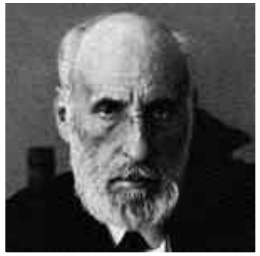


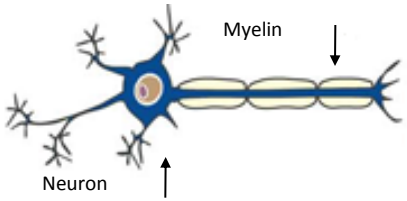
PAPEL DE LA MICROBIOTA EN EL CONTROL Y DESARROLLO DE LA ESCLEROSIS MULTIPLE

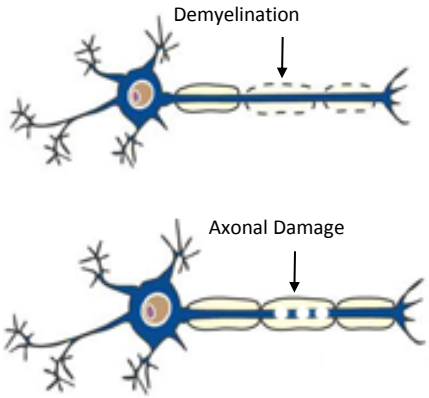
Carmen Guaza
Grupo de Neuroinmunología
Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas

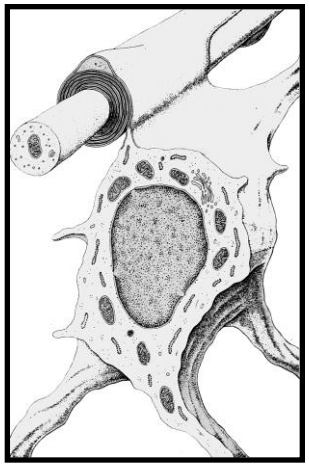
UIMP 2016
Nuevos Avances y Desafíos en Esclerosis Múltiple

ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Principales características





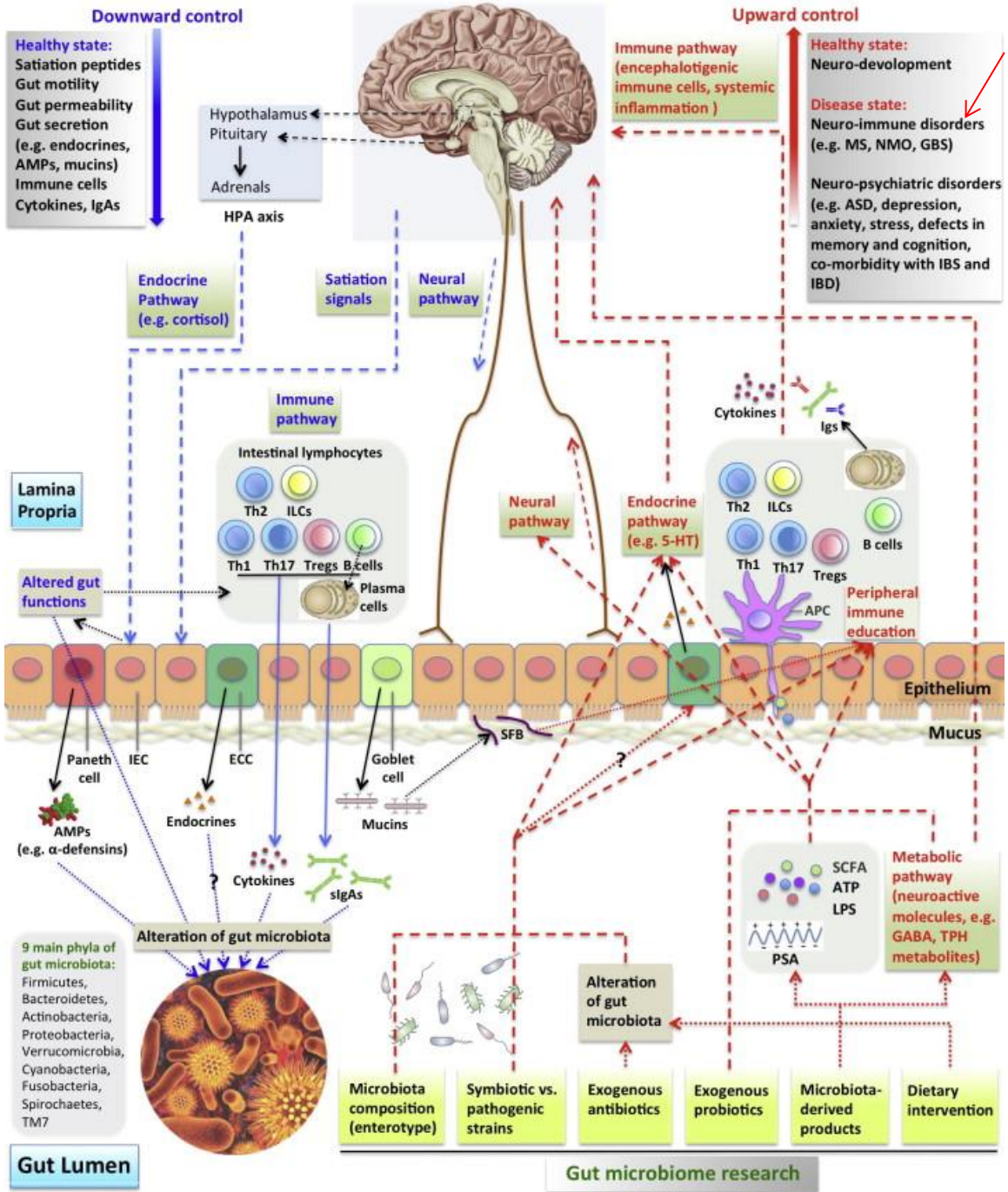


Etiología desconocida:

- Factores genéticos (HLA Clase II, alelos DR15/DQw6)
- Factores ambientales (Latitud, Infección virus Epstein -Barr, Vitamina D, Tabaco…)
- Interacciones genético-ambientales
- Mecanismos epigenéticos (Micro ARNs, Metilación de ADN, Histonas)

Microbiota

EJE INTESTINO-CEREBRO



Wang and Kasper 2015

Que es la microbiota???

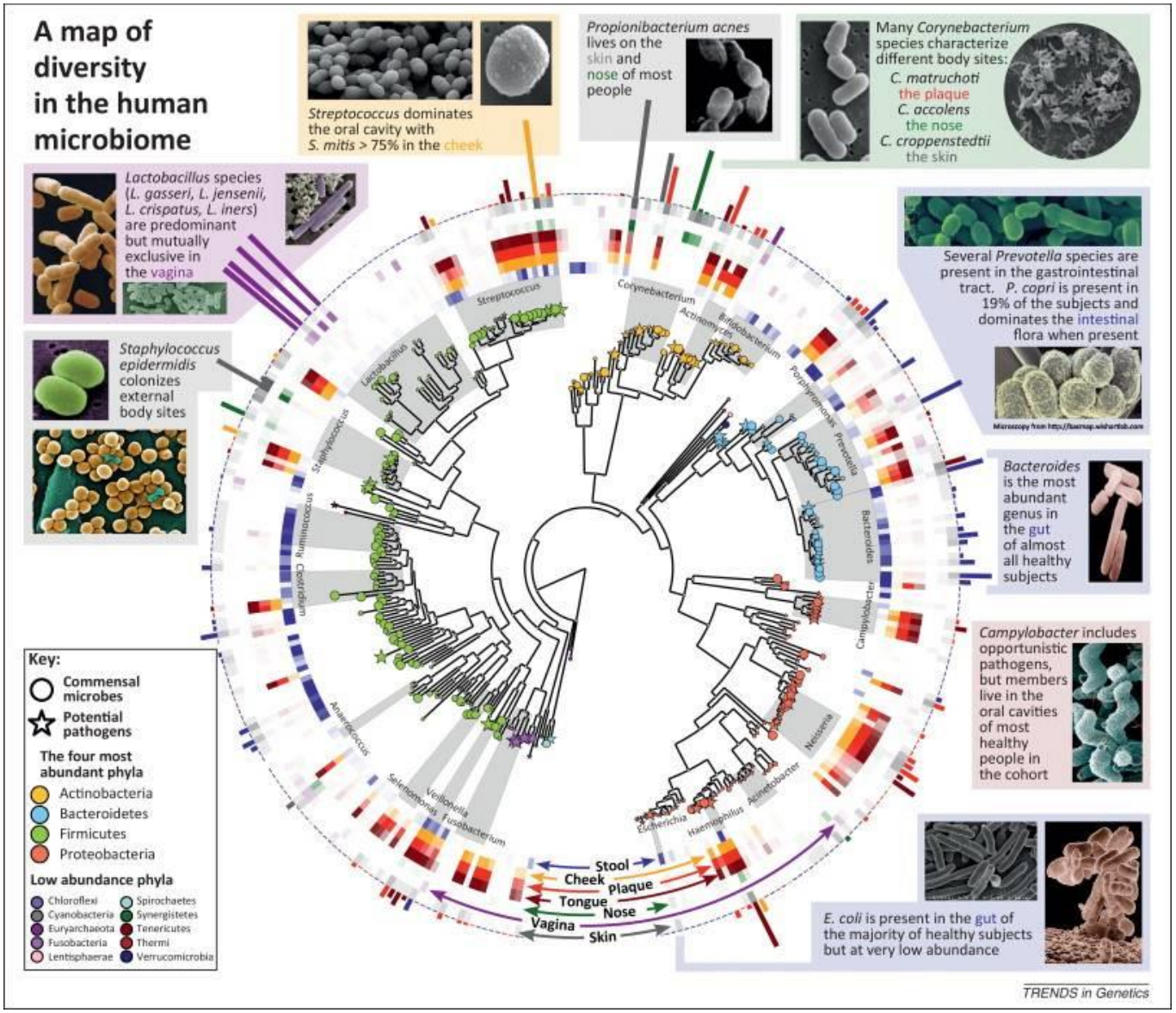
Ecosistema microbiano complejo que reside en gran parte en el intestino distal

Contiene casi 100 trillones de microorganismos, la mayoría de las cuales son bacterias.
Se han identificado más de 1000 especies de bacterias

Phylum Bacteroidetes

Phylum Firmicutes

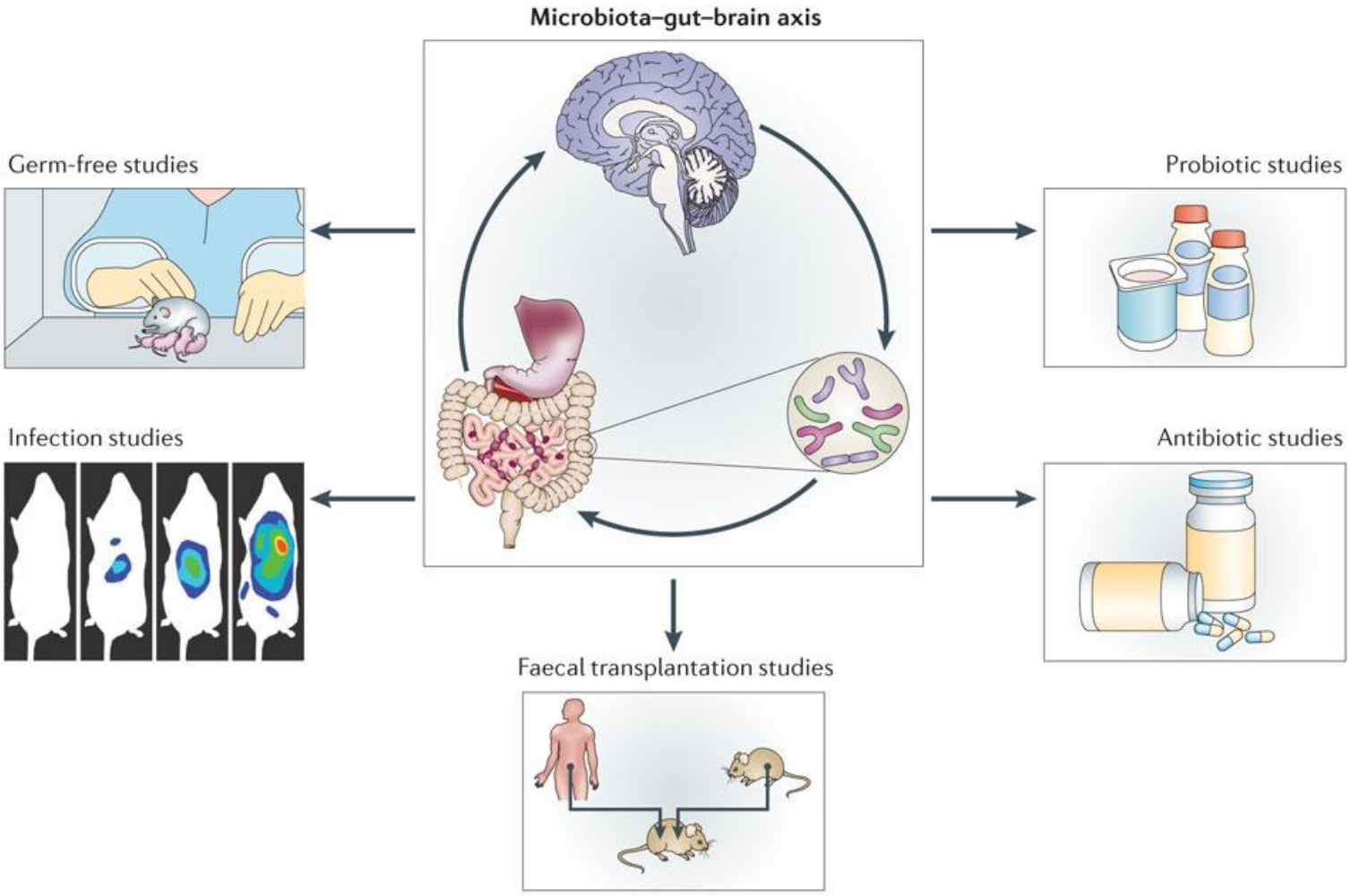
90% de las categorías filogenéticas


A map of diversity in the human microbiome
Streptococcus dominates the oral cavity with S. mitis > 75% in the cheek
Propionibacterium acnes lives on the skin and nose of most people
Many Corynebacterium species characterize different body sites:
C. matruchoti the plaque
C. accolens the nose
C. croppenstedtii the skin
Lactobacillus species (L. gasseri, L. jensenii, L. crispatus, L. iners) are predominant but mutually exclusive in the vagina
Several Prevotella species are present in the gastrointestinal tract. P. copri is present in 19% of the subjects and dominates the intestinal flora when present
Staphylococcus epidermidis colonizes external body sites
Bacteroides is the most abundant genus in the gut of almost all healthy subjects
Campylobacter includes opportunistic pathogens, but members live in the oral cavities of most healthy people in the cohort
E. coli is present in the gut of the majority of healthy subjects but at very low abundance
Streptococcus
Corynebacterium
Actinomyces
Bifidobacterium
Lactobacillus
Propionibacterium
Prevotella
Staphylococcus
Bacteroides
Clostridium
Campylobacter
Anaerococcus
Neisseria
Selenomonas
Veillonella
Fusobacterium
Escherichia
Haemophilus
Acinetobacter
Stool
Cheek
Plaque
Tongue
Nose
Vagina
Skin
Key:
Commensal microbes
Potential pathogens
The four most abundant phyla
Actinobacteria
Bacteroidetes
Firmicutes
Proteobacteria
Low abundance phyla
Chloroflexi
Cyanobacteria
Euryarchaeota
Fusobacteria
Lentisphaerae
Spirochaetes
Synergistetes
Tenericutes
Thermi
Verrucomicrobia
TRENDS in Genetics

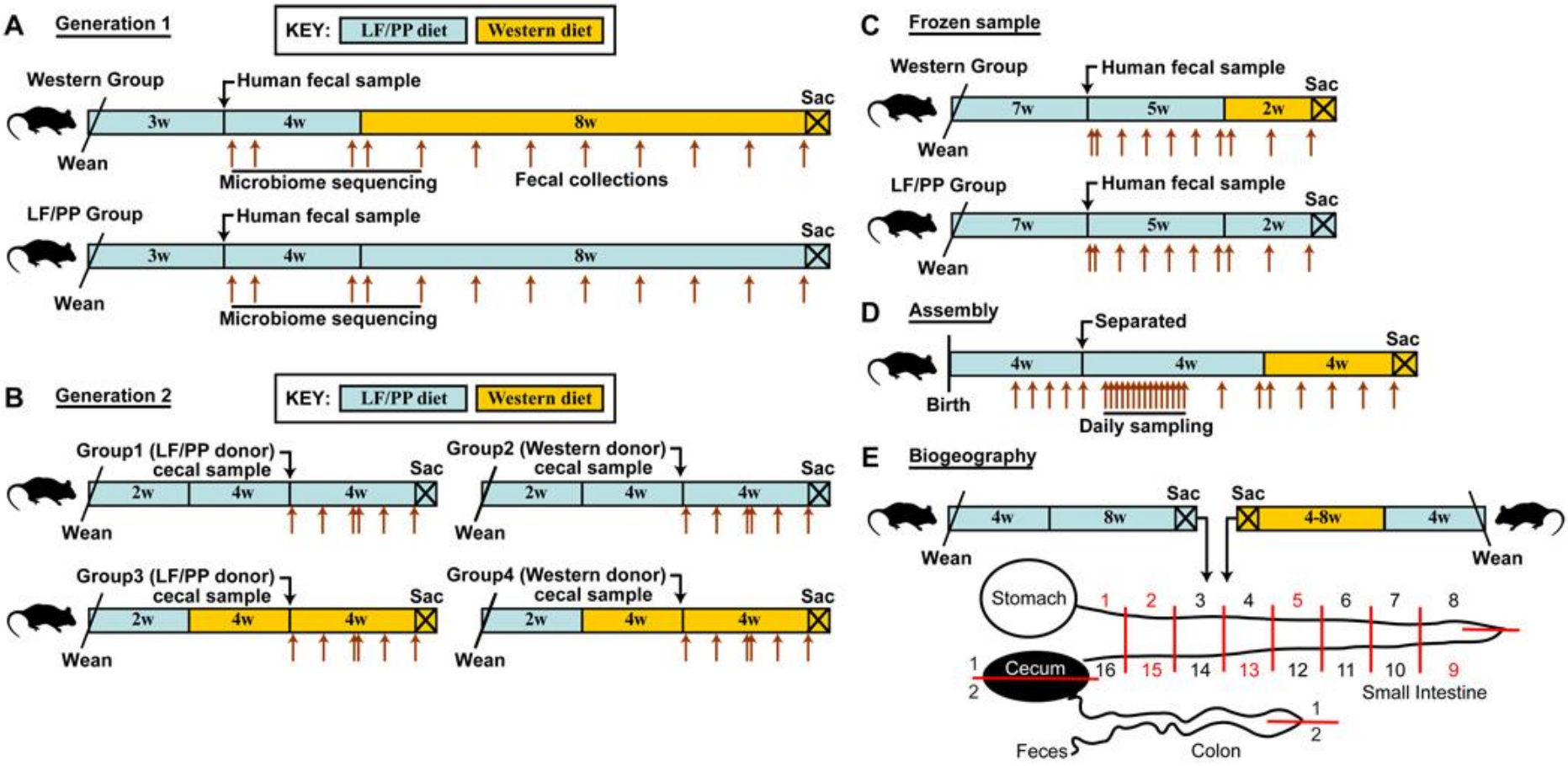
FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA MICROBIOTA

Integridad de la barrera epitelial y barrera a la colonización de patógenos
Desarrollo de la Respuesta Inmune, Maduración del S. Inmune
Fuente de Energía, Biosíntesis de Vitamina K y Vitaminas de Grupo B
Funciones Metabólicas: degradación de polisacáridos vegetales a ácidos grasos de cadena corta: propionato, acetato y butirato
Metabolismo de xenobióticos, fármacos, antibióticos y productos bioactivos
Transformación de sales biliares

Estrategias utilizadas para investigar el papel de la microbiota en la salud y la enfermedad

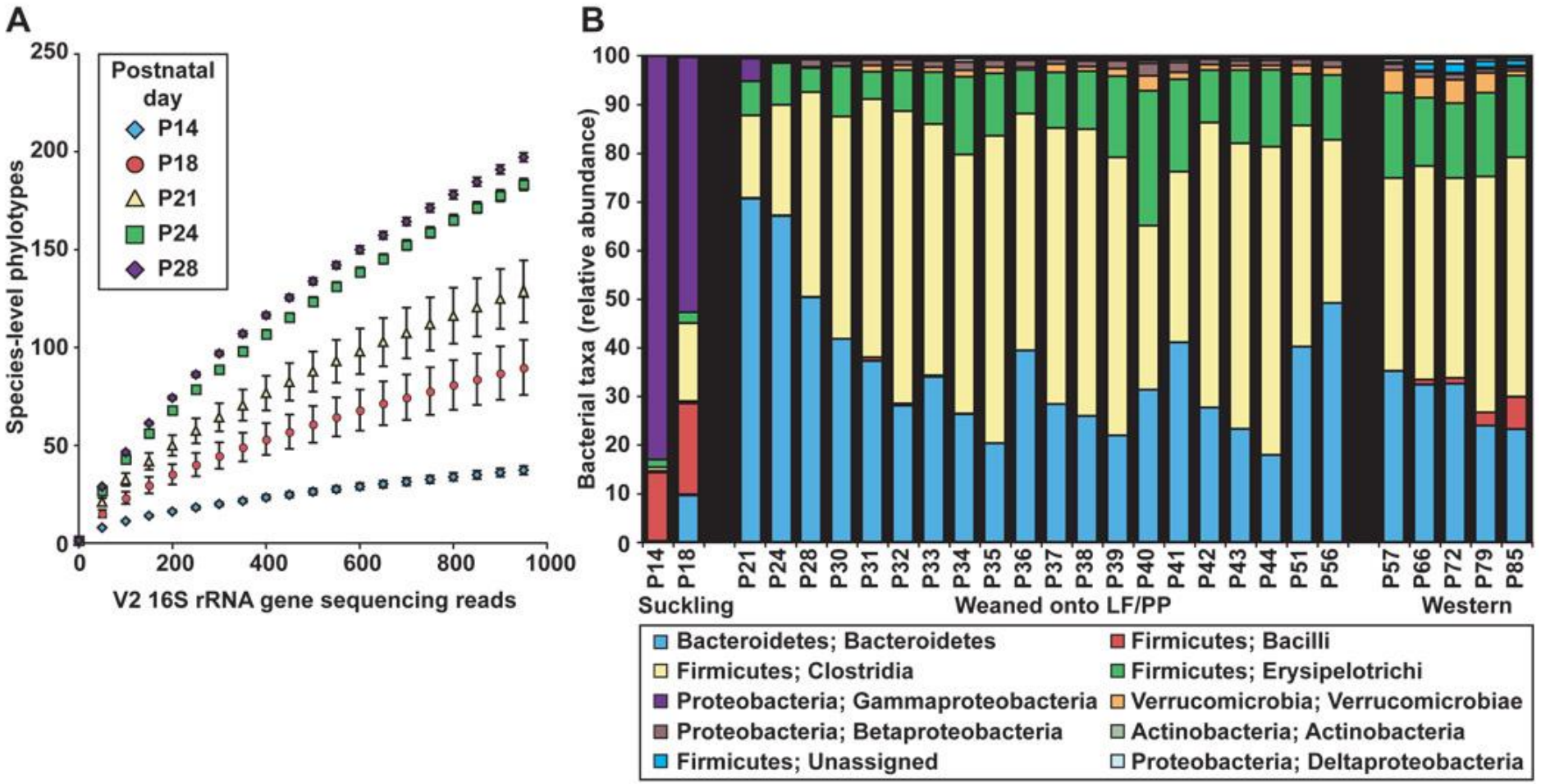


TRANSPLANTE DE MICROBIOTA HUMANA A RATÓN GF
Estudio de dietas en la microbiota: Metagenómica



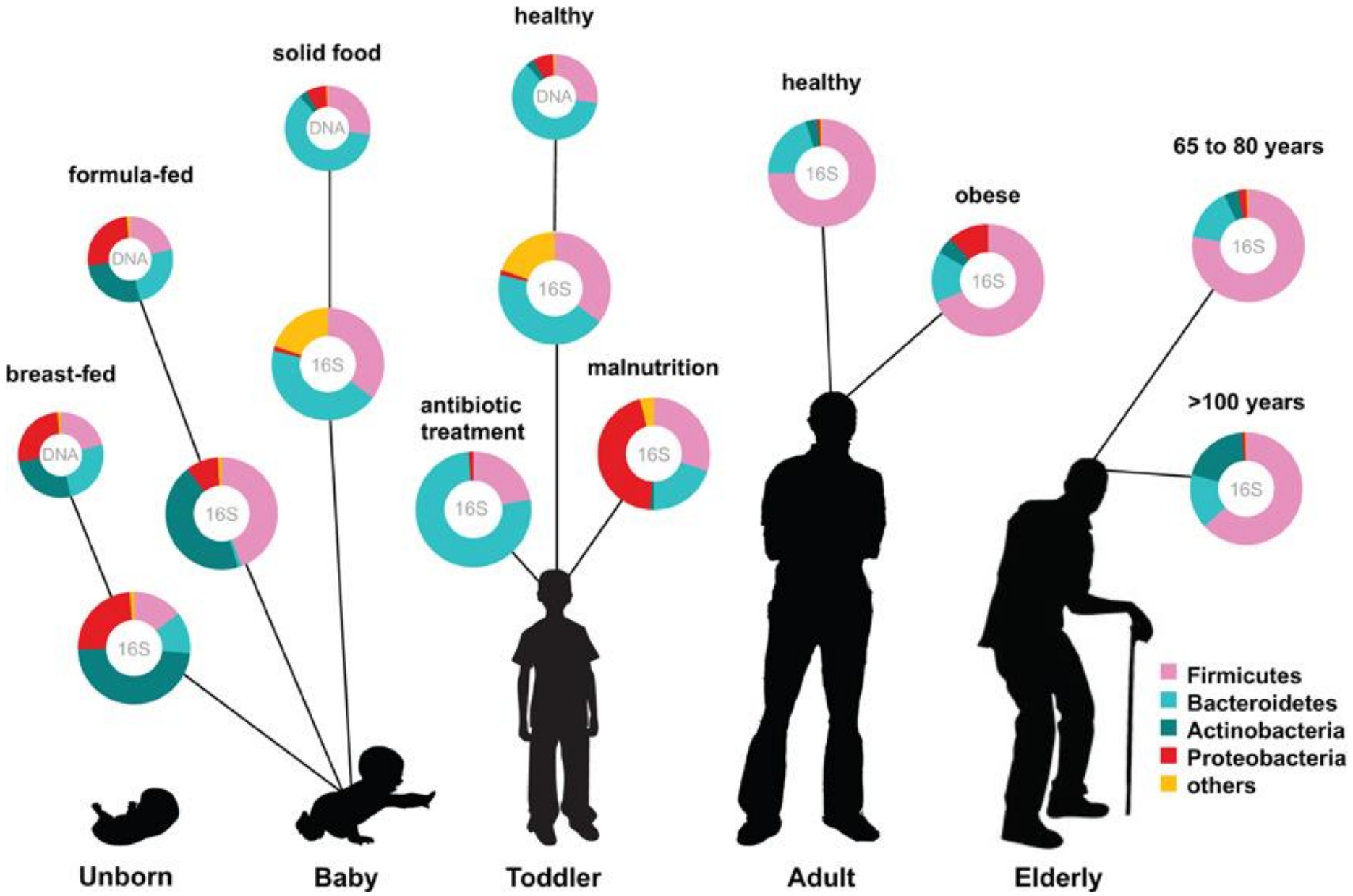
Turnbaugh y col., Sci Transl Med 2009

Ensamblado postnatal de la microbiota humanizada



Turnbaugh y col., 2009

Ratones gnotobióticos humanizados constituyen unas herramientas útiles para desarrollar estudios comparativos de metagenómica que demuestren como la microbiota y el microbioma intestinal humano se adapta en función de cambios en la composición de la dieta

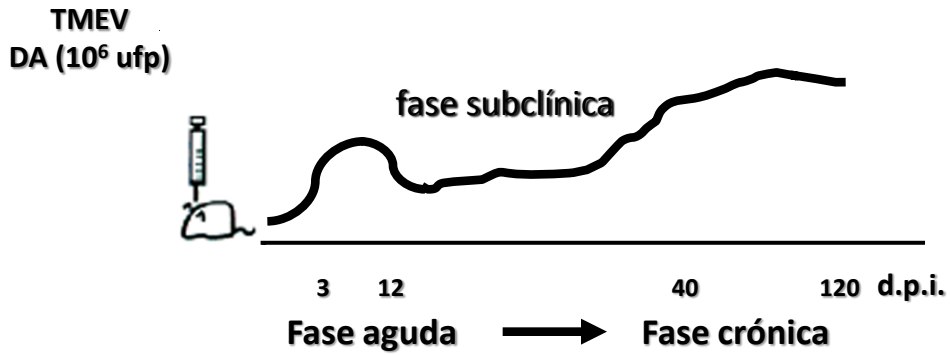


Ottman et al., Front. Cell. Infect. Microbiol (2012)

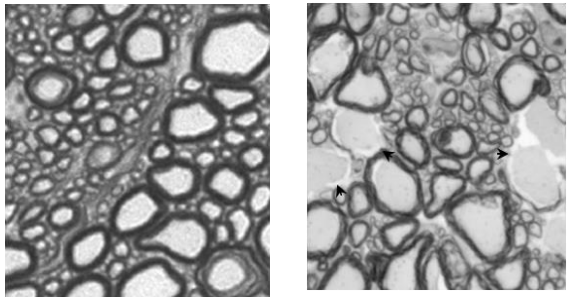
Modelos experimentales de Esclerosis Multiple :

- Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE): inmunización con péptidos de mielina
- Encefalomielitis por infección con el virus de Theiler (TMEV-IDD)

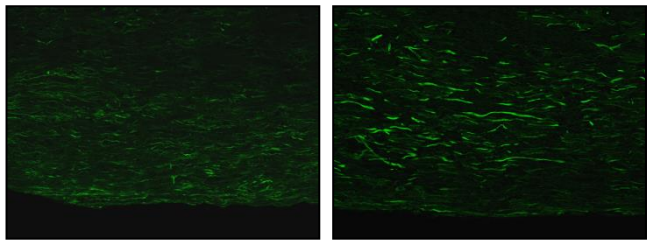
Inoculación de TMEV a ratones susceptibles SJL/J



Déficit motor



Desmielinización



Daño axonal

Modelo animal	TRATAMIENTO	Puntuación clínica	Respuesta inmune	Referencia
C57BL6, MOG; SJL/J MOG-TCR tg	**Ratones GF**	Desciende	↓Th1 y Th17 ↑Frecuencia T_{reg}	Lee et al., Proc Natl Acad Sci USA (2011) Berer et al., Nature (2011)
C57BL6, MOG; SJL/J , PLP	**Antibióticos de amplio espectro**	Desciende	↑ Frecuencia T_{reg} ↓ citoquinas inflamatorias	Ochoa-Reparáz et al., J immunol (2009) Yokote et al., Am J Pathol (2008)
C57BL6, MOG	Admón. oral *B.fragilis*	Desciende	↑Frecuencia T_{reg}, B_{reg}	Ochoa-Reparáz et al., J Immunol (2010) Ochoa-Reparáz et al., Gut microbes (2010) Ochoa-Reparáz et al., Mucosal Immunol (2010)
C57BL6, MOG	Admón. oral de PSA *B.fragilis*	Desciende	↑Frecuencia T_{reg} $CD39^+$	Wang et al., Nat Comun. (2014) Wang et al., Gut microbes (2014)
SJL/J, PLP	**Admón. Oral con *Salmonella typhimurium* que expresa CFA/I fimbriae de *E. coli***	Desciende (tanto terapéutico como profiláctico)	↓Th1 y Th17 ↑Frecuencia T_{reg}	Jun et al., J Neuroimmunol (2007) Ochoa-Reparaz et al., J Immunol (2007) Jun et al., J Immunol (2005)
Lewis rat, MBP	Admón. oral de *Bifidobacterium animalis*	Desciende duración	No analizado	Ezendam et al.,Clin Exp Immunol (2008)
C57BL6, MOG; SJL/J, PLP	Admón. oral de *Lactobacillus spp.*	Desciende	↓Th1 y Th17 ↑Frecuencia T_{reg} dependiente de IL-10	Lavasani et al., PLoS ONE (2010) Takata et al., Plos O (2011) Maassen et al., Vaccine (2008)
C57BL6, MOG; Lewis rat, MBP	Admón. oral de *Lactobacillus spp. con Bifidobacterium bifidum*	Desciende	↓ Th1 y Th17 ↑Frecuencia T_{reg}	Kwon et al., Clin Immunol (2013)
C57BL6, MOG	Admón. oral de Hsp65-tg *Lactobacillus lactis*	Desciende	↓ IL-17 ↑IL-10, T_{reg} y T $CD4^+LAP^+$	Rezende et al., J Autoimmun (2013)

Microbiota en pacientes con Esclerosis Múltiple

Tipo de estudio	Sujetos	Detalles	Referencia
Caso-control	7 pacientes RR	Diferencias en *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, y *Proteobacteria*. Los niveles de vitamina D se ven afectados por *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*	Mowry et al., Neurology (2012) Bhargava et al., Curr Neurol Neurosci Rep (2014)
Caso-control	26 pacientes RR 4 pacientes SP	*Clostridium perfringens* tipo A disminuida en heces de pacientes de EM *Clostridium perfringens* tipo B encontrada en LCR de pacientes de EM	Rumah et al., PLoS ONE (2013)
Caso-control	53 pacientes	Incremento de Arqueas en pacientes de EM Descenso de *Butyricimonas* y *Lachnospiraceae*	Jhangi et al., Neurology (2014)
Caso-control	20 pacientes pediátricos RR	Incremento de *Shigella*, *Escherichia,* Descenso de *Eubacterium rectale* y *Corynebacterium*	Tremlett et al., Mult Scler (2014)
In vitro		PSA de *B. fragilis* fue capaz de inducir supresión a través de Treg CD39+ y de IL-10 in vitro tanto en pacientes como en controles	Telesford et al., Mult Scler (2014)
Poblacional	En marcha	El consorcio de microbioma en EM está analizando miles de muestras de pacientes de EM secuenciando 16S	

redEspañolade esclerosismúltiple

Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis

Yun Kyung Lee[a,1], Juscilene S. Menezes[a,1], Yoshinori Umesaki[b], and Sarkis K. Mazmanian[a,2]

[a]Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91125; and [b]Yakult Central Institute for Microbiological Research, Tokyo 186-8650, Japan

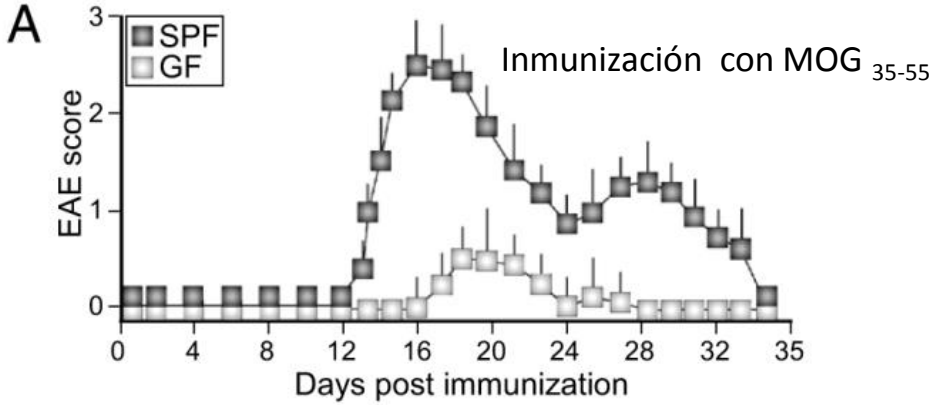
Edited by Jeffrey I. Gordon, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, and approved June 23, 2010 (received for review January 19, 2010)

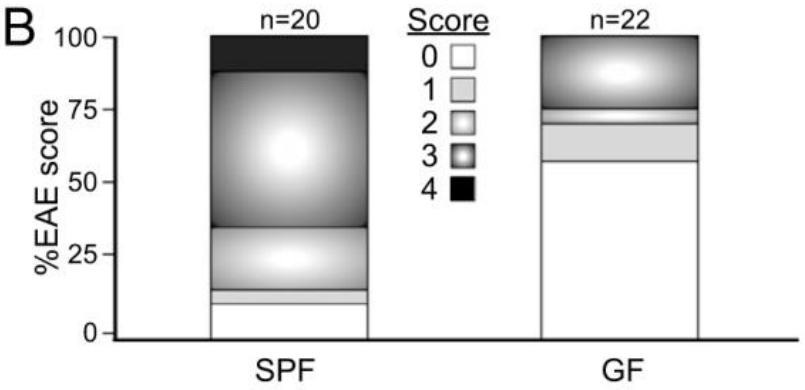
- PUEDE LA MICROBIOTA AFECTAR RESPUESTAS INMUNES DISTANTES DE LA MUCOSA INTESTINAL?

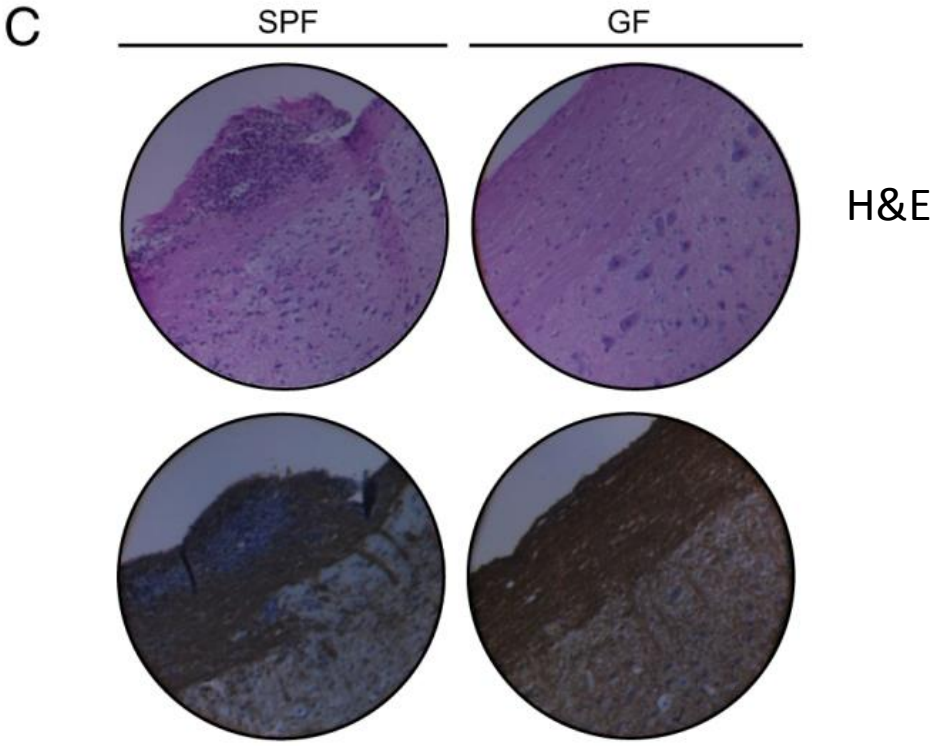
- COMO INFLUYE LA MICROBIOTA EN EL BALANCE Th1-Th17/Tregs?

- CUAL ES EL PAPEL DE LA MICROBIOTA EN EL COMIENZO y SEVERIDAD DE LA EAE ?

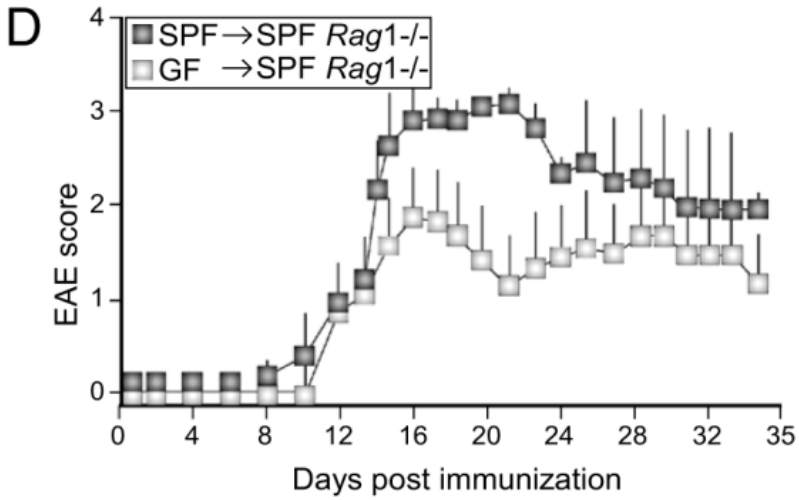
Ratones GF desarrollan una EAE menos severa que los ratones convencionales







H&E



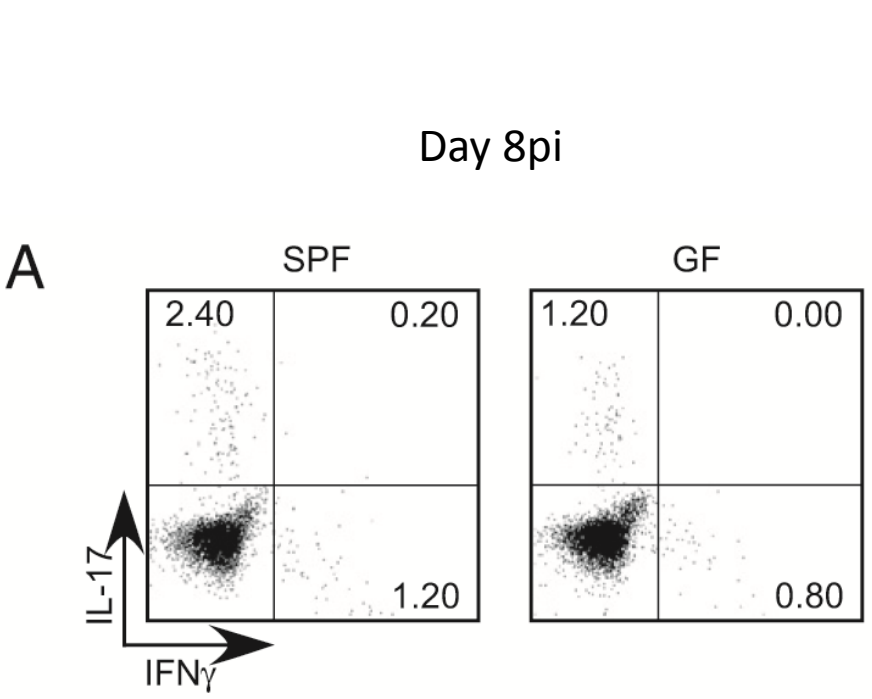
©2011 by National Academy of Sciences

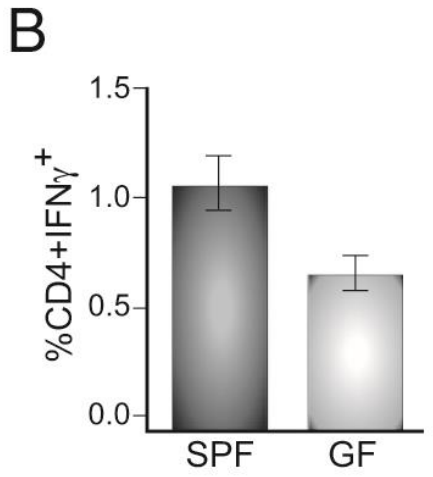
Lee Y K et al. PNAS 2011;108:4615-4622

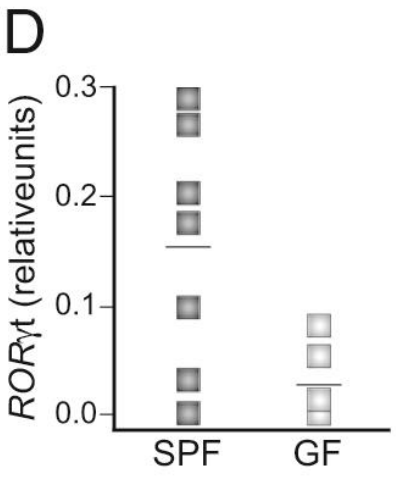
PNAS

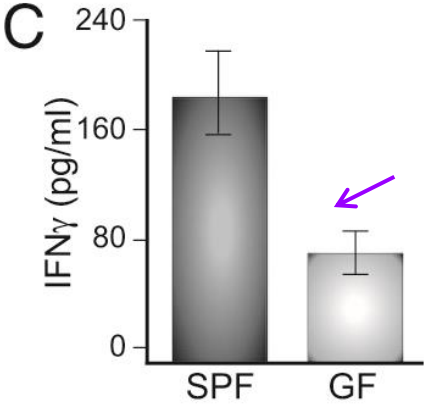
Ex vivo-In vitro

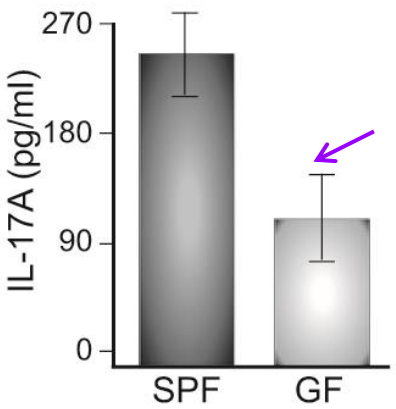
La inflamación está atenuada en ratones GF en EAE









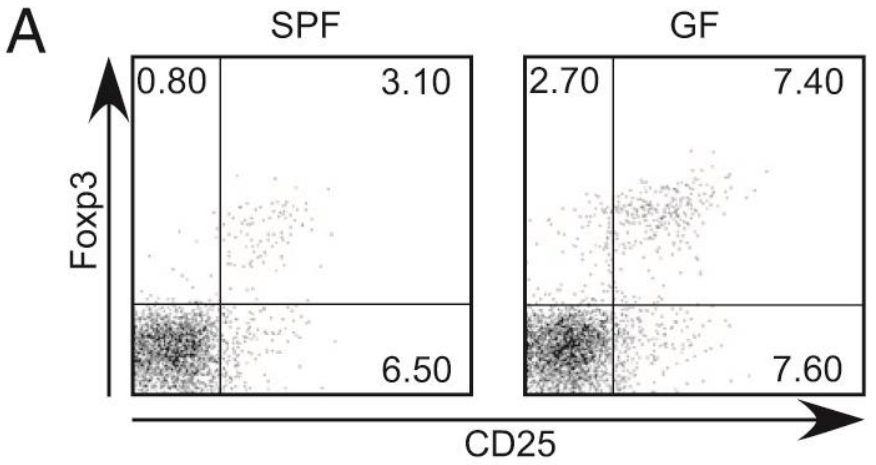


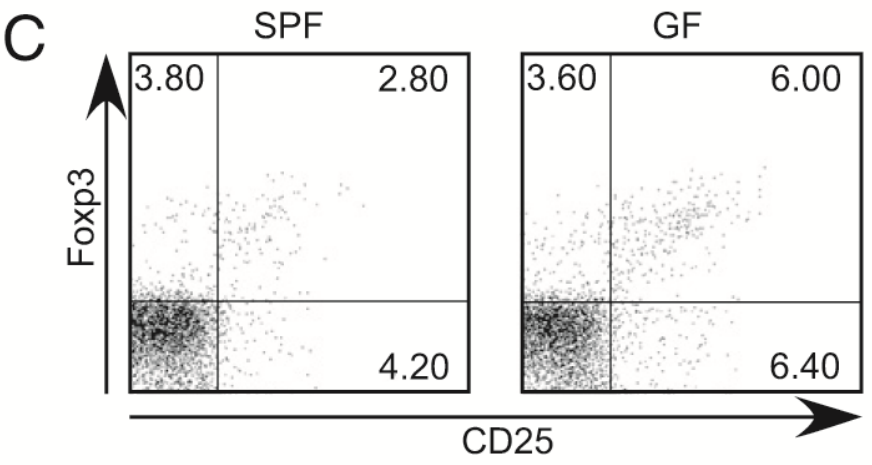
©2011 by National Academy of Sciences

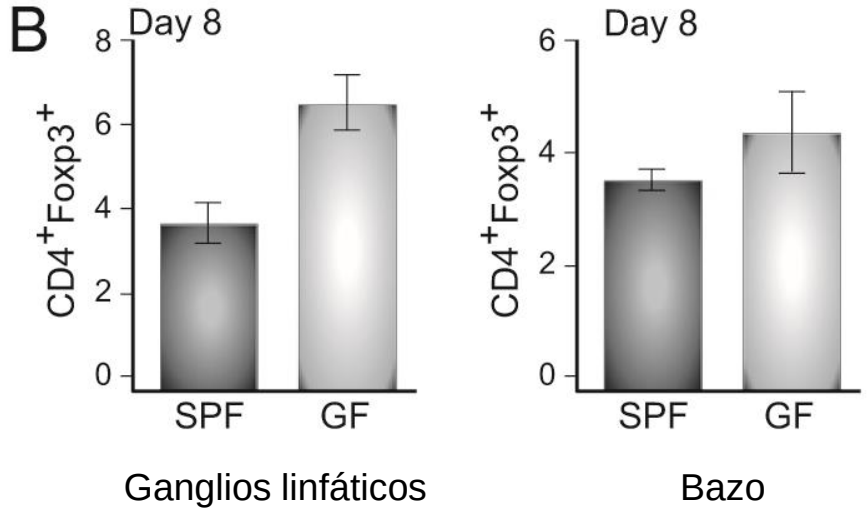
Lee Y K et al. PNAS 2011;108:4615-4622

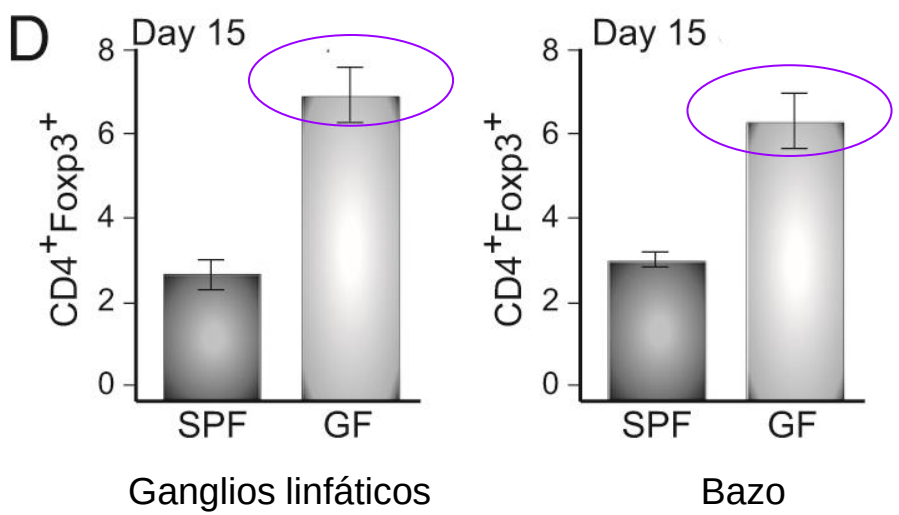
PNAS

Los ratones GF aumentan la proporción de células CD4+CD25+Foxp3+ en EAE









©2011 by National Academy of Sciences

✓ Las células T $CD4^+$ de ratones GF retienen la capacidad de inducir EAE cuando se estimulan con MOG + IL-2, aunque en menor grado que los linfocitos T $CD4^+$ de ratones SPF

✓ Porqué este fenotipo intermedio?

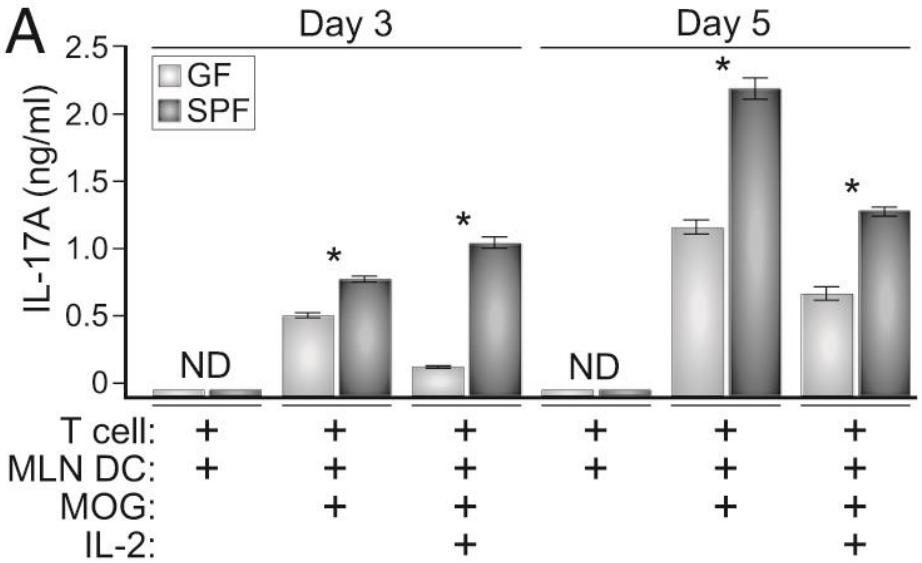
Mayor proporción de Tregs en los linfocitos transferidos de ratones GF.

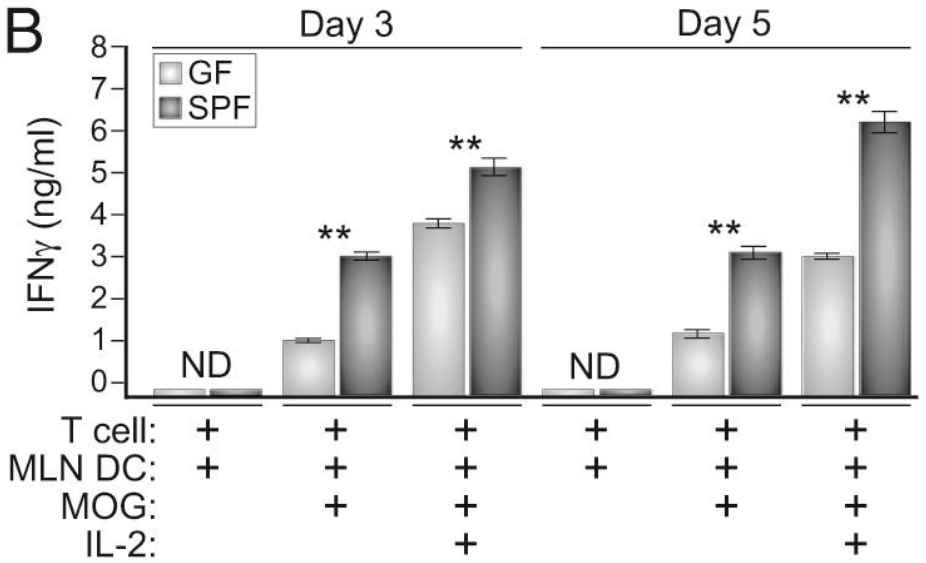
✓ Las células T de ratones GF no presentan una dificultad de respuesta inherente

EL "*STATUS*" DE LAS CELULAS CD4+ ES **ACTIVAMENTE** REGULADO POR LA MICROBIOTA

La microbiota impacta de manera dinámica y reversible la programación de las respuestas inmunes patogénicas durante procesos autoinmunes

Las células dendríticas de ratones GF son deficientes en la capacidad de activación de celulas T específicas de MOG

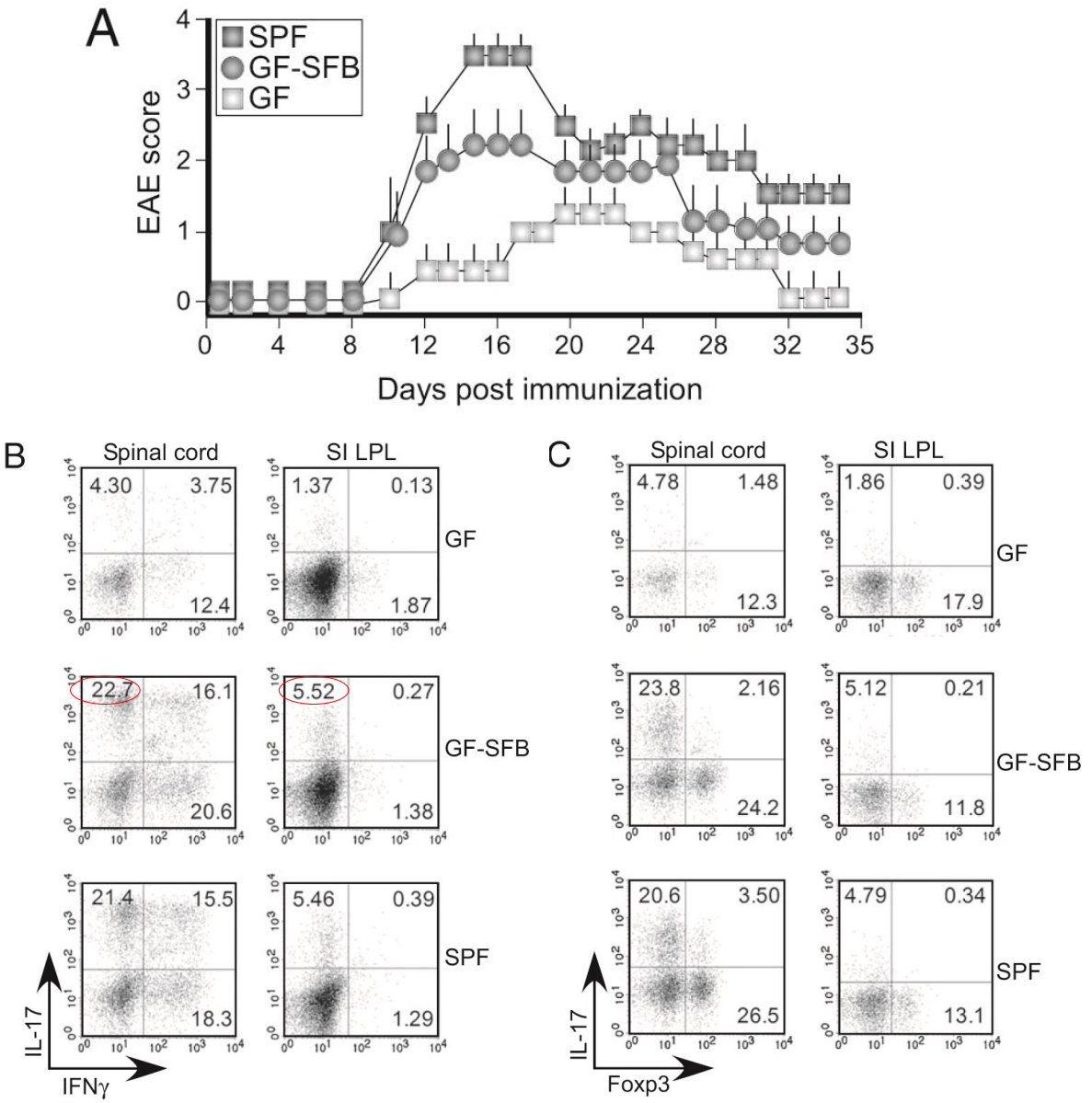




©2011 by National Academy of Sciences

Lee Y K et al. PNAS 2011;108:4615-4622

La monocolonización intestinal con SFB en ratones GF induce EAE tras inmunización con MOG



Lee Y K et al. PNAS 2011;108:4615-4622

©2011 by National Academy of Sciences

PNAS

Ratones GF son resistentes a la EAE porque no generan células T patogénicas Th-17 debido a la incapacidad de las células dendríticas del intestino de activar a los linfocitos T. Además los ratones GF generan más linfocitos Treg

La EAE puede ser re-establecida mediante colonización con la bacteria filamentosa segmentada (SFB) que permiten la polarización Th17

ARTICLE ADDENDUM

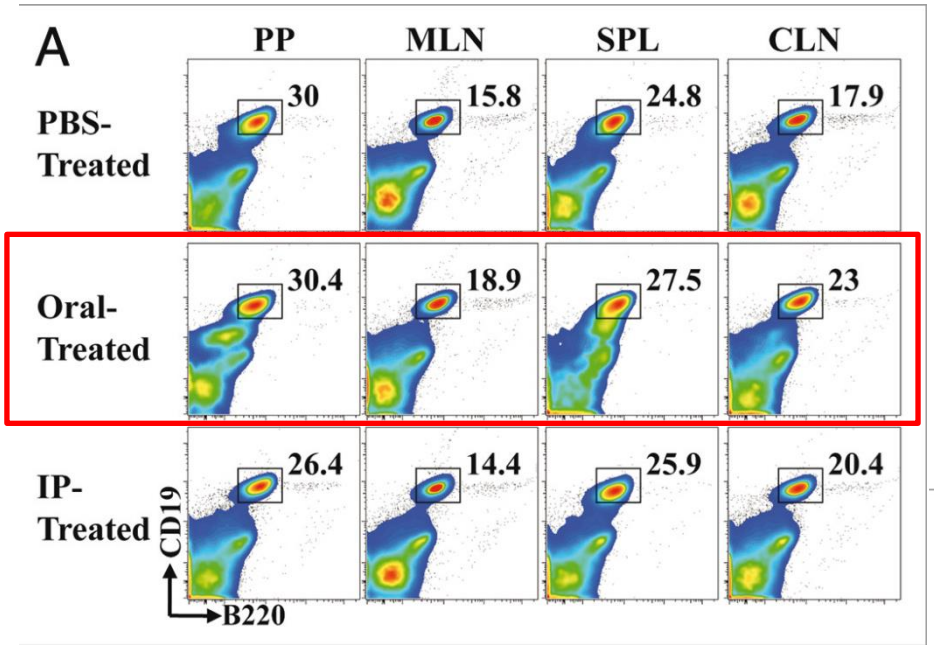
Gut Microbes 1:2, 103-108; March/April 2010; © 2010 Landes Bioscience

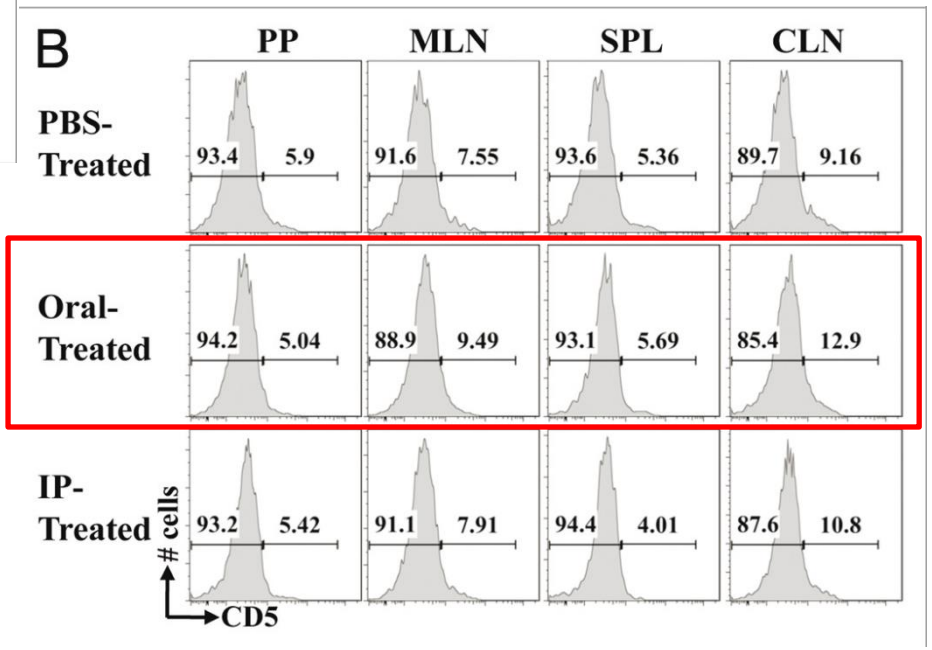
Induction of a regulatory B cell population in experimental allergic encephalomyelitis by alteration of the gut commensal microflora

Javier Ochoa-Repáraz,[1,*] Daniel W. Mielcarz,[2] Sakhina Haque-Begum[1] and Lloyd H. Kasper[1]

Departments of [1]Medicine; and [2]Microbiology/Immunology; Dartmouth Medical School; Lebanon, NH USA

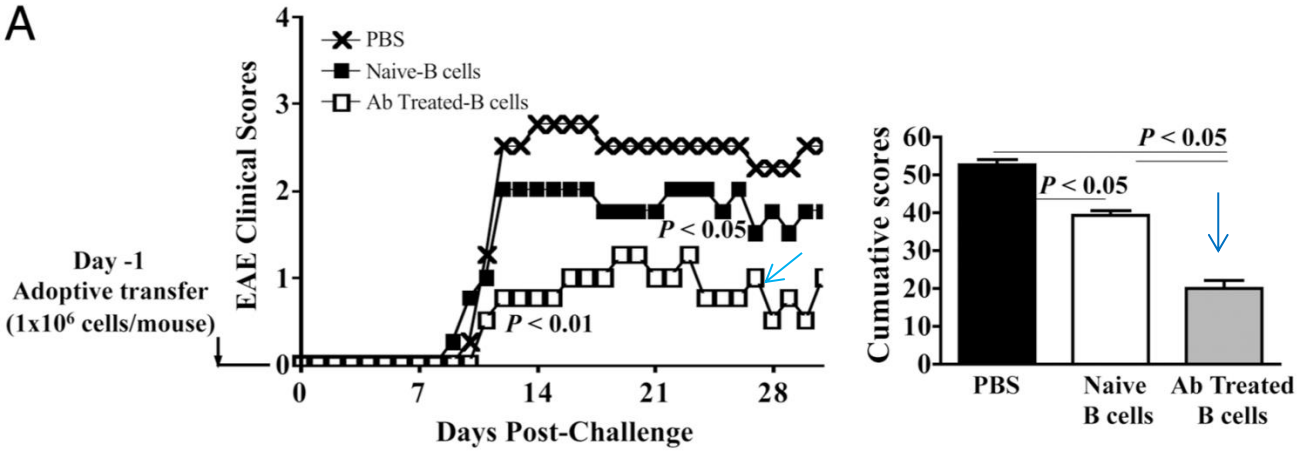
El tratamiento oral con antibióticos altera el porcentaje de células B CD5⁺ en EAE



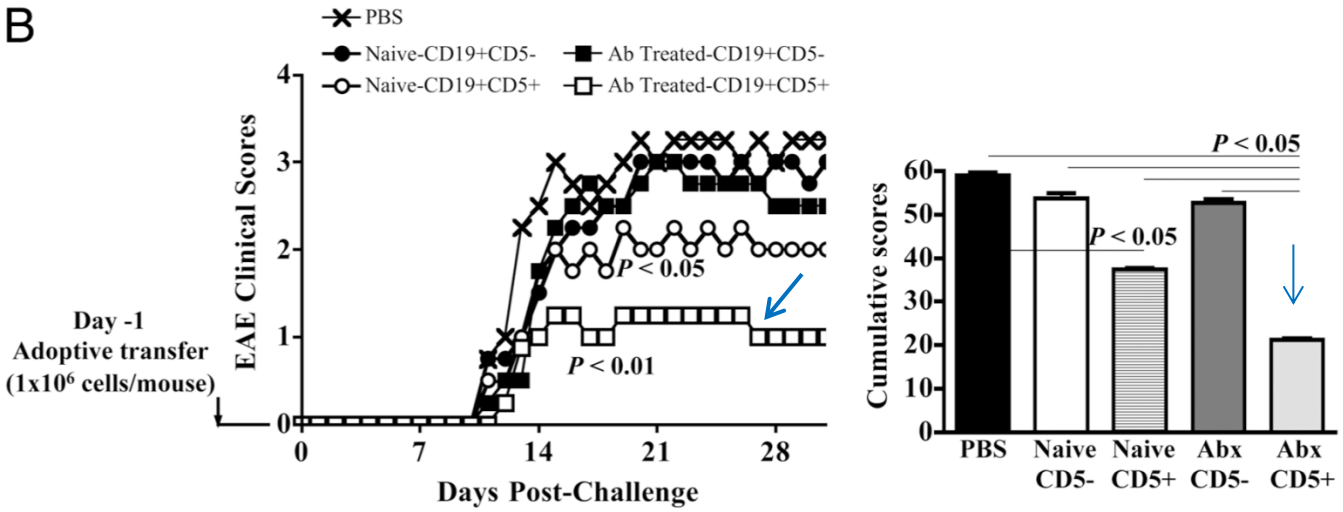


La transferencia de células B CD5⁺ obtenidas de ratones tratados con antibióticos protege frente a la EAE

Transferencia adoptiva de linfocitos B totales CD19⁺



Comparativa entre transferir células B CD5⁺ o células B CD5⁻



- ✓ Las alteraciones de la flora intestinal inducen cambios en la respuesta inmune regulando procesos inflamatorios del SNC mediante las subpoblaciones de **células B reguladoras**

- ✓ Las células B reguladoras modulan la inflamación a través de la producción de IL- 10 e IL- 13.

- ✓ La transferencia de células B reguladoras provenientes de ratones EAE tratados con antibióticos reduce la severidad de la EAE.

ES POSIBLE MANIPULAR LA MICROBIOTA PARA OBTENER UN BENEFICIO TERAPÉUTICO EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE??

ORIGINAL ARTICLE

Gut Microbiota in Multiple Sclerosis: Possible Influence of Immunomodulators

Brandi L. Cantarel, PhD,† Emmanuelle Waubant, MD, PhD,‡ Christel Chehoud,§ Justin Kuczynski, PhD,§ Todd Z. DeSantis, MSc,§ Janet Warrington, PhD,§ Arun Venkatesan, MD, PhD,‖ Claire M. Fraser, PhD,†¶ and Ellen M. Mowry, MD, MCR‖* J Investig Med. 2015

Asociación del tratamiento con acetato de glatiramer y suplementos de vitamina D en EM con cambios en unidades taxónomicas específicas de la flora intestinal

Probióticos, Prebioticos, Dieta… ?

OPEN ACCESS Freely available online 2010

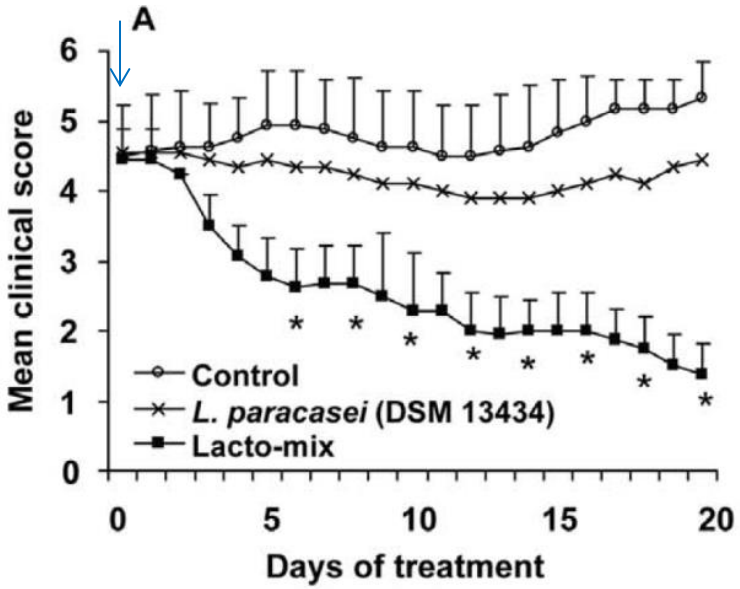
PLoS one

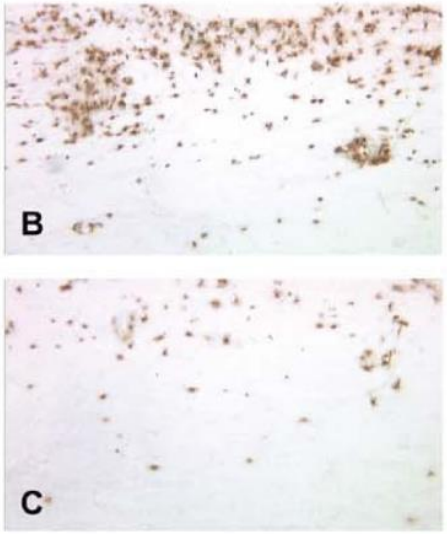
A Novel Probiotic Mixture Exerts a Therapeutic Effect on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mediated by IL-10 Producing Regulatory T Cells

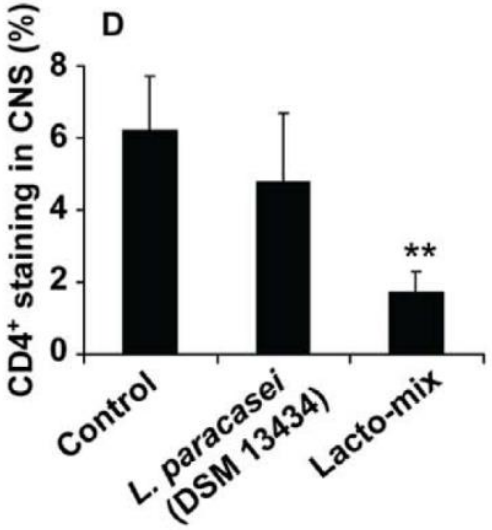
Shahram Lavasani[1,3]*, Balik Dzhambazov[2], Mehrnaz Nouri[3], Frida Fåk[1], Sophia Buske[1], Göran Molin[4], Henrik Thorlacius[3], Jan Alenfall[5], Bengt Jeppsson[3], Björn Weström[1]

1 Department of Cell and Organism Biology, Lund University, Lund, Sweden, **2** Department of Experimental Medical Science, Lund University, Lund, Sweden, **3** Surgery Research Unit, Clinical Research Centre, Department of Clinical Sciences, Lund University, Malmö, Sweden, **4** Department of Food Technology, Engineering and Nutrition, Chemical Center, Lund University, Lund, Sweden, **5** Probi AB, Lund, Sweden

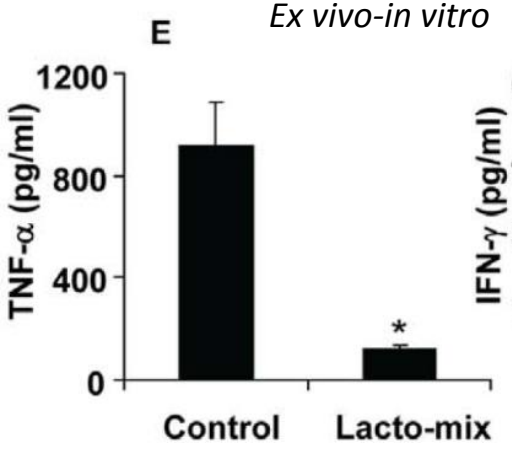
Efecto terapéutico de la administración de una mezcla de probióticos (*Lactobacillus)* en ratones con EAE establecida

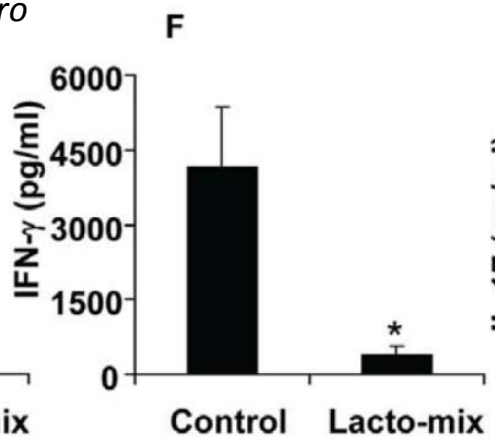


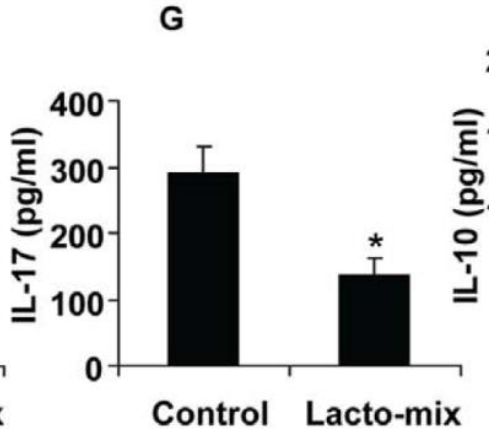


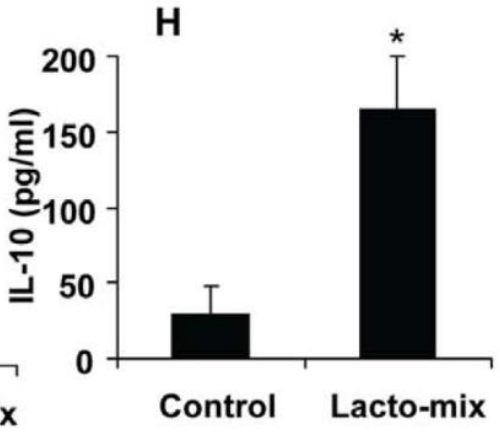


Ex vivo-in vitro









Author Manuscript

Author Manuscript

HHS Public Access

Author manuscript

Nat Commun. Author manuscript; available in PMC 2015 January 21.

Published in final edited form as:

Nat Commun. ; 5: 4432. doi:10.1038/ncomms5432.

An intestinal commensal symbiosis factor controls neuroinflammation via TLR2-mediated CD39 signaling

Yan Wang[1], Kiel M. Telesford[1], Javier Ochoa-Repáraz[1], Sakhina Haque-Begum[1], Marc Christy[1], Eli J. Kasper[1], Li Wang[2], Yan Wu[3], Simon C. Robson[3], Dennis L. Kasper[4], and Lloyd H. Kasper[1,*]

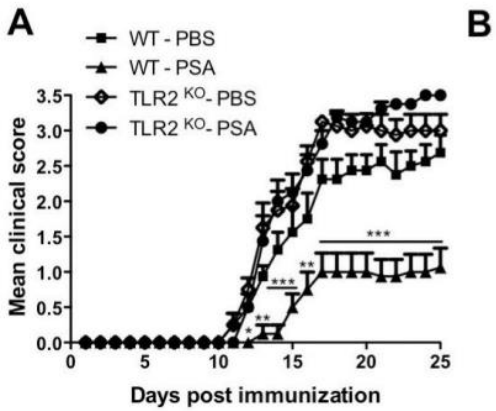
[1]Department of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine, Dartmouth College, Lebanon, New Hampshire 03755, USA

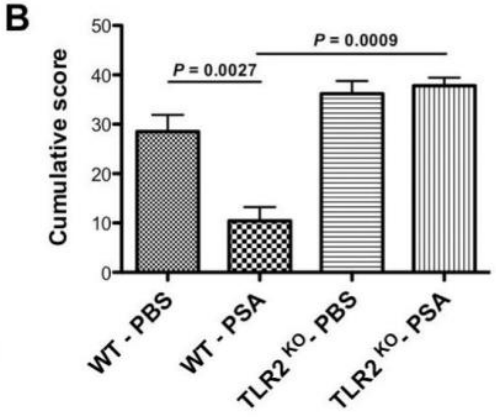
[2]Department of Microbiology and Molecular Genetics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin 53226, USA

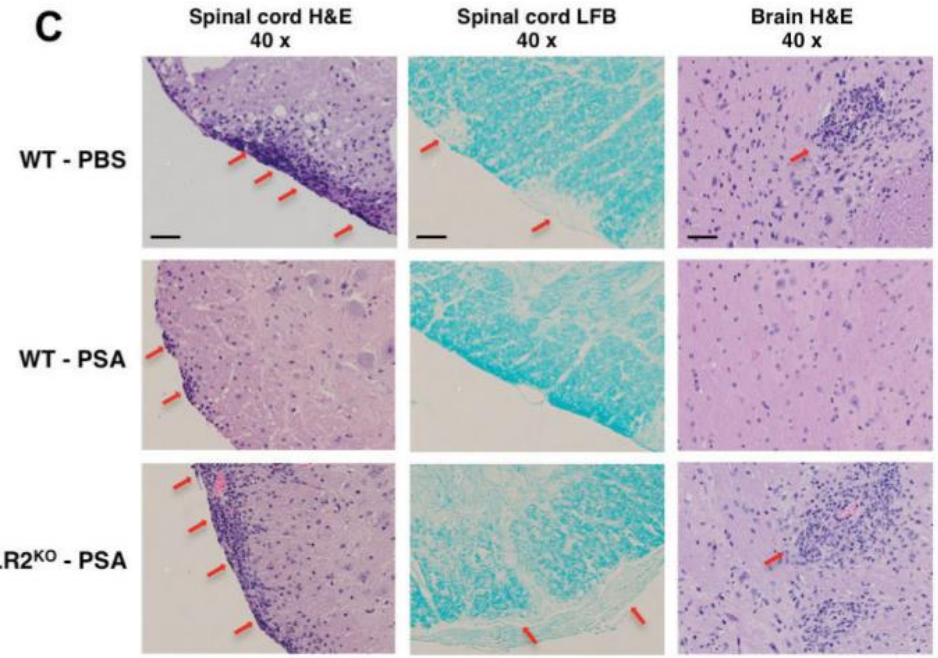
[3]Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

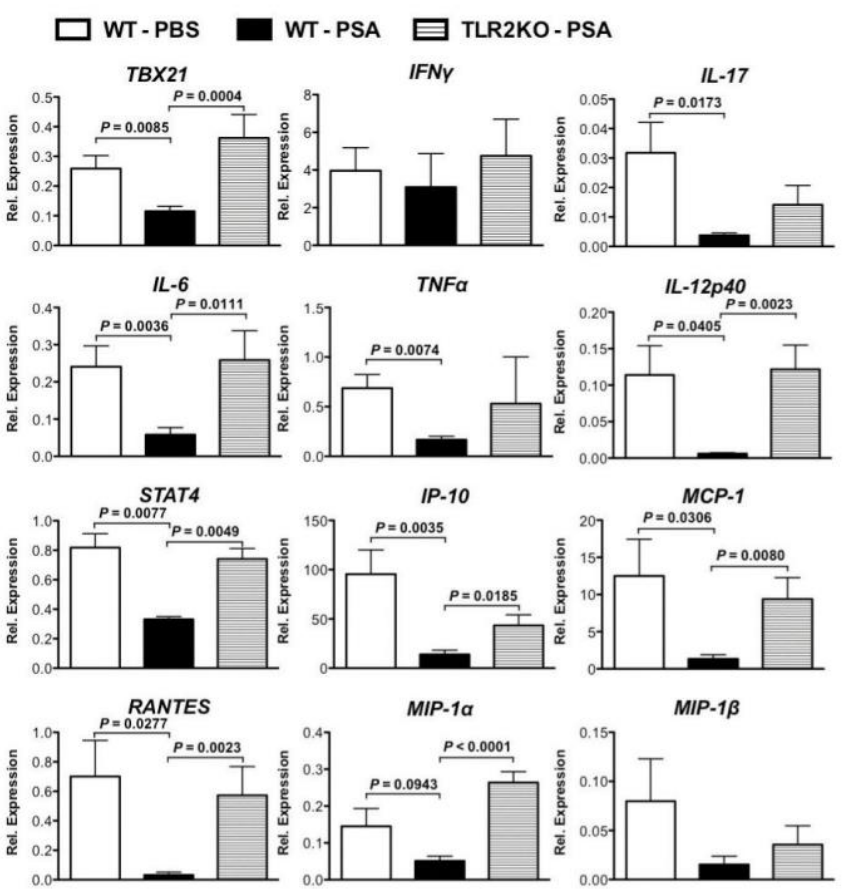
[4]Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

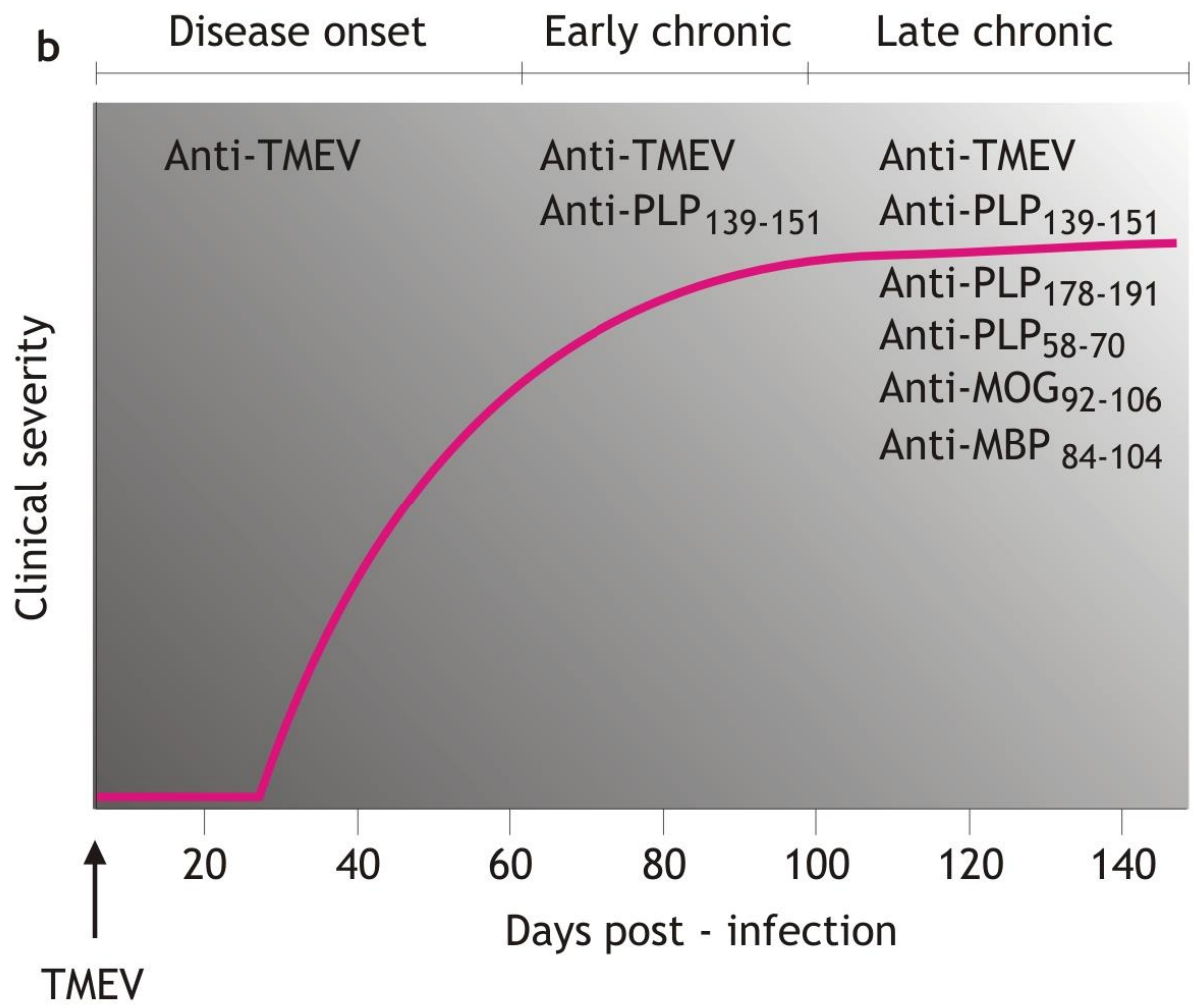
El tratamiento con PSA de *B. fragilis* confiere protección frente a EAE



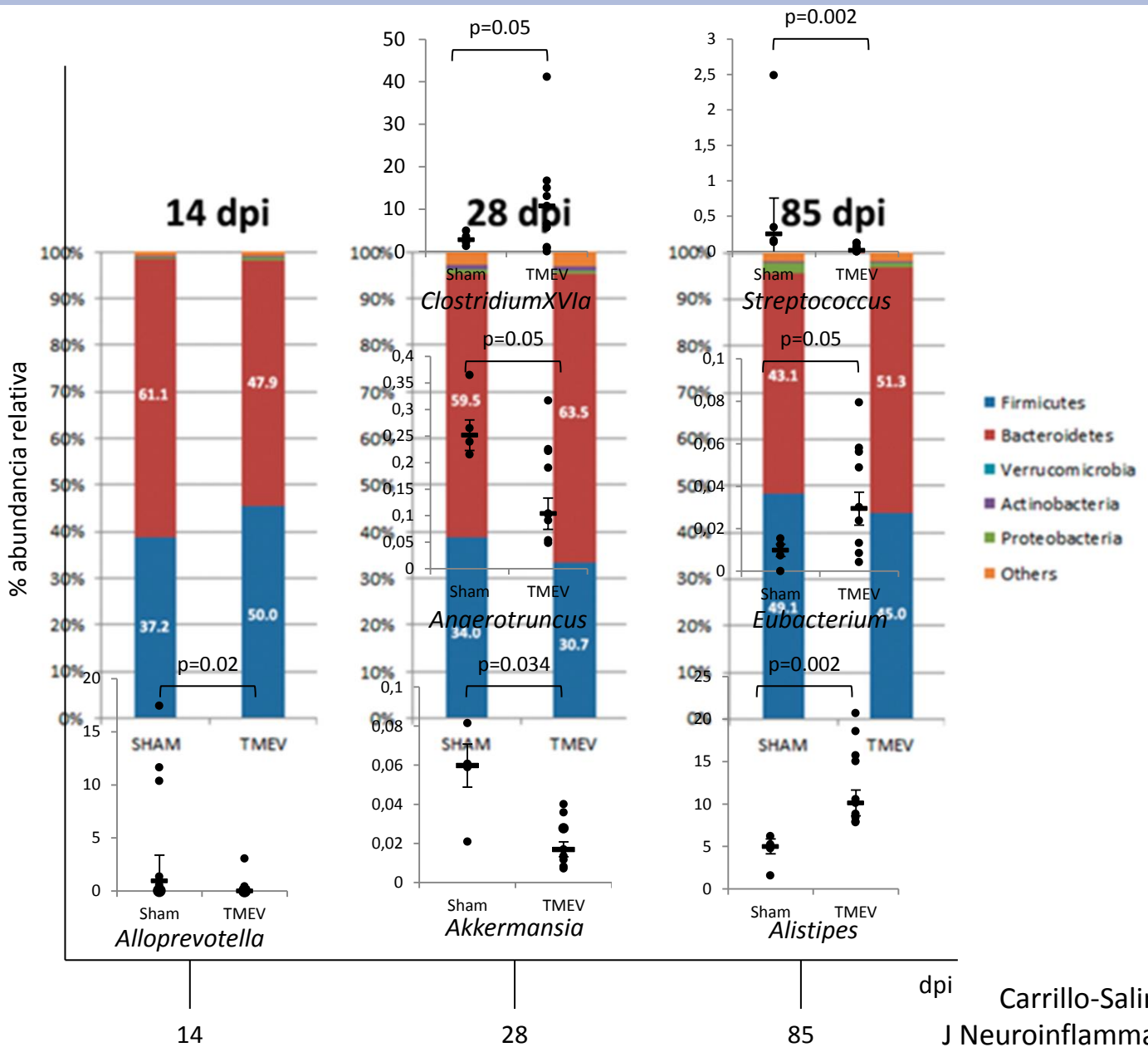




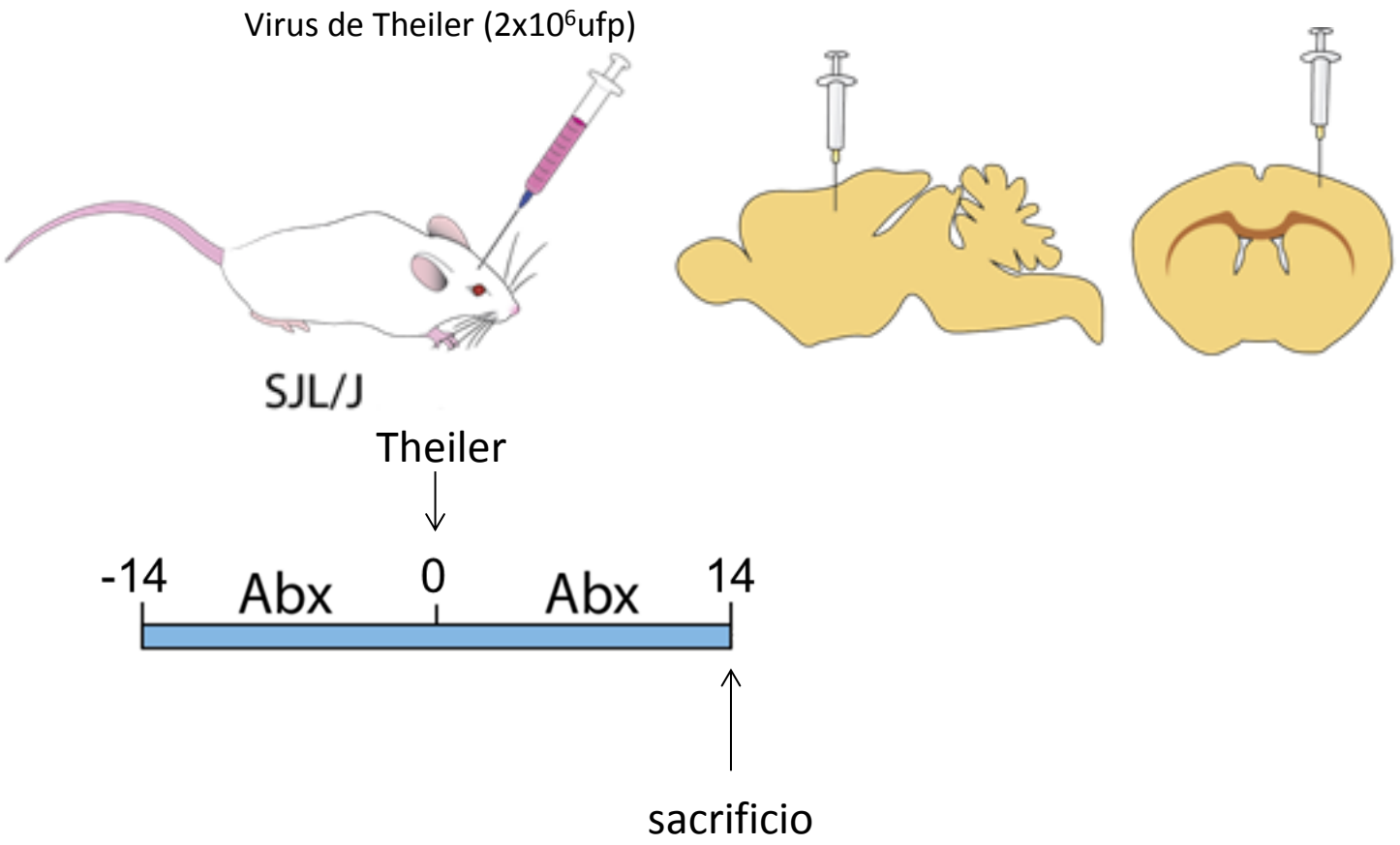



b
Disease onset
Early chronic
Late chronic
Anti-TMEV
Anti-TMEV
Anti-PLP139-151
Anti-TMEV
Anti-PLP139-151
Anti-PLP178-191
Anti-PLP58-70
Anti-MOG92-106
Anti-MBP 84-104
Clinical severity
20
40
60
80
100
120
140
Days post - infection
TMEV

La inoculación intracerebral del virus de Theiler induce cambios en la microbiota

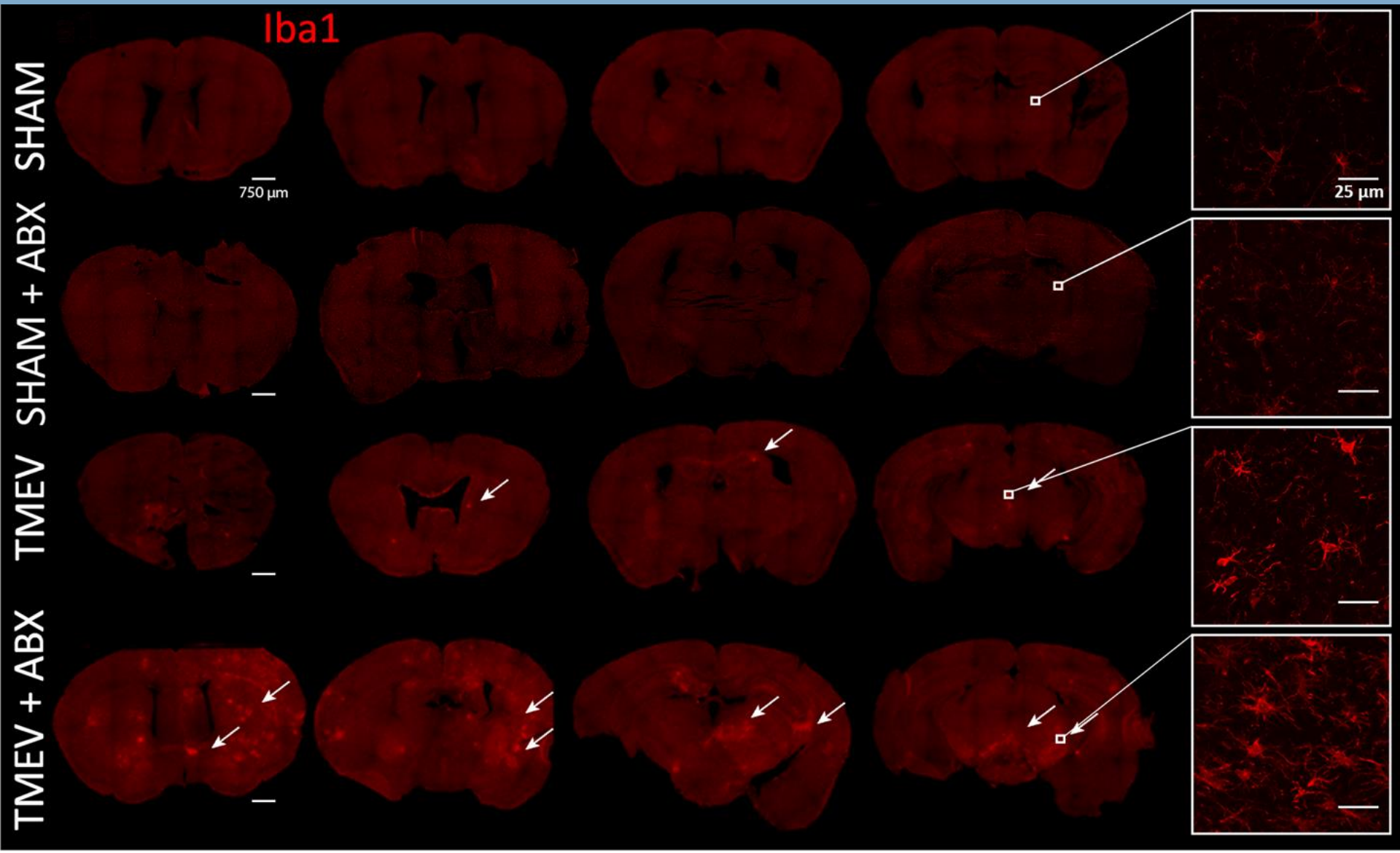


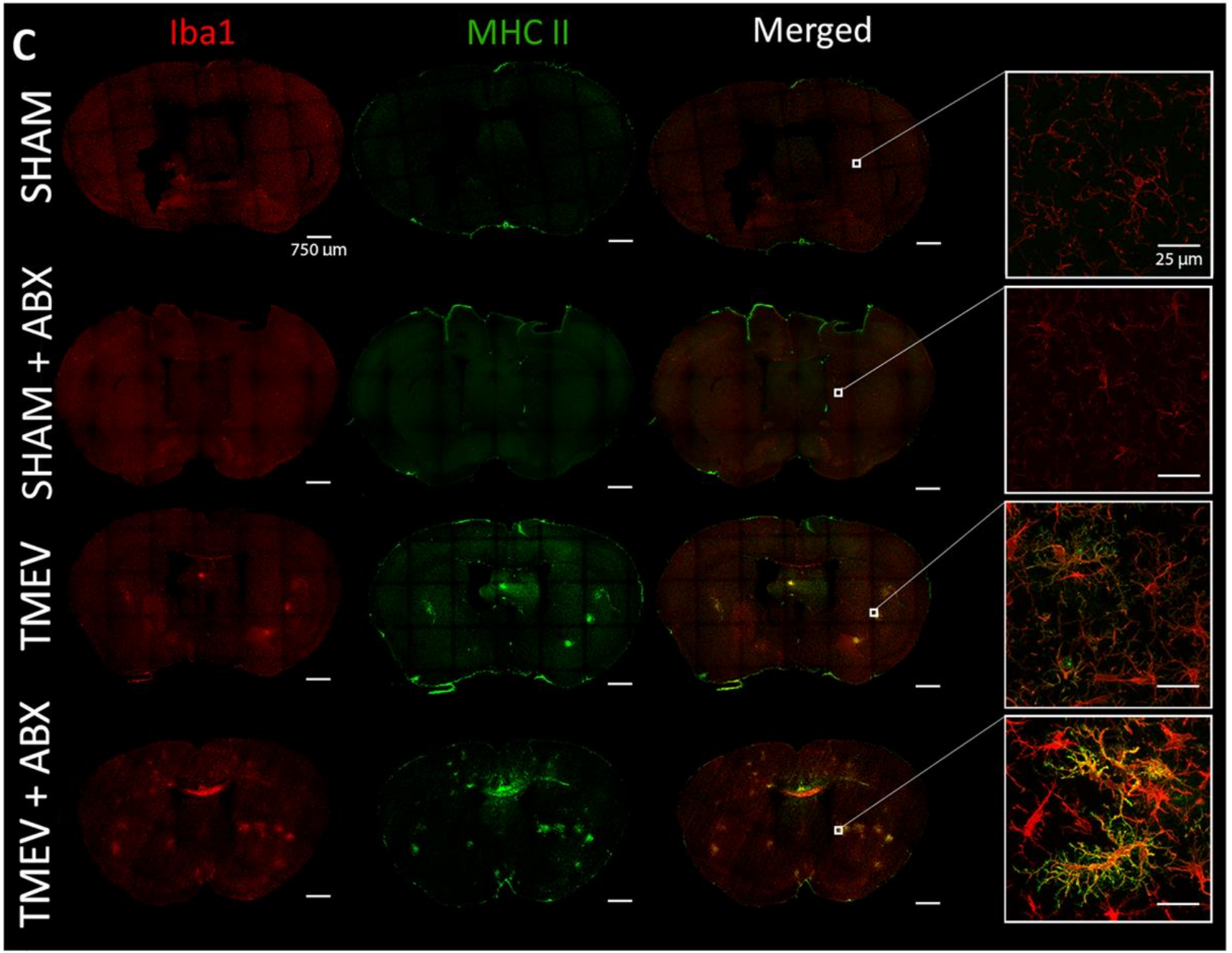
Carrillo-Salinas et al.,
J Neuroinflammation, enviado

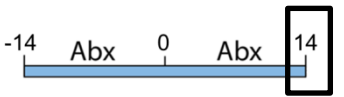


Abx: ampicilina, metronidazol, neomycina sulfato y vancomicina

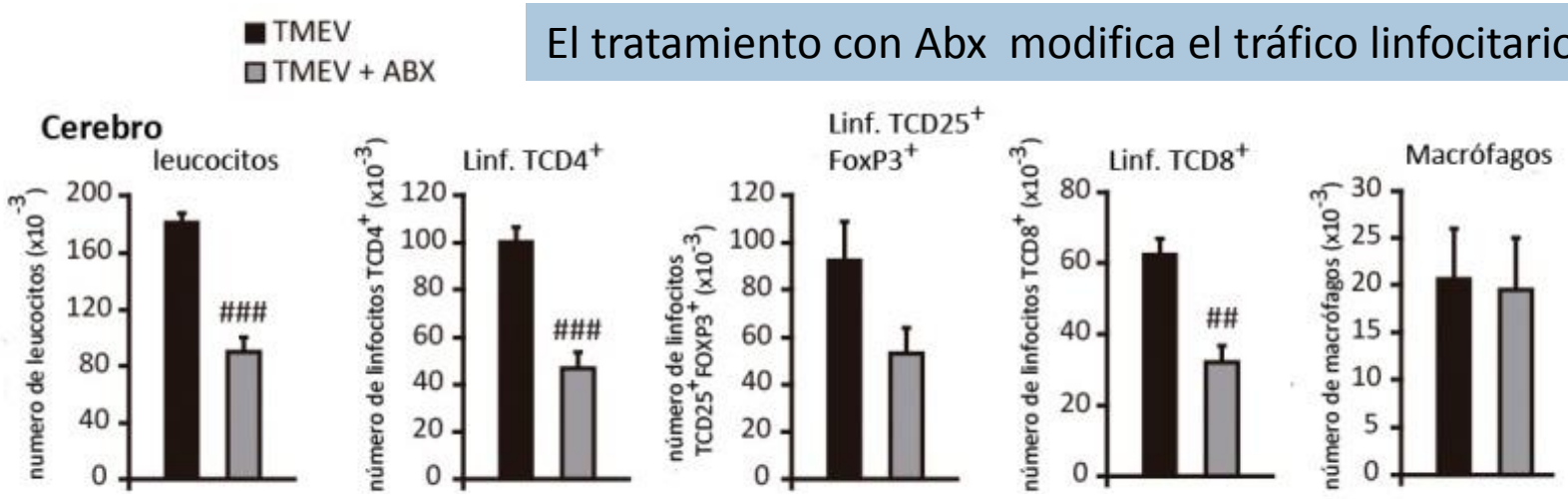
La disbiosis aumenta la respuesta microglial a la infección con el virus de Theiler

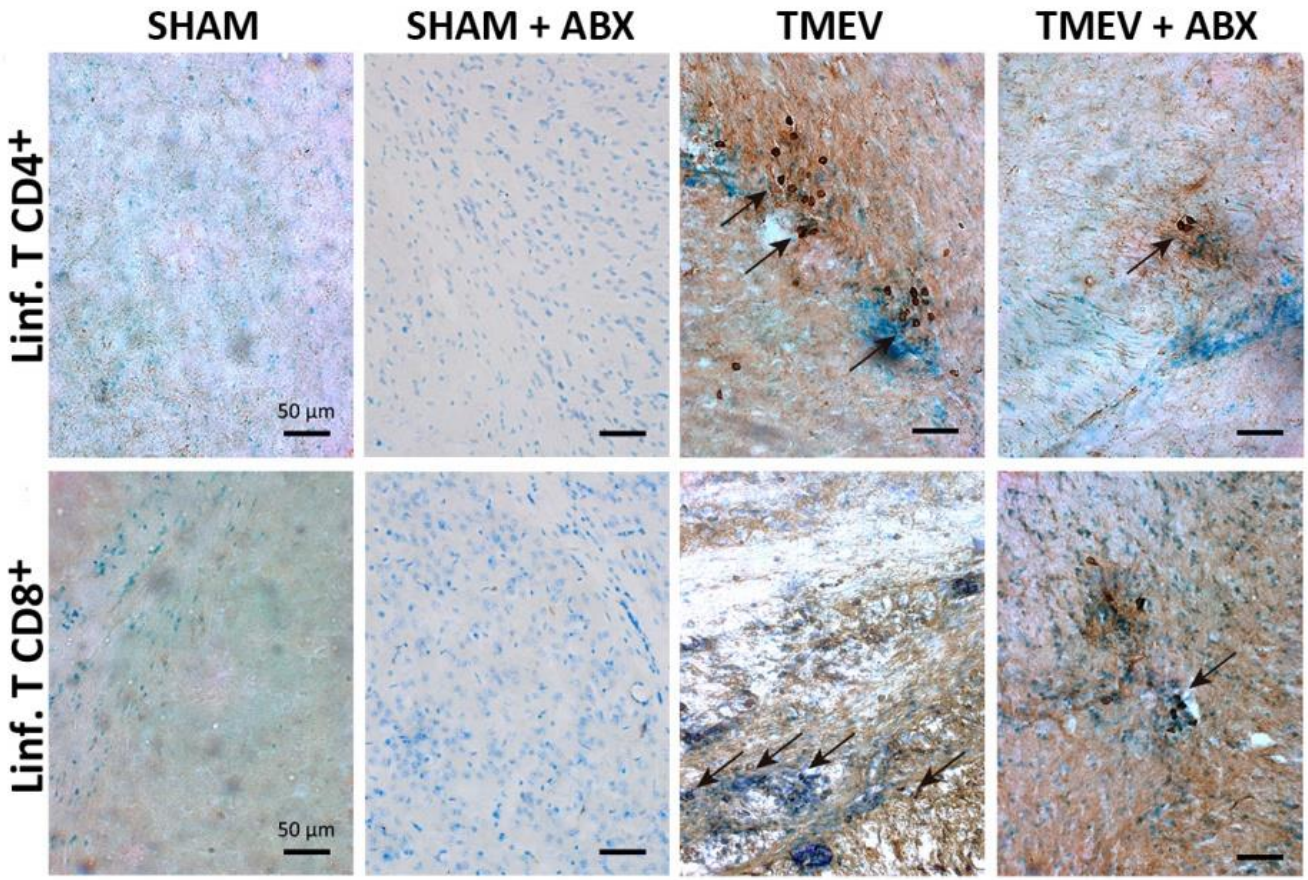



c
Iba1
MHC II
Merged
SHAM
SHAM + ABX
TMEV
TMEV + ABX
750 um
25 µm


-14
Abx
0
Abx
14

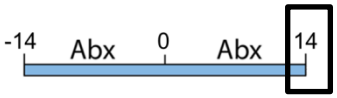
El tratamiento con Abx modifica el tráfico linfocitario al SNC



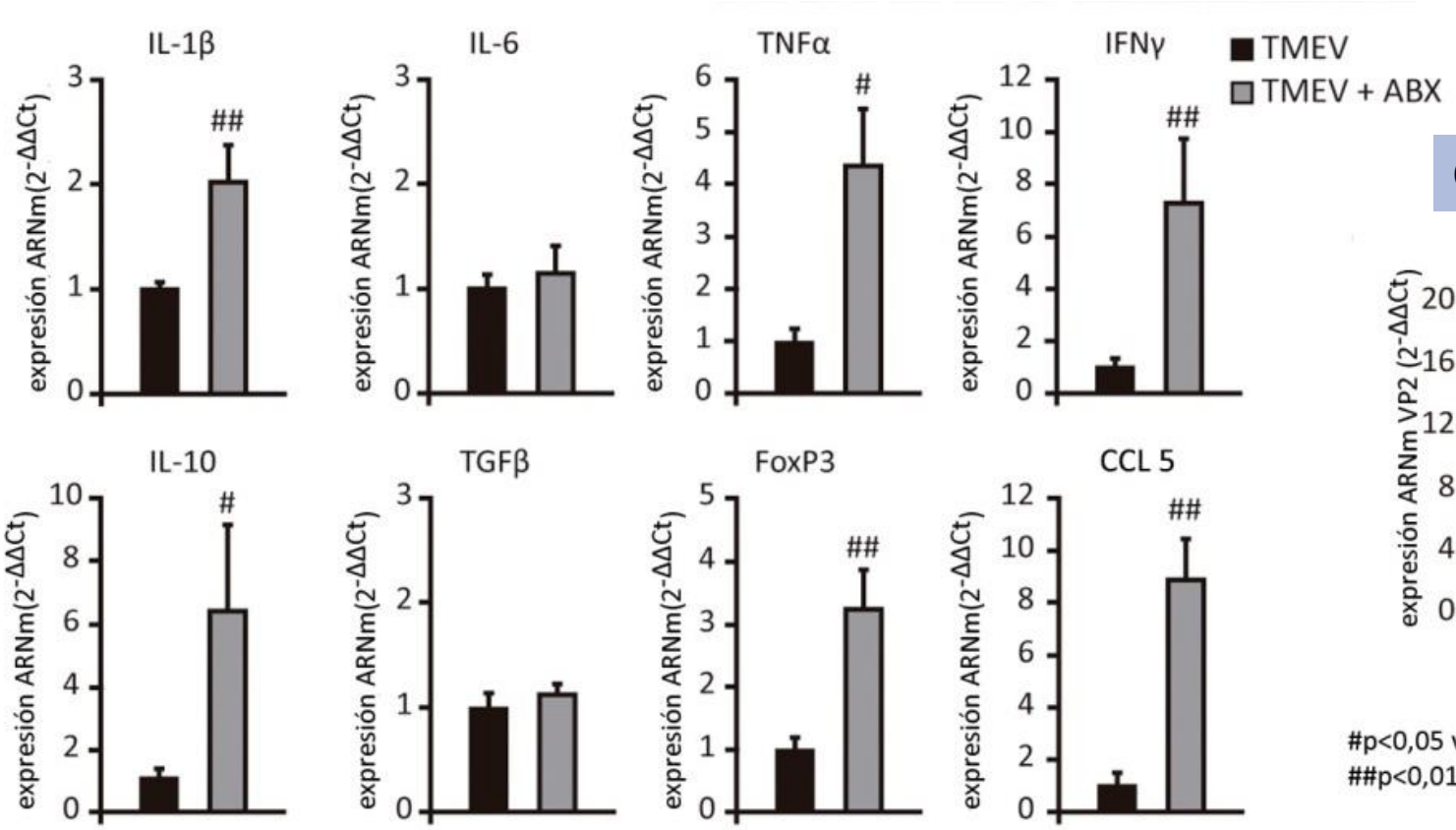


##p<0,01 vs. TMEV
###p<0,001 vs. TMEV

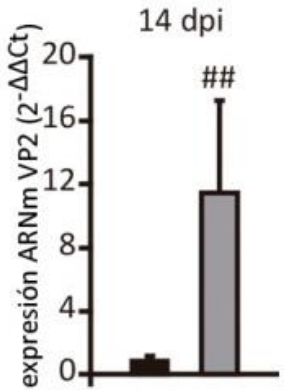
Infiltrados linfocitarios en cerebro



Efecto del tratamiento con Abx sobre la respuesta inmune intracerebral a la infección con TMEV

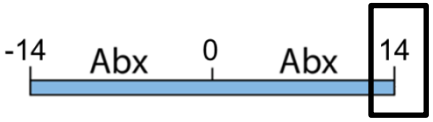


Carga Viral

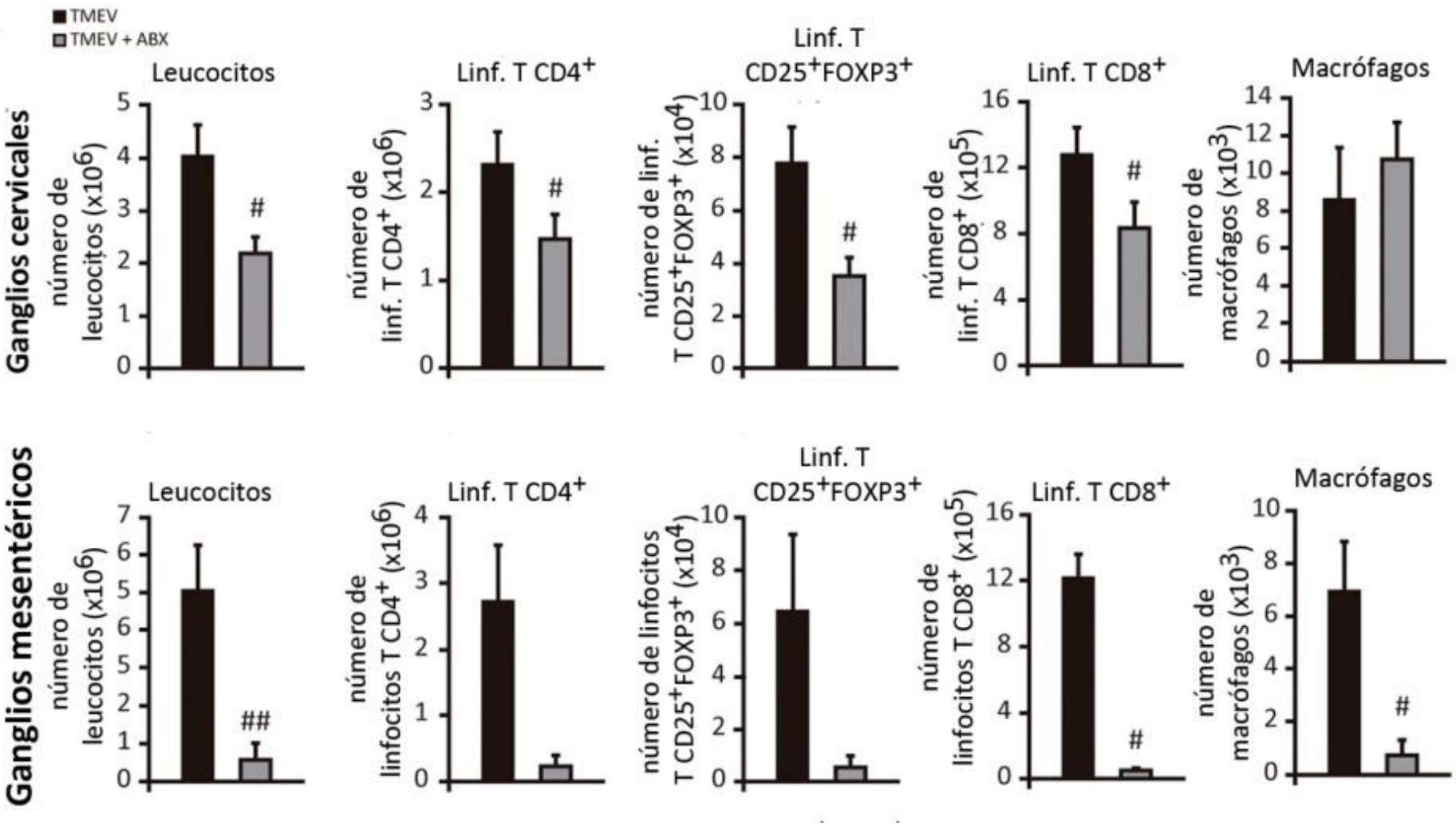


#p<0,05 vs. TMEV
##p<0,01 vs. TMEV

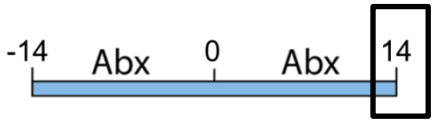
#p<0,05 vs. TMEV
##p<0,01 vs. TMEV



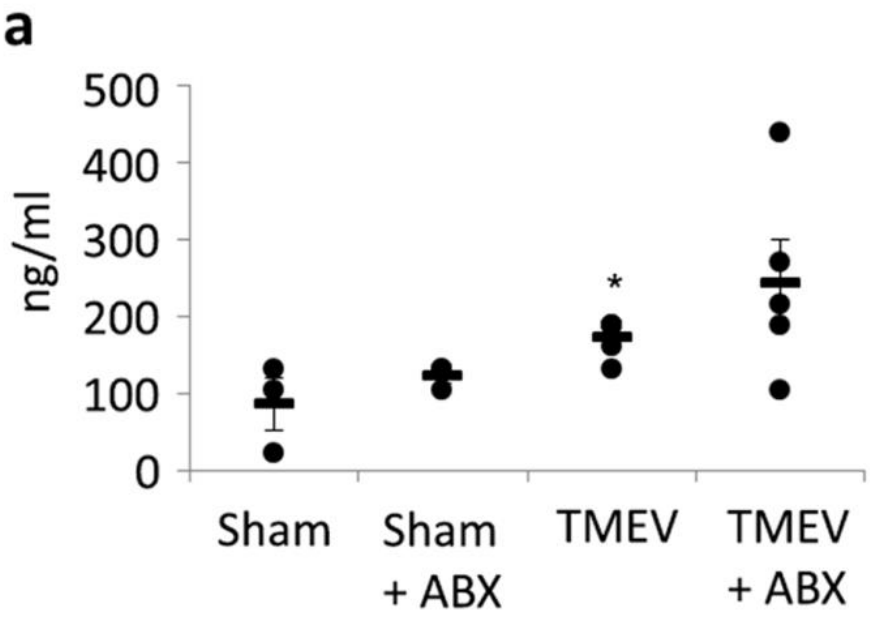
La disbiosis modifica las poblaciones leucocitarias en ganglios cervicales y mesentéricos de ratones infectados con TMEV

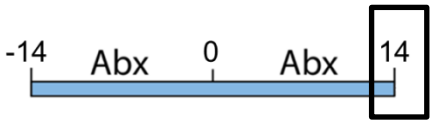


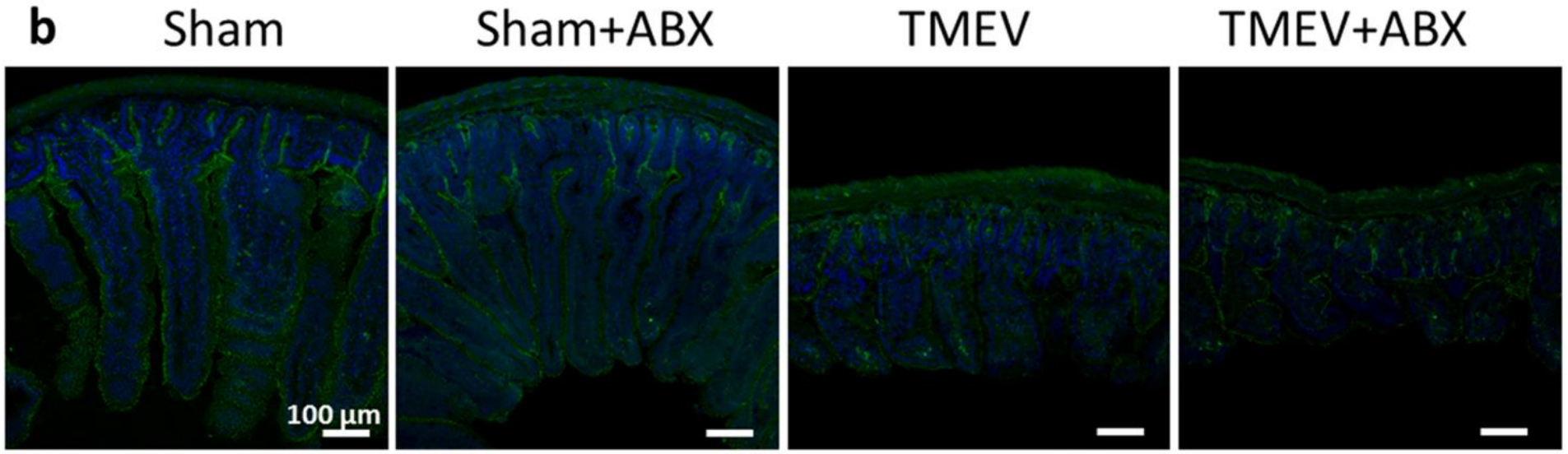
#p<0,05 vs. TMEV
##p<0,01 vs. TMEV

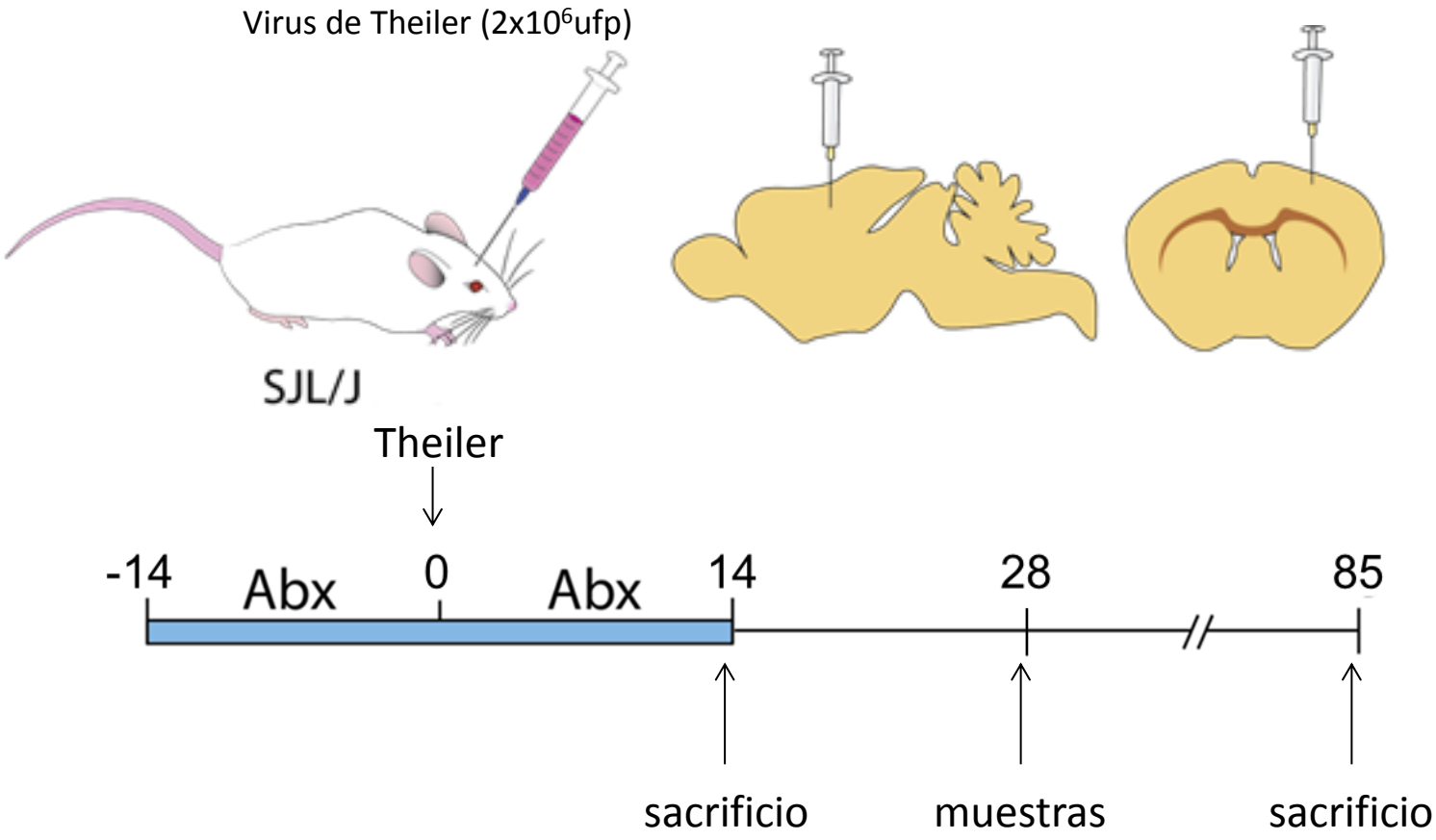


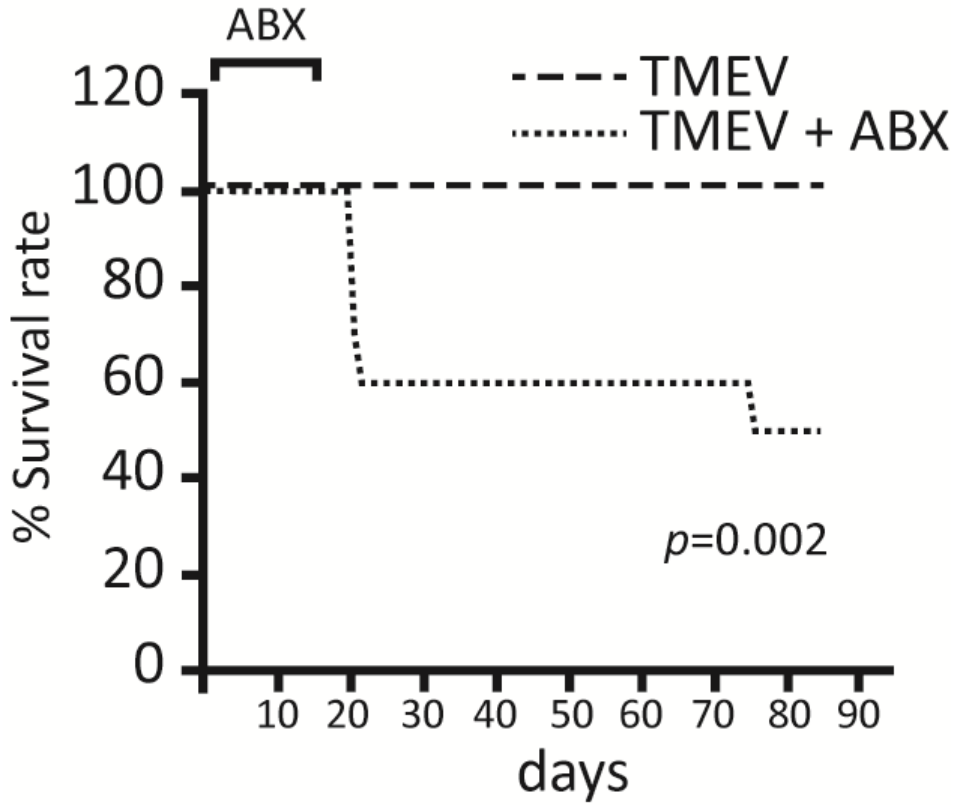
La inoculación intracerebral de TMEV aumenta la permeabilidad intestinal



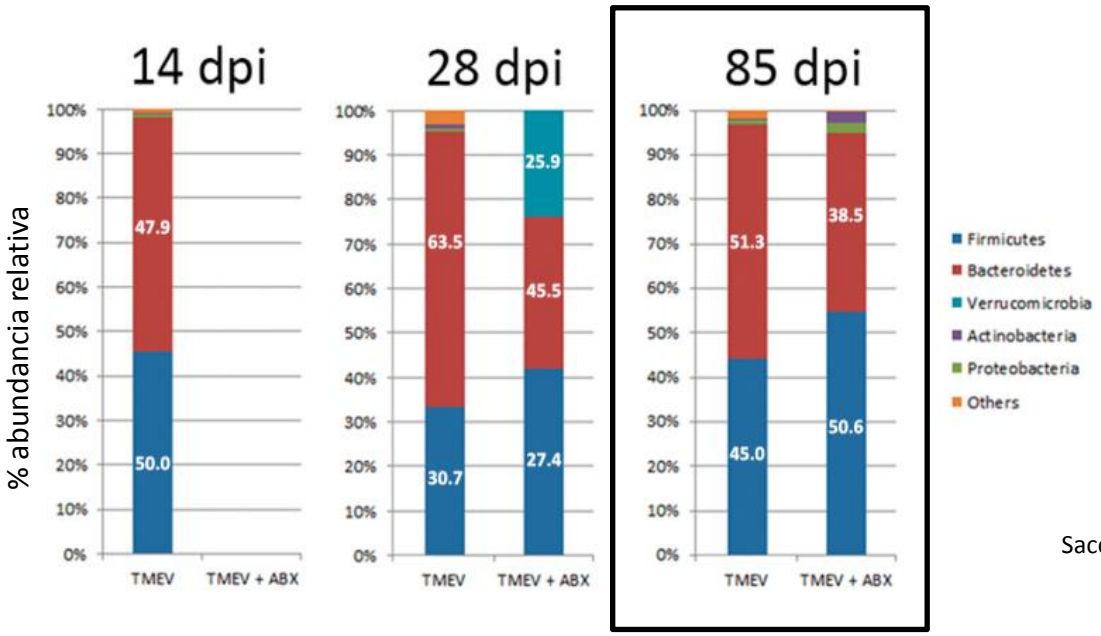


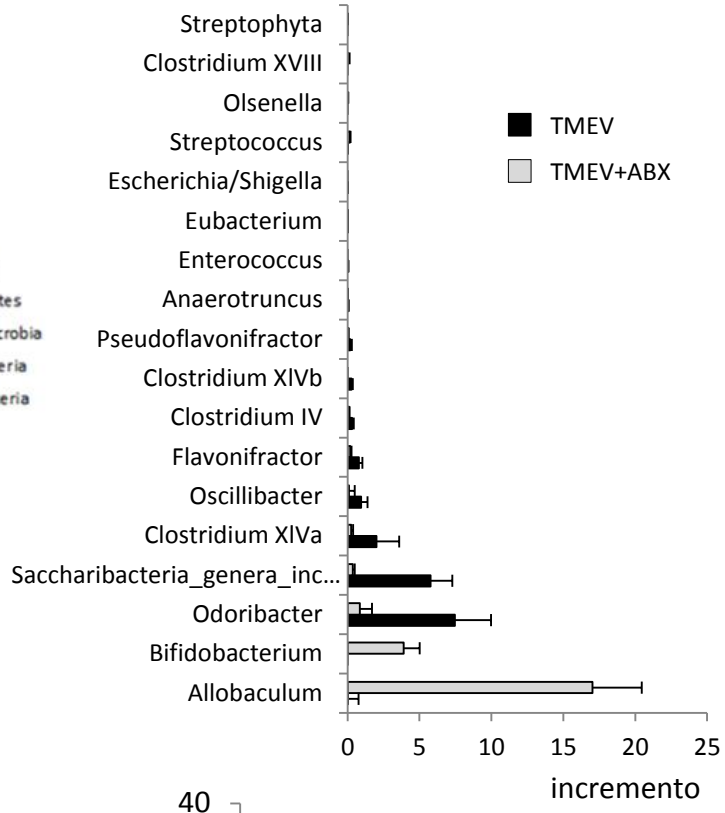



Virus de Theiler (2x10^{6}ufp)
SJL/J
Theiler
-14
Abx
0
Abx
14
28
85
sacrificio
muestras
sacrificio

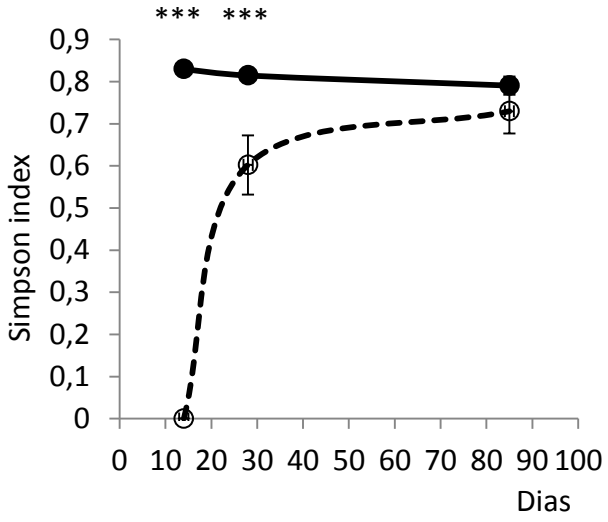

ABX
TMEV
TMEV + ABX
% Survival rate
120
100
80
60
40
20
0
p=0.002
10 20 30 40 50 60 70 80 90
days

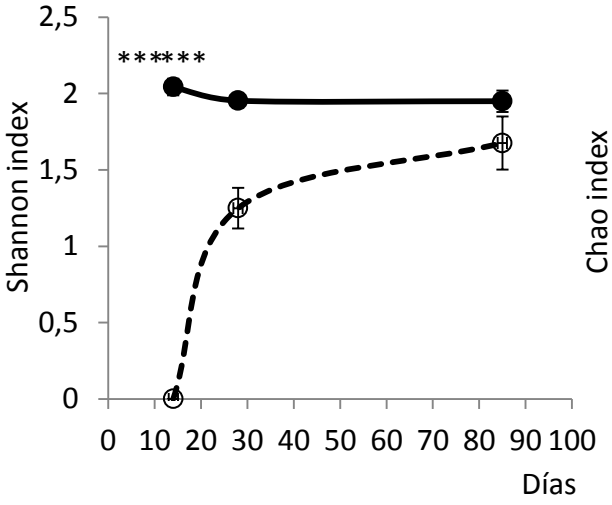
Efecto de la disbiosis sobre la microbiota de ratones TMEV-IDD

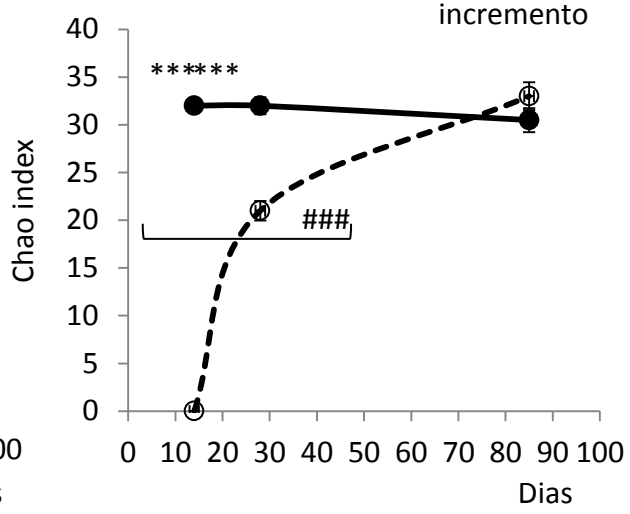




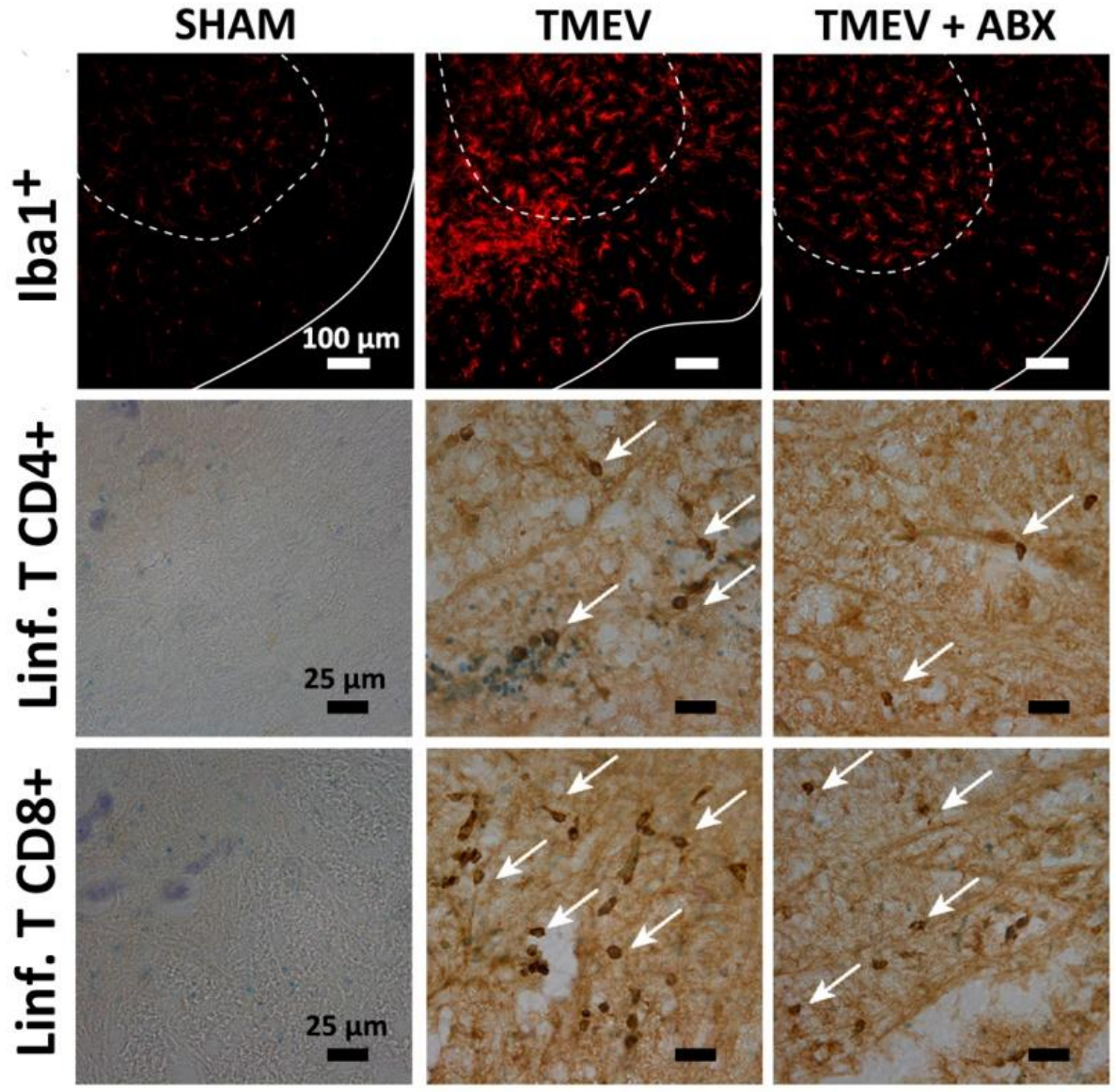
índices de diversidad



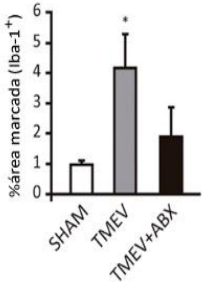




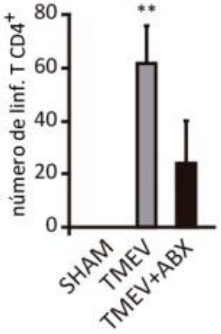
El tratamiento con Abx durante la fase de inducción provoca cambios sutiles en médula espinal en la fase crónica de TMEV-IDD



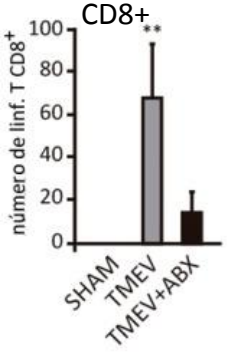
Activación microglial

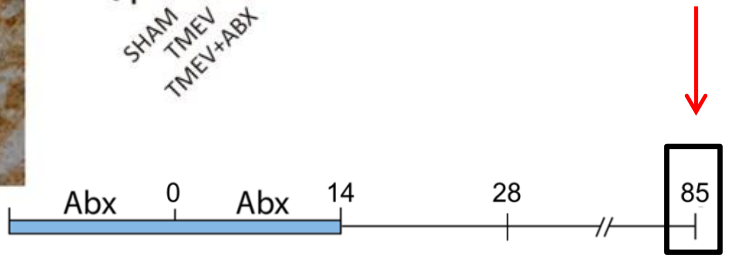


CD4+

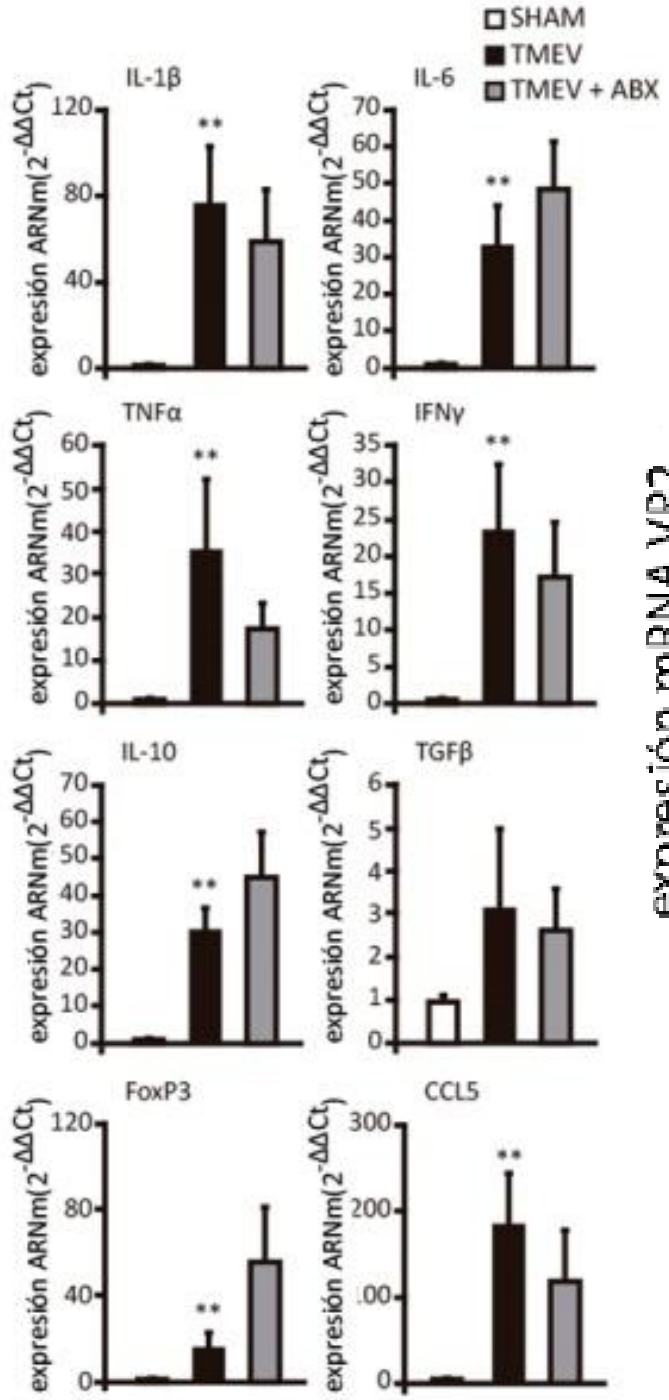


CD8+

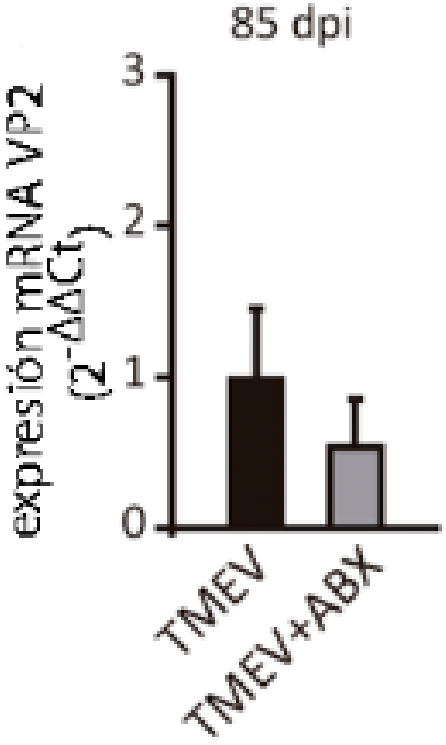




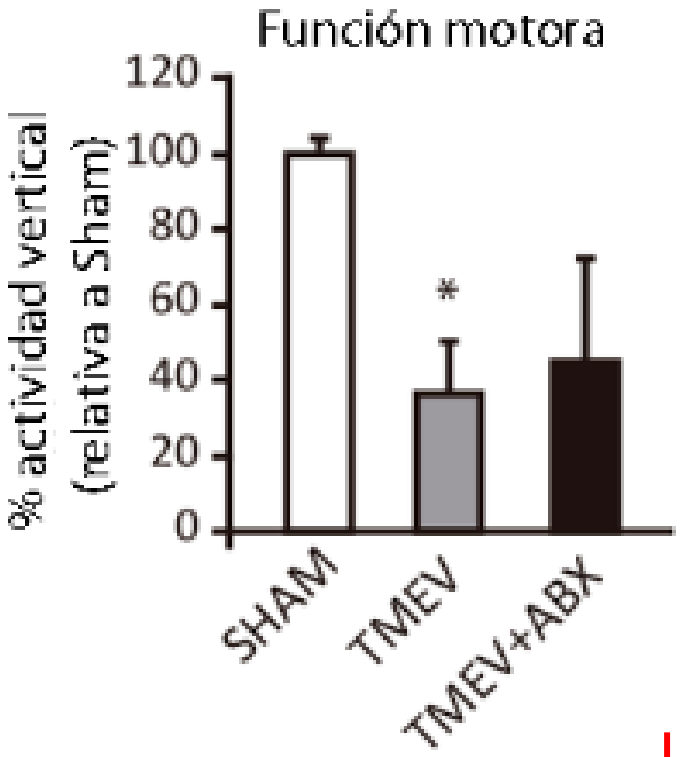
El tratamiento con Abx durante la fase de inducción no modifica la respuesta inmune en médula espinal en la fase crónica de TMEV-IDD

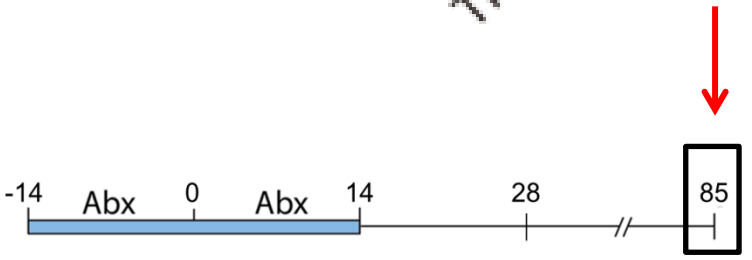


Carga Viral



Disfunción Neurológica





- ✓ La infección cerebral con TMEV modifica la microbiota intestinal
- ✓ La depleción temprana de microbiota por el tratamiento con antibióticos afecta la respuesta inmune a la infección cerebral con TMEV
- ✓ El tratamiento con Abx afecta la evolución de la enfermedad en términos de mayor mortalidad en periodos de tiempo cercanos a una microbiota de perfil inflamatorio (28dpi)
- ✓ Los ratones TMEV-Abx que sobreviven presentan la misma severidad y carga viral que los que no recibieron Abx , posiblemente debido al reestablecimiento de los índices de diversidad
- ✓ Importancia de la biodiversidad en la composición de la microbiota

Perspectivas Futuras

Paso de la biología descriptiva del microbioma a **aspectos translacionales** con el desarrollo de terapias dirigidas en aquellas enfermedades en las que una disfunción de la microbiota contribuye a su patología

- Cual es la microbiota relevante en la salud y en la enfermedad?
- Desarrollo de herramientas que permitan una mejor interpretación de los datos
- Estandarización de los modelos animales
- Mayor tamaño muestral / Estudios longitudinales

La investigación sobre la manipulación de la microbiota intestinal es un campo de gran expansión por su potencial explotación terapéutica

GRACIAS!!!

Luisa María Villar Guimerans
José Carlos Alvarez Cermeño
Rosa del Campo
Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid

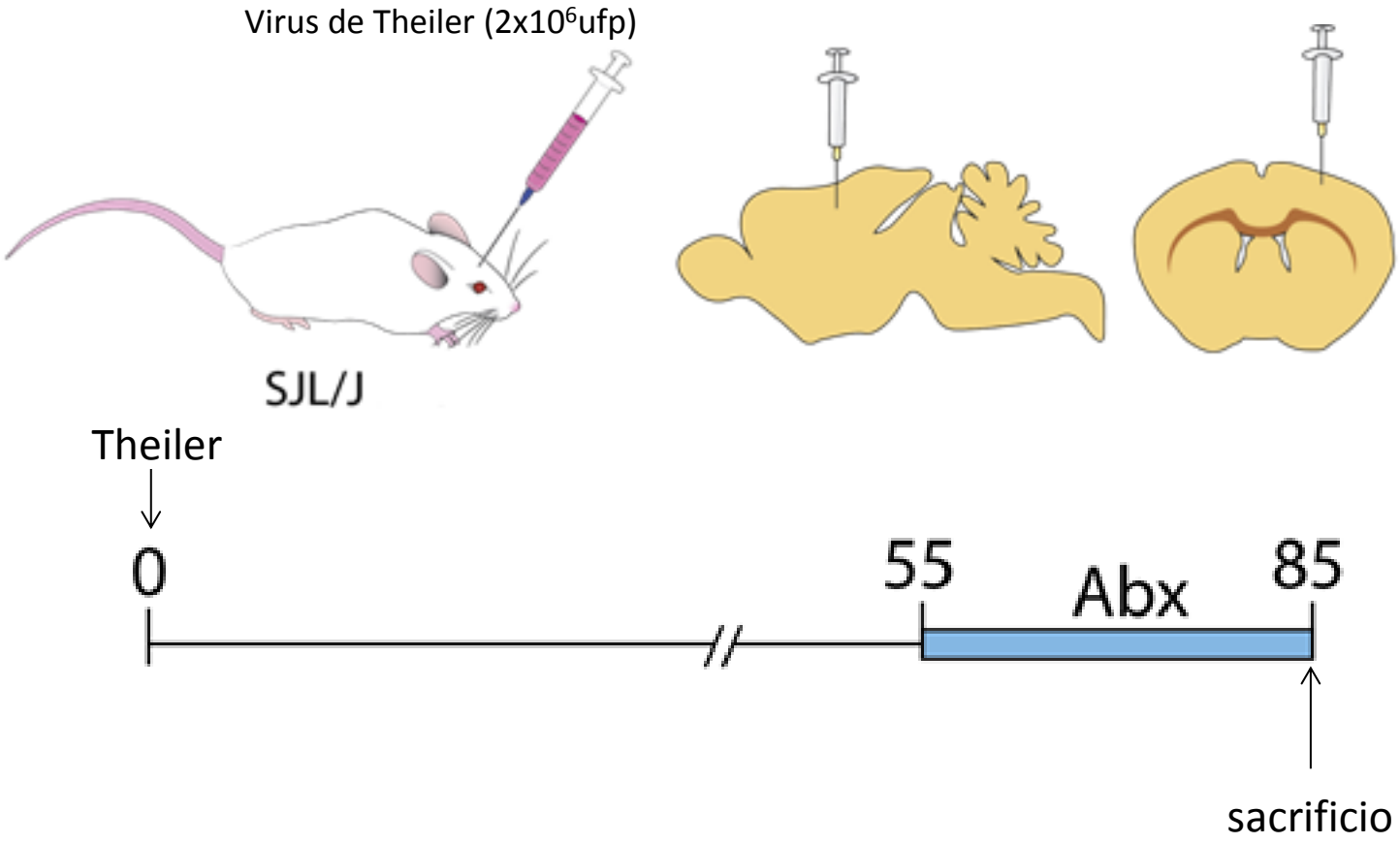
Eduardo Molina-Holgado
Unidad de Neuroinflamación
Hospital Nacional de Parapléjicos

Xavier Montalban
Carmen Espejo
Manuel Comabella
Hospital Universitario
Vall d´Hebron, Barcelona

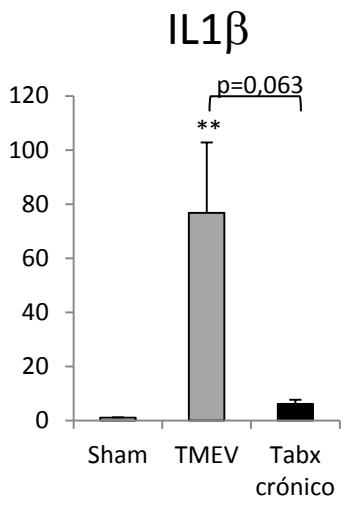
Koen Vandenbroeck
Universidad del País Vasco
Parque Tecnológico de Vizcaya

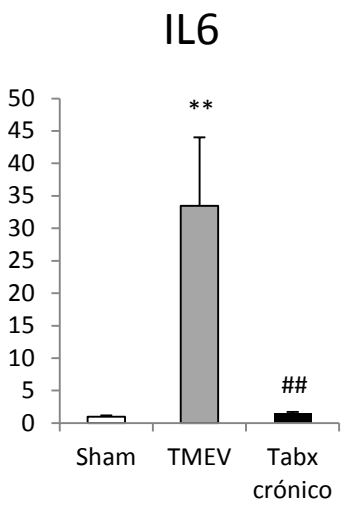
Fernando de Castro
Instituto Cajal; CSIC
Diego Clemente
Grupo de Neuroinmuno Reparación
Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo

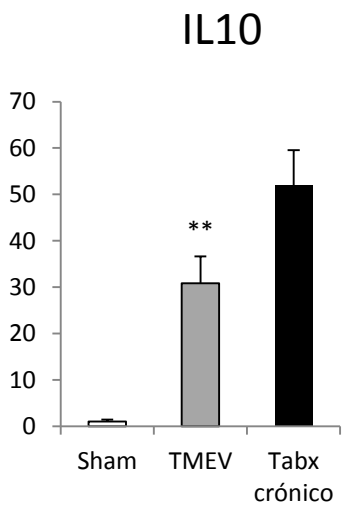
Financiación
SAF: 2010/17501
SAF: 2013/42374 R
CAM:S-Sal-0261-2006
CAM: S-2010/BDM-2308
Innocash: INC-0367
INNPACTO:IPT2011-0861
REEM: RD07/0060/0010
REEM: RD12/0032/0001

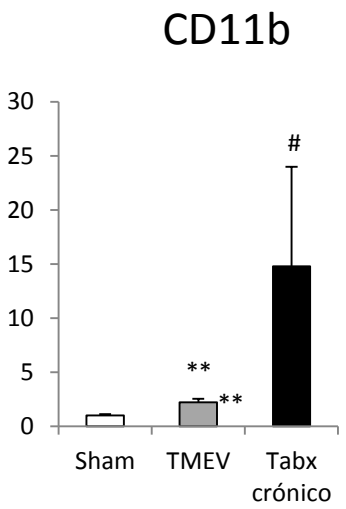

Virus de Theiler (2x10^{6}ufp)
SJL/J
Theiler
0
55
Abx
85
sacrificio

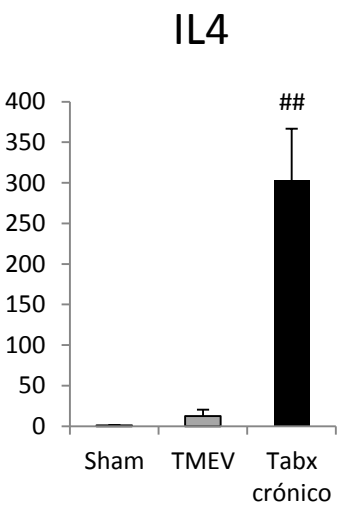
Tratamiento con Abx en la fase presintomática

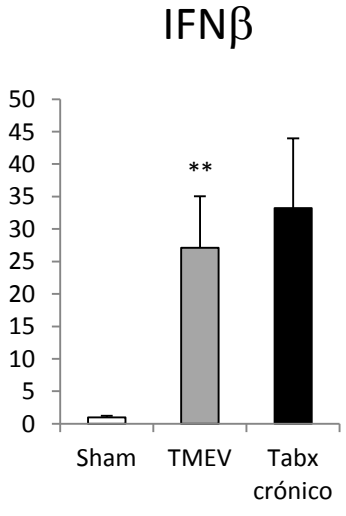


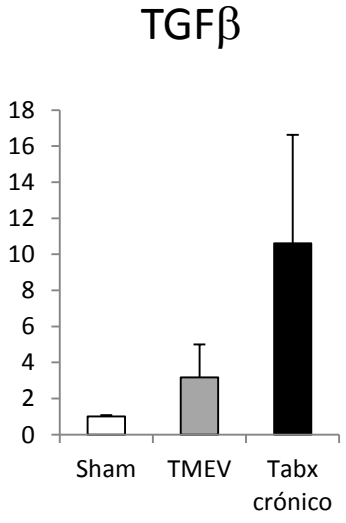


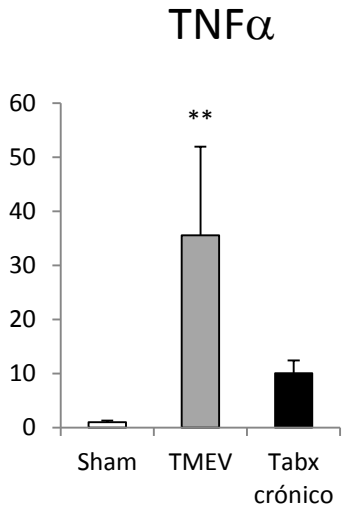


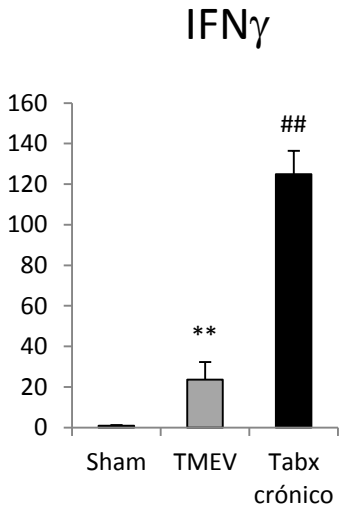


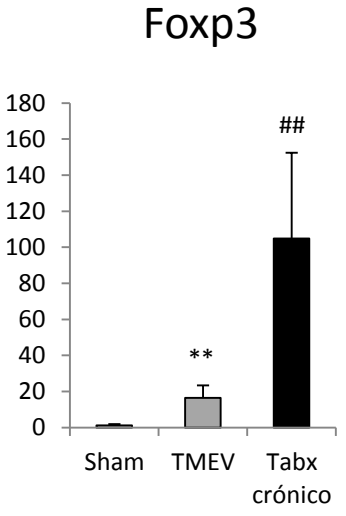


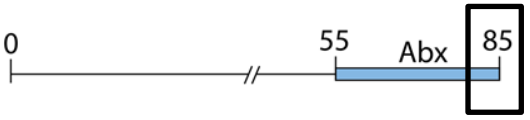




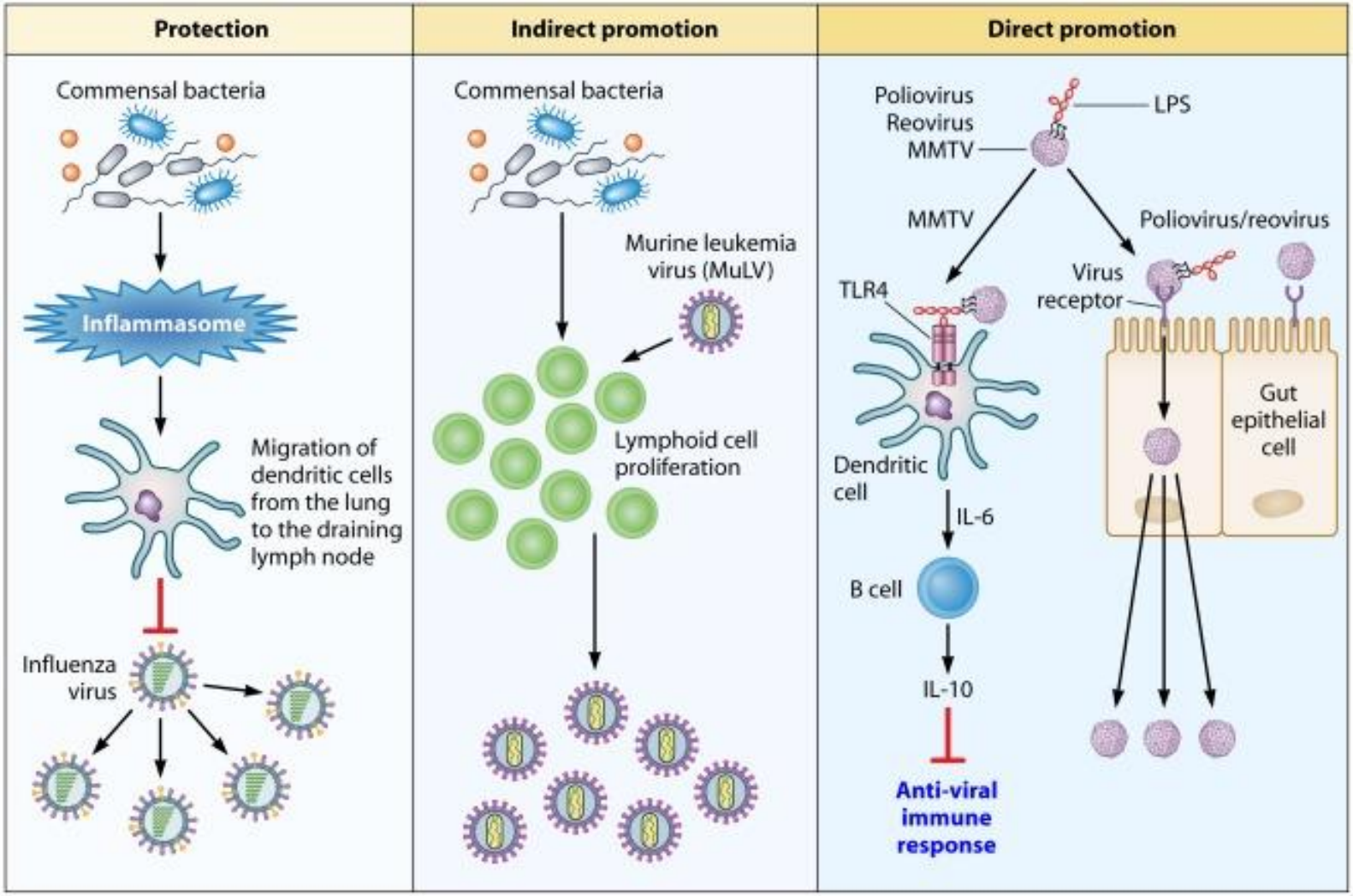








Influencia de la microbiota en la patogénesis viral



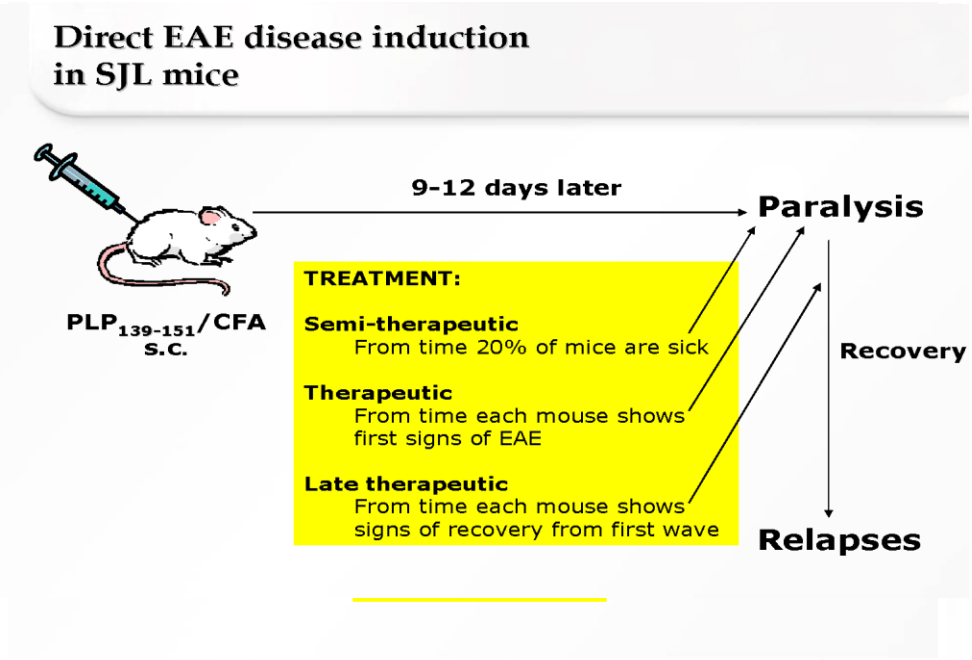
Wilks & Golovkina *Plos Pathog* 2102

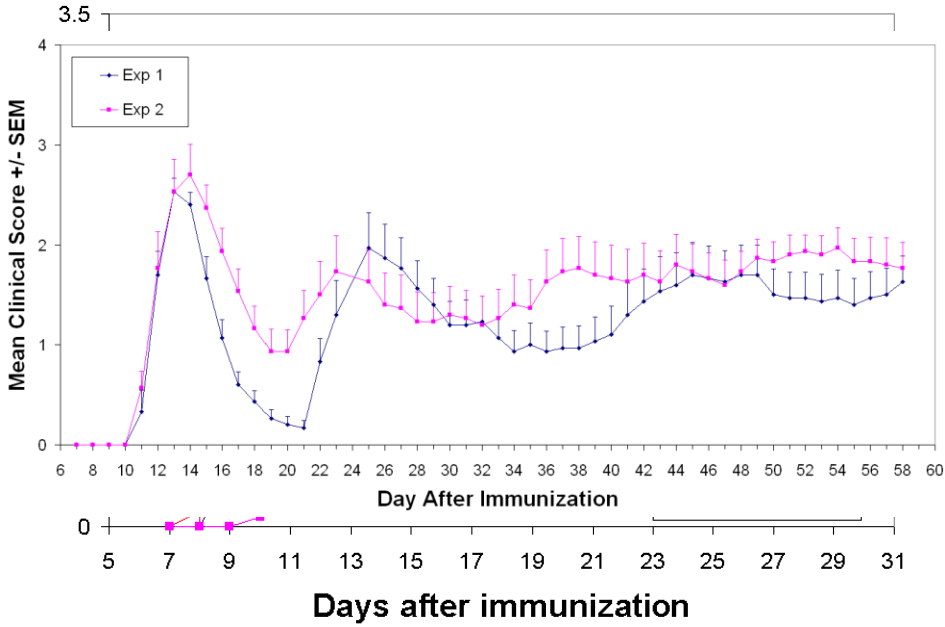
•Encefalomielitis Autoimmune experimental (EAE): Immunización con proteínas de mielina

1.-Activa: inmunización con antígenos de mielina

-Modelo más común empleado

-Proporciona un buen valor predictivo de eficacia en EM



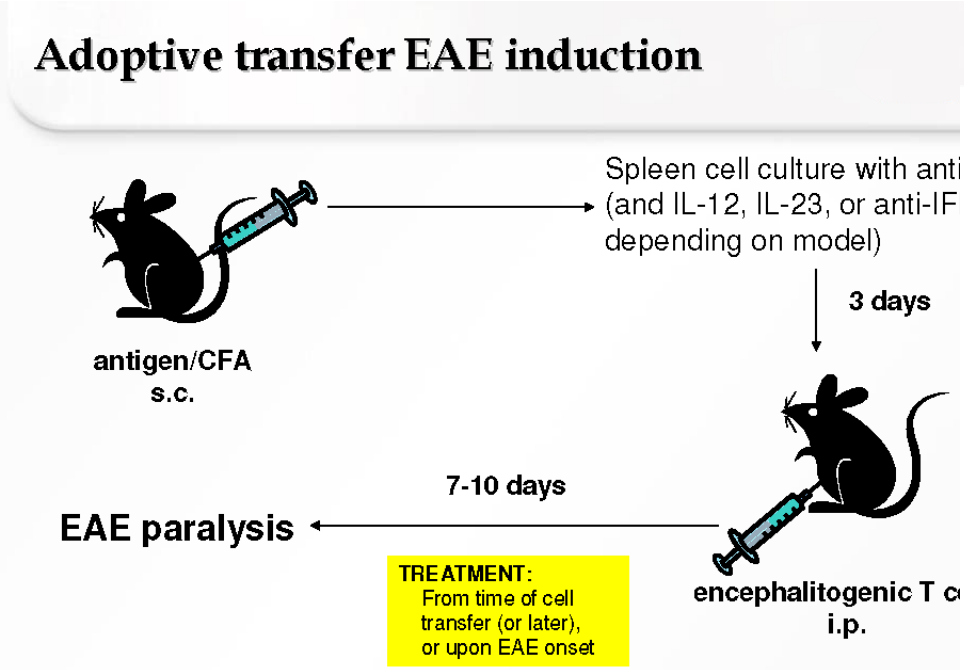


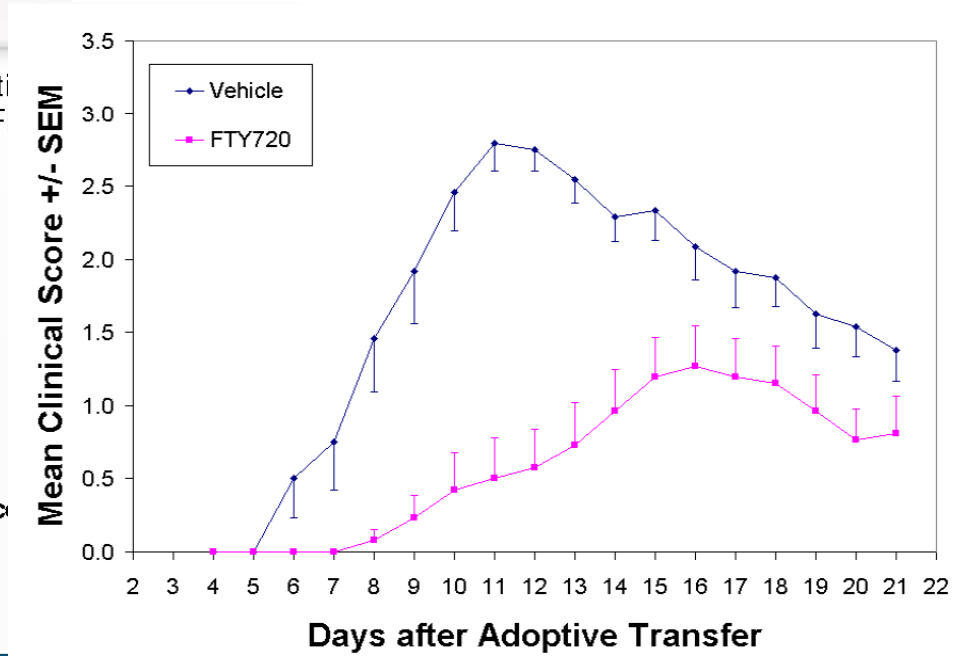
•Encefalomielitis Autoimmune experimental (EAE): Inmunización con proteínas de mielina

2.-Pasiva: transferencia de células T reactivas a antígenos de mielina

-Modelo terapéutico más sensible

-**Permite el estudio de implicación de Th1 o Th17**



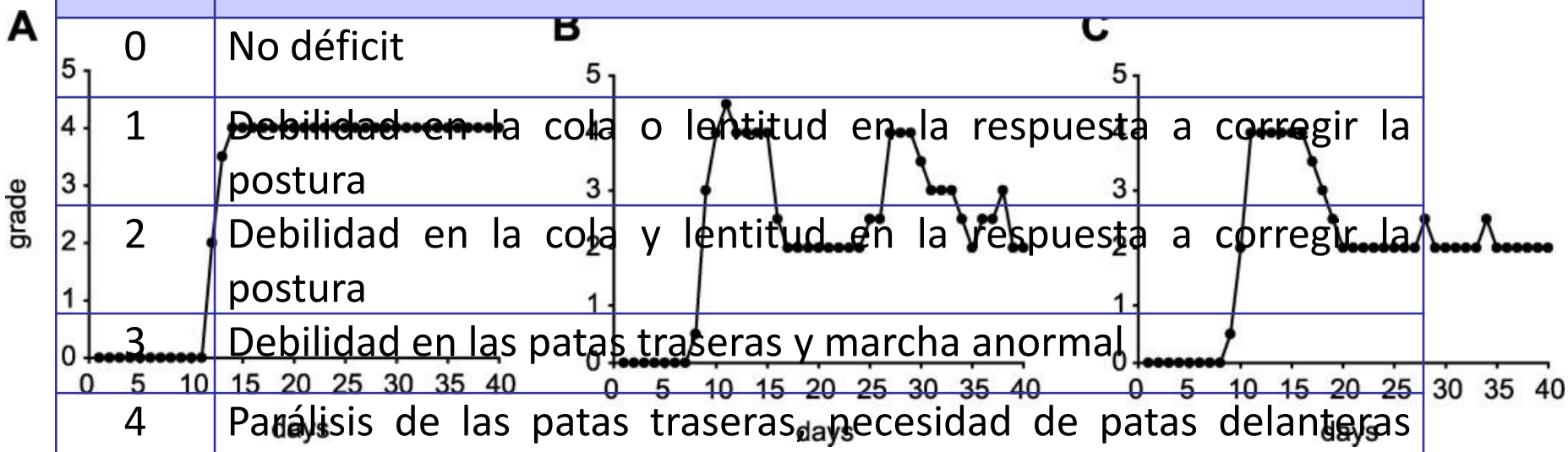


Sintomatología

MODELOS de EAE:

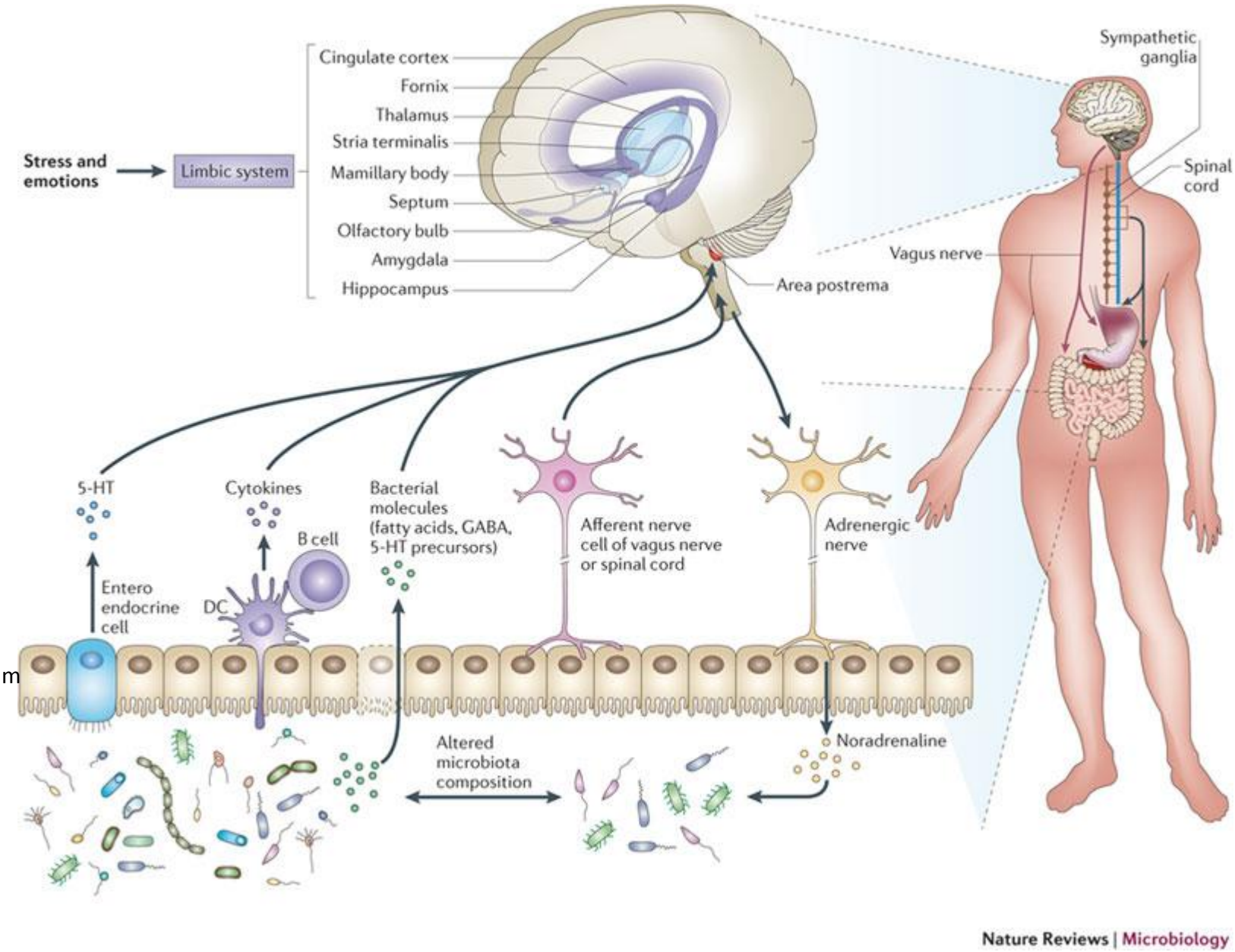
Evolución clínica:

Grado	Signos clínicos
0	No déficit
1	Debilidad en la cola o lentitud en la respuesta a corregir la postura
2	Debilidad en la cola y lentitud en la respuesta a corregir la postura
3	Debilidad en las patas traseras y marcha anormal
4	Parálisis de las patas traseras, necesidad de patas delanteras para desplazamiento
5	Parálisis de las patas traseras, debilidad de las patas delanteras, dificultad de movimiento
6	Moribundo.



Cepa ratón	C57 BL/6	SJL/J	SJL/J
Inmunógeno	MOG_{35-55}	$PLP_{139-151}$	MBP_{84-104}

EL EJE INTESTINO-CEREBRO



Animales GF

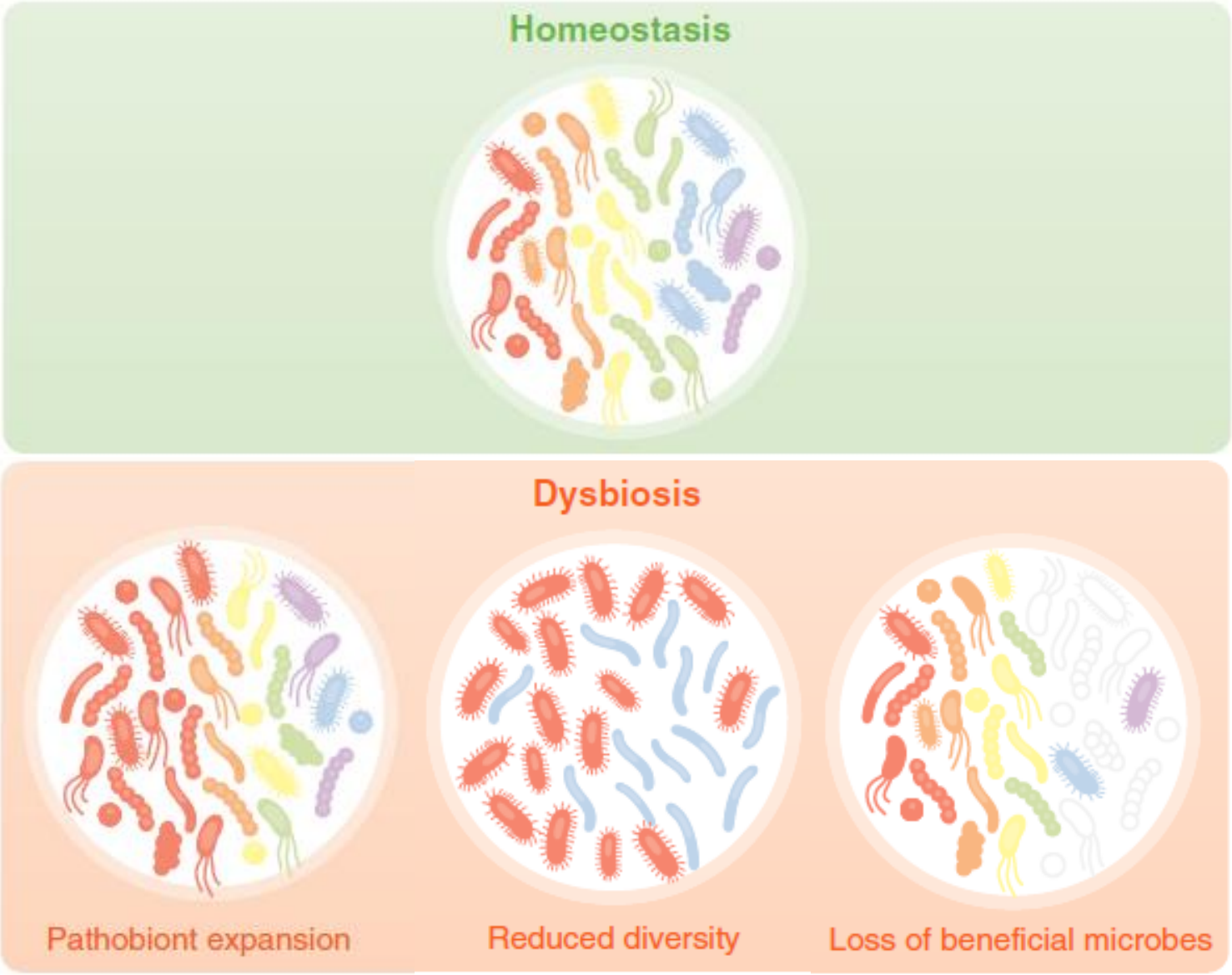
- Consecuencias morfológicas:
  - Ciego muy abultado-hinchado.
  - Área de superficie intestinal reducida.
  - Placas de Peyer más pequeñas.
  - Menor grosor de las vellosidades.
- Tránsito más lento a través de las células epiteliales intestinales.
- Mayor proporción de células Treg
- Disminución de células efectoras Th1/Th17
- ↑ NK cells: animales más susceptibles a colitis.
- ↑ IgE en suero: Desarrollo de alergias.

Peterson & Round, *Cell Microbiol*, 2014

Cambios en la abundancia relativa de algunos géneros de microbiota de ratones Sham y ratones TMEV.

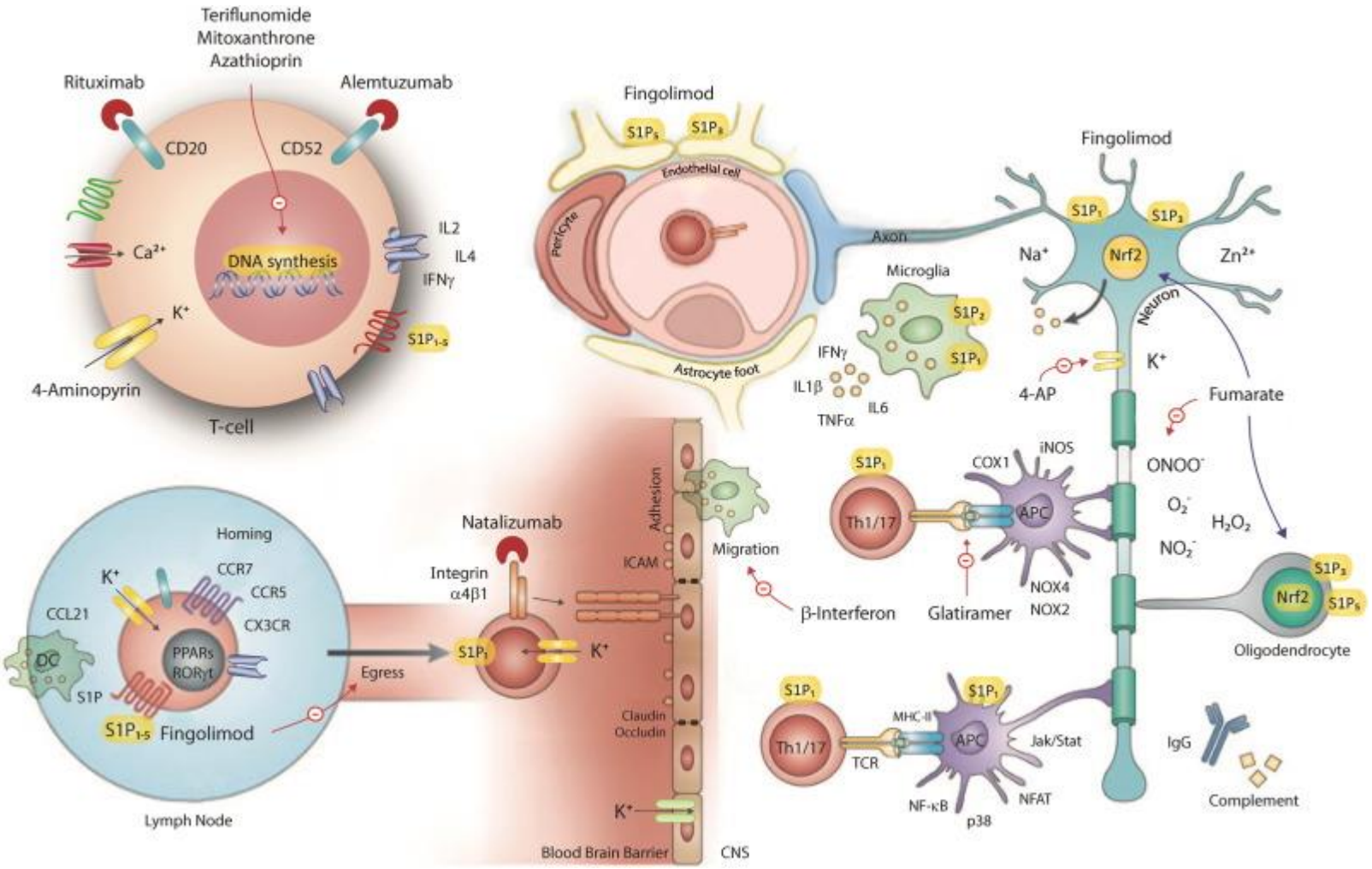
	Decrease	Increase
	(14-28dpi)	(28-85dpi)
Anaerotruncus	Sham (p=0.109)	Sham (p=0.486)
	TMEV (p=0.001)*	TMEV(p=0.243)
Clostridium XIVb	Sham (p=0.008)*	Sham (p=0.486)
	TMEV (p=0.0001)*	TMEV(p=0.008)*
Dorea	Sham (p=0.109)	Sham (p=0.114)
	TMEV (p=0.002)*	TMEV(p=0.035)*
Eubacterium	Sham (p=0.028)*	Sham (p=0.114)
	TMEV (p=0.006)*	TMEV(p=0.0001)*
Lachnospiracea_incertae_sedis	Sham (p=0.383)	Sham (p=1)
	TMEV (p=0.0004)*	TMEV(p=0.421)
Oscillibacter	Sham (p=0.109)	Sham (p=1)
	TMEV (p=0.0001)*	TMEV(p=0.006)*
Pseudoflavonifractor	Sham (p=0.299)	Sham (p=0.92)
	TMEV (p=0.0001)*	TMEV(p=0.216)
	Increase	Decrease
	(14-28dpi)	(28-85dpi)
Akkermasia	Sham (p=0.004)*	Sham (p= 0.029)*
	TMEV (p=0.0001)*	TMEV(p=0.022)*
Enterorhabdus	Sham (p=0.882)	Sham (p=0.144)
	TMEV (p=0.159)	TMEV(p=0.002)*

Cambios en la microbiota

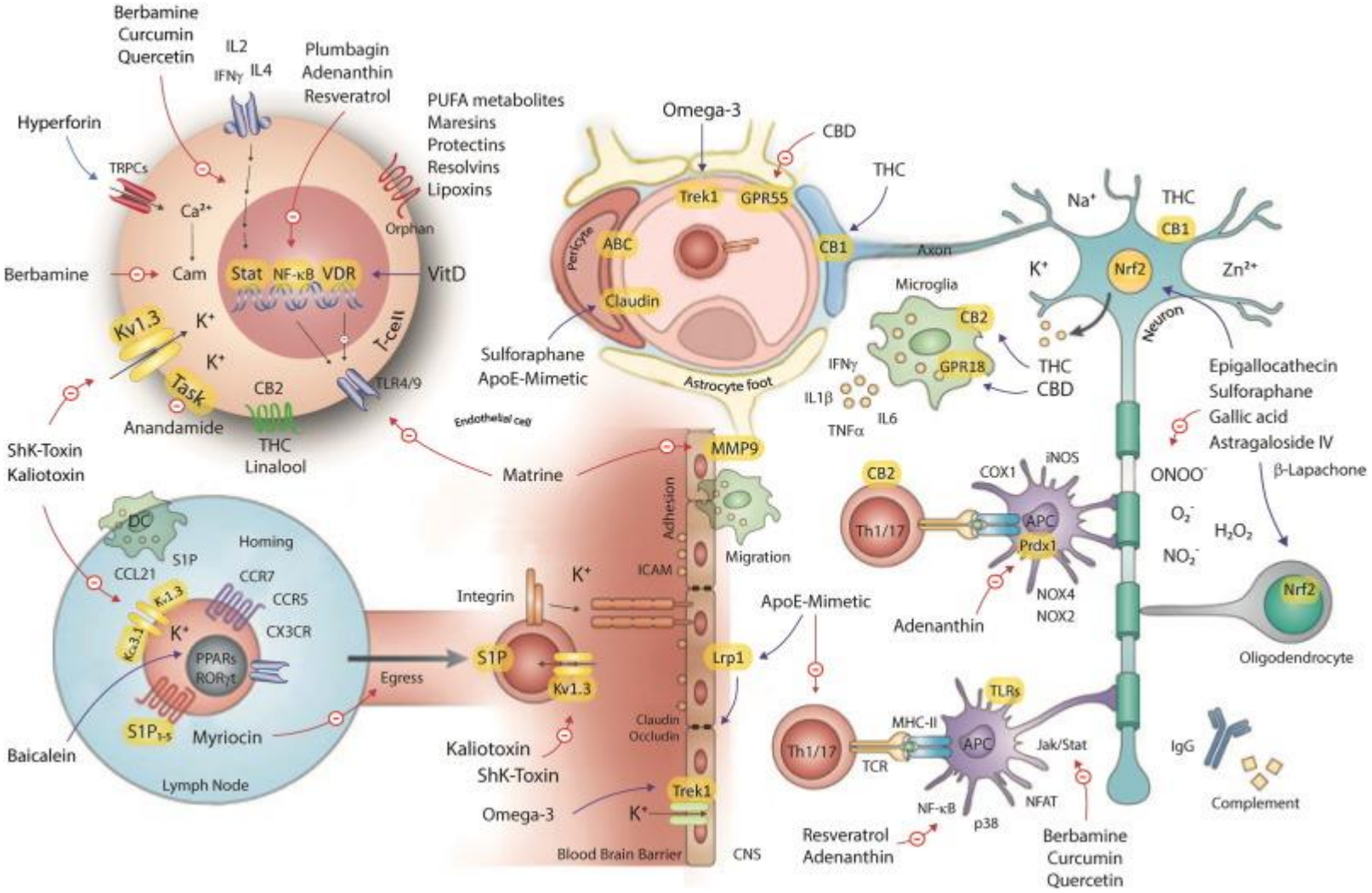


Peterson & Round, *Cell Microbiol*, 2014

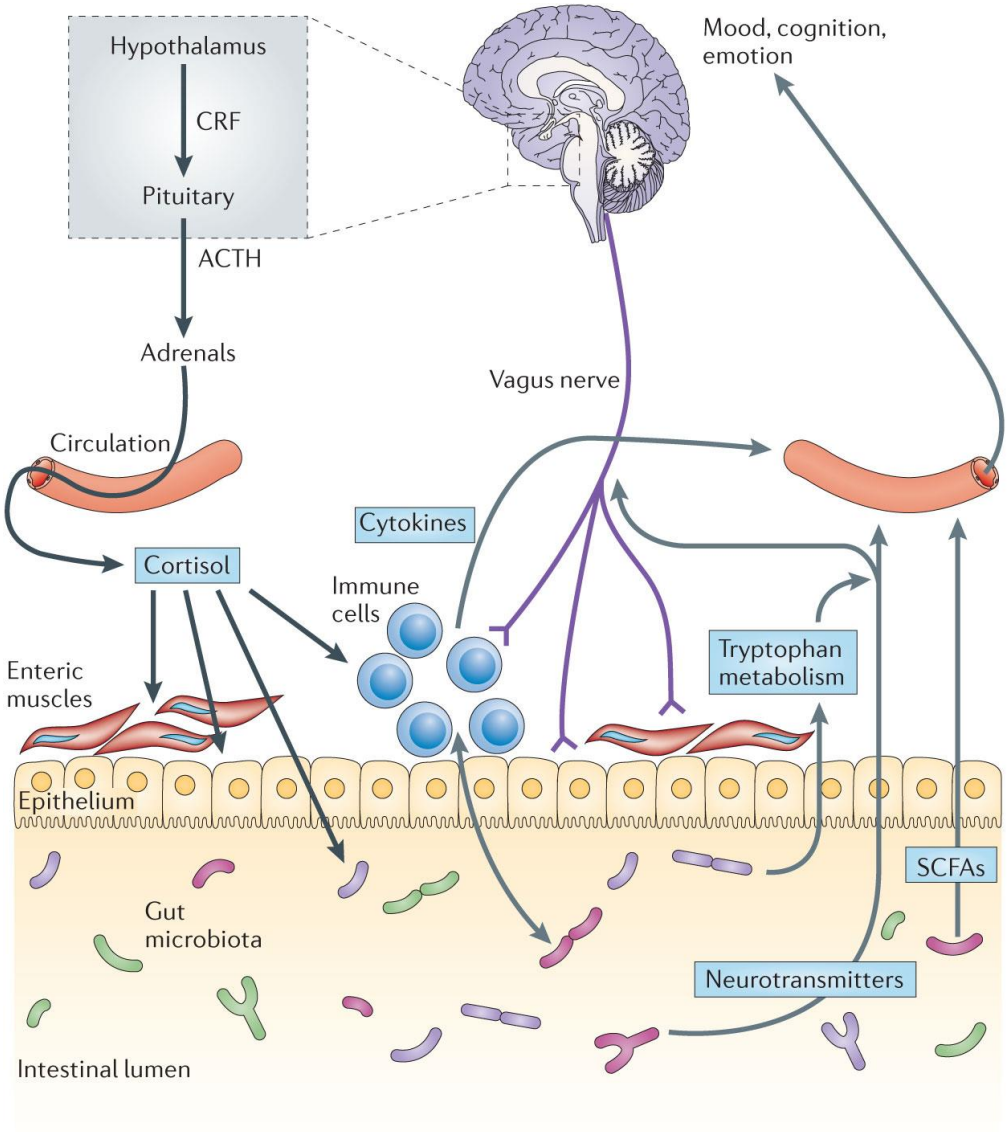
Terapéutica de la Esclerosis Múltiple



Nutrientes y Compuestos Naturales

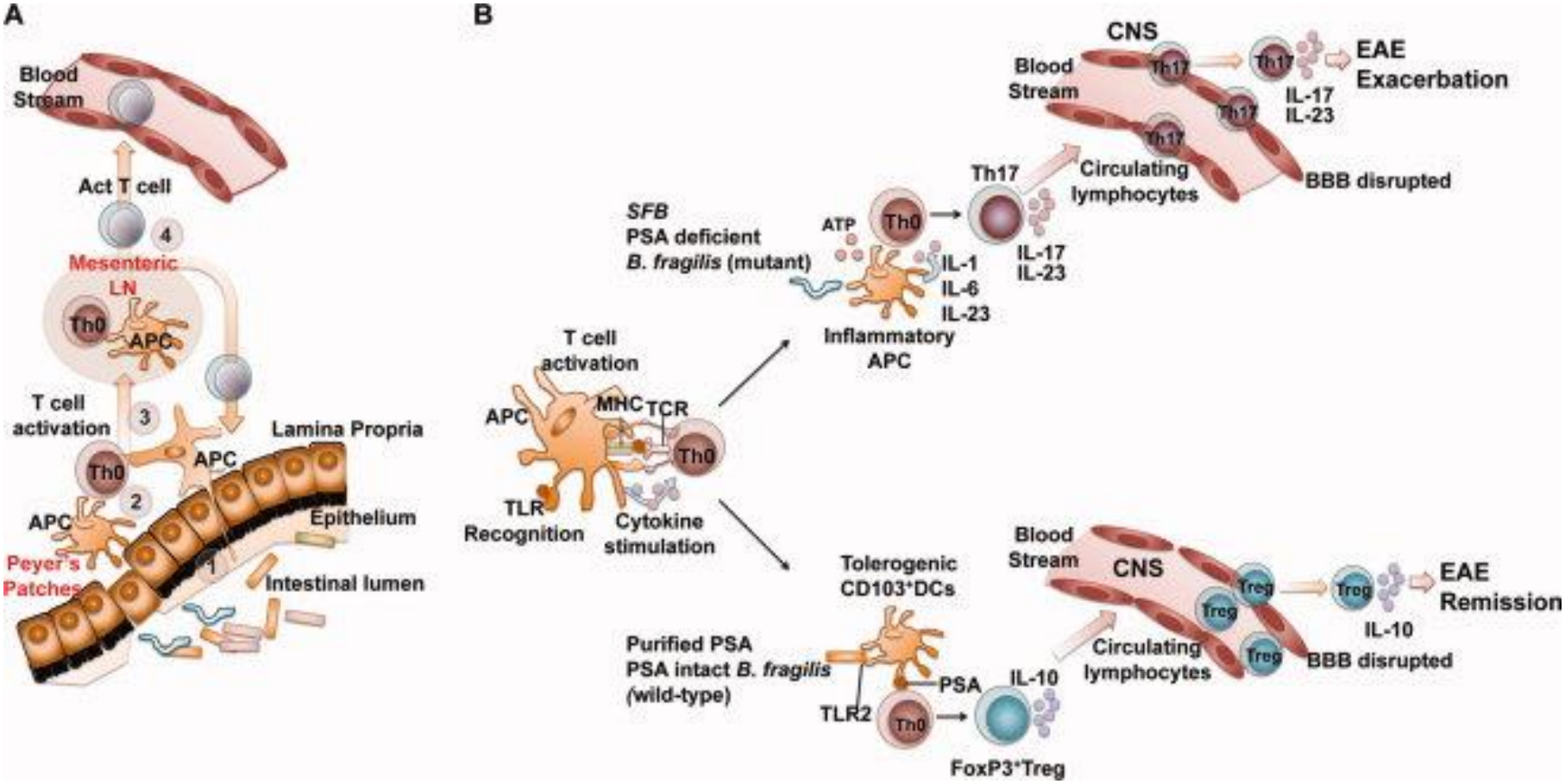


Pathways involved in bidirectional communication between the gut microbiota and the brain



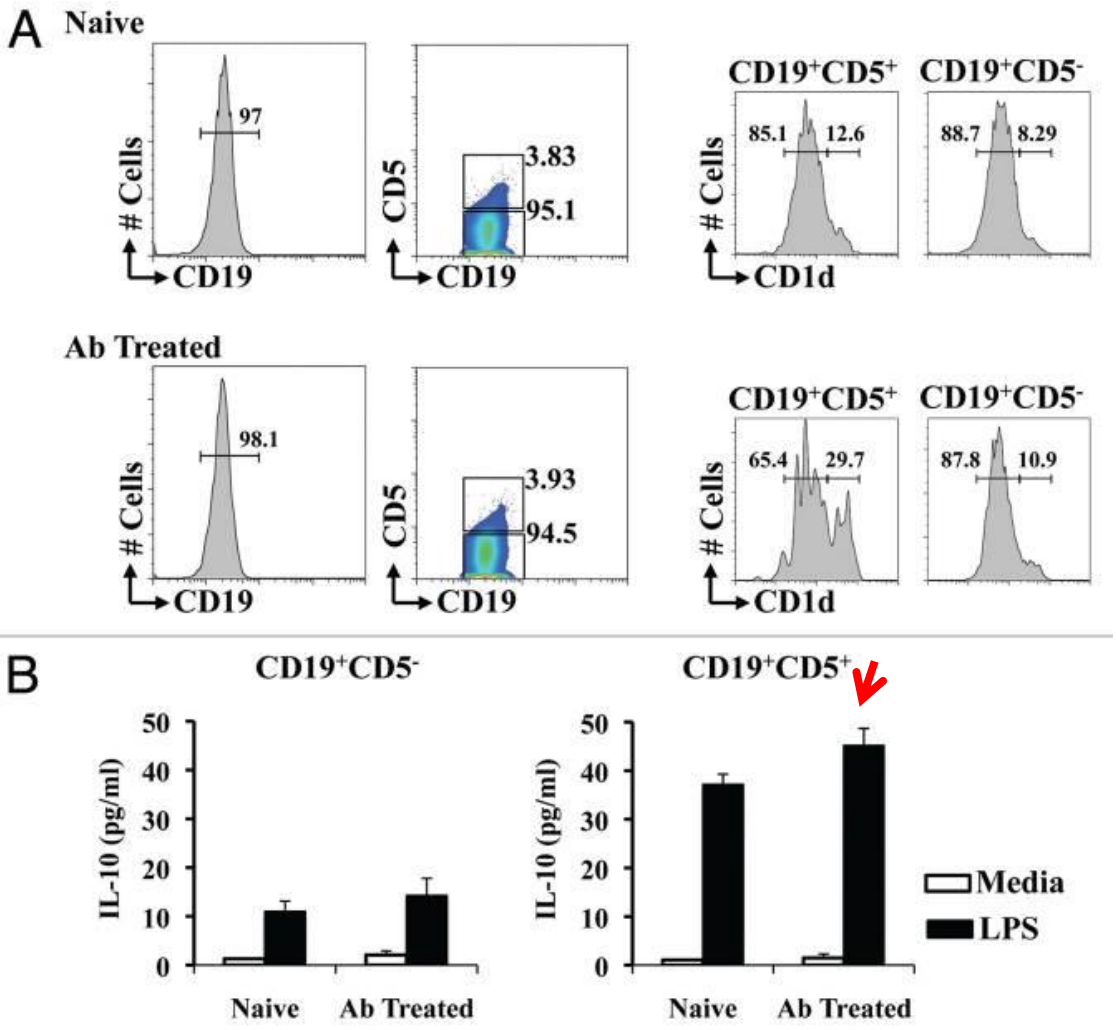
Nature Reviews | Neuroscience

$CD4^+$ T cells induced by gut commensal bacteria can exacerbate or reduce the severity of experimental CNS demyelinating disease.



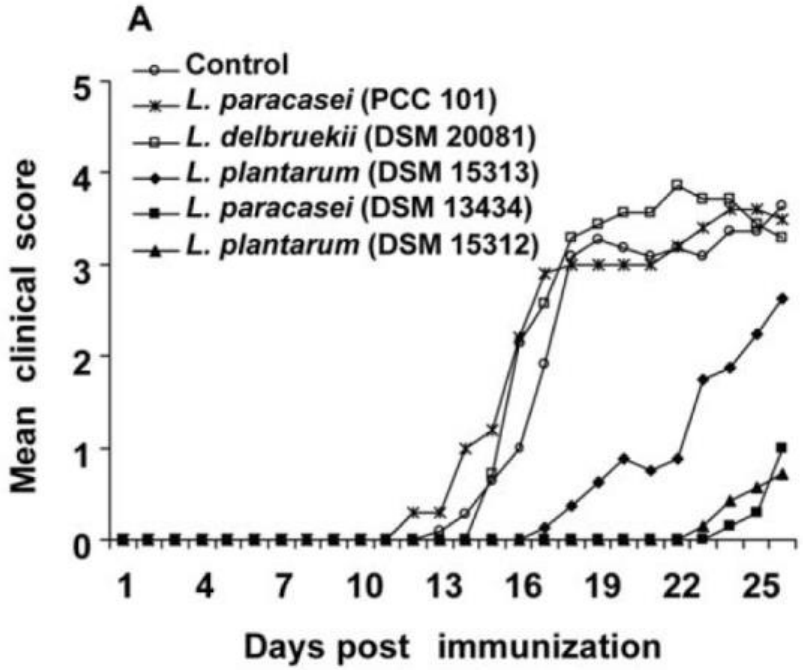
La producción de IL-10 por linfocitos B $CD5^+$ aumenta en ratones *naïve* tratados con antibióticos por vía oral

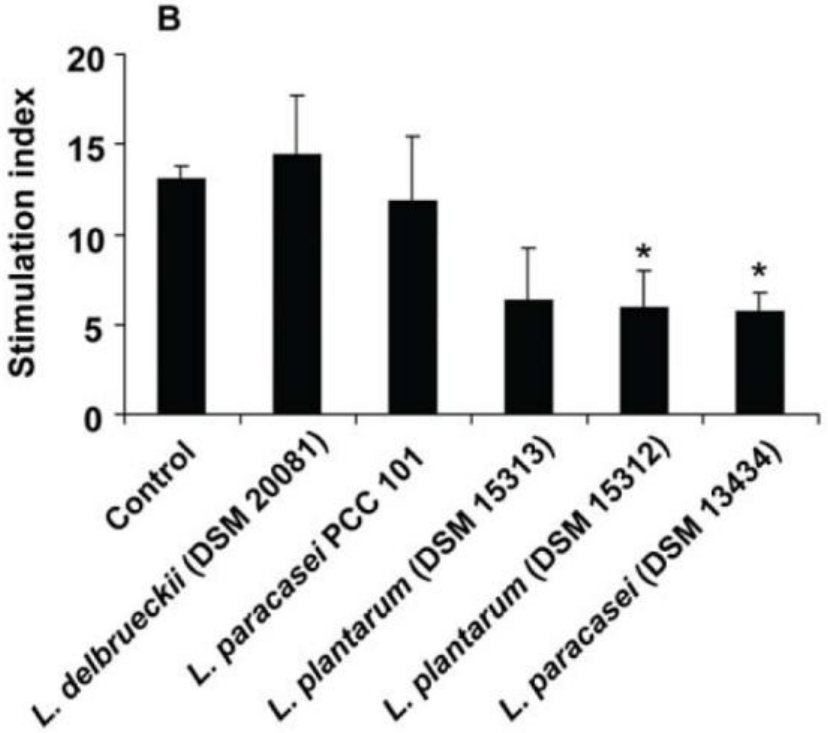
In vitro

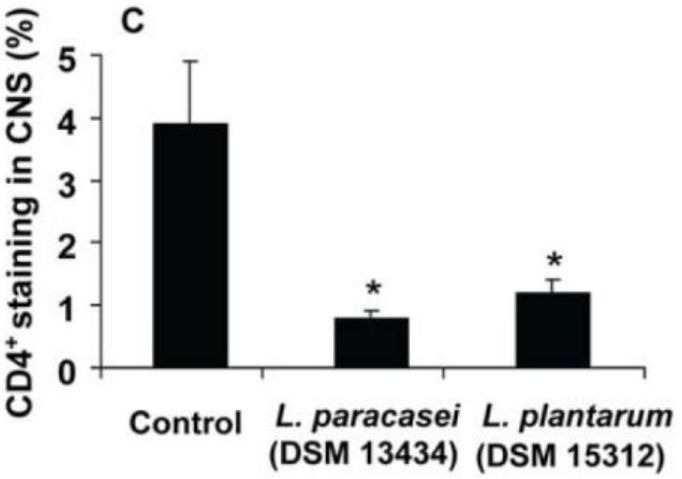
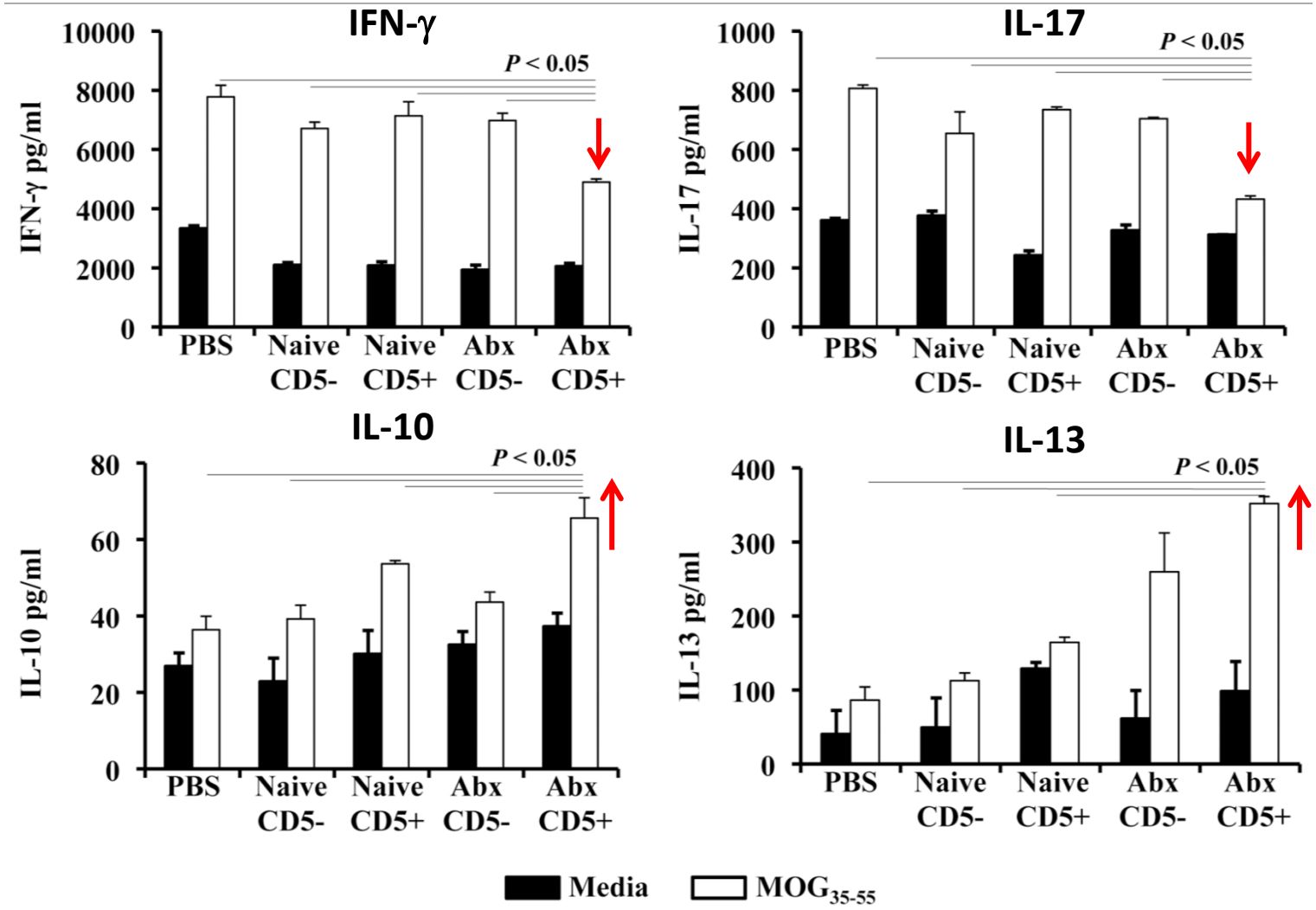


Ochoa–Reparaz et al., 2010

Distintas cepas de *Lactobacillus* previenen EAE y suprimen células T autoreactivas







La tranferencia adoptiva de células B CD5⁺ obtenidas de ratones EAE tratados con Abx polarizan el patrón de expresión de citoquinas hacía un fenotipo Th2