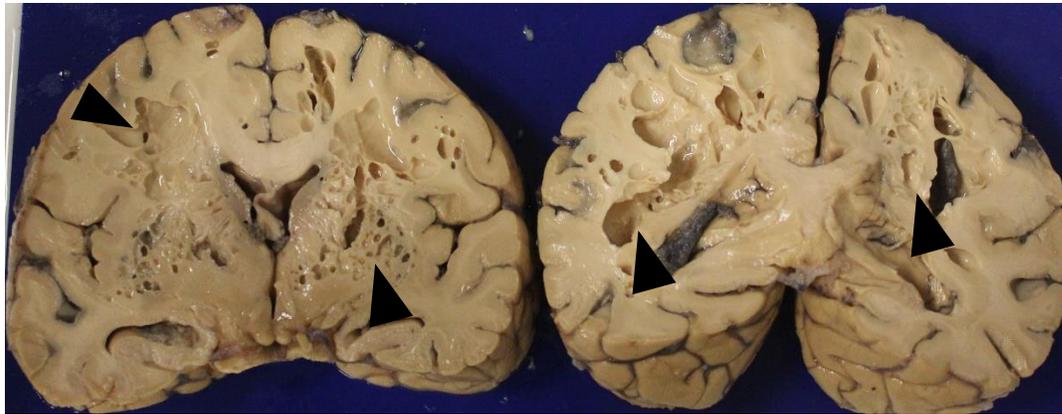
**Figura 3. Depósitos PAS positivos en muestras de encéfalo.** Giro temporal medio 20X (A), en corteza cerebelar 10X (B), médula espinal 5X (C) (se indican con la cabeza de flecha) y Puente de Varolio 5X (D).

### 9.6 Colocalización de bacterias con placas seniles

En cuatro de cinco casos se pudo observar la aglutinación de bacterias formando acúmulos en presencia del péptido  $\beta$ A en el tejido cerebral (Figuras 4 y 6). En dos casos, con un índice *post mortem* mayor a 12 horas, el defecto de la fijación por formaldehído al 10% favoreció la colonización por bacilos Gram positivos.

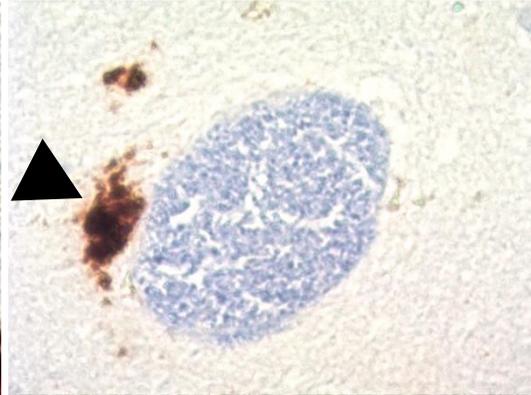
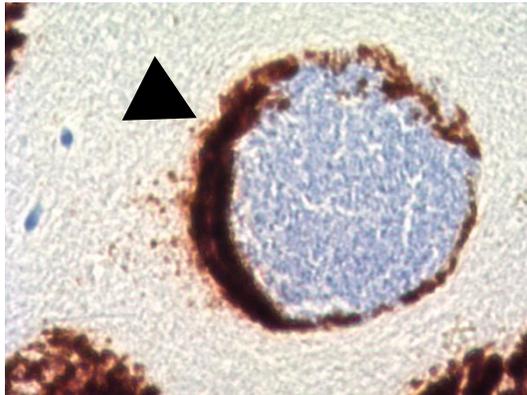
En el primer caso, macroscópicamente se observaron múltiples cavitaciones (artefacto descrito como cerebro en queso suizo) a todo lo largo de los hemisferios cerebrales, comprometiendo los cuatro lóbulos cerebrales y afectando especialmente la sustancia blanca y los núcleos de la base (figura 4A). También se observaron cavitaciones en tallo cerebral, especialmente en la porción basal de la protuberancia y en la sustancia blanca a nivel de cerebelo. Microscópicamente se observaron acúmulos de bacilos Gram positivos, algunos colocalizados con el  $\beta$ A (Figura 4B y 4C). En algunas regiones se observó el  $\beta$ A bordeando totalmente los acúmulos. Con el fin de descartar que los acúmulos no estuvieran contenidos dentro de vasos sanguíneos se realizó inmunohistoquímica para Vimentina (Invitrogen, EE.UU.), comprobando que la acumulación de los bacilos no fue dentro de estas estructuras (Figura 4D y 4E).

A



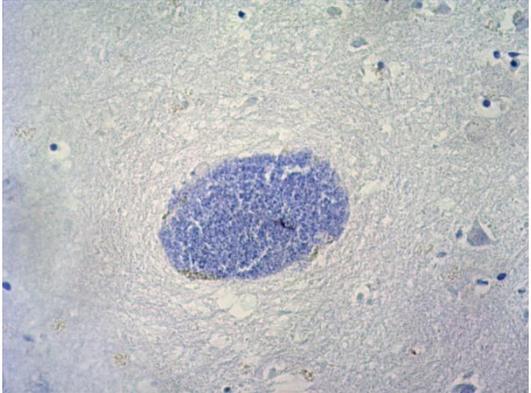
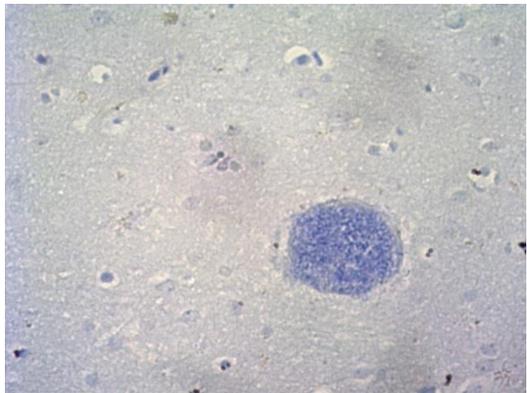
**B**

**C**



**D**

**E**

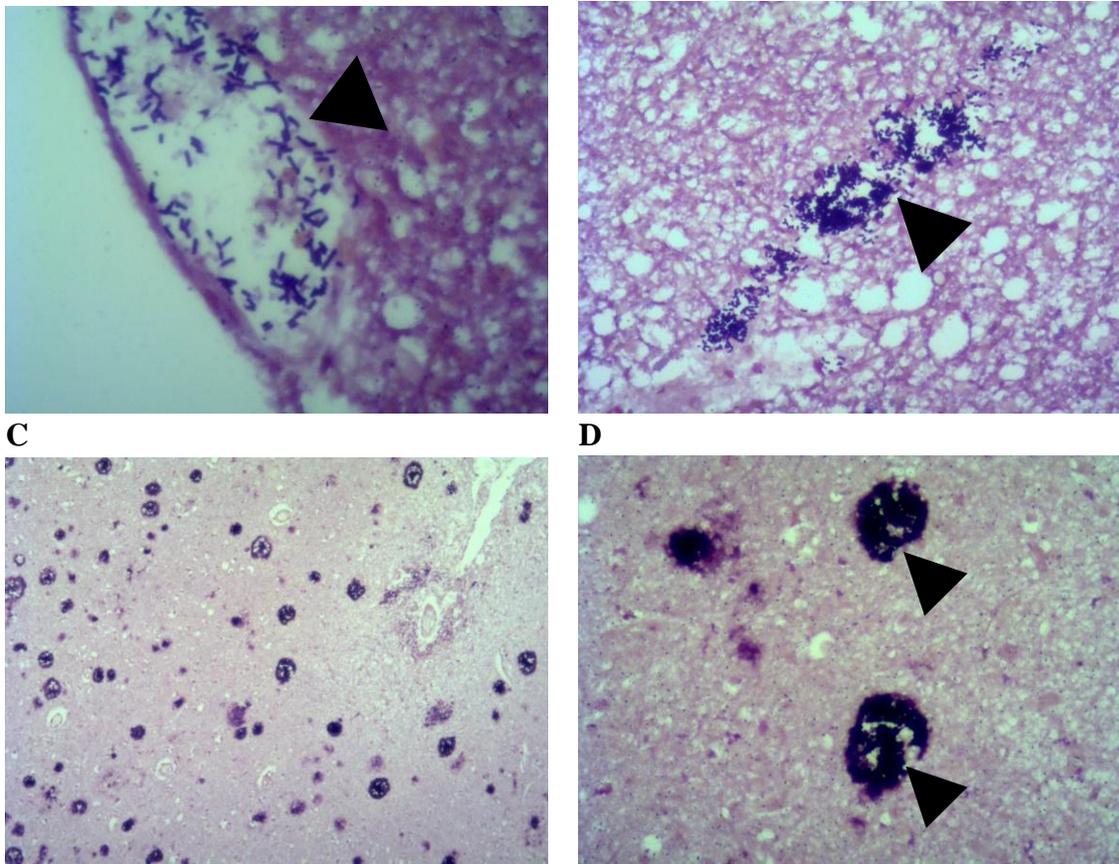


**Figura 4. Acúmulos bacterianos colocalizados con el  $\beta$ A.** Artefactos de cerebro en “queso suizo” (A) Detección de  $\beta$ A en tejido cerebral de paciente con EAF (PSEN1-E280A) 40X (B y C) (se indica con cabeza de flecha). Vimentina negativa 20X (D y E).

En el segundo caso, macroscópicamente también se observaron cavitaciones sólo en los hemisferios cerebrales (sustancia blanca, núcleos basales y tálamo), de menor cantidad y tamaño con respecto al caso anterior. Microscópicamente se observaron acúmulos bacterianos de bacilos Gram positivos que no se colocalizaron con el  $\beta$ A (Figura 5).

**A**

**B**



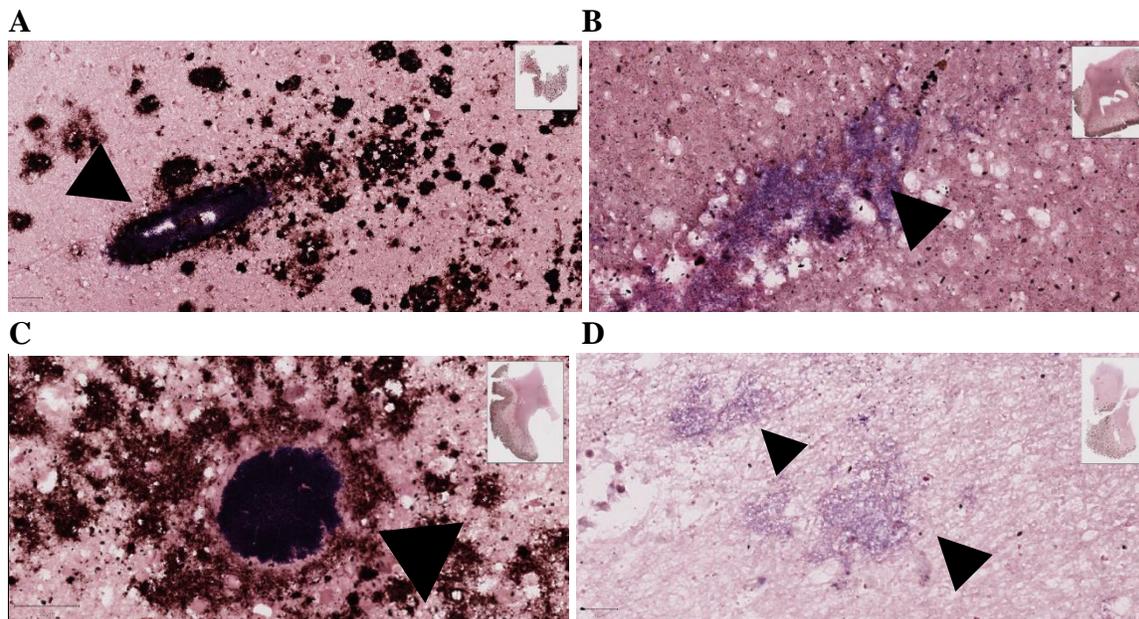
**Figura 5. Acúmulos bacterianos sin colocalización con el  $\beta$ A.** Bacilos gram positivos 40X (A y B) (se indica con cabeza de flecha) y placas seniles (se indica con cabeza de flecha) 20X (C) y 40X (D) respectivamente, sin colocalización en lóbulo frontal de un paciente con EAF (PSEN1-I162S). Tinción doble (immunohistoquímica para  $\beta$ A y tinción de gram).

Los otros tres casos, en los que la colonización bacteriana fue inducida *in vitro*, a las 12 horas post infección, no se observó crecimiento bacteriano en el tejido cerebral. Mientras que si se observaron acúmulos de cocos y bacilos Gram positivos a las 24 y 48 horas post infección. Aproximadamente el 35 % de los acúmulos se colocalizaron con el  $\beta$ A. A las 24 horas post infección se observó la mayor cantidad (Tabla 9).

**Tabla 9.** Total de acúmulos bacterianos en tejido cerebral.

Acúmulos bacterianos	Caso				
	1	2	3	4	5
N	42	35	386	171	499
Colocalización con $\beta$ A n (%)	2 (4.76)	0 (0.00)	131 (34.03)	60 (35.09)	167 (33.43)
Tiempo de infección					
24 horas n (%)	No aplica	No aplica	96 (36.92)	37 (38.54)	83 (36.72)
48 horas n (%)	No aplica	No aplica	35 (27.78)	23 (30.67)	84 (30.77)

En total se obtuvieron 269 capturas de los acúmulos bacterianos (cocos o bacilos) con y sin colocalización con el  $\beta$ A durante las 24 y 48 horas post infección (Figura 6). A cada acúmulo se le determinó el área en  $\text{mm}^2$  con el fin de comprobar diferencias entre el tipo de bacteria, presencia del  $\beta$ A o el tiempo post infección.



**Figura 6. Acúmulos bacterianos con y sin colocalización con  $\beta$ A.** Acúmulos de *E. faecalis* colocalizando con  $\beta$ A (15X) (A) Acúmulos de *E. faecalis* sin  $\beta$ A (20X) (B) en el lóbulo frontal después de 24 horas de infección. Acúmulos de *L. rhamnosus* con  $\beta$ A (30X) (C) Acúmulos de *L. rhamnosus* sin  $\beta$ A (30X) (D) en lóbulo frontal después de 48 horas de infección. (se indica con cabeza de flecha). Tinción doble: inmunohistoquímica para  $\beta$ A y tinción de Gram.

Al comparar el área de acúmulos entre bacilos y cocos, se encontró que la mediana del área de los acúmulos de los cocos Gram positivos ( $1.39 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.001$ ) fue significativamente mayor que el área de los acúmulos de los bacilos (Tabla 10). Independiente del tipo de bacteria (bacilo o coco), se comprobó que cuando el acúmulo bacteriano se encuentra colocalizado con el  $\beta$ A, la mediana del área ( $0.004 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.001$ ) fue significativamente menor en comparación a cuando no se colocaliza con el péptido (Tabla 10). Por otro lado, se observó que no existen diferencias significativas entre la mediana del área de los acúmulos bacterianos a las 24 horas ni a las 48 horas post infección (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis bivariado del área de los acúmulos bacterianos en tejido cerebral con enfermedad de Alzheimer.

Área acúmulos bacterianos (mm <sup>2</sup> )	N=269	Mediana (RIQ)	P25-P75	Shapiro-Wilk W	Shapiro-Wilk p	Mann-Whitney U p
Tipo de bacteria						<0.001
Bacilos	107	0.623 (1.48)	0.003-1.48	0.672	<0.001	
Cocos	162	1.39(73.9)	0.007-73.9	0.401	<0.001	
Colocalización con $\beta$ A						<0.001
Negativos	143	1.61 (5.61)	0.84-6.45	0.424	<0.001	
Tiempo de infección						0.034
24 h	60	1.02 (0.91)	0.734-1.64	0.712	<0.001	
48 h	53	1.61 (3.34)	0.986-4.33	0.504	<0.001	
Positivos	126	0.004 (0.355)	0.002-0.357	0.288	<0.001	
Tiempo de infección						0.107
24 h	69	0.004 (0.335)	0.002-0.337	0.342	<0.001	
48 h	57	0.004 (26.6)	0.002-26.6	0.434	<0.001	

Adicionalmente se quiso comprobar si el área del acúmulo bacteriano se correlacionaba con el área del  $\beta$ A, para esto se realizó una correlación de Spearman y se encontró que hay una baja correlación positiva entre ambos (0.565,  $p < 0.001$ ).

## 10. DISCUSIÓN

A pesar de que la EA es el tipo de demencia más común a nivel mundial, su etiología continúa siendo desconocida hasta el momento. La detección directa de agentes infecciosos (ADN, componentes estructurales o enzimas) en muestras de tejido cerebral o indirecta de anticuerpos específicos en LCR, suero o plasma de pacientes con EA y no en individuos sanos ha sugerido la posibilidad de un origen infeccioso para esta demencia. En este estudio, se buscaron agentes infecciosos en tejido encefálico *post mortem* mediante tres metodologías: microarrays, PCR panfúngica y multiplex y aislamiento e identificación por MALDI-TOF. Sin embargo, contrario a lo esperado y reportado previamente por otros autores, se detectaron agentes infecciosos en tres casos con EA y en dos casos del grupo control. Además, se aislaron bacterias tanto del grupo control como en el grupo con EA. Por otro lado, se encontraron bacterias Gram positivas colocalizadas con el péptido  $\beta$ A en el tejido cerebral.

El análisis de los datos sociodemográficos de este estudio estuvo en concordancia con otros trabajos en cuanto a la mayor afectación del sexo femenino por la EA (114). En un metanálisis realizado por Niu y Col. (115), se demostró una prevalencia en los hombres y en las mujeres del 3,31% (IC del 95%, 2,85-3,80) y 7,13% (IC del 95%, 6,56-7,72), respectivamente. Además, una incidencia de 7,02 por 1.000 personas-año (IC del 95%, 6,06-8,05) en los hombres 13,25 por 1.000 personas-año (IC del 95%, 12,05-14,51) en las mujeres en Europa. La mayor ocurrencia de esta demencia en el sexo femenino aún no está científicamente explicada, sin embargo, se sugiere que factores de riesgo hasta ahora descritos para la enfermedad, como APOE, el nivel de educación, la enfermedad cardiovascular o la menopausia, pueden ser influenciados por el sexo (116).

En general, la edad de aparición de la EA es superior a los 65 años (117). En este estudio, el inicio de los síntomas estuvo por encima de los 75 años. Es claro que la edad avanzada es un factor de riesgo para el desarrollo de esta demencia (6).

Los casos de este estudio con EA, confirmados por estudio histopatológico, clínicamente habían presentado síntomas descritos para la EA como: el desorden amnésico, principalmente en la memoria episódica y afectación de la función ejecutiva, en el lenguaje y en la orientación visoespacial. Estos síntomas pueden ser explicados por la afectación del hipocampo y los circuitos neuronales al inicio de la enfermedad (118).

De acuerdo a los resultados obtenidos por medio de la evaluación del compromiso de la funcionalidad (FAST), se pudo observar que los casos con EA se encontraban en etapas avanzadas de la enfermedad con un severo deterioro de su funcionalidad (Tabla 1). Esta herramienta neuropsicológica es muy sensible, en especial en estadios finales de la enfermedad; además permite correlacionar la clínica con los hallazgos neuropatológicos. Esto es equiparable a obtener un puntaje de seis en la escala de deterioro global (GDS) (119).

En relación con el tiempo de duración (años) de la EA, para los casos de este estudio fue de 9.38 años, a diferencia de 3.8 reportados por Bryan y col. (120), en un seguimiento por ocho años a individuos que desarrollaron EA en EE.UU.

Las enfermedades cardiovasculares o metabólicas se han considerado un factor de riesgo vascular modificable para el desarrollo de la EA; trece de los casos con EA y cinco casos controles, presentaron patologías de este tipo (Tabla 2). Específicamente once de los casos con EA (50%) presentaron hipertensión arterial, sin embargo, los resultados de estudios previos son contradictorios con respecto a la relación entre hipertensión y EA (121).

Por otro lado, en el grupo control, se encontró que la mitad (5 casos) de los pacientes presentaron algún tipo de cáncer. Se ha demostrado que existe una relación inversa entre cáncer y el desarrollo de EA (122); sin embargo, con los datos de este trabajo no fue posible establecer alguna relación.

La multimorbilidad (HTA, diabetes mellitus tipo II, obesidad, entre otros), hábitos de vida poco saludables y la edad avanzada, confiere susceptibilidad a la ocurrencia de infecciones. Por ejemplo, en ambos grupos de estudio, la mayoría consumió cigarrillos (Tabla 2), esto sumado a la edad avanzada, predispone a sufrir infecciones respiratorias bacterianas o virales (123), como consecuencia de los cambios estructurales que induce esta sustancia en el sistema respiratorio y a la disminución de la respuesta inmune (124).

Se ha demostrado que las enfermedades cardiovasculares y metabólicas afectan el sistema inmune. La diabetes mellitus tipo II, por ejemplo, causa inmunosupresión e inflamación (125), por lo que se ha sugerido que personas con EA y con este trastorno metabólico, suelen

ser más susceptibles a infecciones en el SNC por agentes como *Listeria* spp., *Blastomyces* spp., virus del Nilo occidental y VHH-3 (126). En este estudio, la coexistencia de la EA e infección por VHH-3 no se asoció a antecedentes de diabetes mellitus tipo II. Contrario a esto, la infección o reactivación por VHS-1 no se relaciona con diabetes mellitus tipo II, con la hipertensión, ni con el consumo de cigarrillo o licor; pero si con la edad (127).

En general, las personas que padecen de EA mueren por complicaciones como infecciones respiratorias, urinarias o de piel y tejidos blandos. La principal causa de muerte en los pacientes con EA del estudio fue sepsis secundaria a una infección respiratoria (Tabla 1), mientras que en el estudio de Todd y col. (128), la neumonía fue la causa de muerte más común. En adultos mayores, las enfermedades infecciosas son muy frecuentes, Goto y col. (129), en un estudio realizado en EE. UU observaron que, entre las enfermedades infecciosas en esta población, las infecciones respiratorias (26.2% (95% (CI)=25.7-26.6%)) estuvieron por encima de las infecciones urinarias o septicemia.

Por su parte, los pacientes con EA, en etapas finales o tardías de la EA, pierden su funcionalidad y progresan a un estado de postración que les impide moverse. Esto podría explicar el aumento de las infecciones respiratorias en el último año de los casos incluidos en este estudio (Tabla 3).

La atrofia cerebral hace parte del proceso normal del envejecimiento, se estima que anualmente hay una reducción del 0.2% del volumen de la sustancia gris, principalmente en la región frontal, como consecuencia de la pérdida de nuevas sinapsis, espinas sinápticas y pérdida neuronal. En la EA, la disminución del volumen cerebral es del 2-3% por año (130) y contrario a lo que se observa en personas sin EA, la región cerebral más vulnerable es el hipocampo en donde la reducción de volumen de sustancia gris es de 10% o del 30% en estadios iniciales y finales (respectivamente) (131). Lo anterior concuerda con lo observado en este estudio, el peso de los encéfalos afectados por la EA fue inferior al del grupo control (978.18 g y 1033.9 g respectivamente) (Tabla 4). Generalmente, el patrón de progresión de la atrofia a nivel cerebral en la EA suele ser similar al patrón de propagación de las placas seniles y ovillos neurofibrilares, con inicio en el hipocampo y en la corteza entorrinal.

A la fecha, este es el primer trabajo en el que se buscaron diferentes agentes infecciosos simultáneamente en la misma muestra de un número considerable de muestras de encéfalos tanto de los casos de EA como de los controles.

A diferencia de otros estudios en los que se han encontrado diversos agentes infecciosos en cerebros de personas con EA (15,32,66,132), en este estudio se limitó solo a tres casos (Tabla 5), a pesar de haber utilizado varias técnicas, una de ellas, microarreglos, con amplia cobertura, con capacidad para detectar 12.513 especies (valor predictivo positivo de 96.2%. 92.6% y 61.3% para discriminar entre género, especie o cepa, respectivamente) (133). La baja detección de agentes infecciosos en los casos de EA podría explicarse por la ausencia de estos, por el bajo número de copias genómicas y estar relacionada con la sensibilidad de

las técnicas utilizadas. El límite de detección de la técnica de microarreglos es de 100 copias de ADN (133) y, por ejemplo, el único reporte a la fecha de detección de ADN mediante PCR convencional de VHH-3 en tejido cerebral, reporta una sensibilidad de esta técnica menor a 10 copias de ADN viral (134).

Los resultados de la detección de virus de la Familia *Herpesviridae* en tejido encefálico de pacientes con la EA son diversos, mientras que en los estudios de Wozniak y col. (135), y Lin y col. (134), fueron exitosos, el de Kittur y col. (136), no lo fue; esta diferencia puede estar asociada a la sensibilidad en la detección de copias de ADN de las técnicas utilizadas en cada estudio.

Aunque fueron pocos los casos en los que se detectaron agentes infecciosos en este estudio, es importante resaltar que en tres casos (13.63%), se identificaron los virus neurotrópicos VHS-1.2, VHH-3 y/o VHH-4 (Tabla 5). Estos virus son de amplia circulación en la población mundial, causan infecciones latentes y son los que más se han identificado en muestras de tejidos encefálicos de personas que han padecido la EA, principalmente VHS-1 (Tabla 12). El genoma de este virus se ha detectado en estructuras límbicas, unas de las regiones más afectadas por la enfermedad (137). Adicionalmente, Wozniak y col. (135), por medio de hibridización *in situ*, observaron una proporción de ADN de VHS-1 asociado a las placas seniles igual al 70% en corteza frontal y a 74% en corteza temporal en un estudio con cinco pacientes. Los estudios de detección directa del genoma del VHS-1 son limitados, la mayoría han sugerido la infección viral por la detección de anticuerpos (50,109). Es así como tanto la reactivación y la latencia del VHS-1 se han asociado a la progresión de la EA (34,138).

A diferencia con otros estudios, en los que la detección de los virus VHH-5 o VHH-6 en casos de la EA supera el 50% (Tabla 11) en el presente estudio no se detectaron.

**Tabla 11.** *Herpesviridae* detectados en tejido encefálico con enfermedad de Alzheimer.

Agente infeccioso	Encéfalos con EA	Región cerebral	Referencia
VHS-1	5/11	Frontal Temporal	Mori y col., J Clin Microbiol., 2004
	5/5	Frontal Temporal	Wozniak y col., J Pathol., 2009
	2/2	Frontal	Mori y col., J Virol., 2004
VHS-2	7/53	Frontal	Lin y col., J Pathol., 2002
VHH-5	16/45	Temporal	
VHH-6	36/50		
VHH-4	5/80	Frontal	Carbone y col., Neurobiol Aging., 2014
VHS-1	1/34	Frontal	Hemling y col., Ann Neurol., 2003
VHH-3	9/34	Temporal	
VHH-6	30/34	Hipocampo Girus cinguli	

Los virus VHS-2 y VHH-3 aunque en menor proporción, en comparación con el VHS-1, también se han detectado en tejidos de personas con EA (56,134). Sin embargo, la relación con la etiología de la EA es controvertida, mientras Tsai y col. (139), en un estudio retrospectivo realizado en Taiwán, encontraron que en pacientes con infección oftálmica por VHH-3 tenían un Hazard riesgo de 2.83 (95% CI: 1.83–4.37) para la EA en comparación con los que no la tenían, Ou y col. (140), no encontraron riesgo asociado a este virus ni al VHS-2 para el desarrollo de la EA. La relación entre EA y VHH-4 no está clara, además la detección en tejidos de personas con EA es baja (141).

En uno de los casos de EA de este estudio, se encontró simultáneamente VHS-1, 2 y VHH-4. Es posible que tanto el VHH-4 como el VHH-6 potencien la acción del VHS-1 para inducir neurodegeneración (57).

La medición del título de anticuerpos totales o específicos contra estos virus en LCR o suero, pueden ser un complemento valioso en los estudios que pretenden establecer una asociación entre agentes virales y la etiología de la EA. Itzhaki RF. (142), sugirió mayor riesgo de padecer demencia por EA, en individuos en los que se detectaron IgG o IgM que en los seronegativos.

Los resultados del presente estudio fueron negativos, en los dos grupos, para la detección de ADN fúngico tanto por la tecnología de microarreglos como por la PCR panfúngica. Además, ni en la historia clínica ni en el estudio macroscópico y microscópico de tejido cerebral, hubo evidencia de meningitis, encefalitis, hidrocefalia o abscesos cerebrales que permitieran sospechar de alguno de los hongos que causan neuroinfecciones como levaduras (*Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp, *Trichosporon* spp.), hongos moniliaceos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.) Mucoromycetes (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp.), hongos

dimórficos (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp. o *Histoplasma capsulatum*) y hongos dematiáceos (*Cladophialophora bantiana*, *Exophiala dermatitidis*) (143). Tampoco se encontró en las historias clínicas datos de trauma, cirugías o antecedentes que pudieran favorecer una infección fúngica.

El diagnóstico de las infecciones fúngicas es complicado ya que los métodos convencionales tienen muchas limitaciones y no existen herramientas diagnósticas eficaces. Cuando no se conoce el hongo que puede estar causando la infección, se recurre a técnicas moleculares basadas en PCR denominadas “panfúngicas”. Estas técnicas emplean iniciadores universales capaces de detectar y amplificar cualquier especie fúngica. La sensibilidad de estas técnicas en muestras de biopsias parafinadas se ha descrito que está entre 64%-89% (144). Específicamente en la EA, diferentes estudios han demostrado tanto la presencia de ADN como de antígenos fúngicos (enolasa,  $\beta$ -tubulina o quitina) en muestras de corteza frontal, entorrinal/hipocampo o corteza cerebelar de pacientes con EA (80,83,145–147), más no en individuos sin EA. Adicionalmente, se ha sugerido que los cuerpos amiláceos observados en esta patología posiblemente sean de origen de fúngico.

Llama la atención que los hongos que se han identificado en los diferentes estudios con el objetivo de establecer la relación entre la EA y una etiología fúngica son principalmente ambientales (*Cladosporium* spp, y *Sclerotinia borealis*) o hacen parte de la microbiota permanente o transitoria de la piel o mucosas humanas (*C. albicans*, *C. famata*, *Malassezia* spp y *Saccharomyces cerevisiae*) (84,145). En consecuencia, estos resultados deben ser corroborados con más estudios, con el fin de descartar que no se haya tratado de contaminación con los cerebros en el momento de la manipulación para obtener las muestras.

El hecho que se hayan aislado bacterias en los dos grupos del estudio no permite sugerir la asociación entre la EA e infecciones por microorganismos de este tipo. Además, en las historias clínicas no había antecedentes de infecciones a nivel del sistema nervioso central, de neurocirugías, de traumas craneoencefálico o de drenajes severos de LCR, excepto en un caso, que pudieran facilitar la colonización e infección. Es posible que las bacterias aisladas sean contaminantes adquiridas durante la manipulación del tejido encefálico; sin embargo, los cultivos microbiológicos del ambiente y de las superficies donde se manipularon las muestras, fueron en su mayoría negativos para hongos y bacterias y en los pocos que se observó crecimiento, correspondieron a especies diferentes a las que se obtuvieron a partir del cultivo de tejido cerebral.

El papel de las bacterias en la patogénesis de la EA se atribuye, por un lado, a las similitudes estructurales de algunas de sus proteínas o colonias bacterianas con las placas seniles (148). Por otro lado, se ha propuesto que el péptido  $\beta$ A tiene propiedades antimicrobianas y su agregación sea la respuesta a una infección bacteriana. Zhan y col. (77), demostraron que el LPS colocaliza con el  $\beta$ A en el parénquima cerebral de pacientes con EA.

*Treponema pallidum*, el agente etiológico de la sífilis se ha relacionado con la etiología de la EA. Considerando lo anterior, en dos casos confirmados con la EA que habían tenido una prueba VDRL reactiva, se realizó coloración de PAS con el fin de observar colonias bacterianas. Los resultados de la coloración fueron positivos y podrían estar indicando la presencia de colonias y biopelículas formadas por espiroquetas tal como lo observó Allen y col. (149). Sin embargo, la presencia de estas bacterias debe ser confirmada con coloraciones más específicas para la detección de espiroquetas, teniendo en cuenta que no se contó con información acerca de la fecha del reporte de la prueba de VDRL y si los pacientes habían recibido o no tratamiento. Miklossy (150), observó que las biopelículas formadas por espiroquetas son similares a las placas seniles observadas en la EA, concluyendo que las placas seniles podrían corresponder a colonias bacterianas. En contradicción con estos reportes, Ou y col. (140), no encontraron un riesgo asociado con la infección por espiroquetas y la EA.

El tipo y número de microorganismos identificados en los controles pueden indicar contaminación ambiental o con microbiota humana, a excepción de un caso sin EA en dónde se encontró ADN de varias enterobacterias y VHH-4, (Tabla 6). Ambos agentes infecciosos se han relacionado con la EA, sin embargo, en este caso la causa probable de muerte estuvo asociada a una meningitis bacteriana y posiblemente alguna enterobacteria causó la infección. Aunque la infección en el SNC por enterobacterias es poco común, *E.coli* ha sido reportada causando meningitis (151). Adicionalmente, el paciente fue diagnosticado con carcinoma escamocelular a los 72 años y presentó antecedentes de múltiples tumores en piel, en los últimos 5 años. El VHH-4 se ha relacionado con este tipo de lesiones principalmente en individuos con algún tipo de inmuno-compromiso (152) y la infección por este virus es común en este tipo de pacientes (153).

Con respecto a la presencia de bacterias colocalizadas con el  $\beta$ A, ninguno de los cinco casos había registrado sintomatología asociada a meningitis o encefalitis y tampoco se encontraron hallazgos sugestivos de infección en el encéfalo antes del fallecimiento. Solo en un caso no se observó dicha colocalización, posiblemente porque el tiempo de fijación del tejido fue más rápido y la penetración del formaldehído al 10% fue desde las áreas corticales hacia el interior del encéfalo, afectando la movilidad del  $\beta$ A hacia los lugares (subcorticales) dónde se estaba dando la colonización bacteriana.

Con respecto a los tres casos en dónde la colonización bacteriana fue inducida, se observó que los acúmulos bacterianos tuvieron menor área cuando estaban colocalizados con el  $\beta$ A (Tabla 10). Estudios previos han demostrado *in vitro* que la actividad de este péptido contra *E. faecalis* y *L. monocytogenes* está relacionada con el aumento en la aglutinación y disminución de su crecimiento (94). Spitzer y Col. (93), demostraron que diferentes péptidos amiloidogénicos ( $\beta$ A<sub>1-42</sub>,  $\beta$ A<sub>2-42</sub>,  $\beta$ A<sub>3-43</sub>) se unen a la superficie de *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ), *Staphylococcus aureus* y *C. albicans*, inducen la formación de aglutinados y se produce una autoagregación acelerada del péptido en presencia de los microorganismos. En este estudio, se observó que el péptido  $\beta$ A puede aglutinar las

bacterias en acúmulos (Figura 6 C y 6D) similar a los acúmulos observados por Spitzer y Col. (93), cuando las bacterias crecían en medio Muller-Hilton con  $\beta$ A. También, Torren y Col. (91), proponen que la agregación del péptido  $\beta$ A en la superficie de la pared bacteriana es necesario para que se dé la aglutinación de las bacterias. Este mecanismo de aglutinación también se ha observado con otros AMPs presentes en saliva o con la proteína catiónica de eosinófilos, las cuales inducen aglutinación de microorganismos para evitar la propagación y facilitar la fagocitosis.

Como se mencionó anteriormente, el péptido  $\beta$ A también puede aglutinar virus como influenza o VHS mediado por la fibrilación u oligomerización del péptido, el cual se une a las glicoproteínas de la superficie viral y acelera el depósito del  $\beta$ A (154). En otro estudio, Chen y col. (38), demostraron que no sólo los péptidos derivados de la PPA inducen aglutinación, sino que otros péptidos formadores de fibras amiloides presentes en la pared de *S. mutans* aglutinan *S. sanguis*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* también lo hacen.

En este trabajo no se observó diferencias entre el área de los acúmulos de bacilos y de cocos en presencia del  $\beta$ A (Tabla 10), posiblemente esto se debe a que el péptido  $\beta$ A tiene un amplio espectro de acción contra bacterias, hongos y virus y tiene alta afinidad por el LPS bacteriano, como el glucano (90,155).

Los resultados observados de la infección inducida durante 24 y 48 horas mostraron que no existe diferencia en el área de los acúmulos en presencia de  $\beta$ A (Tabla 10). Es posible que el péptido tenga una acción bacteriostática. Estudios *in vitro* con péptidos de  $\beta$ A sintéticos a concentraciones conocidas han demostrado eficacia después de seis horas de incubación con los microorganismos (92,93). El presente trabajo fue una observación *in situ* en el tejido cerebral y no se conocían ni la disponibilidad ni la concentración del péptido en el medio y posiblemente esto pudo influir en el tiempo de acción del péptido para aglutinar las bacterias. También, diversos autores proponen que uno de los mecanismos de acción microbicida del péptido  $\beta$ A, es mediante la formación de poros en la membrana de la célula, a través de interacciones hidrofóbicas, los cuales generan toxicidad y muerte (156). Por lo anterior, es necesario realizar experimentos adicionales que permitan dilucidar si el péptido  $\beta$ A es capaz de inducir la muerte del microorganismo, impide su reproducción o si actúa con los dos mecanismos.

Por otro lado, se encontró que a 48 horas posterior a la infección, al menos el 30% de los acúmulos bacterianos colocalizaron con el péptido  $\beta$ A (Tabla 9), posiblemente esto pudo estar relacionado a la disminución del metabolismo y muerte celular; si bien los tejidos fueron incubados en un medio adecuado, no se tuvieron en cuenta las condiciones óptimas para un cultivo celular, afectando así, la disponibilidad y producción de  $\beta$ A en el medio.

Finalmente, hubo una baja asociación entre el área del péptido  $\beta$ A y el área del acúmulo bacteriano (Tabla 11). Spitzer y Col. (93), calcularon el área del  $\beta$ A de forma similar a como se realizó en este estudio. Sin embargo, no evaluaron la asociación entre las bacterias

aglutinadas y el péptido  $\beta$ A, por lo que no es posible comparar los resultados. Los demás reportes de estudios en donde evalúan colocalización del péptido  $\beta$ A con agentes infecciosos, son limitados y lo demuestran mediante la detección de una parte del agente (LPS o ADN) *in situ* (77). Por lo que es necesario corroborar si a mayor cantidad de  $\beta$ A hay mayor aglutinación de bacterias.

La baja detección de agentes infecciosos en la mayoría de los casos con EA, a diferencia de lo observado en otros estudios, podría tener diferentes causas: en primer lugar, es posible que la participación de los agentes infecciosos en la etiología de la EA (acción directa) sea en etapas tempranas de la enfermedad o a través de la inducción de respuesta inmune local o sistémica (acción indirecta).

En segundo lugar, la búsqueda inicial de los agentes infecciosos se realizó a nivel de corteza cerebral, hipocampo y corteza cerebelar. Sin embargo, al no encontrar ningún agente infeccioso en los primeros 10 casos analizados, se decidió restringir la búsqueda de los agentes específicamente en la corteza temporal de los demás casos pendientes por estudiar. Se seleccionó esta región cerebral, porque es una de las primeras en afectarse y la más afectada por la enfermedad (112). Además, entre los estudios que demostraron la presencia directa de ADN de origen infeccioso, la corteza temporal ha sido de las más utilizadas para dicha detección. Aun así, no fue posible encontrar agentes infecciosos en la mayoría de los casos con EA, concordando con los resultados obtenidos en la búsqueda inicial cuando se incluyó un mayor número de regiones cerebrales. Por lo anterior, es posible que los agentes no invadan todas las regiones cerebrales de forma permanente, sino que pueden restringirse al sitio anatómico que facilita el acceso al parénquima cerebral (nervio olfatorio o plexos coroides) o sólo invadir otras zonas en momentos de reactivación.

Existe la posibilidad, si realmente agentes infecciosos como virus participan directamente en el desarrollo de la EA, sean agentes que aún no han sido descritos en la literatura científica, es decir virus nuevos o virus que, gracias a los mecanismos de coevolución, se hayan incorporado al genoma humano y participen en la regulación de la expresión génica y al no ser patógenos hayan sido poco estudiados o las técnicas usadas en este estudio no tengan la sensibilidad para detectarlos. En este sentido, Ludvik y col. (157), demostraron que los retrovirus endógenos corresponden al 8% del ADN total humano y participan en el patrón de expresión en células progenitoras humanas de origen neuronal, estos retrovirus endógenos también han sido asociados a otros desórdenes neurológicos como esclerosis lateral amiotrófica, esquizofrenia y trastorno afectivo bipolar, sin embargo, es un tema poco explorado y que necesita estudios adicionales. De hecho, específicamente para la esclerosis lateral amiotrófica, se ha descrito una sinergia por parte de los virus en las neuronas motoras, por medio de su interacción en vías de expresión génica, estrés oxidativo o neuroinflamación (157).

Otra posibilidad es que se trate de virus nuevos, teniendo en cuenta que solo sólo se conoce el 1% del total de virus que existen, sería pertinente usar otras metodologías diagnósticas que

sean capaz de detectarlos, ya que tanto los microarreglos como la PCR multiplex, detectan secuencias conocidas y publicadas en la base de datos como el NCBI. En este sentido, opciones metodológicas como la secuenciación de próxima generación (NGS del inglés *Next-Generation DNA Sequencing*) o la amplificación de único cebador independiente de secuencia (SISPA del inglés *sequence independent single primer amplification*), serían relevantes en la búsqueda de nuevos virus asociados a la EA,

Finalmente, se conoce que frente a una infección, el organismo activa la respuesta inmune innata y adaptativa; en el primer caso, células del sistema inmune innato como macrófagos, neutrófilos y natural killer, se activan y liberan al medio citoquinas, quimioquinas y óxido nítrico, entre otros. Estas moléculas, además de atraer y activar otras células, producen un estado inflamatorio (158). Las vías de señalización que se activan en la respuesta inmune frente a una infección viral, también se han relacionado con la EA y con otras enfermedades neurodegenerativas (159). Además, el óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno durante la respuesta inmune a patógenos pueden participar en la agregación anómala del  $\beta$ A y de pTAU (24). McManus y col. (76), demostraron que la microglia, macrófagos residentes del tejido cerebral, puede responder a estímulos locales o periféricos y generar una memoria inmune a nivel cerebral que, al enfrentarse de forma repetida a un mismo estímulo infeccioso, responderá de forma exacerbada y puede influir en la progresión de la EA. Lo anterior puede sugerir que la producción y acumulación del  $\beta$ A en este tipo de demencia, es una consecuencia de la estimulación de la respuesta inmune de tipo innata frente a uno o varios agentes infecciosos, lo que se puede relacionar, con la colocalización de agentes virales, bacterianos y fúngicos con las placas seniles que han sido observadas en algunos estudios (135,160). Posterior al autoensamblaje del  $\beta$ A en respuesta a un agente infeccioso, este péptido de forma anómala se unirá a membranas dentro de las neuronas, como en el caso de la mitocondria, generando poros y estrés oxidativo, un mecanismo de daño asociados a la EA.

## 11. CONCLUSIONES

A pesar de que la mayoría de los casos incluidos en este estudio presentaron infecciones que se han descrito de forma frecuente en la población mayor, estas infecciones se presentaron como consecuencia del estado avanzado de la EA y no por estar asociados con la presentación o desarrollo de esta demencia.

Aunque en ambos grupos, la mayoría de las muestras fueron negativas para agentes infecciosos por diferentes metodologías, se detectaron agentes infecciosos en tejido encefálico *post mortem* tanto en el grupo control como en los casos con EA. Por lo anterior no es posible determinar si los agentes infecciosos tienen una participación directa sobre el desarrollo o progresión de la EA.

Los resultados obtenidos en este estudio no permiten apoyar la hipótesis de una etiología infecciosa para la EA porque se aislaron microorganismos en los dos grupos de estudio. Sin embargo, no se cuantificaron anticuerpos contra los virus más implicados en la EA para determinar si existe una correlación entre haber tenido una infección y sufrir EA (acción indirecta).

Con los resultados obtenidos por PCR Multiplex, microarreglos y el aislamiento microbiano, se concluye que no existe una correspondencia entre la detección de agentes virales por PCR Multiplex, ni entre las bacterias detectadas por microarreglos y aquellas que fueron aisladas a partir de tejido cerebral. Sería conveniente realizar estudios adicionales mediante el uso de técnicas con una mejor sensibilidad que permitan detectar de forma directa (ADN o sus componentes) los agentes infecciosos en el tejido cerebral, con el fin de comprobar si realmente existe una participación directa de estos agentes en el desarrollo de la EA.

Considerando que los acúmulos bacterianos presentes en el tejido cerebral son más pequeños cuando se encuentran colocalizados con el péptido  $\beta A$ , es posible pensar que este péptido puede inducir aglutinación de microorganismos y a razón de esto, es que se da su oligomerización. Sin embargo, son necesarios más estudios que permitan por un lado corroborar estos resultados y establecer el mecanismo de acción como péptido antimicrobiano y por el otro, que permitan explicar cuáles son las células que participan en la secreción de este péptido y la secuencia de eventos que se dan frente a una respuesta inmune innata.

Aunque el trabajo brinda información alrededor de la hipótesis infecciosa de la etiología de la EA, es importante hacer alusión a algunas limitaciones que se pueden identificar:

1. La selección de las muestras que conforman cada grupo de estudio fue conveniencia, esto impidió controlar algunas variables como el sexo y el tamaño muestra en cada grupo de estudio.
2. El tamaño muestral, a pesar de que éste supera el número de casos estudiados en comparación con otros estudios similares, es posible que no haya sido representativo.
3. El manejo no estéril de los cerebros al momento de la donación pudo dificultar la interpretación del papel de las bacterias y hongos ambientales o de la microbiota humana, aislados en algunas muestras.

Finalmente, la EA es una enfermedad multifactorial, en la que participan factores intrínsecos y extrínsecos, entre estos se encuentran los factores ambientales, en dónde se podrían incluir los agentes infecciosos, los cuales podrían activar, de forma repetitiva, la respuesta inmune, promover la inflamación y como resultados la neurodegeneración.

## 12. REFERENCIAS

1. American Psychiatric Association. DSM-V. quinta. Panamericana, editor. 2014.
2. Lopera F. La enfermedad de Alzheimer familiar. *Rev Neuropsicol Neuropsiquiatría y Neurociencias*. 2012; 12:163–88.
3. Rabinovici BGD. Late-onset Alzheimer Disease. 2019;(February):14–33.
4. Jack Jr CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Budd Haeberlein S, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease HHS Public Access Author manuscript. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2018;14(4):535–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>.
5. S.S. Mirra, A. Heyman, D. Mackeel, S.M Sumi, B.J. Crain L. B. The consortium to establish a registry for alzheimer's Disease (CERAD). *Neurology*. 1991;
6. Ikeda T, Yamada M. Risk factors for alzheimer disease. *Brain and Nerve*. 2019;62(7):679–90.
7. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 Sep 15];13(6):614–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24849862>
8. Herrup K. Reimagining Alzheimer's disease - An age-based hypothesis. Vol. 30, *Journal of Neuroscience*. 2010. p. 16755–62.
9. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H BG. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2013;9(2):106–18.
10. Yu Yamazaki, Na Zhao, Thomas R. Caulfield, Chia-Chen Liu GB. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol*. 2019;17(3):501–518.
11. Shinohara M, Murray ME, Frank RD, Shinohara M, DeTure M, Yamazaki Y, et al. Impact of sex and APOE4 on cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2016 Aug 1;132(2):225–34.
12. Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid- $\beta$  [Internet]. [cited 2020 May 6]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3381721/>
13. Carmona S, Zahs K, Wu E, Dakin K, Bras J, Guerreiro R. The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Vol. 17, *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2018. p. 721–30.
14. Kalaria RN. Vascular basis for brain degeneration: Faltering controls and risk factors for dementia. *Nutr Rev*. 2010;68(SUPPL. 2):S74–87.
15. Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, Ball MJ. Microbes and Alzheimer's Disease Recommended Citation. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2016;51(4):979–84. Available from: [http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-160152%0Ahttp://digitalcommons.pcom.edu/scholarly\\_papers/1657](http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-160152%0Ahttp://digitalcommons.pcom.edu/scholarly_papers/1657)
16. Ahmed RM, Devenney EM, Irish M, Ittner A, Naismith S, Ittner LM, et al. Neuronal network disintegration: Common pathways linking neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(11):1234–41.
17. Henry W. Querfurth, M.D., Ph.D., and Frank M. LaFerla P. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 362, [Internet]. 2010;362:329–344. Available from:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416062318100546>
18. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, et al. ApoE influences amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) clearance despite minimal apoE/A $\beta$  association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 7;110(19):E1807–16.
  19. Zhao Z, Sagare AP, Ma Q, Halliday MR, Kong P, Kisler K, et al. Central role for PICALM in amyloid- $\beta$  blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat Neurosci*. 2015 Jun 25;18(7):978–87.
  20. Merkwirth C, Martinelli P, Korwitz A, Morbin M, Brönneke HS, Jordan SD, et al. Loss of Prohibitin Membrane Scaffolds Impairs Mitochondrial Architecture and Leads to Tau Hyperphosphorylation and Neurodegeneration. *PLoS Genet* [Internet]. 2012 Nov [cited 2020 May 12];8(11):e1003021. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23144624>
  21. Llorens-Martín M, López-Doménech G, Soriano E, Avila J. GSK3 $\beta$  Is Involved in the Relief of Mitochondria Pausing in a Tau-Dependent Manner. LeBlanc AC, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Nov 14 [cited 2020 May 12];6(11):e27686. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0027686>
  22. Palop JJ, Mucke L. Amyloid-B-induced neuronal dysfunction in Alzheimer’s disease: From synapses toward neural networks. Vol. 13, *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2010. p. 812–8.
  23. Sepulveda-Falla D, Glatzel M, Lopera F. Phenotypic profile of early-onset familial Alzheimer’s disease caused by presenilin-1 E280A mutation. *J Alzheimer’s Dis*. 2012;32(1):1–12.
  24. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer’s Disease. 2016 [cited 2018 Mar 29]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>
  25. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease at 25 years. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2016;8(e201606210):1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025652>
  26. Bryan KJ, Lee H, Perry G, Smith MA, Casadesus G. Transgenic Mouse Models of Alzheimer’s Disease: Behavioral Testing and Considerations [Internet]. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis; 2009 [cited 2020 May 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204338>
  27. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer’s Disease with plaques and tangles: Intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409–21.
  28. Middleton PJ, Petric M, Kozak M, Rewcastle NB, Crapper McLachlan DR. HERPES-SIMPLEX VIRAL GENOME AND SENILE AND PRESENILE DEMENTIAS OF ALZHEIMER AND PICK. Vol. 315, *The Lancet*. 1980. p. 1038.
  29. Bu XL, Yao XQ, Jiao SS, Zeng F, Liu YH, Xiang Y, et al. A study on the association between infectious burden and Alzheimer’s disease. *Eur J Neurol*. 2015;22(12):1519–25.
  30. Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2002;202(1–2):13–23.
  31. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Glass*. 2010;140(6):918–34.

32. Licastro F, Carbone I, Raschi E, Porcellini E. The 21st century epidemic: infections as inductors of neuro-degeneration associated with Alzheimer's Disease. *Immun Ageing* [Internet]. 2014;11(1):1–9. Available from: <http://www.immunityageing.com/content/11/1/22>
33. Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, et al. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J* [Internet]. 2005 Aug [cited 2019 Feb 11];19(10):1329–31. Available from: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.05-3776fje>
34. Lövheim H, Gilthorpe J, Adolfsson R, Nilsson L-G, Elgh F. Reactivated herpes simplex infection increases the risk of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2014;11:1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043910>
35. Samplins M, Roles KA. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. 2007;7(February):161–7.
36. Westergaard L, Christensen HM, Harris DA. The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2007;1772(6):629–44. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443907000609>
37. Andrés C, Lanau V. *biología molecular Prion diseases : from molecular biology to clinical practice*. 2010;26(2).
38. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2017;38(9):1205–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2017.28>
39. Dohler F, Sepulveda-Falla D, Krasemann S, Altmeyen H, Schlüter H, Hildebrand D, et al. High molecular mass assemblies of amyloid- $\beta$  oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease. *Brain*. 2014;137(3):873–86.
40. Barry AE, Klyubin I, Mc Donald JM, Mably AJ, Farrell MA, Scott M, et al. Alzheimer's Disease Brain-Derived Amyloid- $\beta$ -Mediated Inhibition of LTP In Vivo Is Prevented by Immunotargeting Cellular Prion Protein. *J Neurosci* [Internet]. 2011;31(20):7259–63. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.6500-10.2011>
41. Debatin L, Streffer J, Geissen M, Matschke J, Aguzzi A, Glatzel M. Association between deposition of  $\beta$ -amyloid and pathological prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurodegener Dis*. 2008;5(6):347–54.
42. Watts JC, Condello C, Stohr J, Oehler A, Lee J, DeArmond SJ, et al. Serial propagation of distinct strains of A prions from Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2018 Oct 9];111(28):10323–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982139>
43. Greenwald J, Riek R. Biology of amyloid: Structure, function, and regulation. *Structure*. 2010;18(10):1244–60.
44. Carbone I, Lazzarotto T, Ianni M, Porcellini E, Forti P, Masliah E, et al. Herpes virus in alzheimer's disease: Relation to progression of the disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2014;35(1):122–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.024>
45. Tian P, Boomsma W, Wang Y, Otzen DE, Jensen MH, Lindorff-Larsen K. What

- does Evolution Tell us about the Structure of a Functional Amyloid Protein? *Biophys J* [Internet]. 2015;108(2):227a. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.1253>
46. Luis Thomasini R. Introductory Chapter: Human Herpesvirus - A Short Introduction. In: *Human Herpesvirus Infection - Biological Features, Transmission, Symptoms, Diagnosis and Treatment*. IntechOpen; 2020.
  47. Martin C, Concha MI, Otth C. Herpes simplex virus tipo 1 como factor de riesgo asociado con la enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2011;139:779–86.
  48. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Craske J, Itzhaki RF. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol*. 1991;33(4):224–7.
  49. Lövheim H, Gilthorpe J, Johansson A, Eriksson S, Hallmans G, Elgh F. Herpes simplex infection and the risk of Alzheimer's disease: A nested case-control study. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2015;11(6):587–92. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526014027708>
  50. Steel AJ, Eslick GD. Herpes Viruses Increase the Risk of Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2015 Jul 24 [cited 2018 Oct 8];47(2):351–64. Available from: <http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-140822>
  51. Piacentini R, Li Puma DD, Ripoli C, Marcocci ME, De Chiara G, Garaci E, et al. Herpes Simplex Virus type-1 infection induces synaptic dysfunction in cultured cortical neurons via GSK-3 activation and intraneuronal amyloid- $\beta$  protein accumulation. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(June):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep15444>
  52. Cheng S Bin, Ferland P, Webster P, Bearer EL. Herpes simplex virus dances with amyloid precursor protein while exiting the cell. *PLoS One*. 2011;6(3).
  53. Carter CJ. APP, APOE, complement receptor 1, clusterin and PICALM and their involvement in the herpes simplex life cycle. *Neurosci Lett* [Internet]. 2010;483(2):96–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.066>
  54. Stiles KM, Milne RSB, Cohen GH, Eisenberg RJ, Krummenacher C. The herpes simplex virus receptor nectin-1 is down-regulated after trans-interaction with glycoprotein D. *Virology* [Internet]. 2008 Mar 30 [cited 2018 Oct 9];373(1):98–111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076965>
  55. Cribbs DH, Azizeh BY, Cotman CW, LaFerla FM. Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide. *Biochemistry* [Internet]. 2000 May 23 [cited 2018 Oct 9];39(20):5988–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10821670>
  56. Kristen H, Santana S, Sastre I, Recuero M, Bullido MJ, Aldudo J. Herpes simplex virus type 2 infection induces AD-like neurodegeneration markers in human neuroblastoma cells. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2015;36(10):2737–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.06.014>
  57. Readhead B, Funk CC, Ehrlich ME, Gandy S, Dudley JT, Readhead B, et al. Multiscale Analysis of Independent Alzheimer ' s Cohorts Finds Disruption of Molecular , Genetic , and Clinical Networks by Human Herpesvirus Article

- Multiscale Analysis of Independent Alzheimer ' s Cohorts Finds Disruption of Molecular , Genetic , and Cl. 2018;1–19.
58. Talwar P, Gupta R, Kushwaha S, Agarwal R, Saso L, Kukreti S, et al. Viral induced oxidative and inflammatory response in Alzheimer's disease pathogenesis with identification of potential drug candidates: A systematic review using systems biology approach. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2018 Apr 19 [cited 2018 Oct 9];16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29676229>
  59. Barnes LL, Capuano AW, Aiello AE, Turner AD, Yolken RH, Fuller Torrey E, et al. Cytomegalovirus Infection and Risk of Alzheimer Disease in Older Black and White Individuals. 2014 [cited 2020 May 19]; Available from: <http://www.ibl-america.com/>
  60. Maheshwari P, Eslick GD. Bacterial Infection and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2014 Dec 2 [cited 2018 Sep 11];43(3):957–66. Available from: <http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-140621>
  61. Gérard HC, Dreses-Werringloer U, Wildt KS, Deka S, Oszust C, Balin BJ, et al. *Chlamydia* (*Chlamydia*) *pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;48(3):355–66.
  62. MacIntyre a, Hammond CJ, Little CS, Appelt DM, Balin BJ. *Chlamydia pneumoniae* infection alters the junctional complex proteins of human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2002;217(2):167–72. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12480099](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12480099)
  63. Lim C, Hammond CJ, Hingley ST, Balin BJ. *Chlamydia pneumoniae* infection of monocytes in vitro stimulates innate and adaptive immune responses relevant to those in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2014;11(1):5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4295513&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  64. Prescott, harley, Klein. *Microbiología*. 5ta edición.
  65. Miklossy J, Balin BJ, Crean S, Mccully K. Historic evidence to support a causal relationship between spirochetal infections and Alzheimer's disease. 2015 [cited 2018 Oct 9]; Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  66. Coureuil M, Lécuyer H, Bourdoulous S, Nassif X. A journey into the brain: insight into how bacterial pathogens cross blood–brain barriers. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017 Mar 16 [cited 2018 Sep 15];15(3):149–59. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.178>
  67. Miklossy J. Alzheimer's disease - a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2011;8(1):90. Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/8/1/90>
  68. Poole S, Singhrao SK, Chukkapalli S, Rivera M, Velsko I, Kesavalu L, et al. Active invasion of *Porphyromonas gingivalis* and infection-induced complement activation in ApoE<sup>-/-</sup> mice brains. *J Alzheimer's Dis*. 2014;43(1):67–80.
  69. Allen HB, Allawh RM, Gresham K, Donnelly K, Goyal K. Tertiary Lyme Disease. *Clin Microbiol Open Access*. 2018;07(02):2–4.

70. Laugisch O, Johnen A, Maldonado A, Ehmke B, Walter B, Olsen I, et al. Periodontal Pathogens and Associated Intrathecal Antibodies in Early Stages of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2018 Sep 11 [cited 2018 Oct 10];1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30223397>
71. Leira Y, Domínguez C, Seoane J, Seoane-Romero J, Pías-Peleteiro JM, Takkouche B, et al. Is Periodontal Disease Associated with Alzheimer's Disease? A Systematic Review with Meta-Analysis. Vol. 48, *Neuroepidemiology*. S. Karger AG; 2017. p. 21–31.
72. Chen CK, Wu YT, Chang YC. Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: A retrospective, population-based, matched-cohort study. *Alzheimer's Res Ther*. 2017;9(1):1–7.
73. Carter CJ, France J, Crean SJ, Singhrao SK. The Porphyromonas gingivalis/Host Interactome shows enrichment in GWASdb genes related to alzheimer's disease, diabetes and cardiovascular diseases. *Front Aging Neurosci*. 2017 Dec 12;9(DEC).
74. Shindler-Itskovitch T, Ravona-Springer R, Leibovitz A, Muhsen K. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between Helicobacter pylori Infection and Dementia. *J Alzheimer's Dis*. 2016;52(4):1431–42.
75. Fani L, Wolters FJ, Ikram MK, Bruno MJ, Hofman A, Koudstaal PJ, et al. Helicobacter pylori and the risk of dementia: A population-based study. *Alzheimer's Dement*. 2018 Oct 1;14(10):1377–82.
76. McManus RM, Higgins SC, Mills KHG, Lynch MA. Respiratory infection promotes T cell infiltration and amyloid- $\beta$  deposition in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging*. 2014 Jan;35(1):109–21.
77. Zhan X, Stamova B, Jin LW, Decarli C, Phinney B, Sharp FR. Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology* [Internet]. 2016 Nov 29 [cited 2020 Oct 19];87(22):2324–32. Available from: </pmc/articles/PMC5135029/?report=abstract>
78. Wendeln A, Degenhardt K, Kaurani L, Gertig M, Ulas T, Jain G, et al. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. 2018;
79. Andreasen M, Taylor JD, Meisl G, Chapman MR, Knowles TPJ, Dobson CM, et al. Physical Determinants of Amyloid Assembly in Biofilm Formation. *MBio*. 2019;10(1):1–12.
80. Pisa D, Alonso R, Rábano A, Horst MN, Carrasco L. Fungal enolase,  $\beta$ -tubulin, and chitin are detected in brain tissue from Alzheimer's disease patients. *Front Microbiol*. 2016;7(NOV):1–12.
81. Alonso R, Pisa D, Rábano A, Carrasco L. Alzheimer's disease and disseminated mycoses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2014 Jul 23 [cited 2017 Mar 28];33(7):1125–32. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-013-2045-z>
82. Lomiguen C, Vidal L, Kozlowski P, Prancan A, Stern R. Possible Role of Chitin-Like Proteins in the Etiology of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2018 Sep 28 [cited 2018 Oct 10];1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30282354>
83. Pisa D, Alonso R, Rábano A, Carrasco L. Corpora amylacea of brain tissue from neurodegenerative diseases are stained with specific antifungal antibodies. *Front Neurosci*. 2016;10(March):1–12.
84. Pisa D, Alonso R, Juarranz A, Rábano A, Carrasco L. Direct visualization of fungal

- infection in brains from patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2015 [cited 2017 Mar 28];43(2):613–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25125470>
85. Kourbeti IS, Mylonakis E. Fungal central nervous system infections: prevalence and diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2014 Feb 6 [cited 2018 Jun 20];12(2):265–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392732>
  86. Hill JM, Clement C, Pogue AI, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw WJ. Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD). *Front Aging Neurosci*. 2014;6(JUN):1–5.
  87. Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int*. 2000;36(3):175–84.
  88. Roberts RG. Good Amyloid, Bad Amyloid—What's the Difference? *PLoS Biol*. 2016;14(1):2–4.
  89. Magrone T, Russo MA, Jirillo E. Antimicrobial Peptides: Phylogenic Sources and Biological Activities. First of Two Parts. *Curr Pharm Des*. 2018;24(10):1043–53.
  90. Kagan BL, Jang H, Capone R, Teran Arce F, Ramachandran S, Lal R, et al. Antimicrobial Properties of Amyloid Peptides NIH Public Access. *Mol Pharm*. 2012;9(4):708–17.
  91. Torrent M, Pulido D, Nogués MV, Boix E. Exploring New Biological Functions of Amyloids: Bacteria Cell Agglutination Mediated by Host Protein Aggregation. *PLoS Pathog*. 2012;8(11).
  92. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, et al. The Alzheimer's disease-associated amyloid  $\beta$ -protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. 2010;5(3):1–10.
  93. Spitzer P, Condic M, Herrmann M, Oberstein TJ, Scharin-Mehlmann M, Gilbert DF, et al. Amyloidogenic amyloid- $\beta$ -peptide variants induce microbial agglutination and exert antimicrobial activity. 2016 [cited 2020 May 18]; Available from: [www.nature.com/scientificreports/](http://www.nature.com/scientificreports/)
  94. Kumar D, Kumar V, Choi SH, Washicosky KJ, William A, Tucker S, et al. Amyloid- $\beta$  Peptide Protects Against Microbial Infection In Mouse and Worm Models of Alzheimer's Disease. *Sci Transl Med*. 2017;8(340).
  95. White MR, Kandel R, Tripathi S, Condon D, Qi L, Taubenberger J, et al. Alzheimer's Associated b-Amyloid Protein Inhibits Influenza A Virus and Modulates Viral Interactions with Phagocytes. 2014 [cited 2020 May 18]; Available from: [www.plosone.org](http://www.plosone.org)
  96. Charlotte James A, Manale Harfouche B, Nicky J Welton A, Katherine ME Turner C, Laith J Abu-Raddad B, Gottlieb SL, et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016 [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 2]. Available from: <https://www.who.int/bulletin/volumes/98/5/19-237149.pdf>
  97. OMS | Demencia [Internet]. WHO. World Health Organization; 2017 [cited 2017 Oct 17]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
  98. Washington DC. Demencia una prioriDaD De saluD pública [Internet]. [cited 2018 Oct 25]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/98377/9789275318256\\_spa.pdf;jsessionid=6AE23D113DA9048A3A4102546360DBBD?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/98377/9789275318256_spa.pdf;jsessionid=6AE23D113DA9048A3A4102546360DBBD?sequence=1)
  99. BUPA, Coste EL, Prevalencia LA, Alzheimer D, Demencia DE. La Demencia En

- América: El coste y la prevalencia del Alzheimer y otros tipos de demencia; La Demencia En América: El coste y la prevalencia del Alzheimer y otros tipos de demencia. Available from: <https://www.alz.co.uk/sites/default/files/pdfs/dementia-in-the-americas-SPANISH.pdf>
100. Pradilla A. G, Vesga A. BE, León-Sarmiento FE. Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano. *Rev Panam Salud Pública*. 2003 Aug;14(2):104–11.
  101. González Quiñones JC. Resumen: “Sabe Colombia 2015: Estudio Nacional de Salud, Bienestar y Envejecimiento.” *Cart Comunitaria*. 2017;25(144):24.
  102. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 24]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
  103. Aguirre-Acevedo DC, Lopera F, Henao E, Tirado V, Muñoz C, Giraldo M, et al. Cognitive Decline in a Colombian Kindred With Autosomal Dominant Alzheimer Disease: A Retrospective Cohort Study A mixed-effects model was used to estimate annual rates of change in cognitive test scores and to mark the onset of cognitive decline. *HHS Pub. JAMA Neurol* [Internet]. 2016;73(4):431–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5505685/pdf/nihms870505.pdf>
  104. Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J. 2016 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s Dement* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2020 Oct 19];12(4):459–509. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/27570871/>
  105. Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Lopera F, Jimenez-Del-Rio M. Cholinergic-like neurons carrying PSEN1 E280A mutation from familial Alzheimer’s disease reveal intraneuronal sAPP $\beta$  fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca<sup>2+</sup> dysregulation: Therapeutic implications. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(5):1–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0221669>
  106. Hernandez ME, Aranda-abreu GE, Herrera-rivero M, Hernández-aguilar ME, Manzo J, Aranda-abreu GE. Alzheimer ’ s disease : Immunity and diagnosis *Enfermedad de Alzheimer : inmunidad y diagnóstico*. 2016;(November).
  107. Porcellini E, Carbone I, Ianni M, Licastro F. Alzheimer ’ s disease gene signature says : beware of brain viral infections. *Immun Ageing* [Internet]. 2010;7(1):16. Available from: <http://www.immunityageing.com/content/7/1/16>
  108. Bourgade K, Garneau H, Giroux G, Le Page AY, Bocti C, Dupuis G, et al.  $\beta$ -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer’s disease-associated herpes simplex virus-1. *Biogerontology*. 2014;16(1):85–98.
  109. Wozniak MA, Itzhaki RF. Antiviral agents in Alzheimer-s disease: Hope for the future? *Ther Adv Neurol Disord*. 2010;3(3):141–52.
  110. Mirra SS. The CERAD neuropathology protocol and consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer’s disease: A commentary. *Neurobiol Aging*. 1997;18(4 SUPPL.).
  111. Valls-Pedret C, Molinuevo JL, Rami L. Diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer: Fase prodrómica y preclínica. *Rev Neurol*. 2010;51(8):471–80.
  112. Ball M, Braak H, Coleman P, Dickson D, Duyckaerts C, Gambetti P, et al. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*. 1997;18(4 SUPPL.):4–5.

113. Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli M V., Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Performance of panfungal- and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: A 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1737–40.
114. 2017 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s Dement.* 2017 Apr 1;13(4):325–73.
115. Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurologia.* 2017 Oct 1;32(8):523–32.
116. Nebel RA, Aggarwal NT, Barnes LL, Gallagher A, Goldstein JM, Kantarci K, et al. Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer’s disease: A call to action HHS Public Access Author manuscript. *Alzheimers Dement.* 2018;14(9):1171–83.
117. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al. Alzheimer’s disease. *Lancet.* 2016 Jul;388(10043):505–17.
118. Khan AM, Din JS. Guideline to Different Aspects of Assessment in Alzheimer’s Disease Patient. Vol. 2, Res. 2018.
119. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res [Internet].* 1975 [cited 2020 Oct 12];12(3):189–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1202204/>
120. James BD, Leurgans SE, Hebert LE, Scherr PA, Yaffe K, Bennett DA. Contribution of Alzheimer disease to mortality in the United States. *Neurology [Internet].* 2014 Mar 25 [cited 2020 Aug 20];82(12):1045–50. Available from: <https://n.neurology.org/content/82/12/1045>
121. de Bruijn RFAG, Ikram MA. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer’s disease. *BMC Med [Internet].* 2014 Nov 11 [cited 2020 Oct 7];12(1). Available from: [/pmc/articles/PMC4226863/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2598/27875990/)
122. Shafi O. Inverse relationship between Alzheimer’s disease and cancer, and other factors contributing to Alzheimer’s disease: A systematic review. *BMC Neurol [Internet].* 2016 Nov 22 [cited 2020 Oct 19];16(1). Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/27875990/>
123. Lawrence H, Hunter A, Murray R, Lim WS, McKeever T. Cigarette smoking and the occurrence of influenza – Systematic review. *J Infect [Internet].* 2019 Nov 1 [cited 2020 Oct 27];79(5):401–6. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/31465780/>
124. Raag M, Pärna K. Cigarette smoking and smoking-attributable diseases among Estonian physicians: A cross-sectional study. *BMC Public Health [Internet].* 2018 Jan 30 [cited 2020 Oct 27];18(1). Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/29378544/>
125. Knapp S. Diabetes and infection: Is there a link? - A mini-review [Internet]. Vol. 59, *Gerontology.* Gerontology; 2013 [cited 2020 Oct 27]. p. 99–104. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/23182884/>
126. Jay CA, Solbrig M V. Neurologic infections in diabetes mellitus. In: *Handbook of Clinical Neurology [Internet].* Elsevier B.V.; 2014 [cited 2020 Oct 27]. p. 175–94. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/25410222/>
127. Forbes H, Warne B, Doelken L, Brenner N, Waterboer T, Luben R, et al. Risk

- factors for herpes simplex virus type-1 infection and reactivation: Cross-sectional studies among EPIC-Norfolk participants. *PLoS One*. 2019;14(5):1–19.
128. Todd S, Barr S, Passmore AP. Cause of death in alzheimer’s disease: A cohort study. *QJM [Internet]*. 2013 Aug 1 [cited 2020 Aug 20];106(8):747–53. Available from: <https://academic.oup.com/qjmed/article/106/8/747/1576521>
  129. Goto T, Yoshida K, Tsugawa Y, Camargo CA, Hasegawa K. Infectious Disease-Related Emergency Department Visits of Elderly Adults in the United States, 2011-2012. *J Am Geriatr Soc [Internet]*. 2016 Jan 1 [cited 2020 Oct 12];64(1):31–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26696501/>
  130. Fox NC, Schott JM. Imaging cerebral atrophy: Normal ageing to Alzheimer’s disease [Internet]. Vol. 363, *Lancet*. Elsevier Limited; 2004 [cited 2020 Oct 14]. p. 392–4. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/15074306/>
  131. Toepper M. Dissociating normal aging from Alzheimer’s disease: A view from cognitive neuroscience. *J Alzheimer’s Dis*. 2017;57(2):331–52.
  132. Pisa Di, Alonso R, Fernández-Fernández AM, Rábano A, Carrasco L. Polymicrobial Infections in Brain Tissue from Alzheimer’s Disease Patients. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–14.
  133. Mcloughlin KS. Microarrays for pathogen detection and analysis. *Brief Funct Genomics*. 2011;10(6):342–53.
  134. Lin WR, Casas I, Wilcock GK, Itzhaki RF. Neurotropic viruses and Alzheimer’s disease: A search for varicella zoster virus DNA by the polymerase chain reaction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry [Internet]*. 1997 [cited 2020 Oct 17];62(6):586–9. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/9219743/>
  135. Wozniak M, Mee AP, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer’s disease amyloid plaques. *J Pathol [Internet]*. 2009 Jan [cited 2020 Oct 17];217(1):131–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.2449>
  136. Kittur SD, Hoh JH, Kawas CH, Hayward GS, Endo H, Adler WH. A molecular hybridization study for the presence of Herpes simplex, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in brain and blood of Alzheimer’s disease patients. *Arch Gerontol Geriatr [Internet]*. 1992 [cited 2020 Oct 17];15(1):35–41. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/15374379/>
  137. Melvyn J, Ball WJL, Eli M, Kammerman and JMH. Intracerebral propagation of Alzheimer’s disease: strengthening evidence of a herpes simplex virus etiology. *Alzheimers Dement*. 2013;2(5):169–75.
  138. Mori I, Kimura Y, Naiki H, Matsubara R, Takeuchi T, Yokochi T, et al. Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer’s disease. *J Med Virol [Internet]*. 2004 Aug [cited 2020 Oct 22];73(4):605–11. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/15221907/>
  139. Tsai M-C, Cheng W-L, Sheu J-J, Huang C-C, Shia B-C, Kao L-T, et al. Increased risk of dementia following herpes zoster ophthalmicus. Messaoudi I, editor. *PLoS One [Internet]*. 2017 Nov 22 [cited 2020 Oct 17];12(11):e0188490. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0188490>
  140. Ou Y-N, Zhu J-X, Hou X-H, Shen X-N, Xu W, Dong Q, et al. Associations of Infectious Agents with Alzheimer’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimer’s Dis*. 2020 Apr 7;75(1):299–309.
  141. Kleines M, Schiefer J, Stienen A, Blaum M, Ritter K, Häusler M. Expanding the spectrum of neurological disease associated with Epstein-Barr virus activity. *Eur J*

- Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2017 Mar 28];30(12):1561–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-011-1261-7>
142. Itzhaki RF. Corroboration of a major role for herpes simplex virus type 1 in Alzheimer’s disease [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2018 [cited 2020 Oct 17]. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/30405395/>
  143. Góralaska K, Blaszkowska J, Dzikowiec M. Neuroinfections caused by fungi [Internet]. Vol. 46, *Infection*. Urban und Vogel GmbH; 2018 [cited 2020 Oct 27]. p. 443–59. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/29785613/>
  144. Valero C, de la Cruz-Villar L, Zaragoza Ó, Buitrago MJ. New Panfungal Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol*. 2016;54(12):2910–8.
  145. Alonso R, Pisa D, Marina AI, Morato E, Rábano A, Rodal I, et al. Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Biol Sci*. 2015;11(5):546–58.
  146. Pisa D, Alonso R, Rábano A, Rodal I, Carrasco L. Different Brain Regions are Infected with Fungi in Alzheimer’s Disease. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2015;1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep15015>
  147. Alonso R, Pisa D, Fernández-Fernández AM, Carrasco L. Infection of fungi and bacteria in brain tissue from elderly persons and patients with Alzheimer’s disease. *Front Aging Neurosci*. 2018;10(MAY):1–20.
  148. Sawyer EB, Claessen D, Gras SL, Perrett S. Exploiting amyloid: How and why bacteria use cross- $\beta$  fibrils. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(4):728–34.
  149. B. Allen H, Morales D. Alzheimers Disease: a novel hypothesis integrating spirochetes, biofilm, and the immune system. *J Neuroinfectious Dis*. 2016;07(01):1–3.
  150. Miklossy J. Bacterial Amyloid and DNA are Important Constituents of Senile Plaques: Further Evidence of the Spirochetal and Biofilm Nature of Senile Plaques. *J Alzheimer’s Dis*. 2016;53(4):1459–73.
  151. Brouwer MC, van de Beek D. Management of bacterial central nervous system infections. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017 [cited 2020 Oct 18]. p. 349–64. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/28187809/>
  152. Kiryanov SA, Levina TA, Polyakov AP, Rebrikova I V., Murashko DA, Konopleva M V., et al. Detection of Epstein-Barr virus genome in oral cavity squamous cell carcinoma samples of Russian patients. *Vopr Virusol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Oct 17];64(3):112–7. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/31622057/>
  153. Stojanov IJ, Woo S Bin. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus associated conditions of the oral mucosa. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2020 Oct 17];32(1):3–11. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/25749203/>
  154. Asti A, Gioglio L. Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation? *J Alzheimer’s Dis*. 2014;39(1):169–79.
  155. Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, Laferla FM. Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Exacerbates Tau Pathology by a Cyclin-Dependent Kinase 5-Mediated Pathway in a Transgenic Model of Alzheimer’s Disease. 2005 [cited 2019

- Feb 11]; Available from:  
<http://www.jneurosci.org/content/jneuro/25/39/8843.full.pdf>
156. Kawahara M. Neurotoxicity of  $\beta$ -Amyloid Protein: Oligomerization, Channel Formation and Calcium Dyshomeostasis. *Curr Pharm Des.* 2012;16(25):2779–89.
  157. Brattå PL, Jö Nsson ME, Fasching L, Jern P, Parmar M, Correspondence JJ, et al. TRIM28 Controls a Gene Regulatory Network Based on Endogenous Retroviruses in Human Neural Progenitor Cells. *Cell Rep [Internet].* 2017 [cited 2020 Oct 24];18:1–11. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.010><http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.010>
  158. Kang SJ, Liang HE, Reizis B, Locksley RM. Regulation of Hierarchical Clustering and Activation of Innate Immune Cells by Dendritic Cells. *Immunity [Internet].* 2008;29(5):819–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.017>
  159. Costa Sa AC, Madsen H, Brown JR. Shared Molecular Signatures Across Neurodegenerative Diseases and Herpes Virus Infections Highlights Potential Mechanisms for Maladaptive Innate Immune Responses. *Sci Rep [Internet].* 2019 Dec 1 [cited 2020 Oct 15];9(1). Available from:  
[/pmc/articles/PMC6584587/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35000000/)
  160. Dasari M, Espargaro A, Sabate R, Lopez Del Amo JM, Fink U, Grelle G, et al. Bacterial Inclusion Bodies of Alzheimer's Disease  $\beta$ -Amyloid Peptides Can Be Employed To Study Native-Like Aggregation Intermediate States. *ChemBioChem.* 2011;12(3):407–23.