

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

La microbiota intestinal como marcador diagnóstico en la
esclerosis múltiple

Autora:

D^a. María Ángeles Méndez Miralles

Director:

Dr. D. Vicente Navarro López

Murcia, julio de 2023

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

La microbiota intestinal como marcador diagnóstico en la
esclerosis múltiple

Autora:

D^a. María Ángeles Méndez Miralles

Director:

Dr. D. Vicente Navarro López

Murcia, julio de 2023



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Vicente Navarro López como Director de la Tesis Doctoral titulada **“La Microbiota Intestinal como marcador diagnóstico en la Esclerosis Múltiple”** realizada por Dña. María Ángeles Méndez Miralles en el Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011 de 28 de enero, en Murcia, a 04 de julio de 2023.

Dr. D. Vicente Navarro López



RESUMEN

ANTECEDENTES

En las últimas décadas se ha visto un notable aumento del interés sobre la microbiota intestinal y su posible influencia en las enfermedades del ser humano, incluyendo las enfermedades neurológicas. En concreto, se ha postulado un papel fundamental en la modulación del sistema inmune del huésped y se ha propuesto como factor etiopatogénico de enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple (EM).

Hallazgos recientes tanto en el modelo animal de la esclerosis múltiple (encefalomielitis autoinmune experimental) como en los estudios realizados en pacientes con EM, han mostrado datos que sugieren una alteración de la riqueza y la composición de la microbiota intestinal en la EM. El papel de la disbiosis intestinal es aún desconocido.

OBJETIVO

En el estudio analizamos la microbiota intestinal de 15 pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente (EMRR) y 15 controles sanos para compararla y determinar si existen diferencias en la diversidad y la composición de la misma.

MATERIAL Y MÉTODO

Se recogen los datos demográficos de los sujetos del estudio incluyendo la edad y los datos antropométricos como el peso, la altura y el índice de masa corporal. Para determinar la composición de la microbiota intestinal se recogen las muestras de heces de ambos grupos del estudio y se realiza una secuenciación de nueva generación (NGS) del gen del ARN ribosomal 16S. Posteriormente, se realiza un seguimiento prospectivo de los pacientes durante 24 meses, en el que se registran las variables clínicas y radiológicas de la evolución de la enfermedad.

RESULTADOS

La composición de la microbiota intestinal de los pacientes con EMRR mostró diferencias en las abundancias relativas de los géneros bacterianos *Lachnospiraceae*, *Ezakiella*, *Ruminococcaceae*, *Hungatella*, *Roseburia*, *Clostridium*, *Shuttleworthia*, *Poephyromonas* y *Bilophila*, cuando se compararon con las muestras de los controles. Estos géneros fueron incluidos en un análisis de regresión logística para determinar la sensibilidad y la especificidad de la prueba, basada en el número de secuencias detectadas de cada uno de los microorganismos en una muestra a estudio. Finalmente, se calcularon las curvas ROC y el área bajo la curva con un IC del 95 % y se determinó que los géneros *Roseburia*, *Lachnospira*, *Ezakiella*, *Bilophila* y *Ruminococcus* mostraron una adecuada sensibilidad y especificidad para la prueba. En concreto, *Ezakiella* con AUC de 75,0 (IC 95% 60,6-89,4) y *Bilophila* con AUC de 70,2 (IC 95% 50,1-90,4) fueron los que mejor detectaron a los sujetos con EMRR.

CONCLUSIONES

Existe una disbiosis en la microbiota intestinal de los pacientes con EMRR. Un análisis de los componentes de la microbiota sugiere el papel de algunos géneros bacterianos como factor y diagnóstico de la EMRR.

PALABRAS CLAVE

Microbiota intestinal; esclerosis múltiple remitente-recurrente; *Ezakiella*; *Bilophila*.

PALABRAS TESAURO

Neurología (D_GEN 32, ID_MED 05, ID_ESP 07)

Microbiología (D_GEN 24, ID_MED 14, ID_ESP 00)

ABSTRACT

INTRODUCTION

In recent decades, gut microbiota has received considerable interest in its possible influence on human diseases, including neurological disorders. Specifically, a major role in the modulation of the host's immune system has been postulated and it has been proposed as an etiopathogenic factor of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis (MS).

Recent findings both in the animal model of MS (experimental autoimmune encephalomyelitis) and in studies carried out in patients with multiple sclerosis, have shown data that suggest an alteration in the richness and composition of the gut microbiota in MS. The role of this gut dysbiosis is still unknown.

OBJECTIVES

In the study, we analyzed the gut microbiota of 15 patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) comparing with diet-matched 15 healthy controls to determine if there are differences between them in the diversity and composition of gut microbiota.

MATERIAL AND METHOD

Demographic data including age and anthropometric data such as weight, height and body mass index are collected. To determine the composition of the gut microbiota, stool samples from both study groups are collected and Next-generation sequencing (NGS) of the 16S ribosomal RNA gene was performed. Subsequently, a prospective follow-up of 24 months was carried in the patient group. Clinical and radiological data of the patients were recorded.

RESULTS

The composition of the gut microbiota of RRMS patients showed differences in the relative abundances of the bacterial genera *Lachnospiraceae*, *Ezakiella*, *Ruminococcaceae*, *Hungatella*, *Roseburia*, *Clostridium*, *Shuttleworthia*, *Poephyromonas* y *Bilophila*, when compared to control samples. These genera were included in a logistic regression analysis to determine the sensitivity and specificity of the test, based on the number of detected sequences of each of the microorganisms in a study sample. Finally, the ROC curves and the area under the curve (AUC) with a 95% CI were calculated and it was determined that the genera *Roseburia*, *Lachnospira*, *Ezakiella*, *Bilophila* and *Ruminococcus* showed adequate sensitivity and specificity for the test. Significantly, *Ezakiella* with an AUC of 75.0 (95% CI 60.6-89.4) and *Bilophila* with an AUC of 70.2 (95% CI 50.1-90.4) were the best to identify the subjects with RRMS.

CONCLUSIONS

There is a dysbiosis in the gut microbiota of patients with RRMS. An analysis of the components of the microbiota suggests the role of some genera as a predictive and diagnosis factor of RRMS.

KEYWORDS

Gut microbiota; relapsing-remitting multiple sclerosis; *Ezakiella*; *Bilophila*.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director de tesis todo el tiempo y el esfuerzo que ha dedicado en la elaboración de este proyecto de investigación. Durante estos años has confiado en mí, aún cuando apenas empezaba mi camino en la neurología. Me has apoyado en cada paso que he dado en el abordaje de esta tesis, y aunque fuera a saltos y los tiempos entre ellos se hicieran largos, gracias por tu comprensión y confianza en saber que al final llegaríamos a este momento. Quería agradecerte no solo el haberme dado la gran oportunidad de participar en este proyecto, sino por haber podido colaborar en un estudio de investigación en ciencia básica, tan difícil de conseguir en estos días. He aprendido tanto en estos años que esa mochila de conocimiento y saber construir irá siempre conmigo.

Cómo no agradecer a mi amiga y compañera Rosa Vela, que gracias a su colaboración, este proyecto salió adelante. Gracias por estar ahí y brindarme tu amistad en aquellos años en los que nos acompañamos, en aquella vida que nos juntó y nos hizo ayudarnos. Gracias por tan buenos momentos.

A Ana Frías, por tu ayuda y aportación a este trabajo, gracias por tu amistad y confianza, por mostrar tu alegría y apoyo en los tiempos de inicio de la vida de cualquier neurólogo.

A todos mis compañeros que han trabajado conmigo y me han ayudado siempre que lo he necesitado, doy gracias por tener la suerte de no haberme encontrado sola en el arduo camino que suponen los retos de la neurología en la vida real.

Cómo no agradecer a la persona que hizo que hoy en día esté embarcada en este mundo. A ti Ramón Villaverde, te debo el descubrimiento de la neurología, el interés sobre la esclerosis múltiple que siempre me ha acompañado, el tenerte como mejor referente del buen hacer médico, y la inspiración para perseguir cada día ser mejor médico y persona. Gracias por el entusiasmo que transmites a generaciones de alumnos.

Paloma, siempre me acompañarás aunque no estemos cerca. Fuiste la mejor amiga cuando estaba lejos de casa y continúas estando ahí siempre que lo necesito. Gracias por ayudarme en todos aquellos proyectos de la residencia, en la que sin tener tiempo para nada siempre encontrabas un rato para lo que necesitara. Creo que nadie ha creído en mí como lo haces tú.

A mis padres, por haberme dado la oportunidad de crecer libre en la vida, por ayudarme en cada paso que doy y apoyarme sin contemplaciones. No sé quien sería sin vosotros. Las pocas cosas que sé de la vida, es gracias a todo lo que me habéis enseñado. Siempre os agradeceré el amor y los valores que me han acompañado a vuestro lado.

A Bernardo, porque espero que estemos juntos media vida más. Eres la mejor persona que conozco y siento una enorme gratitud por aquel día en el que nos encontramos entre risas. Ese día fue el primero de nuestra vida. Gracias por ser el mejor compañero que se puede tener. Mi complemento. Mi guía. Mi incondicional.

Y por último, esto te lo dedico a ti mi preciosa Emma, siendo solo una personita y estás tan llena de vida. Cada día nos descubres un nuevo mundo y me encanta estar en él. Disfruto de tu risa como si fuera un sonido desconocido hasta el momento. No lo cambiaría por nada. Iluminas mi vida. Y gracias eternamente por concederme el tiempo que necesitaba para concluir este proyecto, sin ti no hubiese sido posible.

“La historia de la EM, como la propia historia de la medicina, revela muchas dudas, errores y frustraciones. Su riqueza, sin embargo, destaca por el genio de algunos y por la capacidad de observación científica de otros, pero, fundamentalmente, por el ímpetu de trabajo de muchos para disminuir el sufrimiento del prójimo”.

M.A. Moreira, 2002

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	33
1.1	HISTORIA DE LA ENFERMEDAD	33
1.2	EPIDEMIOLOGÍA	35
1.2.1	<i>Incidencia</i>	35
1.2.2	<i>Geografía y migración.</i>	36
1.2.3	<i>Factores genéticos</i>	38
1.2.4	<i>Factores ambientales</i>	39
1.2.4.1	La teoría de la higiene	39
1.2.4.2	La infección por el virus Epstein-Barr	40
1.2.4.3	La microbiota intestinal	43
1.3	ETIOPATOGENIA	43
1.4	ANATOMÍA PATOLÓGICA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	48
1.5	MANIFESTACIONES CLÍNICAS	50
1.6	FORMAS CLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	54
1.7	DIAGNÓSTICO: CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	62
1.8	PRUEBAS COMPLEMENTARIAS DE EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA	67
1.8.1	<i>Resonancia magnética</i>	67
1.8.2	<i>Biomarcadores.</i>	68
1.8.2.1	Líquido cefalorraquídeo (LCR)	68
1.8.2.2	Neurofilamentos de cadena ligera (NfL)	70
1.8.2.3	Chitinasa-3-like-1 (CHI3L1)	70
1.9	TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	71
1.9.1	<i>Fármacos de eficacia de categoría 1</i>	72
1.9.1.1	Interferones	72
1.9.1.2	Acetato de glatirámero	73
1.9.1.3	Teriflunomida	74
1.9.1.4	Dimetil fumarato	74
1.9.2	<i>Fármacos de eficacia de categoría 2</i>	75
1.9.2.1	Moduladores del receptor de la esfingosina 1-fosfato	75
1.9.2.2	Cladribina	76
1.9.3	<i>Fármacos de eficacia de categoría 3</i>	78
1.9.3.1	Natalizumab	78
1.9.3.2	Alemtuzumab	79
1.9.3.3	Anticuerpos monoclonales con efecto anti-CD20	80
2	MARCO TEÓRICO	85
2.1	GENERALIDADES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	87
2.1.1	<i>Función metabólica de la microbiota intestinal.</i>	89
2.1.2	<i>Función inmunológica de la microbiota intestinal.</i>	89
2.1.2.1	Función de barrera intestinal	89
2.1.2.2	Modulación del sistema inmune.	90
2.1.3	<i>Función eje-cerebro-intestino.</i>	92
2.2	LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL MODELO ANIMAL DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	93
2.3	LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	100
2.3.1	<i>Los helmintos y su influencia en la esclerosis múltiple</i>	100
2.3.1.1	El papel de los helmintos en la inmunidad	100
2.3.1.2	Helmintos en el modelo animal (EAE)	101

2.3.1.3	Estudios experimentales con infección por helmintos en pacientes con EM	102
2.4	ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE	106
2.5	ENSAYOS CLÍNICOS INTERVENCIONISTAS CON TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS	120
2.5.1	<i>Ensayos clínicos con Vitamina D</i>	120
2.5.2	<i>Ensayos clínicos con probióticos</i>	123
3	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	135
3.1	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	137
3.2	OBJETIVOS	139
3.3	HIPÓTESIS	139
4	MATERIAL Y MÉTODO	141
4.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	143
4.2	POBLACIÓN DEL ESTUDIO	143
4.2.1	<i>Selección de la muestra</i>	143
4.2.1.1	Criterios de inclusión	144
4.2.1.2	Criterios de exclusión	144
4.2.1.3	Grupo control	145
4.2.1.4	Tamaño muestral	145
4.3	ASPECTOS ÉTICOS	146
4.4	CRONOGRAMA	146
4.4.1	<i>Fase de inclusión de los participantes</i>	146
4.4.2	<i>Fase de recogida de las muestras</i>	147
4.4.3	<i>Fase de seguimiento longitudinal de los pacientes</i>	148
4.4.4	<i>Fase de análisis del estudio</i>	148
4.4.5	<i>Fase de evaluación de resultados</i>	148
4.5	VARIABLES RECOGIDAS EN EL ESTUDIO	149
4.5.1	<i>Variables demográficas:</i>	149
4.5.2	<i>Variables clínicas relacionadas con la EM:</i>	149
4.5.3	<i>Variables clínicas no relacionadas con la esclerosis múltiple:</i>	150
4.5.4	<i>Variables relacionadas con la microbiota intestinal:</i>	150
4.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	150
4.7	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	151
4.7.1	<i>Procesamiento de la muestra para el estudio de la microbiota intestinal</i>	151
4.7.1.1	El ADN y ARN bacteriano	151
4.7.1.2	Extracción del ADN bacteriano de las muestras de heces	152
4.7.1.3	Amplificación y secuenciación del ADN bacteriano	154
4.7.2	<i>Análisis bioinformático de las secuencias de amplicones del gen bacteriano ADNr 16S y análisis taxonómico</i>	158
4.8	ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	161
4.8.1	<i>Estudio de la diversidad y riqueza de la microbiota intestinal</i>	161
4.8.1.1	Curvas de rarefacción	162
4.8.1.2	Diversidad alfa	162
4.8.1.3	Estudio de la diversidad beta	164
4.8.2	<i>Análisis Principal de Componentes</i>	165
4.8.3	<i>Evaluación de la microbiota intestinal como marcador diagnóstico</i>	166
4.8.3.1	Curvas ROC y área bajo la curva	166
4.8.3.2	Índice de Youden	169

5	RESULTADOS	171
5.1	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO	173
5.1.1	<i>Selección de la muestra</i>	173
5.1.2	<i>Características del grupo de pacientes de esclerosis múltiple</i>	175
5.1.3	<i>Características del grupo de controles sanos.</i>	179
5.2	PRIMERA PARTE: ESTUDIO DE CASOS-CONTROLES SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE	180
5.2.1	<i>Estudio de la diversidad ecológica de la microbiota intestinal</i>	180
5.2.1.1	Número de OTUs	180
5.2.1.2	Curvas de rarefacción	182
5.2.1.3	Diversidad alfa	184
5.2.1.4	Diversidad beta	188
5.2.2	<i>Análisis Principal de Componentes</i>	189
5.2.3	<i>Clasificación taxonómica de las muestras de microbiota intestinal</i>	191
5.2.4	<i>Descripción cuantitativa de la microbiota en pacientes con EM</i>	194
5.2.5	<i>Descripción cuantitativa de la microbiota en el grupo control</i>	200
5.2.6	<i>Diferencias en la composición entre el grupo de pacientes con EM y el grupo control. Comparación con test estadísticos para cada nivel taxonómico en ambos grupos.</i>	205
5.2.6.1	Diferencias a nivel de filum entre muestras de pacientes y controles	205
5.2.6.2	Diferencias a nivel de familia entre muestras de pacientes y controles	206
5.2.6.3	Diferencias a nivel de género entre muestras de pacientes y controles	209
5.3	SEGUNDA PARTE: LA MICROBIOTA INTESTINAL COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	214
5.3.1	<i>Curvas ROC y el área bajo la curva</i>	214
5.3.1.1	Género <i>Roseburia</i>	215
5.3.1.2	Género <i>Ekaziella</i>	216
5.3.1.3	Género <i>Ruminococcus</i>	217
5.3.1.4	Género <i>Lachnospira</i>	218
5.3.1.5	Género <i>Bilophila</i>	219
6	DISCUSIÓN	221
6.1	LA ALTERACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	223
6.2.	LA MICROBIOTA INTESTINAL COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO DE LA EM	231
7	CONCLUSIONES	235
8	LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	239
8.1	LIMITACIONES	241
8.2	LÍNEAS DE FUTURO	242
9	BIBLIOGRAFÍA	243
10	ANEXOS	265
	ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN DEL ESTUDIO	267
	ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO	269
	ANEXO 3. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA	271
	ANEXO 4. CUESTIONARIO DE DIETA Y ESTILO DE VIDA	273
	ANEXO 5. MODELO NEUROSTATUS (ESCALA EDSS)	281
	ANEXO 6. MEDIDAS CENTRALES DE CADA GÉNERO DEL GRUPO DE PACIENTES	297
	ANEXO 7. MEDIDAS CENTRALES DE CADA GÉNERO DEL GRUPO CONTROL	303
	ANEXO 8. COEFICIENTE DE INCREMENTO DE FRECUENCIAS ENTRE GRUPOS	309

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosomal
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BHE	Barrera hematoencefálica
BOC	Bandas oligoclonales
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , antígenos de diferenciación
CD4+	Linfocitos T <i>helpers</i> o colaboradores
CD8+	Linfocitos citotóxicos
CDI	Índice de enfermedad acumulativo
CIS	Síndrome clínico aislado
CPA	Célula presentadora de antígeno
DMT	Tratamientos modificadores de la enfermedad
EBNA	Antígenos nucleares del virus Epstein-Barr
EAE	Encefalomiелitis alérgica experimental
EDSS	Escala expandida del estado de discapacidad
EM	Esclerosis múltiple
EMCD	Esclerosis múltiple clínicamente definida
EmPCR	Reacción en cadena de la polimerasa basada en emulsión
EMPP	Esclerosis múltiple primaria progresiva
EMPR	Esclerosis múltiple progresiva recidivante
EMRR	Esclerosis múltiple recurrente remitente
EMSP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
Gd	Gadolinio
GEL	Lesiones con captación de gadolinio
GF	Germ-free rodents

Gr1	Marcador fenotípico de granulocitos en ratones
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HR	<i>Hazard ratio</i>
HTLV	Virus linfotrópico T humano
IC	Intervalo de confianza
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN- γ	Interferón gamma
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
IQR	Rango intercuartílico
JC	Virus <i>John Cunningham</i>
LCR	Líquido ceforraquídeo
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LFA-1	Antígeno-1 asociado a la función de los linfocitos
LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
MBP	Proteína básica de mielina
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MOG	Glicoproteína de la mielina del oligodendrocito
MSFC	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEDA	No evidencia de actividad de la enfermedad
NF κ B	Factor nuclear kappa beta
NfL	Cadena ligera de neurofilamento
NK	Natural killer
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nrf2	<i>Factor erythroid-derived 2</i>
OCT	Tomografía de coherencia óptica
pb	par de bases de nucleótidos

PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIRA	Progresión de la discapacidad independiente de brotes
PLP	Proteína proteolipídica
PPAR	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
RAG	Genes activadores de recombinación
RIS	Síndrome radiológico aislado
RNFL	Capa de fibras nerviosas de la retina
RM	Resonancia magnética
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
S1P	Esfingosina 1-fosfato
SELs	Lesiones lentamente expansivas
SNC	Sistema nervioso central
SFB	<i>Segmented filamentous bacteria</i>
SPF	<i>Specific-pathogen-free</i>
TAB	Tasa anualizada de brotes
TCR	Receptor del linfocito T
TCR $\gamma\delta^+$	Linfocitos T con TCR de cadena gamma y delta
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocito T <i>helper</i>
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
VEB	Virus <i>Epstein-Barr</i>
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLA-4	Integrina $\alpha 4\beta 1$

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la prevalencia de EM a nivel mundial	37
Figura 2. Distribución de la prevalencia de EM en Europa	37
Figura 3. Cronograma de la investigación sobre VEB y EM	41
Figura 4. El modelo topográfico de la esclerosis múltiple de Krieger	57
Figura 5. El modelo topográfico de las formas clínicas de la esclerosis múltiple de Krieger	57
Figura 6. El curso de la esclerosis múltiple en dos fases (inflamatoria y neurodegenerativa)	59
Figura 7. Clasificación de las formas clínicas de la esclerosis múltiple de Lublin	61
Figura 8. Cronología de la aprobación de los fármacos con indicación para pacientes con EM	71
Figura 9. Factores que influyen en la elección del tratamiento de la EM	72
Figura 10. Vías metabólicas para la formación de ácidos grasos de cadena corta	90
Figura 11. Relación entre la microbiota intestinal y la respuesta inmune del individuo	92
Figura 12. Representación del eje microbiota-intestino-cerebro	93
Figura 13. Inducción y evaluación de la encefalitis autoinmune experimental	94
Figura 14. Estudio del efecto inhibidor de la administración de antibióticos sobre la EAE	99
Figura 15. La estructura del ribosoma bacteriano	152
Figura 16. Magna-Pure-LC2 ROCHE para la extracción de ADN bacteriano	152
Figura 17. Flujo de trabajo de amplicones 16S V3 y V4	155
Figura 18. Proceso de ADN polimerasa con uso de cebadores	157
Figura 19. Registro de dieta habitual en el grupo de pacientes con EM	174
Figura 20. Registro de dieta habitual en el grupo de controles sanos	174
Figura 21. Representación KRONA de la microbiota de un paciente con EMRR no activa	192
Figura 22. Representación KRONA de la microbiota de un paciente con EMRR activa	193

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución de la edad de inicio de la esclerosis múltiple	36
Gráfico 2. Relación entre estado de infección por virus Epstein-Barr y esclerosis múltiple	41
Gráfico 3. Diagramas de cajas de los niveles de NfL en pacientes con EM	42
Gráfico 4. Distribución de los tipos de placas desmielinizantes durante la evolución de la EM	48
Gráfico 5. Grados de discapacidad a lo largo de la evolución determinada por dos fases	60
Gráfico 6. Tiempo medio que transcurre desde el SCA hasta el diagnóstico de EM	66
Gráfico 7. Algoritmo terapéutico propuesto para la elección individualizada del tratamiento de la EM	84
Gráfico 8. Diferencias en el pronóstico según el periodo de tiempo en el que se realiza el diagnóstico	84
Gráfico 9. Composición de la microbiota intestinal en el adulto sano	88
Gráfico 10. EAE inducida en ratones Germ free y colonizados por SPB	96
Gráfico 11. Desarrollo de la EAE en ratones germ free y SPF	98
Gráfico 12. Estudio de Schistosoma mansoni sobre la EAE	101
Gráfico 13. Diferencias clínicorradiológicas en pacientes con EM e infección por helmintos	103
Gráfico 14. Estudio HINT de administración de Trichura suis ova (TSO) en pacientes con EM	104
Gráfico 15. Incidencia de EM en las Islas Feroe	107
Gráfico 16. Composición de la microbiota intestinal entre pacientes y controles del estudio de Miyake	109
Gráfico 17. Géneros bacterianos más significativos de la microbiota intestinal en pacientes pediátricos	111
Gráfico 18. Relación entre brotes clínicos y la ausencia de Fusobacteria en población pediátrica	112
Gráfico 19. Diferencias en la composición de la microbiota entre pacientes con EM y sujetos sanos	113
Gráfico 20. Análisis Principal de Componentes Principal en pacientes EM (activa, no activa) y controles	115
Gráfico 21. Comparación de abundancias relativas de especies bacterianas entre pacientes y controles	116
Gráfico 22. Abundancias relativas de algunos géneros bacterianos entre los grupos EM y control	117
Gráfico 23. Estudio sobre el trasplante de microbiota intestinal de pacientes con EM a ratones	118
Gráfico 24. Trasplante de microbiota procedente de gemelos (EM/sano) a ratones GF	119
Gráfico 25. Producción de citoquinas antiinflamatorias en estudio de trasplante fecal	120
Gráfico 26. Abundancias relativas de géneros bacterianos en pacientes tratados con vitamina D	122
Gráfico 27. Estudio de diversidad alfa en muestras de pacientes tras recibir probióticos	125
Gráfico 28. Estudio de la diversidad beta en muestras de pacientes que recibieron probióticos	126
Gráfico 29. Impacto del tratamiento con probióticos en algunos géneros bacterianos de pacientes con EM	127
Gráfico 30. Efectos del mix de probiótico sobre los linfocitos Treg y la producción de IL-10	128
Gráfico 31. Abundancias relativas de algunos géneros bacterianos en formas progresivas de EM	129
Gráfico 32. Correlación entre la abundancia de F. plautii con los niveles de marcadores de inflamación	130
Gráfico 33. Estudio del metaboloma en la microbiota intestinal de pacientes con EM	131
Gráfico 34. Estudio del viroma en la microbiota intestinal en pacientes con EM activa	132
Gráfico 35. Rendimiento del ensayo Qubit dsDNA HS	153
Gráfico 36. Curva ROC para el estudio de marcadores diagnósticos	167
Gráfico 37. Curvas de rarefacción de las muestras de todos los sujetos a nivel filum	182
Gráfico 38. Curvas de rarefacción de las muestras de todos los sujetos a nivel género	183
Gráfico 39. Curvas de rarefacción de las muestras de todos los sujetos a nivel familia	183
Gráfico 40. Distribución Boxplot con la comparación medias del índice de Shannon a nivel filum y familia	184
Gráfico 41. Distribución Boxplot con la comparación medias del índice de Shannon a nivel género	185
Gráfico 42. Distribución Boxplot con la comparación medias del índice de Simpson a nivel de filum y familia	186

Gráfico 43. Distribución Boxplot con la comparación medias del índice de Simpson a nivel género	187
Gráfico 44. Distribución Boxplot con la comparación medias del índice de Jaccard a nivel de familia y género	188
Gráfico 45. Distribución Boxplot con la comparación medias de Sorensen a nivel de familia y género	189
Gráfico 46. Análisis Principal de Componentes a nivel de familia	190
Gráfico 47. Análisis Principal de Componentes a nivel de filum	190
Gráfico 48. Análisis Principal de Componentes a nivel de género	191
Gráfico 49. Representación de los filums más abundantes en el grupo de pacientes	194
Gráfico 50. Representación de las familias más abundantes en el grupo de pacientes	195
Gráfico 51. Representación de los géneros más abundantes en el grupo de pacientes	198
Gráfico 52. Representación de los filums más abundantes en el grupo control	200
Gráfico 53. Representación de las familias más abundantes en el grupo control	201
Gráfico 54. Representación de los géneros más abundantes en el grupo control	203
Gráfico 55. Filums que se encuentran en diferente proporción en ambos grupos	205
Gráfico 56. Familias que se encuentran en diferente proporción en ambos grupos	207
Gráfico 57. Géneros que se encuentran en diferente proporción en ambos grupos	209
Gráfico 58. Curva ROC del género Roseburia	215
Gráfico 59. Curva ROC del género Ekaziella	216
Gráfico 60. Curva ROC del género Ruminococcus	217
Gráfico 61. Curva ROC del género Lachnospira	218
Gráfico 62. Curva ROC del género Bilophila	219

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Score clínico de la severidad de la EAE	95
Tabla 2. Marcadores biológicos y escalas de síntomas asociados en EM tras tratamiento con probióticos	124
Tabla 3. Características del grupo de pacientes con EM (parte I)	178
Tabla 4. Características clínico-radiológicas de los pacientes con EM (parte II)	179
Tabla 5. Comparación de datos demográficos y medidas antropométricas entre ambos grupos	180
Tabla 6. Cuantificación de las diferentes OTUs registradas en el grupo de pacientes	180
Tabla 7. Cuantificación de las diferentes OTUs registradas en el grupo control	181
Tabla 8. Comparación de medias del índice de Shannon con test no paramétricos a nivel filum	185
Tabla 9. Comparación de medias del índice de Shannon con test no paramétricos a nivel familia	185
Tabla 10. Comparación de medias del índice de Shannon con test no paramétricos a nivel género	185
Tabla 11. Comparación de medias del índice de Simpson con test no paramétricos a nivel filum	187
Tabla 12. Comparación de medias del índice de Simpson con test no paramétricos a nivel familia	187
Tabla 13. Comparación de medias del índice de Simpson con test no paramétricos a nivel género	187
Tabla 14. Medidas centrales de los filums detectados en el grupo de pacientes	195
Tabla 15. Medidas centrales de las familias detectadas en el grupo de pacientes	196
Tabla 16. Medidas centrales de los géneros detectados en el grupo de pacientes	198
Tabla 17. Medidas centrales de cada filum detectado en la microbiota del grupo control	200
Tabla 18. Medidas centrales de cada familia detectada en la microbiota del grupo control	201
Tabla 19. Medidas centrales de los géneros más abundantes de la microbiota del grupo control	204
Tabla 20. Medianas de los filums que se encuentran en diferente proporción entre ambos grupos	206
Tabla 21. Comparación de medianas de filums detectados en ambos grupos	206
Tabla 22. Medianas y rangos intercuartílicos de las familias entre pacientes y controles	207
Tabla 23. Comparación de medianas de las familias de ambos grupos con test no paramétricos	208
Tabla 24. Análisis comparativo de las medias de las familias bacterianas entre pacientes y controles	208
Tabla 25. Medianas y rangos intercuartílicos de los géneros en ambos grupos	210
Tabla 26. Comparación de medianas de las familias de ambos grupos	210
Tabla 27. Análisis comparativo de las medias de los géneros bacterianos entre pacientes y controles	211
Tabla 28. Odds ratio de las diferencias a nivel de familia entre pacientes y controles	213
Tabla 29. Odds ratio de las diferencias a nivel de género entre pacientes y controles	213
Tabla 30. Área bajo la curva del género Roseburia	216
Tabla 31. Área bajo la curva del género Ezakiella	217
Tabla 32. Área bajo la curva del género Ruminococcus	218
Tabla 33. Área bajo la curva del género Lachnospira	218
Tabla 34. Área bajo la curva del género Bilophila	219
Tabla 35. Resumen de la correlación entre géneros bacterianos y la presencia o ausencia de EM	220
Tabla 36. Medidas centrales de cada genero de los pacientes (continuación)	297
Tabla 37. Medidas centrales de cada genero de los controles (continuación)	303
Tabla 38. Coeficiente de incremento de frecuencia del nivel de familia entre pacientes y controles (cont.)	309
Tabla 39. Coeficiente de incremento de frecuencia del nivel de género entre pacientes y controles (cont.)	311

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Criterios diagnósticos de Poser</i>	63
<i>Cuadro 2. Criterios de Barkhof para la diseminación en el espacio</i>	64
<i>Cuadro 3. Criterios diagnósticos de McDonald 2017 para esclerosis múltiple</i>	65
<i>Cuadro 4. Resumen de los hallazgos publicados en microbiota intestinal de pacientes con EM</i>	133-134
<i>Cuadro 5. Primers empleados en la amplificación de fragmentos de ADN_r</i>	154

I - INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple

1.1 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

La esclerosis múltiple (en adelante, EM) es una enfermedad crónica, de naturaleza autoinmune desmielinizante y neurodegenerativa que afecta al sistema nervioso central (SNC)¹.

La historia de la EM² comienza a mediados del siglo XIX con Sir Robert Carswell (1793–1857). Era un médico escocés que trabajó para el Museo londinense University College, mostrando fotografías de material de autopsias en las que se podía observar ilustraciones de cerebros que contenían placas inexplicables (1831). Poco después, publicó estos casos en forma de atlas en el año 1838 llamado *Pathological Anatomy; Illustrations of the Elementary Forms of Disease*³. Su coetáneo, Jean Cruveilhier (1791-1874) durante su trabajo como profesor de anatomía patológica en la Facultad de Medicina de la Universidad de París, también observó algunas placas marrones en el SNC en algunas de las autopsias que realizaba de rutina, publicando posteriormente un atlas entre 1835-1842 llamado *Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible*⁴. Fue el primero que describió un caso de EM en la literatura (con material necrópsico) y que denominó paraplejía a la afectación de la médula. No fue hasta Friedrich Theodor von Frerichs, en Alemania, quien primero correlacionó las lesiones patológicas descritas con hallazgos clínicos en el año 1849. También fue el primero en describir sus peculiaridades, que era una enfermedad que afectaba más a jóvenes y que en ocasiones se presentaba en forma de recurrencias, como así publicó en el año 1856 su pupilo Valentiner dos casos con episodios y remisiones y con presencia de síntomas cognitivos, síntomas a los que actualmente se le otorga gran importancia.

En cuanto a los primeros hallazgos sobre la fisiopatología, Carl Rokitansky describió en el año 1857 que las placas se componían de una proliferación de tejido conectivo y que eran capaces de producir paraparesia progresiva. Es conocida la disposición perivascular (perivenular) de estas placas y ya en el año 1863 Eduard Rindfleisch fue el primero en incidir sobre este hecho. Un año más tarde, Fromann describió la naturaleza desmielinizante y la presencia de astrocitosis⁵.

No obstante, las primeras correlaciones clínico-anatómicas específicas de la esclerosis múltiple se siguen atribuyendo a Jean-Martin Charcot (1825-1893), célebre neurólogo que describió otras entidades que llevan su epónimo. Descubrió que uno de sus empleados que presentaba nistagmo, temblor y ataxia (tríada de Charcot) no sufría tabes dorsalis espasmódica, como él mismo le había diagnosticado años antes, sino que descubrió la presencia de placas en el estudio necropsico. Fue quien insistió en que se trataba de una entidad clínico-anatómica diferente, que se presentaba con agudizaciones y remisiones, con lesiones diseminadas en el tiempo y espacio, que afectaban a la mielina de predominantemente la región periventricular, el nervio óptico y la médula espinal. En el año 1868 publicó un manuscrito donde describió esta una nueva enfermedad previamente confundida con parálisis⁶. Sin embargo, el término de “sclérose en plaques disséminée” se empleó por primera vez por uno de sus colaboradores, Edmé Félix Alfred Vulpian en el año 1866⁷. Con respecto a los subtipos de la EM, fue en el año 1906 cuando Otto Marburg describió por primera vez un caso de EM fulminante, que lleva su epónimo, además de identificar la presencia de degeneración axonal aguda y atrofia de fibras nerviosas⁸. Asimismo, observó un probable caso de esclerosis concéntrica, que más tarde, Balo en el año 1928 denominaría encefalitis periaxial concéntrica⁹, que hoy en día nombramos con su epónimo. James Dawson (1870-1927) recogió toda la información clínico-patológica que había hasta el momento y la publicó en el año 1916, realizando diversas descripciones anatomopatológicas como la ausencia de mielina en las lesiones en placas más antiguas, al contrario de las lesiones agudas, en las que se podía observar una infiltración linfocitaria en los vasos sanguíneos con signos de desmielinización aguda¹⁰.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

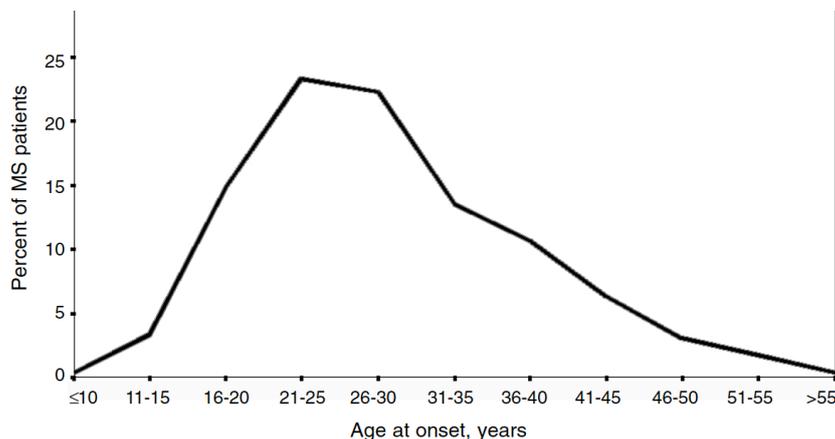
1.2.1 Incidencia

La EM suele afectar a adultos jóvenes cuya edad de presentación tiene un pico de incidencia máxima que se encuentra entre los 25 y 35 años de edad. Es excepcional su aparición por encima de los 50 años y por debajo de los 10 años¹¹. Dado que es una enfermedad neurodegenerativa, los pacientes adquieren una discapacidad progresiva a lo largo de la evolución, suponiendo la primera causa de discapacidad en adultos jóvenes después de los accidentes de tráfico. La EM afecta más a mujeres que a hombres con una proporción 3:1¹². En un estudio realizado en un área de salud próxima, en Alicante, se estimó que la proporción mujer:hombre afectados por la EM era de 3,5:1¹³. En las diferencias entre ambos sexos influyen factores hormonales. Esta hipótesis se basa en la observación del decremento de la tasa de brotes durante el embarazo (relacionado por la inmunodepresión que se experimenta sobre todo en el primer trimestre) para luego aumentar en el periodo postparto. Además, existe una mayor incidencia de la enfermedad en jóvenes (20-40 años)¹⁴ que es la edad reproductiva de la mujer, y desciende notablemente a partir de la menopausia (al igual que la tasa de brotes). Sin embargo, se comporta de forma simétrica en el momento en que los pacientes comienzan la fase de progresión de la discapacidad, que ocurre antes en hombres y que en mujeres suele aparecer alrededor de la menopausia¹⁵.

Se cree que la incidencia de la enfermedad está aumentando y que el aumento de casos no solo es debido a la mejora de los criterios de diagnóstico, que cada vez es más precoz. Además, se estima que la incidencia está aumentando más entre las mujeres, por lo que la diferencia en la proporción entre mujeres y hombres se hace aún más notable. Esta tendencia se ha relacionado con el aumento de la edad materna en la primera gestación, una menor tasa de embarazos por mujer y un aumento de otros factores ambientales como el aumento de la exposición al tabaco¹⁶. La prevalencia global a nivel mundial de la EM según un informe de la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple era de 30 a 33 casos por 100.000 habitantes en el año 2013¹⁷. Se estima que se ha incrementado notablemente el número de personas afectadas por EM (2,8 millones en todo el mundo), un 30% más que la estimación del año 2013. La prevalencia estimada a nivel mundial ha

sido del 35,9 casos por cada 100.000 habitantes en el año 2020¹⁸. Entre las zonas geográficas con incidencias más altas se encuentran los países europeos (108 cada

Gráfico 1. Distribución de la edad de inicio de la esclerosis múltiple



En el eje de abscisas se representa los periodos de edad en años. En el eje de ordenadas la proporción de pacientes que iniciaron la EM en una determinada edad (de Ligouri, M. Neurol. Sci. 2020).

100.000 habitantes; mayor cuanto más al norte)¹⁹ y América del Norte (140 cada 100.000 habitantes)²⁰. Las incidencias más bajas se sitúan en África subsahariana (2.1 cada 100.000 habitantes) y el este de Asia (2.2 cada 100.000 habitantes)²¹.

1.2.2 Geografía y migración.

En la EM existen algunos factores característicos que influyen en la incidencia de la enfermedad. Existe una clara distribución geográfica, con una incidencia alta en países occidentalizados que es mayor conforme aumenta la distancia al ecuador. Específicamente, la mayor incidencia ocurre entre los 40-60º de latitud norte en el hemisferio Norte²². Se cree que influye el nivel de exposición solar (relación inversa entre el número de horas de exposición solar con la prevalencia de la EM) y los niveles de vitamina D3 (colecalfiferol) que suelen estar disminuidos en pacientes con EM. La vitamina D3 se obtiene por la acción de los rayos solares (radiación ultravioleta B) sobre el 7-dehidrocolesterol localizado en la piel y en una menor proporción, a través de la ingesta de alimentos que contengan colecalfiferol. Más tarde, es hidrolizada en el hígado formándose el 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol) y posteriormente en el riñón creando el 1-25 dihidroxicolecalciferol (calcitriol) que es la forma activa²³. Se cree que presenta un efecto inmunomodulador en el sistema

inmune en pacientes con EM²⁴. Otros factores se engloban en el estilo de vida de estos países con predominancia del sedentarismo, el tabaquismo²⁵, el índice de masa corporal (obesidad) en la infancia o en la adolescencia, y la dieta con alta ingesta calórica, rica en azúcares refinados y ácidos grasos de origen animal²⁶.

Figura 1. Distribución de la prevalencia de EM a nivel mundial

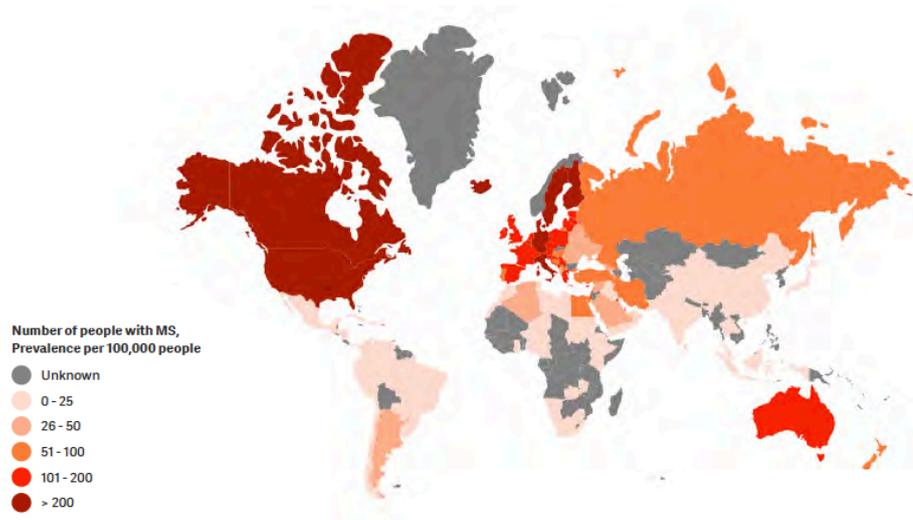
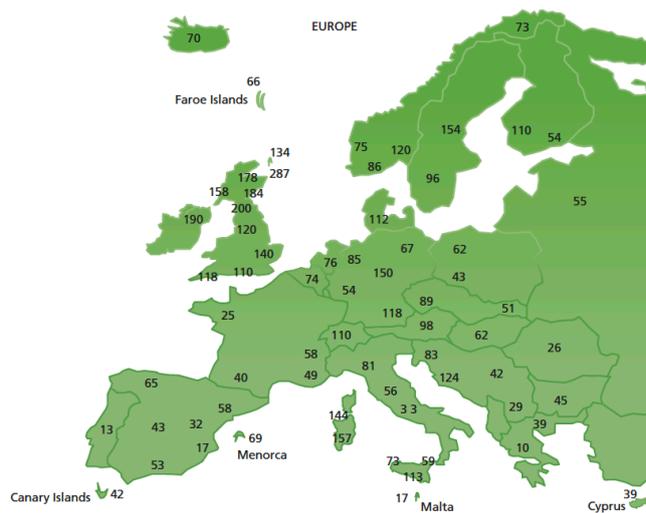


Figura 2. Distribución de la prevalencia de EM en Europa



Distribución de la prevalencia de la EM en Europa (nº casos/100.000 habitantes)

Además de tener en cuenta la influencia del área geográfica y el estilo de vida predominante, por ejemplo en los países occidentalizados, hay que tener en cuenta otra variable que está condicionando diferencias en la incidencia determinada por los anteriores factores ambientales: la inmigración. Muchos de los países de alta incidencia fueron aquellos que recibieron más población de grupos ancestrales originarios en el norte de Europa (Escandinavia) como los vikingos, como ocurre entre poblaciones como los habitantes de las islas Canarias, los palestinos de Kuwait, los sardes y los parsis de la India²⁷. En contraposición, grupos étnicos como los africanos y los asiáticos presentan una baja prevalencia de la enfermedad, además de una diferente presentación clínica con predominio de formas óptico-espinales^{28,29}.

Por otro lado, se ha observado que las personas que emigran desde un país de alta incidencia a otro de baja de incidencia antes de los 15 años adquieren un bajo riesgo de desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, por encima de esta edad, el riesgo no se ve influido por las diferencias en la incidencia entre el país de origen y el nuevo país de residencia³⁰.

1.2.3 Factores genéticos

Como hemos indicado anteriormente, existe una clara influencia genética en los estudios intrafamiliares. Existe un mayor riesgo de desarrollar EM entre hermanos, siendo superior al riesgo entre familiares como hijos, tíos o primos. Se ha encontrado una correlación entre gemelos monocigóticos del 20-30%. Sin embargo, entre gemelos dicigóticos se mantiene la misma prevalencia que entre hermanos 2-5%. Con respecto al estudio de genes relacionados con la EM se ha determinado una relación con los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MCH) tipo II en el que los alelos DRB1*15:01, y DQB1*03:01-DQB1*03:02 se relacionan con mayor fuerza. Con respecto al primer alelo del MCH, el DRB1*15:01, existe una correlación positiva con un riesgo de desarrollar EM representado con una odds ratio (OD) de 3 en pacientes en homocigosis para este alelo³¹. Este alelo se ha relacionado con la edad de inicio, la severidad de la enfermedad y la presencia de mayor volumen de sustancia blanca afectada y mayor atrofia cerebral³². Sin embargo, el alelo HLA-B*44:02 se ha mostrado como factor protector para EM correlacionándose con un menor volumen de lesiones de

sustancia blanca³³. Por otro lado, se han identificado más de 100 polimorfismos fuera del MHC que están relacionados con la aparición de EM, indicando la influencia de herencia poligénica³⁴.

1.2.4 Factores ambientales

1.2.4.1 La teoría de la higiene

Desde hace varias décadas ha surgido con fuerza la relación entre las enfermedades autoinmunes, entre las que se encuentra la EM, y la teoría de la higiene (Strachan, 1989)³⁵ en relación a infecciones adquiridas en la infancia, que recientemente se ha reformulado como la hipótesis de los “viejos amigos” (Rook, 2003)³⁶. Esta teoría se desarrolló ante la evidencia del aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas inflamatorias como las alergias y las enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal en los países desarrollados a partir del siglo XIX y que no solo es debida a la mejora en los métodos diagnósticos³⁷.

La hipótesis de los “viejos amigos” se basa en la presencia de microorganismos que han coevolucionado junto con los mamíferos a lo largo de su historia. Este hecho ha condicionado la necesidad de que dichos microorganismos sean tolerados por el huésped, por lo que han tenido un papel fundamental en la inducción de mecanismos de inmunorregulación. Abdel Omran describió por primera vez en 1971 la Transición Epidemiológica³⁸. En su trabajo indicaba que la Primera Transición Epidemiológica aconteció hace ya más de 10.000 años (Neolítico) y consistió en la transición a la agricultura y la ganadería. Este hecho condujo al estrecho contacto entre los seres humanos con diferentes microorganismos entre los que destacan los que conforman la microbiota residente en la piel, el aparato respiratorio, el intestino, etc., los que originan las infecciones crónicas adquiridas en la infancia, los microorganismos ambientales que se encuentran en los animales, el suelo o el agua no potable, y por último, los parásitos (helminthos) que persisten a lo largo de la vida en el huésped humano y que si no se modulara la respuesta inmune contra ellos podrían producir patología.

A finales del siglo XIX aconteció la Segunda Transición Epidemiológica, que consistió en el inicio del saneamiento de las ciudades con el empleo de agua clorada

que produjo la disminución de contacto con microorganismos y restos fecales que existían en las ciudades por una deficiente higienización¹⁷⁻³⁹. La primera vez que el aumento de prevalencia de la esclerosis múltiple se relacionó con el nivel de saneamiento de un país desarrollado fue en el año 1966 en el estado de Israel⁴⁰.

Se cree que existe una correlación inversa entre la exposición temprana a microorganismos infecciosos y el riesgo de desarrollar EM a lo largo de la vida. Se trata de la influencia de la mejora en la higiene en la infancia que promueve una modulación de la respuesta inmune adquirida hacia el tipo Th1 que es pro-inflamatoria al tener una menor exposición a microorganismos. Al contrario, si este contacto ocurriese en la infancia temprana la respuesta inmune viraría hacia la promoción de linfocitos T reguladores⁴¹.

1.2.4.2 *La infección por el virus Epstein-Barr*

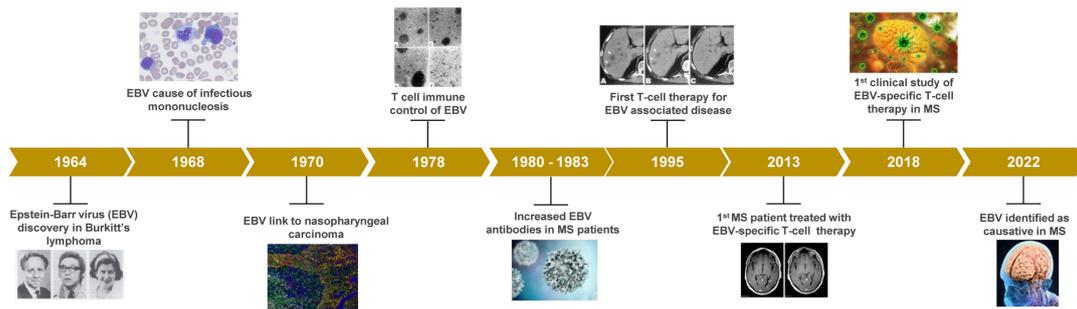
De entre los factores infecciosos que se han estudiado hay uno que marca la diferencia. Se trata de la adquisición de la infección por virus Epstein-Barr (VEB) y/o el desarrollo de mononucleosis infecciosa en edad tardía (la adolescencia o adultos jóvenes). Entre los pacientes con EM se estima una seroprevalencia para el virus Epstein-Barr de casi el 100%, mientras que para la población sana sería del 90-95% y en niños menor del 85%⁴².

Además, al igual que ocurre con la incidencia de la EM que determina un gradiente geográfico según la latitud, se ha estimado una mayor prevalencia de infección por VEB en la infancia en la zona sur de países como EEUU en comparación con la zona norte en relación con un menor nivel socio-sanitario y peores medidas de higiene^{43,44}. Sin embargo, existe un riesgo 2-3 veces superior para desarrollar EM en pacientes que han sufrido la mononucleosis infecciosa⁴⁵. Existe pues una paradoja con la teoría de la higiene que precisamente habla sobre el aumento del riesgo de desarrollar EM cuando no se tiene exposición a microorganismos infecciosos por un aumento en la higiene de la población. Sin embargo, según las investigaciones relacionadas con el VEB y la mononucleosis infecciosa, es precisamente esta población la que adquiere más riesgo de desarrollar la EM⁴⁶.

Se realizó un estudio con una cohorte de más de 10 millones de militares de EEUU de la que se disponía muestras de sangre extraídas en el momento de su incorporación y periódicamente a lo largo de unos 20 años. De entre los 801 sujetos

que desarrollaron EM, solo 1 paciente era seronegativo para VEB. Salvo este sujeto, los restantes 32 que eran seronegativos en el momento basal del estudio, presentaron seroconversión de VEB antes del debut de la EM.

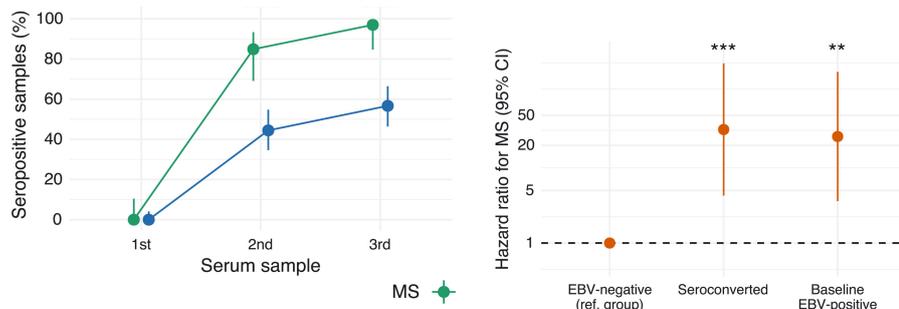
Figura3. Cronograma de la investigación de la relación entre VEB y la EM.



Cronograma de los principales avances en la investigación sobre la relación entre VEB y la EM: desde el descubrimiento del VEB hasta su implicación en el origen de varias enfermedades (linfoma, EM, etc) (procedente de: Smith, C. and Khanna, R. Clin. Transl. Immunol. 2023)

Se determinó pues, un riesgo relativo de 26,5 veces superior de desarrollar EM en sujetos con serología positiva de VEB, en concreto, el riesgo relativo se incrementa hasta 32.4 (95% IC: 4.3 to 245.3, $p < 0.001$) en aquellos pacientes que desarrollaban la seroconversión y adquieren la mononucleosis infecciosa en la edad adulta comparado con aquellos que permanecían seronegativos. El riesgo relativo de los sujetos que ya presentaban la infección por VEB antes de su inclusión en la cohorte ascendía a 26,5 (95% IC: 3.7 to 191.6; $p = 0.001$). El tiempo de seroconversión de estos pacientes antes del inicio de los síntomas de la enfermedad fue de 7.5 años (rango intercuartílico: 2-15 años).

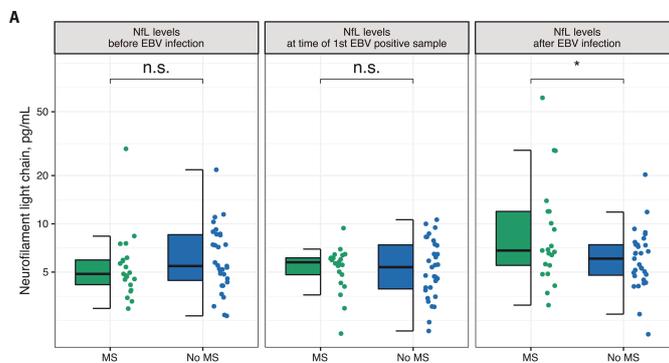
Gráfico 2. Relación entre estado de infección por virus Epstein-Barr y esclerosis múltiple.



A la izquierda, sujetos de la cohorte de militares de EEUU con seroconversión de infección por VEB. En la primera muestra no tenían anticuerpos anti-VEB. Se muestra seroconversión en mayor proporción de sujetos entre aquellos que desarrollaron EM en el seguimiento longitudinal que en sujetos sanos. A la derecha, riesgo relativo (Hazard ratio) para EM según estatus serológico para VEB (de Björnevik, K. et al. Science 2022).

Además, se determinaron los niveles de neurofilamentos de cadena ligera (NfL) que son un biomarcador de neurodegeneración y que como veremos más adelante en la parte de diagnóstico se elevan aproximadamente 6 años antes de la aparición de los síntomas de EM⁴⁷. En los pacientes con EM que fueron seronegativos en el momento de la inclusión en la cohorte se encontraron niveles similares de NfL que los individuos que no desarrollaron EM en ningún momento tanto antes como durante el momento de la infección por VEB. Sin embargo, tras la infección por VEB los niveles de NfL se incrementaron notablemente, dilucidando su papel en la fisiopatología de la enfermedad, ya que la elevación de NfL en pacientes seropositivos que aún no han desarrollado la EM podría comportarse como un biomarcador de diagnóstico precoz de la EM en pacientes que tienen la infección por VEB⁴⁸.

Gráfico3. Diagramas de cajas de los niveles de NfL en pacientes con EM.



Se representan los niveles de NfL en un grupo de pacientes con EM y en sujetos sanos en diferentes momentos de la infección por VEB. Antes de la infección, los niveles de NfL de los sujetos que desarrollarán EM eran similares a los sujetos que no habían tenido la infección. Después de la infección, los NfL de los pacientes que desarrollarán EM se elevan de forma significativa (de Björnevik, K. et al. JAMA Neurol. 2020)

Concretamente, en un estudio anterior de la misma cohorte de militares de EEUU, se estimó que los sujetos que tenían títulos de anticuerpos anti-EBNA (considerados como marcador de una buena respuesta inmune al virus) igual o

mayor de 320 unidades tenían más riesgo de conversión a EM que aquellos que tenían títulos por debajo de 20 unidades⁴⁹. Se cree que la relación entre EM y VEB se debe a que es un virus con la capacidad de activar y expandir linfocitos B y T autoreactivos durante el desarrollo de la mononucleosis infecciosa. Como veremos más adelante, los pacientes con EM presentan linfocitos autoreactivos con menos requerimientos para la coestimulación y un descenso en la función regulatoria del sistema inmune. Además, en un estudio se determinó que los anticuerpos anti-EBNA1 reconocían con más frecuencia antígenos específicos de la mielina que otros que no estaban relacionados con la EM⁴⁴.

1.2.4.3 *La microbiota intestinal*

Recientemente, la microbiota intestinal ha emergido como nuevo factor etiológico ambiental para las enfermedades autoinmunes y entre ellas la EM, que explicaremos en gran medida en el Capítulo II.

1.3 ETIOPATOGENIA

En la esclerosis múltiple se produce principalmente un proceso de desmielinización que afecta esencialmente a la sustancia blanca del SNC. Se desarrollan múltiples lesiones o placas de desmielinización con relativa preservación de los axones (aunque se asocia cierto grado de daño axonal). Las lesiones suelen tener una distribución perivenular y se localizan principalmente a nivel periventricular y subpial⁵⁰.

Después de analizar los factores predisponentes de la etiopatogenia de la esclerosis múltiple (factores genéticos y ambientales) iniciamos la descripción de su fisiopatología que se basa en el concepto de autoinmunidad. Los datos que defienden el origen inmune de la EM son los siguientes: el estudio anatomopatológico de las lesiones desmielinizantes en estudios necrópsicos, la similitud entre éstos y los hallazgos en el modelo animal de investigación de la EM (la encefalomiелitis autoinmune experimental o EAE), el curso clínico de la enfermedad que se produce en la mayoría de pacientes típicamente en exacerbaciones (brotos) y remisiones, el incremento de la actividad de la enfermedad en aquellos pacientes que han recibido tratamiento con IFN gamma, la influencia del componente genético entre los factores predisponentes, la

predominancia de la enfermedad entre el género femenino además de la influencia hormonal en determinados momentos de la vida fértil de las mujeres como el embarazo y el puerperio⁵¹.

Desde el siglo XIX se han venido describiendo las lesiones desmielinizantes en los estudios anatomopatológicos. Fue Cruveilhier en 1835 y Carswell en 1838 los primeros que realizaron estas descripciones en estudios de microscopía óptica. Sin embargo, no fue hasta Charcot en 1868 cuando se realizó por primera vez la correlación anatomoclínica de la enfermedad, acuñándose el nombre de *esclerosis en placas*. Finalmente se adoptó el término esclerosis múltiple, empleado por los autores norteamericanos⁵².

Desde hace décadas se distinguen dos formas clínicas en la EM, que se correlacionan en cierta medida con las diferentes fases de la enfermedad. Las formas recurrentes, entre la que destaca la más frecuente, la esclerosis múltiple recurrente remitente (EMRR) y que corresponden a una fase predominantemente inflamatoria, y las formas progresivas, entre las que se encuentran la esclerosis múltiple primariamente progresiva (EMPP) y la esclerosis múltiple secundariamente progresiva (EMSP), donde predomina la degeneración axonal. Aunque en los últimos años se ha demostrado que la degeneración axonal comienza al principio de la enfermedad, vamos a desglosar la fisiopatología en estas dos fases, inflamatoria correspondiente a las formas recurrentes, y la fase crónica degenerativa, que representa a las formas progresivas⁵³.

El proceso nosológico de la esclerosis múltiple comienza con la lesión aguda de la mielina. Se conoce que el primer paso que ocurre es la activación de linfocitos T que circulan en sangre periférica. Estos linfocitos T son autorreactivos, es decir, han escapado al control de los órganos linfoides primarios y/o secundarios, donde se eliminan precisamente aquellos linfocitos que reaccionan contra antígenos propios. Se postula que la activación de los linfocitos T se produce a través del reconocimiento de un antígeno de naturaleza desconocida por parte de la microglía que, por mimetismo molecular, es decir, por similitud de epítomos entre un agente externo y la mielina, generaría una reacción inmune que induce la destrucción de la vaina de mielina de los oligodendrocitos (desmielinización). Se cree que este antígeno desconocido se podría generar en el contexto de una estimulación del sistema inmune a raíz de una infección por un microorganismo con el que existe mimetismo molecular o incluso por estimulación directa de superantígenos de

microorganismos que pueden unirse directamente a la molécula HLA de las células presentadoras de antígenos fuera de la hendidura de unión antigénica⁵⁴. En este punto, se ha postulado el papel fundamental que tendría la presencia de infecciones en la infancia del virus Epstein-Barr (VEB), como hemos mencionado anteriormente.

Una vez que el linfocito T autorreactivo está activado tiene la capacidad de expandirse en clones de linfocitos, tras lo cual se producirá la migración al SNC a través de la barrera hematoencefálica (BHE), que está formada funcionalmente por varias estructuras celulares. Entre ellas se encuentran las células endoteliales que presentan uniones estrechas o *tight junctions*, los pies de los astrocitos y los pericitos. Todas estas células junto con sus mecanismos selectivos de transporte transmembrana, tienen el objetivo de mantener la preservación de la BHE y evitar la entrada de agentes externos. En la superficie del linfocito T activado se presentan moléculas de adhesión o integrinas. Entre ellas destacan la alfa-4 integrina o VLA-4 y la integrina llamada antígeno-1 asociado a función de linfocito o LFA-1. A través de la activación y secreción de citoquinas se inducen cambios en el endotelio de los vasos sanguíneos cerebrales que conforman la BEH, que también expresa otras proteínas de adhesión como la molécula de adhesión celular vascular-1 o VCAM-1 y la molécula de adhesión intercelular-1 o ICAM-1⁵⁵. Los linfocitos T activados comienzan a rodar por el endotelio, finalmente contactan y se pegan a la superficie del endotelio, iniciándose un proceso llamado diapédesis⁵⁶. También se segregan metaloproteasas que ayudan en la degradación de la membrana basal que facilita la migración al SNC⁵⁷.

Dentro del SNC se produce una segunda activación del linfocito T autorreactivo al ponerse en contacto con las células presentadoras de antígeno (CPA), en este caso la microglía y los astrocitos, que hacen contactar al linfocito T con antígenos relacionados con la mielina unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)⁵⁸. Tras su activación dentro del SNC se produce la secreción de citoquinas y otros mediadores inflamatorios (como prostaglandinas, óxido nítrico o radicales libres), que favorece la diferenciación del linfocito T en los diferentes tipos de linfocitos efectores: los linfocitos Th1, Th17 (pro-inflamatorios) o Th2 (reguladores) en función del tipo de citoquinas que predominen en el lugar cercano del linfocito en el SNC. En el caso de la respuesta

Th1, se induce a través de la interleucina (IL) 12, la respuesta Th17 sucede a través de la secreción de IL-1, IL-6, IL-23 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Por último, la respuesta Th2 se produce a través de la IL-4 e IL-10⁵⁹.

Debido al reconocimiento de algunos antígenos relacionados con la mielina por parte de los linfocitos Th1 o Th17, segregan interleucinas tales como IL-17, IL-21, IL-22 y el interferón gamma (IFN γ) produciendo un daño directo sobre la vaina de mielina causando su destrucción o desmielinización. Además, son capaces de activar macrófagos, células de la microglía, generando así la pérdida de la mielina de los oligodendrocitos y la degeneración axonal con una proliferación ulterior de astrocitos⁶⁰. Además, existen otras células del sistema inmune que participan en el daño a la mielina como los mastocitos, los linfocitos T que expresan receptor $\gamma\delta$, los linfocitos T CD8+ y los linfocitos B⁶¹. En los últimos años se ha descubierto que los linfocitos B tienen un papel importante en la etiopatogenia de la EM (desde hace décadas era considerada una enfermedad mediada por linfocitos T)⁶². Los linfocitos B participan como células presentadoras de antígenos, en la síntesis de citoquinas (pro- y antiinflamatorias) y recientemente se ha descrito que participan en la formación de los centros linfoides terciarios (centros germinales) en las meninges, proceso íntimamente ligado al daño que se produce en la corteza cerebral, relacionándose con la atrofia cerebral y la discapacidad funcional progresiva que se genera a lo largo de la evolución de la enfermedad. Hasta ahora, la importancia de las células B se centraba sobre todo en su capacidad de generar inmunoglobulinas en el espacio intratecal, cuyo marcador biológico diagnóstico estrella es la detección de bandas oligoclonales (BOC), patrón resultante del proceso de electroforesis del líquido cefalorraquídeo (LCR) en los pacientes con EM, y que tiene una sensibilidad del 95% para su diagnóstico⁶³.

El daño en la vaina de mielina se traduce en un descenso en la velocidad de conducción nerviosa y deriva incluso en bloqueos de la conducción. Anteriormente se creía que el axón se dañaba de forma secundaria y tardía en la evolución de la enfermedad o bien, en las formas agresivas de la EM. Sin embargo, el daño axonal se produce desde el primer momento de la enfermedad y representa la principal causa de la discapacidad neurológica irreversible que se produce en los pacientes. La densidad de axones dañados se correlaciona con la actividad inflamatoria de la enfermedad en las lesiones o placas desmielinizantes agudas. Se han detectado áreas de daño axonal incluso en zonas de sustancia blanca aparentemente sanas en

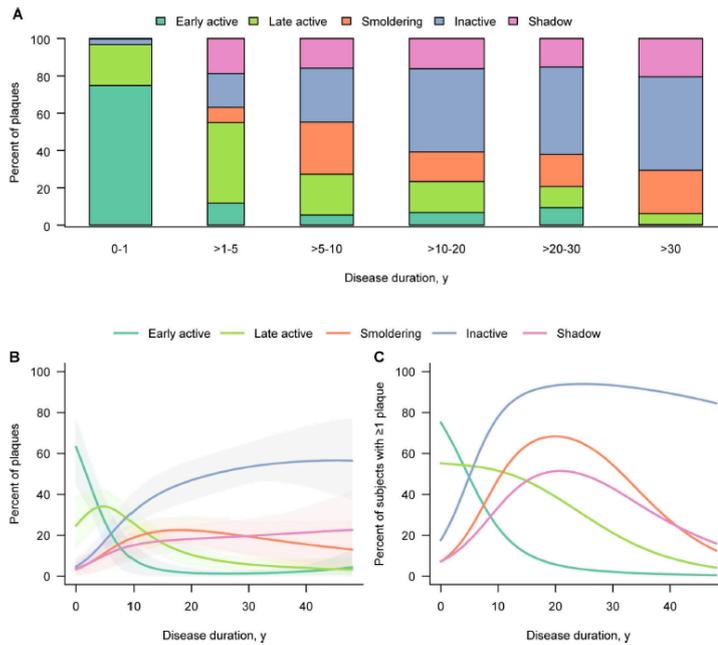
las secuencias de resonancia magnética (RM) y en estudios anatomopatológicos con tinciones habituales de mielina. Se debe probablemente a fenómenos de degeneración walleriana por afectación severa de la mielina de la sustancia blanca distal a estas áreas por un proceso de transección⁶⁴. Además, son considerados otros mecanismos de daño axonal como la acción de citoquinas, enzimas proteolíticas o radicales libres, la respuesta inmune mediada por linfocitos CD8+ citotóxicos, el daño mitocondrial con aumento de calcio intracelular que activa procesos enzimáticos, la citotoxicidad mediada por glutamato y la pérdida de factores tróficos y metabólicos producidos por la vaina de mielina⁶⁵.

Finalmente, el proceso inflamatorio se regula por mecanismos contrapuestos que comienzan desde el inicio del estado inflamatorio con la activación de linfocitos T reguladores (Treg). Estos linfocitos expresan los marcadores CD4+CD25+FoxP3+ en su superficie y representan el 5% de la población total de linfocitos T helper CD4+⁶⁶. Estos linfocitos liberan citoquinas antiinflamatorias como la IL-4, IL-6, IL-19 y el TGF- β . Además, estas moléculas limitan, junto con los linfocitos *natural killer* (NK), la proliferación de linfocitos T colaboradores (respuesta antiertóptica) y la inhibición de su activación (respuesta antiidiotípica), a través de la internalización del receptor de IL-2, promoviendo así la finalización de la respuesta autoinmune⁷².

Como veremos más adelante, a lo largo de la enfermedad estos mecanismos de compensación funcional llegan a no ser suficientes y comienza el inicio de la adquisición de discapacidad residual tras cada brote, y más adelante, es determinante para llegar a la segunda fase de la enfermedad (EM secundariamente progresiva- EMSP) en la que predomina la neurodegeneración crónica. En esta fase, la discapacidad adquirida es progresiva e independiente de los brotes o las lesiones agudas, que a su vez, cada vez están menos presentes siendo prácticamente inexistentes a partir de los 30 años de evolución (*ver gráfico 4*). Entre los factores que determinan la neurodegeneración crónica en esta fase progresiva están la falta de soporte trófico, la activación crónica de la microglía, la alteración de la expresión de los canales iónicos en axones desmielinizados, el daño mitocondrial y el acúmulo de hierro. Un hallazgo característico de las fases progresivas (EMSP y EMPP) son los folículos linfoides de linfocitos B activados, que remedan la arquitectura celular de los ganglios linfáticos y que se localizan a nivel subpial en

las meninges y que se han relacionado directamente con la discapacidad progresiva y la atrofia cortical⁶⁷.

Gráfico 4. Distribución de los tipos de placas desmielinizantes durante la evolución de la EM.



A. Gráfico de barras donde se representan los tipos de placas en función del tiempo de evolución. En los primeros años predominan las placas activas y en los últimos años las placas inactivas y las smoldering lesions. B y C. Gráfico que muestra la evolución de las proporciones de los tipos de placas a lo largo de la evolución. En cada punto de la gráfica los porcentajes suman 100. Las regiones sombreadas representan los intervalos de confianza del 95%.

1.4 ANATOMÍA PATOLÓGICA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Se han realizado varias clasificaciones de las lesiones características que podemos encontrar en los pacientes con EM. Según criterios histológicos se clasifican en placas activas, placas crónicas activas, placas inactivas y placas sombreadas. Las placas activas son placas eminentemente inflamatorias y corresponden a las que presentan captación de gadolinio en la resonancia magnética. Inicialmente se observan oligodendrocitos apoptóticos y una activación precoz de la microglía, sin afectación de la mielina. Cuando comienza la destrucción de la mielina existe un primer <estadio prefagocítico> en el que no existe aún fagocitosis ni células inflamatorias. Enseguida continúa con un infiltrado

abundante de linfocitos T (CD4+ y CD8+), algunos linfocitos B y macrófagos en el <estadio fagocítico>, que se localizan en los espacios perivenulares, inicialmente en la zona central y posteriormente se va expandiendo en la periferia (borde activo) dando lugar a la placa crónica activas también denominadas *slowly expanding lesions (SEs)* o anteriormente *smoldering lesions*, en inglés. Las placas lentamente expansivas presentan una zona central inactiva cicatricial que está rodeada de un anillo de linfocitos y microglía activada que produce la fagocitosis de restos de mielina y axones dañados. Se localizan alrededor de un vaso y van creciendo excéntricamente. Están presentes de forma significativa en los pacientes con EM secundariamente progresiva y su presencia predice la adquisición de discapacidad progresiva y deterioro cognitivo en estos pacientes⁶⁸. Por otro lado, las placas inactivas son muy definidas, de composición cicatricial con axones dañados y escasos macrófagos. No se detectan ni restos de mielina ni inflamación ni remielinización. Son las habituales en los pacientes más evolucionados. Por último, las placas en sombra o sombreadas son las placas que corresponden al proceso de remielinización estable. Son habituales también en pacientes con larga evolución⁶⁹.

Las placas desmielinizantes también pueden ser descritas según criterios etiopatogénicos en cuatro tipos. En primer lugar, las lesiones de tipo I en las que predomina la inmunidad celular con la implicación sobre todo de linfocitos T citotóxicos, macrófagos y microglía, que contienen restos de mielina fagocitados en su interior. Se distribuyen en las áreas perivasculares. También se puede observar una pérdida de oligodendrocitos en la periferia y reaparición de los mismos en el centro inactivo junto con placas remielinizantes. Las lesiones tipo II son similares pero se diferencian de las primeras en que predominan la inmunidad humoral. En ellas existe un importante depósito de inmunoglobulinas IgG y complemento en las zonas de desmielinización activa. En las lesiones de tipo III se disponen infiltrados inflamatorios, también con linfocitos T, macrófagos y microglía, pero no se encuentran los depósitos de inmunoglobulinas ni complemento que había en las lesiones de tipo II. Además, en ellas se observa la producción de radicales libres (daño mitocondrial) que suele apreciarse en lesiones de tipo hipóxico. Sus bordes son más difusos y la pérdida de oligodendrocitos se distribuye tanto en el borde activo como en el centro inactivo. En este tipo de lesión no se encuentran placas de remielinización. Por último, las lesiones de tipo IV que se observan exclusivamente en los pacientes con EMPP. Están formadas por infiltrados inflamatorios de

linfocitos T, macrófagos y microglía y no presentan depósitos de inmunoglobulinas ni complemento. La disposición de la pérdida de oligodendrocitos también se encuentra tanto en el borde activo como en el centro inactivo (son predominantemente oligodendrogiales)^{62,70}.

1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La esclerosis múltiple se presenta como la aparición de episodios recurrentes de inflamación, desmielinización y daño axonal que se manifiestan en forma de lesiones inflamatorio-desmielinizantes circunscritas y localizadas en las diferentes áreas del SNC. Este fenómeno de desmielinización de la sustancia blanca del SNC provoca una alteración en la conducción saltatoria a través de los nódulos de Ranvier, produciendo una lentificación de la conducción del estímulo nervioso en mayor o menor grado (incluso se pueden producir bloqueos de la conducción). De este modo, acaban desarrollándose múltiples signos y síntomas específicos de cada área del SNC que ha sido afectada por una o más lesiones (siempre y cuando éstas sean áreas elocuentes, en las que se producen síntomas como la alteración visual, el vértigo, la hipoestesia o la debilidad muscular. Además, es habitual encontrar lesiones desmielinizantes que no son agudas en la resonancia magnética de pacientes que están en el momento inicial del diagnóstico y que no han causado síntomas específicos anteriormente.

Posteriormente se produce la autolimitación del proceso inflamatorio agudo y el fenómeno de remielinización, aunque la mielina formada en este estadio no es la misma que la que se forma originalmente por lo que se producen cambios estructurales como unos internodos más cortos, que conducen a una disfunción crónica de la conducción del estímulo nervioso⁷¹. Si estos mecanismos llegan a ser resolver la lesión desmielinizante de forma funcional, los síntomas remitirán por completo. Sin embargo, si son insuficientes y la conducción nerviosa en los axones queda alterada, contribuirá a la persistencia de síntomas residuales en los pacientes, ya sean paroxísticos o permanentes, promoviendo la acumulación progresiva de discapacidad a nivel neurológico a lo largo de sus vidas. Este es el mecanismo fisiopatológico que se produce en la aparición de síntomas “negativos” como la debilidad muscular o el déficit sensitivo en un área corporal. Sin embargo, como describiremos más adelante, los pacientes con EM pueden experimentar

síntomas “positivos” e incluso paroxísticos como las parestesias o el fenómeno de Lhermitte, que fue descrito por primera vez por *Marie* y posteriormente por *Babinski*. Consiste en la sensación de una descarga eléctrica que se puede trasladar a toda la columna y que se desencadena con la flexión del cuello. Traduce una afectación desmielinizante de los cordones posteriores de la médula, que a la flexión del cuello produce un estiramiento de los fascículos. Esta relación etiopatogénica fue descrita por Jean Lhermitte⁷². La fisiopatología de los síntomas positivos difiere a la de los déficits neurológicos. Se cree que su origen se encuentra en la generación de trenes ectópicos y ráfagas de impulsos durante la conducción nerviosa, la presencia de interacciones efápticas entre axones y/o neuronas, la activación de impulsos espurios adicionales por la transmisión de impulsos normales y la mecanosensibilidad de los axones subyacentes a las sensaciones inducidas por el movimiento y el dolor⁷³.

Como indicábamos, según el área del SNC afectada se producirán diferentes síntomas. Habitualmente las lesiones desmielinizantes suelen localizarse predominantemente en el nervio óptico, causando cuadros de neuritis óptica, en el tronco del encéfalo y pedúnculos cerebelosos, donde pueden causar diferentes síntomas como visión doble (diplopía) debida a parálisis de movimientos oculomotores como la oftalmoplejía internuclear, nistagmo, vértigo y náuseas, hipoacusia, temblor, inestabilidad de la marcha (ataxia), dificultad para la articulación del habla (disartria), debilidad muscular (paresia), déficits sensitivos en un hemicuerpo (hemihipoestesia), etc. Otra localización frecuente es la médula espinal, que se afecta en forma de mielitis transversa donde pueden causar tanto paresia como afectación de la sensibilidad en ambas extremidades inferiores y/o superiores con un nivel sensitivo y disfunción esfinteriana, que se puede manifestar como incontinencia o retención urinaria, y estreñimiento⁷⁴.

En general, los síntomas que se generan durante los brotes se manifiestan en horas o días y suelen progresar a lo largo de unos días o semanas hasta llegar a una meseta en el grado de intensidad también de días o semanas y que posteriormente irán resolviéndose gradualmente durante un tiempo indeterminado incluso llegando hasta su remisión. Durante las primeras etapas de la enfermedad, la recuperación suele ser aparentemente completa, aunque a veces pueden quedar con síntomas residuales, paroxísticos o permanentes⁷⁵.

La manifestación clínica inicial más frecuente es el déficit sensitivo que constituye el síntoma de debut en el 30% de los casos. Las alteraciones sensitivas pueden abarcar desde síntomas positivos como parestesias, disestesias o dolor neuropático, o síntomas deficitarios como una hipoestesia en diferentes grados. Si la lesión desmielinizante está localizada en la médula, puede acompañarse de una sensación de banda constrictiva horizontal habitualmente localizada en el tronco (nivel sensitivo). La alteración sensitiva, sobre todo cuando se afecta la sensibilidad profunda, puede causar un trastorno del equilibrio promoviendo la aparición de inestabilidad tanto en la marcha como la aparición del signo de Romberg en la exploración⁷⁶.

El segundo síntoma inicial en frecuencia es la neuritis óptica (22% de los casos). Se trata de episodios agudos de pérdida de agudeza visual que los pacientes describen una visión borrosa de grado variable. Típicamente se suele diferenciar de otros trastornos visuales porque se acompaña de dolor ocular sobre todo el desencadenado por los movimientos oculares y discromatopsia. En la exploración oftalmológica puede detectarse la disminución de agudeza visual, defectos campimétricos como un escotoma cecocentral, discromatopsia y el defecto pupilar aferente o fenómeno de Marcus-Gunn⁶². En una de las técnicas diagnósticas más empleadas en pacientes con EM, los potenciales evocados visuales, se confirmará un enlentecimiento en la conducción nerviosa por el nervio óptico con o sin disminución de la amplitud del estímulo (degeneración axonal secundaria). Esta alteración suele mantenerse latente aunque la agudeza visual se recupere. De hecho, el 70% de los pacientes presentan alterados los PEV siendo esta afectación bilateral en la mitad de los casos. Al final los pacientes pueden llegar a presentar atrofia del nervio óptico, de forma congruente como la que se desarrolla a nivel cerebral. Esta atrofia puede detectarse y monitorizarse en la evolución de la enfermedad con la tomografía de coherencia óptica (OCT) que mide el grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina (RNFL) donde se encuentran las fibras amielínicas de las células ganglionares, para el estudio de la afectación del nervio óptico en la enfermedad⁷⁷.

De cerca le sigue la presentación inicial con síntomas motores (20%) que son fácilmente detectables tanto por el paciente que suele referir debilidad muscular en una o varias extremidades como en la exploración del neurólogo, que puede detectar una debilidad junto a un aumento de los reflejos osteotendinosos. Se trata

de la manifestación por afectación del sistema piramidal. Si es lo suficientemente importante, en la exploración se puede encontrar el signo de Babinski⁷⁸. Si la afectación motora se establece en el tiempo, los pacientes acabarán desarrollando la espasticidad⁷⁹. Tanto la paresia de extremidades como la espasticidad pueden alterar la marcha, causando el principal problema de discapacidad de los pacientes con EM que puede condicionar la necesidad de usar un apoyo como un bastón o muleta, o bien más adelante un andador o una silla de ruedas. Al final de la enfermedad los pacientes pueden encontrarse en una situación de dependencia total con inmovilidad que les deja postrados en una cama gran parte o la totalidad del día con dificultad en el habla y disfagia⁸⁰.

Otra presentación clínica, aunque más infrecuente, es la visión doble o diplopía (12%). Suele estar causada por la afectación de los pares craneales oculomotores a nivel de tronco encefálico. Pueden ser trastornos simples como la afectación de un par asilado, siendo la paresia del VI par craneal la más frecuente, o pueden ser trastornos más complejos si se afectan estructuras que conectan los sistemas oculomotores de ambos lados como la oftalmoplejía internuclear anterior que la pueden presentar hasta la mitad de los pacientes a lo largo de la evolución y que se debe a la afectación del fascículo longitudinal medial. Puede ser subclínica y evidenciarse únicamente por exploración física o bien puede referirla el paciente incluso solo con una sensación de oscilopsia. También puede acompañarse de nistagmo⁴³.

Por último, los pacientes que tienen un primer síntoma por afectación desmielinizante describen un vértigo en el 5% de los casos. Suele deberse por la afectación del cerebelo o los pedúnculos cerebelosos. Puede acompañarse de disartria, habla escandida, temblor intencional, disimetría, ataxia e incluso debilidad muscular. *Charcot* describió una triada de síntomas (triada de Charcot) que consiste en nistagmo, temblor intencional y habla escandida, y suelen presentarla los pacientes de esclerosis múltiple⁸¹.

A lo largo de la evolución se irán sumando nuevos síntomas debido a la aparición de nuevos brotes, o bien, los pacientes presentarán nuevamente el mismo síntoma si se debe al crecimiento de una placa previamente existente o bien se forma una nueva en la misma localización del SNC. Otros síntomas que suelen tener los pacientes con EM y que pueden ser igualmente limitantes son la fatiga,

que suele empeorar en situaciones en las que existe un aumento de temperatura como el calor ambiente o la fiebre, la atrofia muscular, la espasticidad (aumento de tono muscular), la afectación esfinteriana con incontinencia o retención urinaria y/o alteración del hábito intestinal, la disfunción sexual con disminución de la libido, disminución de la sensibilidad en el área genital, anorgasmia y dificultad para la erección. También pueden presentar disfunción cognitiva incluso con afectación moderada-severa al final de la evolución, con deterioro cognitivo disejecutivo o subcortical, alteración del ánimo con depresión y ansiedad⁸¹. Por último, se percibe dolor en un alto porcentaje de pacientes. Con frecuencia refieren cefalea, calambres o espasmos dolorosos, lumbalgia, signo de Lhermitte o neuralgia del trigémino. Suelen presentar dolor neuropático en las extremidades o el tronco que describen como dolor urente, eléctrico o disestésico en las áreas de hipoestesia afectadas⁸².

1.6 FORMAS CLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

El 85% de los pacientes con EM desarrollan un curso clínico con brotes o recaídas a lo largo del tiempo y que define la forma mayoritaria de EM llamada recurrente remitente (EMRR). Un brote se define como un episodio clínico correspondiente a la aparición de nuevos síntomas o de un empeoramiento de síntomas previos, junto a la demostración de hallazgos congruentes en la exploración, que sucede de forma aguda o subaguda, tiene una duración de más de 24 horas con o sin una recuperación completa de los síntomas y en ausencia de fiebre o infecciones interrecurrentes. Hay que distinguirlo del empeoramiento transitorio de síntomas previos en relación a procesos interrecurrentes como una infección o situaciones como el calor o el ejercicio, que denominamos pseudobrote. En el caso de la neuritis óptica el empeoramiento transitorio por el calor o la fiebre se denomina fenómeno de Uthoff^{44,83,84}.

Clásicamente se realiza el diagnóstico de esclerosis múltiple clínicamente definida (EMCD) cuando el paciente refiere dos o más brotes o cuando en la exploración neurológica se puede determinar la afectación subclínica de haber presentado afectación neurológica que traduzca de dos o más eventos desmielinizantes con anterioridad. Cuando un paciente tiene un primer episodio clínico o brote sugestivo de enfermedad desmielinizante se procede a una examinación física y la realización de pruebas complementarias que nos ayuden a

determinar si el paciente tiene o no una esclerosis múltiple. Se estudia la distribución y número de lesiones desmielinizantes en resonancia magnética cerebral y medular y se realiza una punción lumbar para determinar las bandas oligoclonales (BOC) en LCR. Gracias a la actualización de los criterios diagnósticos de la EM se puede diagnosticar cada vez de forma más temprana la enfermedad, contribuyendo al inicio más precoz de terapias modificadoras de la historia natural de la enfermedad. Cuando a pesar de los hallazgos en pruebas paraclínicas no se cumplen los criterios de diagnóstico de una EM se define a este primer evento desmielinizante como síndrome clínico aislado (SCA o CIS, del término en inglés *Clinically Isolated Syndrome*). Tras la aparición de los nuevos criterios diagnósticos McDonald 2017 (*ver más adelante en el apartado de diagnóstico*) los casos en los que no se puede definir una EM pero que sí que se trata de un CIS serían tres: la presencia de 1 o más lesiones en resonancia (que no cumpla criterios de diseminación en espacio) con determinación de BOC negativas o la presencia de una lesión desmielinizante en resonancia con BOC positivas, que se trataría de un primer brote de EM con alta probabilidad.

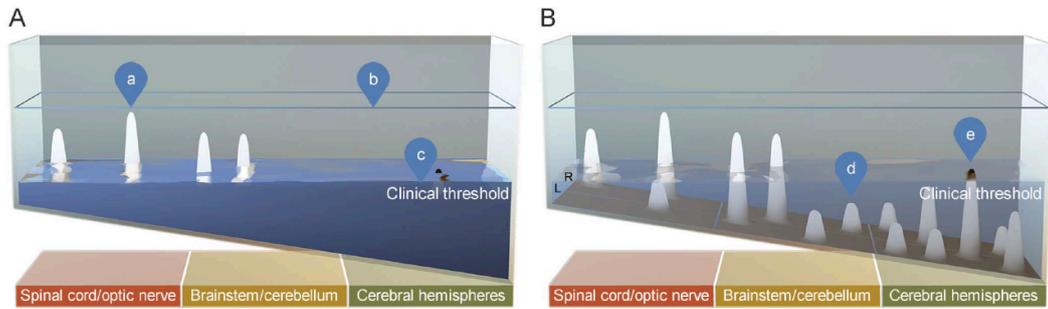
Por otro lado, debido a los avances en resonancia magnética y a su amplio uso ante síntomas neurológicos diversos no relacionados a priori con la EM, se han podido detectar lesiones desmielinizantes silentes antes incluso de la aparición de los primeros síntomas sugestivos de un evento desmielinizante. Si la distribución de estas lesiones es la típica de lesiones desmielinizantes (*ver más adelante en pruebas complementarias*) los pacientes podrán ser diagnosticados de Síndrome Radiológico Aislado (RIS, del término en inglés *Radiologically Isolated Syndrome*) y recibirán seguimiento tanto clínico como radiológico, en una vigilancia médica estrecha por riesgo de conversión a CIS o EMRR⁸⁵. En este punto es importante hacer una buena anamnesis sobre posibles episodios desmielinizantes que puedan haber pasado desapercibidos como parestesias o visión borrosa leves. Además, se ha detectado que un grupo de estos pacientes presentan alteración en los test neurocognitivos y atrofia cerebral medida en resonancia, constituyendo éste un primer síntoma de EM, debiendo entonces considerarse el inicio de tratamientos neuromoduladores al valorar que en realidad ya se traten de pacientes con CIS (a pesar de incluso no haber presentado síntomas clásicos de la enfermedad)⁸⁶. Durante los primeros eventos desmielinizantes aún el SNC puede, a través de mecanismos inmunes reguladores y procesos de remielinización, controlar y resolver de forma

prácticamente completa los síntomas producidos por los primeros brotes clínicos pudiendo alcanzar la remisión completa en muchos casos. Sin embargo, a lo largo de la evolución de la enfermedad, y según la gravedad del brote aunque éste sea el primero, la probabilidad de que los mecanismos reguladores no sean suficientes se incrementará y existirán cada vez más brotes clínicos en los que no se resolverán todos los síntomas y signos, contribuyendo a la aparición de discapacidad neurológica con secuelas irreversibles en los pacientes. Este es la principal causa de gravedad de esta enfermedad, en la que se desarrolla un deterioro neurológico recurrente y/o progresivo que constituye la primera causa no traumática de discapacidad entre los jóvenes¹⁷. Aproximadamente a partir de los 10 años de evolución, el 50% de los pacientes desarrollan una progresión de la discapacidad neurológica sin la aparición necesariamente de un brote clínico que la desencadene. Es entonces cuando desarrollan la fase llamada esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP) que conlleva a una discapacidad progresiva (con o sin brotes clínicos) hasta que se produce cada vez más limitación de la autonomía con restricción de la marcha y necesidad de uso de un bastón o muleta, un andador o silla de ruedas y finalmente, llegan a la situación de encamado, falleciendo al tiempo por complicaciones interrecurrentes o sistémicas⁸⁷.

A continuación se muestra el modelo gráfico que describe cómo se entiende hoy en día la enfermedad postulando el por qué de sus formas clínicas y la evolución a lo largo del tiempo. Se trata del modelo topográfico de **Krieger** y colaboradores, que en el año 2016 diseñó un esquema (*ver figura 4*) en el que se muestra un habitáculo lleno de agua en las que el nivel del agua muestra el umbral clínico y se divide en 3 partes, de menor a mayor profundidad según el área del SNC que tenga de menor a mayor reserva funcional o de mayor a menor elocuencia según la probabilidad de presentar sintomatología según qué área esté afectada. Si se forma una lesión lo suficientemente importante para superar el umbral clínico según el área del SNC afectada, el paciente presentará síntomas del evento desmielinizante. Si no permanecerá entre el volumen de lesiones en T2 subclínicas que podemos encontrar en diferentes estadios de la enfermedad incluido en el diagnóstico de RIS, en el que solo hay lesiones sin sintomatología asociada. Conforme avanza la enfermedad, el nivel del agua va disminuyendo (la reserva funcional neurológica va disminuyendo) a medida que la atrofia del SNC va

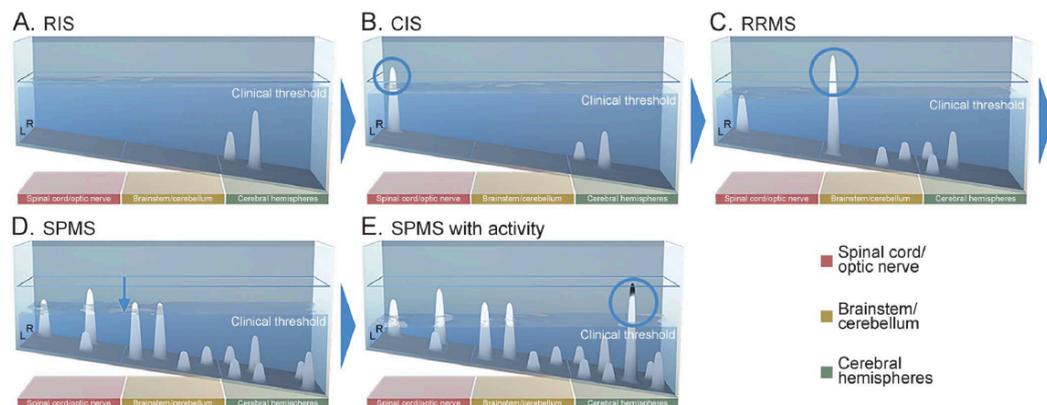
aumentando, perdiendo la capacidad también de recuperación completa tras las recaídas o brotes⁸⁸.

Figura 4. El modelo topográfico de la esclerosis múltiple de Krieger



El nivel del agua representa el umbral clínico en el que las lesiones desmielinizantes pueden o no manifestar sintomatología, que depende de la reserva funcional del individuo en cada momento. A. Punto de vista clínico: Aquí el agua es opaca, solo nos permite ver las puntas (a) que emergen (representación de brotes). Si el brote es lo suficientemente intenso (puntas con suficiente altura), el individuo experimentará síntomas correspondiente a la localización de la lesión. (b) El nivel de agua al inicio refleja la capacidad funcional de reserva y puede estimarse por el volumen cerebral basal en la RM cerebral. (c) El nivel del agua ha disminuido con el tiempo y refleja la pérdida de reserva funcional (atrofia cerebral que se puede medir en resonancia). B. Punto de vista subclínico: el agua es translúcida, tanto los síntomas y signos como las lesiones subclínicas son visibles. (d) Las puntas por debajo del umbral representan el número y el volumen de las lesiones en T2. (e) Las puntas más altas en los hemisferios cerebrales representan las lesiones más destructivas y se muestran tapadas en negro representando a los agujeros negros (black holes) en T1 (de Krieger et al. 2016).

Figura 5. El modelo topográfico de las formas clínicas de la esclerosis múltiple de Krieger.



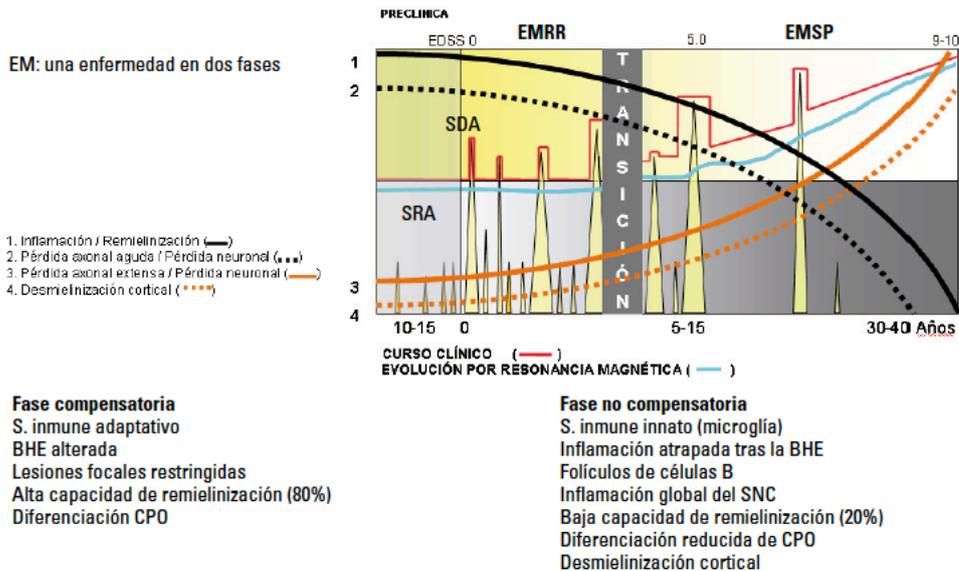
A continuación se muestran imágenes fijas de 5 momentos clave en la evolución de la EM. A. RIS: la reserva funcional cerebral está conservada. Comienzan a surgir las primeras lesiones subclínicas en resonancia. No se manifiestan con síntomas porque no alcanzan el umbral clínico. B. CIS: es la primera lesión que cruza el umbral clínico. Las lesiones que surgen en el área poco profunda tienen más probabilidades de alcanzar el umbral porque tienen menos reserva funcional. C. EMRR clínicamente definida: aparece la segunda lesión que emerge del umbral clínico y muestra síntomas (círculo). La primera lesión disminuyó en tamaño gracias a los mecanismos reguladores y el individuo se recuperó de los síntomas por completo. Las lesiones adicionales subclínicas denotan actividad de la enfermedad ("efectos de base"). D. EMSP: disminución gradual de la reserva funcional, que va revelando la sintomatología/focalidad neurológica correspondiente a la topografía de las lesiones subclínicas que ahora quedan por encima del umbral (progresión de la discapacidad, que surge aquí principalmente por el umbral descendente "efectos de superficie"). E. SPMS con actividad: es la misma situación que la EMSP pero con nuevas lesiones que se manifiestan como brotes (círculo).

Con respecto a la discapacidad, el neurólogo Kurtzke creó una escala de discapacidad para medir la situación de cada paciente de forma dinámica⁸⁹. A lo largo de los estudios tanto de historia natural de los pacientes como de práctica clínica habitual en pacientes tratados con fármacos inmunomoduladores, se ha observado que existe evidencia suficiente para poder diferenciar dos fases en el curso de la esclerosis múltiple⁷³.

En la primera etapa predomina la neuroinflamación local con presencia de lesiones agudas inflamatorias y tiene duración variable. Durante esta fase existe un componente de neurodegeneración y pérdida axonal permanente, pero está clínicamente enmascarada por el importante componente inflamatorio, que condiciona la adquisición de discapacidad neurológica si los procesos de recuperación o remielinización no son suficientes. En esta fase existen variables clínicas que influyen en el curso de la enfermedad. Se ha determinado que el momento en el que los pacientes alcanzan una puntuación en la escala de discapacidad funcional EDSS de 3.0 o 4.0, los mecanismos compensatorios comienzan a fracasar y los pacientes entran en la segunda fase de

neurodegeneración crónica en la que adquieren progresivamente discapacidad neurológica a lo largo del tiempo.

Figura 6. El curso de la esclerosis múltiple en dos fases (inflamatoria y neurodegenerativa).

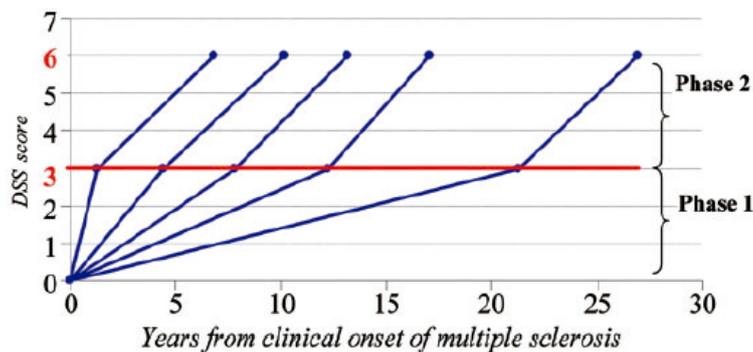


Primero acontece el síndrome radiológico aislado (SRA) que puede preceder en años al diagnóstico de EM. Le sigue el primer evento clínico desmielinizante (SDA) en el que a día de hoy se puede diagnosticar EMRR en la mayoría de casos. Primera fase compensatoria: existe gran componente inflamatorio, los pacientes presentan brotes y lesiones desmielinizantes en resonancia. Al mismo tiempo, se ponen en marcha los mecanismos de remielinización. No obstante, éstos se van agotando a lo largo de la evolución, al igual que también va descendiendo el grado de inflamación focal (representada por la línea negra continua). Aunque la neurodegeneración también se establece desde el inicio, existe un componente de degeneración axonal aguda asociada a la inflamación focal aguda y representa a la discapacidad adquirida tras los brotes (RAW, del inglés relapse-associated worsening) que también disminuye a lo largo de la evolución en la misma medida que disminuye la neuroinflamación (representada por la línea negra discontinua). Comienza la neurodegeneración crónica difusa, que hasta hace unos años se creía que no comenzaba hasta fases avanzadas. Está representada por la línea naranja continua) y representa la segunda fase de la enfermedad, la fase no compensatoria llamada EM secundariamente progresiva (EMSP). Al mismo tiempo se forman los folículos linfoides en las meninges y se produce la desmielinización de la corteza cerebral (representada por la línea naranja discontinua), contribuyendo a la atrofia cerebral progresiva (de Fernández, Ó. et al. 2015)

A este respecto, el estudio de Leray y colaboradores, puso de manifiesto que los factores que influían en el mal pronóstico en la primera etapa son: el género (varones), edad al inicio de la EM (cuanto mayor es el paciente menor tiempo hasta la EDSS 3), el número de brotes durante los primeros dos años y si existe una recuperación incompleta después del primer brote. Sin embargo, lo que sucede en esta primera fase (número de brotes, tiempo hasta el segundo brote, capacidad de

recuperación tras el primer brote, etc) no influye en el desarrollo de la segunda fase de neurodegeneración que representa la EM secundaria progresiva (EMSP)⁹⁰.

Gráfico 5. Grados de discapacidad a lo largo de la evolución determinada por dos fases.



En la gráfica, el eje de abscisas representa la media de tiempo de duración de la EM en años. El eje de ordenadas refleja la discapacidad en EDSS. Las líneas representan diferentes pacientes agrupados en 5 subgrupos diferentes. Fase 1, engloba el inicio de los síntomas de la EM hasta que alcanzan los pacientes una discapacidad significativa e irreversible correspondiente a una puntuación de 3.0 en la escala EDSS. Todos alcanzan la Fase 2 en diferentes momentos de la enfermedad con una velocidad de progresión diferente. Al llegar a la Fase 2 (representa la evolución de la enfermedad con discapacidad de EDSS 3 a EDSS 6). Los pacientes de los 5 subgrupos continúan la progresión de la discapacidad de forma uniforme de forma independiente a la evolución previa en la fase 1 (de Leray, et al. Brain 2010).

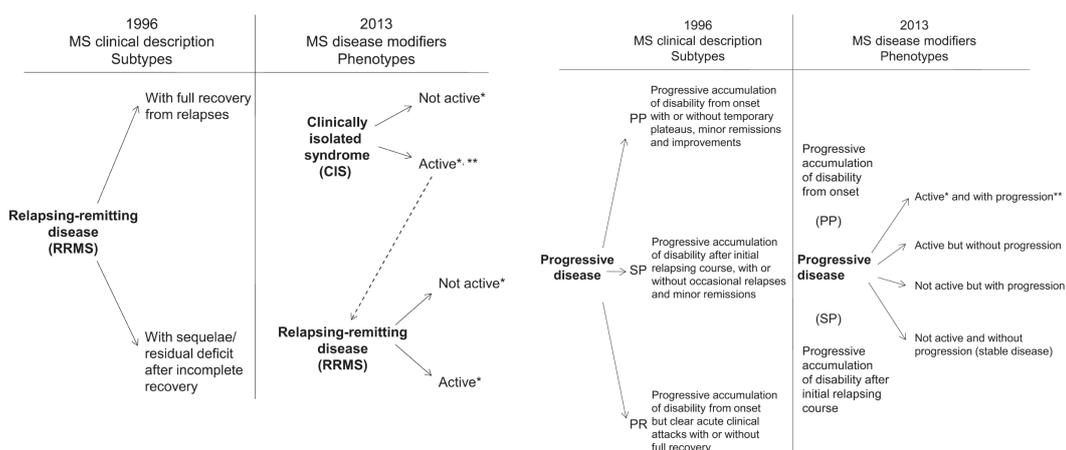
Se ha observado desde el principio, que la edad a la que alcanzan esta fase progresiva los pacientes con EMRR es similar a la que tienen al inicio los pacientes con EM primaria progresiva. También es conocido que los fármacos más antiinflamatorios que son eficaces en la primera fase, dejan de tener esa influencia en la progresión de la discapacidad cuando llegan a la EMSP. Esta segunda fase está dependiente de la neuroinflamación difusa y la neurodegeneración y no así de la inflamación local. Una vez alcanzada esta fase los pacientes progresan en su discapacidad de forma independiente a lo que haya sucedido en la primera fase⁹¹.

Por otro lado, existe una forma clínica de la EM que se manifiesta como una progresión de discapacidad neurológica desde el inicio y se llama esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP), independientemente de estar acompañada de brotes clínicos o no, que en una pequeña proporción de pacientes siguen ocurriendo, lo que determinaría una forma de EM progresiva recidivante (EMPR). La EMPP se da en el 5-15% de los pacientes y suele tener una aparición más tardía, sobre la quinta década de la vida, afectando por igual a mujeres y hombres. Es

frecuente que se inicie como una paraparesia espástica progresiva. Se ha debatido si se podía considerar como una entidad aparte de la EM por sus características especiales de etiopatogenia (menor componente inflamatorio, mayor afectación de degeneración axonal y atrofia cerebral), manifestaciones clínicas, curso y pronóstico⁵⁵.

No obstante, en el año 2013, **F. Lublin** y colaboradores reformularon las formas clínicas clasificándolas en formas recurrentes y formas progresivas, ante las diferencias clínicas y etiopatogénicas de las diferentes etapas de la enfermedad. Las formas recurrentes engloban a la EM recurrente remitente y al síndrome clínico aislado (SCA) cuando sucede el primer evento clínico desmielinizante pero no cumple los criterios diagnósticos de EM. Entre las formas recurrentes se distingue entre activas (presencia de actividad clínica y/o radiológica en el último año) o inactivas. Entre las formas progresivas las divide entre EM secundaria progresiva y EM primaria progresiva, olvidando el término EM primaria recidivante. En estas formas progresivas se distinguen cuatro estadios (no evolutivos): las formas progresivas activas con progresión en las que los pacientes presentan tanto actividad de la enfermedad (clínica y/o radiológica) como progresión de la discapacidad confirmada a los 3 meses; las formas activas sin progresión, las formas con progresión pero inactivas y las formas progresivas sin demostración de actividad ni progresión de discapacidad (estabilidad clínica)⁹².

Figura 7. Clasificación de las formas clínicas de la esclerosis múltiple de Lublin



1.7 DIAGNÓSTICO: CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

En la actualidad el diagnóstico de esclerosis múltiple se realiza por el neurólogo en función de varios criterios: clínicos y paraclínicos. Los primeros criterios diagnósticos que se conocen los introdujeron Allison y Millard en el año 1954, donde establecían los posibles diagnósticos clínicos: esclerosis diseminada temprana, probable esclerosis diseminada y posible esclerosis diseminada⁹³. Al ser eminentemente clínicos existía un alto grado de subjetividad por lo que a la hora de emplearlos en los estudios clínicos permitía alto grado de variabilidad de pacientes con EM o mal diagnosticados de EM.

Para combatir este problema el grupo de **Schumacher** y colaboradores introdujeron nuevos criterios diagnósticos en el año 1965: 1. Examen neurológico alterado. 2. Historia de compromiso de 2 o más partes del SNC. 3. Compromiso del SNC demostrado según uno de los siguientes patrones (a: 2 o más episodios de al menos 24 horas de duración separados como mínimo de 30 días; b: lenta progresión de los síntomas y signos durante al menos 6 meses). 4. Pacientes entre 10 y 50 años al inicio de los síntomas. 5. Signos y síntomas que no pueden ser explicados por otras afecciones⁹⁴.

Como se puede comprobar, desde los primeros criterios diagnósticos de EM se definió claramente lo que constituía un brote clínico (recaída o exacerbación), que se trata de un episodio de afectación neurológica típica de la EM en la que se demuestra que se correlaciona con los hallazgos clinicopatológicos de lesiones inflamatorias desmielinizantes. En general, los síntomas de este episodio deben durar al menos 24 horas y deben haberse descartado otras causas como el empeoramiento de síntomas previos relacionados con un brote anterior (definición de pseudobrote) debido a una elevación de temperatura corporal (fiebre) o infección. Para llegar al diagnóstico de un brote hay que determinar la afectación de una lesión por hallazgos clínicos objetivos además de la anamnesis realizada al paciente. Cuando existen sucesivos brotes, se establece también que un brote debe estar separado del anterior en tiempo por un mes.

Sin embargo, no fue hasta que se extendió el uso de pruebas complementarias como la resonancia magnética y la determinación de bandas oligoclonales (BOC) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) cuando se incorporaron criterios paraclínicos para ayudar a optimizar el diagnóstico de EM y se homogeneizó la población de pacientes de ensayos clínicos. Se trata de los criterios diagnósticos postulados por **Poser** en el año 1983 y que han sido ampliamente utilizados durante décadas. Según estos criterios los pacientes se clasificaban en EM clínicamente definida, EM definida apoyada por pruebas de laboratorio, EM clínicamente probable y EM probable apoyada por pruebas de laboratorio⁹⁵.

Cuadro 1. Criterios diagnósticos de Poser.

Diagnóstico	Requisitos
EM clínicamente definida	<ol style="list-style-type: none"> 1. Presencia de dos brotes y evidencia clínica de dos lesiones separadas 2. Presencia de dos brotes y evidencia clínica de una lesión y evidencia paraclínica de otra lesión separada
EM definida apoyada por laboratorio	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dos brotes, evidencia de una lesión clínica o paraclínica y LCR con BOC o elevación del índice IgG 2. Un brote, evidencia clínica de dos lesiones separadas y LCR con BOC o elevación del índice IgG 3. Un brote, evidencia clínica de una lesión y evidencia paraclínica de otra lesión separada y LCR con BOC o elevación del índice IgG
EM clínicamente probable	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dos brotes. Evidencia clínica de una lesión 2. Un brote y evidencia clínica de dos lesiones separadas 3. Un brote. Evidencia clínica de una lesión y evidencia paraclínica de otra lesión separada
EM probable apoyada por laboratorio	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dos brotes y LCR con BOC o elevación del índice IgG

BOC: bandas oligoclonales; EM: esclerosis múltiple; IgG: inmunoglobulina G; LCR: líquido cefalorraquídeo.

En el año 2001 el grupo de se actualizaron los criterios diagnósticos por **McDonald** y colaboradores, en los que se establecieron conceptos que aún perduran en el momento del diagnóstico: la diseminación en espacio: brotes clínicos o lesiones desmielinizantes que afectan a diferentes áreas del SNC^{96,97}, y la diseminación en tiempo (brotes clínicos o lesiones que se suceden en el tiempo)⁹⁸.

Cuadro 2. Criterios de Barkhof para la diseminación en el espacio

<p>Debe presentar tres de los siguientes:</p> <p>1 lesión captadora de gadolinio o 9 lesiones hiperintensas en T2</p> <p>1 lesión infratentorial</p> <p>1 lesión yuxtacortical</p> <p>3 lesiones periventriculares</p> <p>Una lesión en la médula espinal es equivalente a una lesión infratentorial</p> <p>Una lesión captadora de gadolinio en la médula espinal es equivalente a una lesión cerebral captadora de gadolinio</p> <p>Las lesiones de la médula espinal pueden sumarse a las lesiones cerebrales para alcanzar el número necesario de lesiones en T2</p>
--

Criterios de diseminación en el espacio originales de Barkhof. Se añaden tres últimas consideraciones en la interpretación de las lesiones desmielinizantes que aportaron los criterios modificados por Tintoré y colaboradores (cuadro procedente de Velasco, P. et al. Medicine 2000)

Los criterios de McDonald 2001 se han revisado a lo largo de estas dos décadas. La primera vez en el año 2005 por el equipo de **Polman**⁹⁹ con la validación de los criterios de resonancia de **Tintoré** y colaboradores¹⁰⁰. La siguiente vez en el año 2010 con el mismo grupo investigador¹⁰¹ e incorporando los nuevos criterios de diseminación en tiempo y espacio por resonancia de **Swanton** y colaboradores¹⁰², constituyendo los criterios diagnósticos más ampliamente utilizados en la práctica clínica.

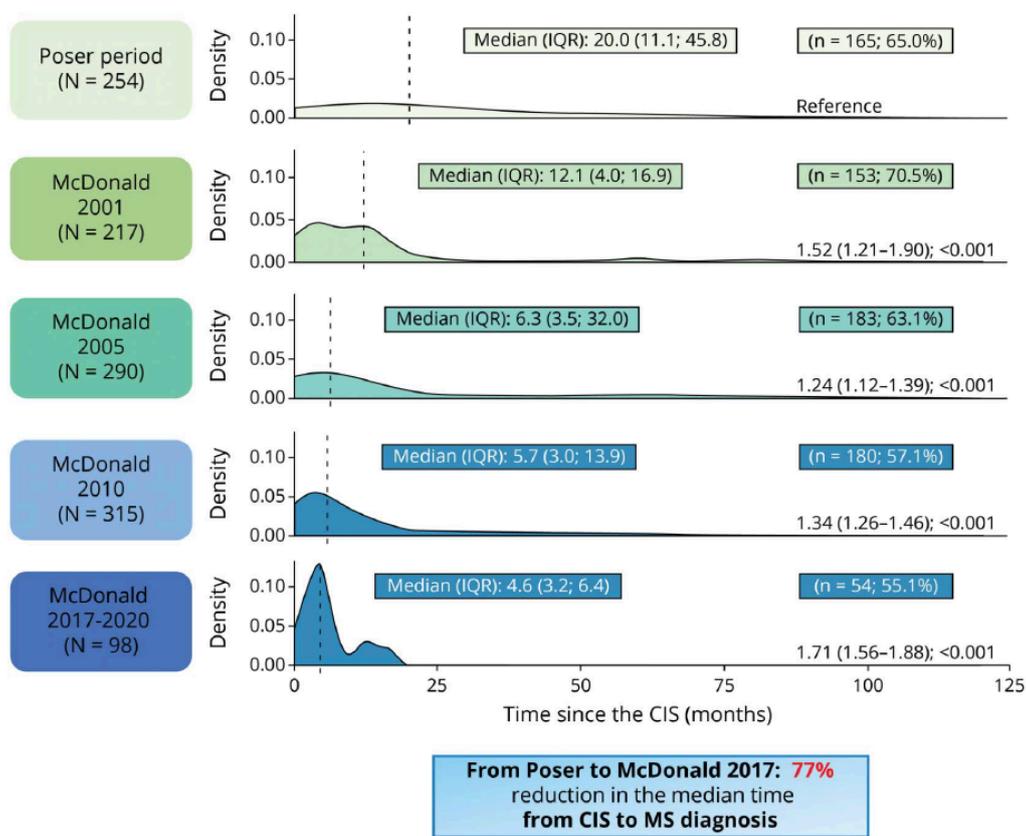
Recientemente, se han revisado los criterios McDonald optimizando el diagnóstico de EM por el grupo de **Thompson**¹⁰³ en el año 2017 y que constituyen los criterios diagnósticos en la actualidad (*ver cuadro 3*). A lo largo de las revisiones de los criterios diagnósticos de McDonald (2005, 2010 y 2017) se ha mejorado la sensibilidad para el diagnóstico de EM ante los primeros síntomas sugestivos de un primer evento desmielinizante.

Cuadro 3. Criterios diagnósticos de McDonald 2017 para esclerosis múltiple.

EMRR	Nº lesiones con evidencia clínica objetiva	Datos adicionales necesarios para el diagnóstico de EM
≥2 brotes clínicos	≥2	Ninguno
≥2 brotes clínicos	1 (además de la evidencia histórica de un brote anterior que afecte a una lesión en distinta localización)	Ninguno
≥2 brotes clínicos	1	DIS demostrado por: <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1 brote clínico adicional sugestivo de otra localización del SNC o, ✓ 1 o más lesiones T2 en RM localizadas en 2 o más áreas típicas de EM (PV, cortical o yuxtacortical, infratentorial y medular) <u>sin excluir las lesiones sintomáticas</u>
1 brote clínico	≥2	DIT demostrado por: <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1 brote clínico adicional o, ✓ Presencia simultánea de lesiones asintomáticas captantes de Gd y lesiones no captantes en cualquier momento o, ✓ 1 o más lesiones nuevas en T2 o captantes de Gd en una RM de cualquier momento con respecto a una basal o, ✓ Presencia de BOC en LCR
1 brote clínico	1	DIS + DIT
EMPP		
1 año de progresión de discapacidad (determinada de forma retrospectiva o prospectiva)		Presencia de ≥2 de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1 o más lesiones en T2 características en 1 o más regiones típicas de EM: PV, cortical o yuxtacortical o infratentorial (sin excluir las sintomáticas) ✓ 2 o más lesiones medulares en T2 (sin excluir las sintomáticas) ✓ Presencia de BOC en LCR

En el gráfico 6 se puede observar como el diagnóstico de EMRR mejora notablemente conforme a la actualización de los criterios diagnósticos McDonald, sobre todo ante los primeros eventos desmielinizantes (SCA o CIS) que alcanzan el diagnóstico inicial de EM clínicamente definida (EMCD) en un mayor porcentaje de casos, comparado los criterios de McDonald 2017 respecto al anterior de 2010¹⁰⁴.

Gráfico 6. Tiempo medio que transcurre desde el SCA hasta el diagnóstico de EM



En el gráfico se muestra el tiempo medio que transcurre desde el primer evento desmielinizante (síndrome clínico asilado) hasta el diagnóstico de EM según los diferentes criterios diagnósticos que ha habido a lo largo del tiempo (representados en diferentes colores). Las líneas discontinuas indican la mediana del tiempo desde el diagnóstico de CIS hasta el de EM. En la parte inferior derecha de cada periodo se muestra el riesgo de ser diagnosticado de EM según los criterios originales de Poser representado por Hazard Ratio (IC 95%). El rango intercuartílico (IQR): n = número de pacientes; porcentaje pacientes diagnosticados de EM sobre el total de pacientes de CIS incluidos en el periodo CIS. Gráfico de Tintoré, M. et al. Neurology 2021).

1.8 PRUEBAS COMPLEMENTARIAS DE EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA

1.8.1 Resonancia magnética

Las lesiones con características desmielinizantes sugestivas de EM tienen las siguientes particularidades: suelen localizarse en áreas del SNC típicas como la sustancia blanca periventricular (sobre todo a nivel posterior), el cuerpo caloso, pueden afectar a la corteza cerebral o al área yuxtacortical (unión cortico-medular), la región infratentorial, la médula espinal y el nervio óptico. Las lesiones corresponden a las placas de desmielinización y según sean agudas o crónicas se mostrarán con captación del contraste gadolinio en secuencia ponderada en T1 o no (*GEL o gadolinium enhancement lesion*). Las lesiones agudas pueden llegar a verse en la secuencia ponderada en T1, independientemente de si captan gadolinio o no. Estas lesiones en T1 se mostrarían hipointensas y traducen la fase de edema cerebral y desmielinización aguda de las placas desmielinizantes. Con el tiempo, irán disminuyendo en tamaño e intensidad de señal en T1. Por otra parte, es habitual encontrar lesiones hipointensas en T1 que se mantienen a lo largo de la evolución denominados agujeros negros (*black holes*, en inglés) que corresponden a las lesiones crónicas y reflejan el daño axonal irreversible del proceso anatomopatológico en la EM. En algunas placas crónicas puede persistir actividad inflamatoria en sus bordes, por lo que podrían mostrarse con captación de gadolinio (lesiones lentamente expansivas o *slowly expanding lesions -SELS-*). Habitualmente se muestran hiperintensas en secuencias de densidad protónica y T2, incluida la secuencia FLAIR (Fluid attenuated inversion recovery) o DIR (Double Inversion Recovery). Estas lesiones suelen ser múltiples y de pequeño tamaño (menores de 25 mm). Si se produce la confluencia entre varias lesiones pueden alcanzar tamaños mayores, al igual que si adoptan una morfología pseudotumoral¹⁰⁵. Las lesiones típicamente periventriculares suelen ser ovoideas, con el eje mayor perpendicular a los ventrículos laterales y en ocasiones pueden mostrar el <signo de la vena central> que traduce la afectación perivenular de la inflamación y desmielinización en la EM, que en la sustancia blanca periventricular se dispone perpendicular a las paredes ependimarias de los ventrículos (traducción radiológica de los <dedos de Dawson>. También son específicas las lesiones que rodean a las astas temporales de los ventrículos laterales. Las lesiones que afectan

al cuerpo calloso se disponen en la superficie subependimaria o en su periferia adquiriendo una disposición radial (hallazgo sensible y específico para EM). Las lesiones yuxtacorticales suelen afectar a las fibras en “U” de la sustancia blanca yuxtacortical de los lóbulos frontales¹⁰⁶. Recientemente se ha ampliado el número de áreas típicas de EM a las lesiones corticales, aunque son más difíciles de demostrar y requieren de una secuencia de doble inversión-recuperación (DIR) de RM 3T, que determina la supresión selectiva de señal tanto del LCR como de la sustancia blanca. En la EM no solo existe afectación de sustancia blanca y de forma retrógrada la sustancia gris o corteza cerebral, sino que hay una afectación primaria de la misma corteza cerebral por procesos inflamatorios y que determina el aumento progresivo de atrofia cerebral de estos pacientes¹⁰⁷.

Las lesiones en territorio infratentorial afectan preferentemente a la sustancia blanca de las superficie cisternal de la protuberancia, la región periacueductal, el núcleo de la oliva inferior, el núcleo del V y del VIII par craneal y el suelo del IV ventrículo (una situación más periférica que la disposición de las lesiones de origen isquémico). En el cerebelo se suelen distribuir en la sustancia blanca de las folias, los pedúnculos cerebelosos y alrededor del cuarto ventrículo. Y, por último, la afectación de la médula espinal también es frecuente localizándose alrededor del epéndimo, en ambas caras de la cisura anterior, en los cordones laterales y en los dorsales¹⁰⁸.

1.8.2 Biomarcadores.

1.8.2.1 Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Los hallazgos en el análisis bioquímico inicial del LCR de los pacientes con EM puede ser normal. La concentración de glucosa es normal. En la mayoría de pacientes la concentración total de proteínas es normal, aunque puede estar ligeramente elevada (leve hiperproteíorraquia) debido a la pequeña y transitoria disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) que ocurre durante la formación de la placa desmielinizante aguda. En la mitad de los pacientes puede haber un leve aumento de células (pleocitosis) aunque no debería sobrepasar las 50 células por μl . En estos casos habría que descartar otras patologías infecciosas del SNC como la infección por VIH¹⁰⁹. La mayoría de células corresponden a linfocitos T en

su mayoría y a un 10% de linfocitos B¹¹⁰. El cultivo bacteriano de LCR debe ser normal.

Con respecto a uno de los más importantes biomarcadores en la esclerosis múltiple encontramos la presencia de bandas oligoclonales (BOC) de IgG en la electroforesis del LCR de la mayoría de pacientes (95%). Este hallazgo traduce la presencia de la síntesis intratecal de anticuerpos por la activación inmune dentro del SNC. También se puede encontrar una elevación de la síntesis de inmunoglobulinas IgG en el 60-70% de los pacientes que se determina analizando el índice IgG en LCR/suero¹¹¹. Si este valor es superior a 0,7 traduce un incremento en la respuesta de linfocitos B intratecal¹¹². Las BOC tienen un valor predictivo negativo pretest del 88% en pacientes con su primer episodio desmielinizante (SCA) por lo que su negatividad debería plantearnos la reevaluación del proceso diagnóstico (constituye una bandera roja o *Red flag*)¹¹³. Sin embargo, la presencia de BOC no es patognomónica de la EM. Existen otras entidades nosológicas que pueden presentarlas como el lupus sistémico eritematoso (LES), la neurosífilis, la neuroborreliosis, los síndromes neurológicos paraneoplásicos, la meningitis aséptica, la neurosarcoidosis, la infección por VIH, el linfoma, otros tumores cerebrales, el síndrome de Sjögren, la encefalitis herpética, el síndrome de Morvan, las encefalitis autoinmunes, la neurotuberculosis, el síndrome anticardiolipina, la mielopatía por HTLV (virus linfotrópico T humano), las enfermedades priónicas, la esquistosomiasis, el síndrome de la persona rígida (*Stiff-person*), la neurocisticercosis, las vasculitis del SNC e incluso el síndrome de Guillain-Barré, entre otros¹¹⁴.

Por otro lado, se han detectado bandas oligoclonales de IgM en el 40% de los pacientes con EM, dentro de las cuales existen IgM que reconocen algunos lípidos de la mielina constituyendo las denominadas BOC IgM lípidoespecíficas. Se cree que tienen un papel pronóstico. Su presencia está relacionada con una mayor carga lesional en RM, la presencia de lesiones en T1 captantes de gadolinio, mayor tasa anualizada de brotes, peor respuesta al tratamiento con interferones y mayor atrofia cerebral¹¹⁵. Constituye un factor de riesgo de conversión de SCA a EM y de progresión de la discapacidad, por lo que algunos grupos las han asociado a un curso agresivo de la enfermedad¹¹⁶.

1.8.2.2 *Neurofilamentos de cadena ligera (NfL)*

Los neurofilamentos son proteínas estructurales del citoesqueleto implicadas en el transporte axonal y están formados por tres subunidades: la cadena ligera de neurofilamento (NfL), el neurofilamento intermedio (NfM) y el neurofilamento pesado (NfH)¹¹⁷. Aparecen elevados en el LCR de pacientes que sufren un daño axonal o neuronal¹¹⁸. También pueden detectarse en otras patologías como las enfermedades neurodegenerativas o los traumatismos del SNC¹¹⁹. Sin embargo, es un potente biomarcador en la evolución de los pacientes con EM ya que se ha comprobado que se eleva de forma significativa en LCR durante los brotes clínicos y la aparición de nuevas lesiones agudas con captación de gadolinio en la RM. Los NfL pueden disminuir e incluso normalizarse con el inicio de los tratamientos modificadores de la enfermedad¹²⁰. Esto se ha demostrado tanto para las formas recurrentes como para las formas progresivas. Estos neurofilamentos se pueden medir igualmente en suero, lo que facilita un uso extendido en la práctica clínica. Se le reconoce un papel pronóstico, se correlaciona con la actividad radiológica en la RM, el grado de discapacidad según la puntuación en la escala EDSS y el grado de atrofia cerebral. Además, es un factor de riesgo independiente para conversión de SCA a EM¹²¹.

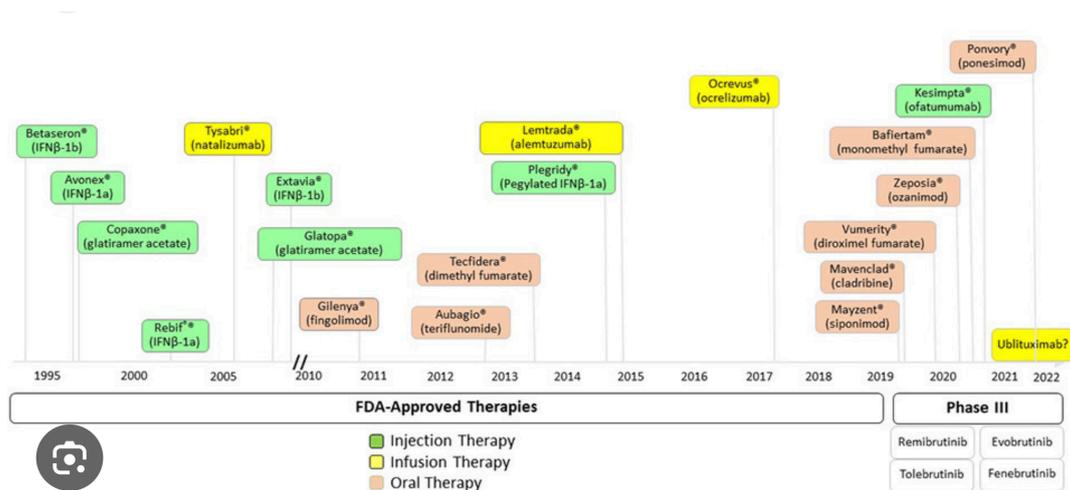
1.8.2.3 *Chitinasa-3-like-1 (CHI3L1)*

La chitinasa-3-like-1 (también llamada YKL-40) es otro nuevo biomarcador que corresponde a una glicoproteína sin actividad quitinasa secretada habitualmente por los monocitos, microglía y los astrocitos activados. Su acción biológica es desconocida y su ligando también, pero parece implicada en los procesos de modulación de la inflamación del SNC. Estudios recientes han demostrado que los niveles altos de chitinasa-3-like-1 en LCR y suero se relacionan con un mayor riesgo de conversión de pacientes con SCA a EM (factor de riesgo independiente) por lo que supone un marcador pronóstico. También se ha relacionado con un mayor riesgo de progresión de discapacidad. Asimismo, su concentración en LCR se relaciona con la presencia de deterioro cognitivo asociado a EM y está presente en las formas progresivas de la enfermedad^{122,123}. Al igual que ocurre con los neurofilamentos de cadena ligera, disminuye su concentración si se inicia un tratamiento modulador de la enfermedad como natalizumab o mitoxantrona^{124,125}.

1.9 TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La investigación en los tratamientos de la esclerosis múltiple se ha multiplicado en las últimas dos décadas. Hemos pasado de una época en la historia de la EM en la que solo era posible confirmar la aparición de los brotes clínicos y administrar el tratamiento con bolos de metilprednisolona (corticoides) intravenosos a una nueva era de fármacos que son capaces de cambiar la historia natural de la enfermedad llamados tratamientos modificadores de la enfermedad (TME o DMT, del inglés *disease-modifying treatment*). El interferón beta 1b fue el primer TME con indicación para pacientes con EMRR que se comercializó en el año 1993^{126,127}.

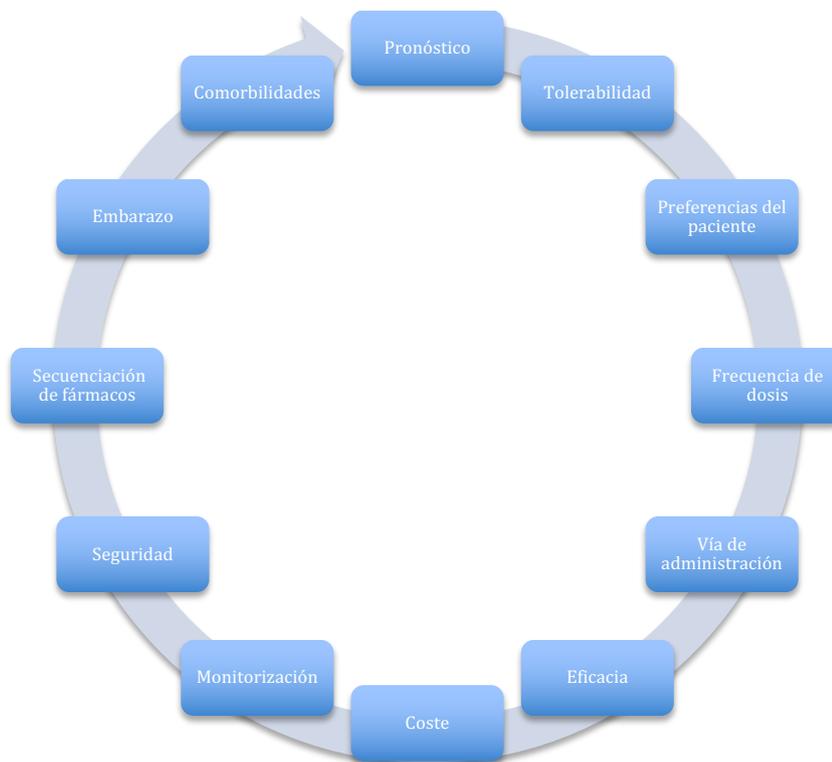
Figura 8. Cronología de la aprobación de los fármacos con indicación para pacientes con EM.



En el momento actual disponemos de muchas más opciones terapéuticas que hace tan solo una década. Debido a la aparición de nuevos fármacos con diferentes rangos de eficacia para controlar la actividad de la enfermedad, se ha propuesto una clasificación por el grupo alemán de expertos en EM en 3 categorías en función de la eficacia en reducir la tasa de brotes: categoría 1, que reduce la tasa de brotes entre un 30 y un 50% comparado con placebo. Aquí se engloban los primeros TMEs que aparecieron (interferones incluyendo el interferón pegilado, acetato de glatirámico) y otros más recientes (teriflunomida, dimetilfumarato). La categoría 2 incluye fármacos con una eficacia en reducir la tasa de brotes entre el 50 y 60% comparado con placebo como la cladribina y los inhibidores de la esfingosina 1

fosfato (S1P) como fingolimod. Por último, la categoría 3 que la forman los fármacos de alta eficacia con una reducción de más del 60% de la tasa de brotes comparada con placebo y de más de 40% comparada con los fármacos de la categoría 1. Se trata de natalizumab, alemtuzumab y los fármacos anti-CD20 como ocrelizumab y ofatumumab. A la hora de elegir el TME para un paciente en concreto, se intenta establecer un consenso con él valorando de forma individualizada todas sus características clínicorradiológicas, comorbilidades, condiciones sociosanitarias y predilecciones personales del paciente dentro de las opciones más adecuadas para cada caso¹²⁸.

Figura 9. Factores que influyen en la elección del tratamiento de la EM



1.9.1 Fármacos de eficacia de categoría 1

1.9.1.1 Interferones

Los interferones (IFN) son fármacos inyectables que surgieron por primera vez en el año 1993 con el interferón beta 1b (Betaferon® 0'25 mg subcutáneo a días

alternos) y más tarde, surgió el interferón beta 1a (Avonex® 30µg intramuscular, una vez a la semana, Rebif® 22µg y 44µg subcutáneo, tres veces a la semana). No se conoce el mecanismo de acción concreto pero se sabe que inhibe la proliferación de linfocitos T y la producción de IFN γ , disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1 y VLA-4), intensifica la función de los linfocitos Th2 supresores y aumenta la secreción de interleucinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10 y TGF- β)¹²⁹. Los interferones han demostrado una disminución de la tasa de brotes después de dos años de tratamiento comparado con placebo del 34% (IFN beta 1b), del 18% (Avonex®), del 27%(Rebif® 22µg) y del 33%(Rebif® 44µg)¹³⁰. Incluso demostraron una reducción del riesgo de progresión medido como el tiempo hasta alcanzar una EDSS de 4 y 6 así como el riesgo de conversión a EMSP¹³¹. Aunque no suelen provocar efectos adversos graves, los pacientes suelen referir efectos adversos a nivel local por la inyección (enrojecimiento, prurito, nódulos subcutáneos) y a nivel sistémico fatiga y síndrome pseudogripal que consiste en un conjunto de síntomas como fiebre, escalofríos, mialgias y fatiga. Suele ser autolimitado y aparece a las horas de la administración. Mejora con paracetamol o antiinflamatorios y suele disminuir con el tiempo, pero ha sido una importante causa de retirada de tratamiento por parte del paciente¹³².

1.9.1.2 Acetato de glatirámero

El acetato de glatirámero (Copaxone® 20 mg subcutáneo diario o 40 mg tres veces a la semana) se introdujo en el año 1996. Entre sus efectos biológicos destacan la inducción de la respuesta de linfocitos T anti-inflamatoria, que es competidor de la proteína básica de la mielina en su unión a los linfocitos T activados y el incremento de la producción de interleucinas antiinflamatorias (IL-10, IL-4, IL-6). Este fármaco reduce en un 28% la tasa anualizada de brotes. Entre los efectos adversos más frecuentes destaca el flushing facial y las palpitaciones. Este fármaco no provoca el síndrome pseudogripal, por lo que durante años fue la terapia de sustitución de los IFN que debían ser retirados por este efecto adverso¹³³.

1.9.1.3 Teriflunomida

La teriflunomida (Aubagio® 14 mg vía oral a diario) fue aprobada en el año 2013. Se trata de un inhibidor selectivo y reversible de la enzima mitocondrial dihidroorotato deshidrogenasa, que participa en la síntesis de novo de las pirimidinas, nucleótido necesario para la rápida expansión de los linfocitos T y B., lo que le confiere un efecto citostático. En el ensayo fase III contra placebo (acetato de glatirámero) determinó una reducción de la tasa anualizada de brotes del 31%¹³⁴. Entre los efectos adversos destaca su teratogenicidad, por lo que en mujeres en edad fértil hay que evitar el embarazo con métodos anticonceptivos efectivos y programar el embarazo. Debido a que su mecanismo de eliminación es de forma mayoritaria a través de la glucuronidación con una baja tasa de eliminación en plasma, puede permanecer en sangre hasta alcanzar concentraciones muy bajas entre 8 y 24 meses. Para acelerar esta eliminación se puede administrar carbón activado o colestiramina¹³⁵.

1.9.1.4 Dimetil fumarato

El dimetil fumarato (DMF) comercializado bajo el nombre de Tecfidera® (240 mg vía oral dos veces al día) fue aprobado también en el año 2013. Se trata de un éster derivado del ácido fumárico que en condiciones fisiológicas actúa como intermediario del ciclo de Krebs. No se conoce bien su mecanismo de acción pero tiene efecto antioxidante, neuroprotector, antiinflamatorio e inmunomodulador, mediado por la activación de la transcripción del factor nuclear eritroide (Nrf2) que controla genes específicos que inducen la producción de sustancias antioxidantes, que disminuyen la aparición de radicales libres.

En el ensayo clínico fase III (CONFIRM) contra placebo demostró una eficacia en reducir la tasa de brotes anualizada con una reducción relativa del 53%, el riesgo relativo de progresión de la discapacidad a las 12 semanas en un 38% y redujo en un 90% el número de lesiones en T1 que captaban contraste en resonancia, comparado con placebo (acetato de glatirámero). Sus efectos adversos más frecuentes son los síntomas gastrointestinales con dolor gástrico y diarrea, el flushing facial y el aumento relativo de infecciones por linfopenia¹³⁶. Hay que destacar que durante su administración en la práctica clínica habitual (postcomercialización) se han detectado 9 casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) hasta la fecha de enero de 2020 de entre más de 445.000 pacientes

en el mundo. La LMP es una infección del SNC potencialmente grave, debida a la reactivación del virus John Cunningham (VJC) en situaciones de inmunodepresión del SNC. En su mayoría, eran pacientes que presentaron linfopenia severa grado 3 mantenida bajo el tratamiento con DMF. La incidencia de LMP en pacientes tratados con este fármaco se ha estimado en 0,02/1000 pacientes, siendo 3 veces menor que fingolimod y 100 veces menor que natalizumab (NTZ), el fármaco con el que más se ha relacionado esta complicación infecciosa y que incluso obligó a detener su ensayo clínico por el aumento de casos entre los pacientes tratados¹³⁷. Recientemente, se ha comercializado un fármaco similar llamado Vumerity® (462 mg 2 veces al día) cuyo profármaco se llama fumarato de diroximel y que se transforma a la misma forma activa que el DMF: el monometil fumarato, por lo que comparten el mismo mecanismo de acción presentando una menor tasa de efectos adversos gastrointestinales y de rubefacción en la piel¹³⁸.

1.9.2 Fármacos de eficacia de categoría 2

1.9.2.1 *Moduladores del receptor de la esfingosina 1-fosfato*

Estos fármacos modulan la acción del receptor de la esfingosina 1-fosfato (S1P) que previene la salida de los linfocitos localizados dentro de los ganglios linfáticos, lo que genera una linfopenia relativa en plasma. Fingolimod fue el primer fármaco oral aprobado para la EM y sucedió en 2009 con el nombre comercial de Gilenya® (0,5 mg vía oral a diario). En el ensayo clínico fase III (FREEDOMS) demostró una reducción de la tasa anualizada de brotes del 54% con respecto a placebo, una menor probabilidad de progresión de la discapacidad a 3 meses del 17.7% y una mayor proporción de pacientes libres de nuevas lesiones en T1 con captación de gadolinio durante el seguimiento de 2 años (89.7% vs. 65.1% en el grupo de placebo; $p < 0.001$). Entre los efectos adversos más significativos se encuentran la bradiarritmia durante las primeras horas o días después de la primera dosis de fingolimod con un descenso medio de 12-13 lpm. En algunos casos se ha detectado la presencia de bloqueos auriculoventriculares, lo que obligó a indicar la monitorización cardíaca durante las primeras 6 horas desde su primera administración. En segundo lugar, se produce una linfopenia relativa en plasma que puede llegar a ser severa (< 200 linfocitos) lo que obligaría a suspender el

fármaco. Esta linfopenia es el origen del aumento de riesgo de infecciones en los pacientes tratados, sobre todo de infecciones por el virus herpes y virus varicela-zoster¹³⁹. Por otro lado, se han descrito casos de edema macular sobre todo en pacientes con antecedentes de uveítis y diabetes mellitus. Se han descrito igualmente aumento del riesgo de desarrollar cáncer de cérvix por reactivación del virus del papiloma humano y de carcinoma basocelular, lo que obliga a una estrecha vigilancia¹⁴⁰.

Finalmente, se han descrito dos efectos de gran importancia: el aumento de casos de LMP durante el tratamiento. Se han descrito un total de 24 casos de LMP de entre todos los pacientes que han recibido tratamiento con fingolimod al menos 2 años en una revisión reciente del año 2022¹⁴¹. En algunos casos están ligados al tratamiento previo con natalizumab en pacientes con presencia de anticuerpos anti-JC, que solía preceder al inicio de fingolimod en pacientes con alta actividad y que debía ser suspendido por el aumento de riesgo de desarrollo de LMP como describiremos a continuación. El otro efecto indeseado es el riesgo de rebote (rebound) tras la suspensión del tratamiento con fingolimod, en el que los pacientes presenta una reactivación de la enfermedad, con una actividad muy superior a la que presentaban justo antes de iniciar el tratamiento. Este fenómeno se produce también con mayor intensidad con la suspensión de natalizumab, un fármaco de alta eficacia de categoría 3¹⁴².

En los últimos años se han comercializado moduladores del S1P más selectivos (con gran afinidad para unirse en los subtipos 1 y 5 del receptor de la S1P, fingolimod actúa en los cinco subtipos de receptores) para disminuir los efectos a nivel cardiovascular. Se trata del siponimod (Mayzent® 0,25 mg vía oral a diario) con indicación exclusiva para la EM secundariamente progresiva activa, y más recientemente el ponesimod (Ponvory®), selectivo para el subtipo 1 del receptor S1P¹⁴³; y el ozanimod (Zeposia® 0,92 mg vía oral a diario), selectivo para los subtipos 1 y 5 del receptor S1P¹⁴⁴. En éste último modulador del S1P se ha descrito un caso de LMP y recientemente se ha descrito un caso probable de efecto rebote publicado por neurólogos españoles.

1.9.2.2 *Cladribina*

La cladribina (Mavenclad®) es un análogo sintético de la desoxiadenosina (2-clorodesoxiadenosina) que tiene función inmunosupresora perteneciendo al grupo

de quimioterápicos por tener función antimetabolito. Es un profármaco que ingresa en las células a través de proteínas transportadoras, transformándose en su forma activa, el trifosfato de 2-clorodesoxiadenosina. El cambio molecular que posee (sustitución de un átomo de hidrógeno por uno de cloro en el anillo purínico) le hace resistente a la acción de la enzima adenosina desaminasa que impide la acumulación tóxica intracelular de las formas fosforiladas de los nucleósidos purínicos. El fármaco es ciertamente selectivo con las células del sistema inmune (linfocitos B y T, además de las células dendríticas) porque poseen más actividad de la enzima que produce dicha fosforilación (desoxicitidina cinasa) y menos de la enzima 5'-nucleotidasa que cataliza la conversión de la desoxiadenosina fosforilada a su forma original. Al inhibir su degradación, se produce la apoptosis celular, generando una depleción rápida y prolongada sobre todo de los linfocitos B, y en menor medida los linfocitos T (sobre todo los CD8+) que puede durar más de 10 meses tras la última administración. Otras células del sistema inmune innato no se casi afectadas, por lo que existe menos riesgo de inmunosupresión. Posteriormente, se produce una recuperación gradual de parte de los linfocitos al final de cada ciclo y una recuperación prácticamente total del recuento total de los linfocitos desde el final del segundo año de tratamiento. Este mecanismo de acción, la reconstitución inmune, se basa en depleccionar la población de linfocitos B y T autoreactivos con una posterior repoblación de linfocitos formados de novo que teóricamente no tendrían que generar la misma respuesta autoreactiva que los iniciales que es la clave de la generación de la enfermedad¹⁴⁵.

Aunque se realizaron varios ensayos clínicos fase II con cladribina intravenosa y subcutánea, no fue hasta el estudio CLARITY fase III donde se estableció la eficacia y la seguridad de la cladribina oral. En él se determinó una reducción relativa de la tasa anualizada de brotes del 57,6% para la dosis acumulada de cladribina de 3,5 mg/kg. Asimismo, el fármaco mostró una reducción del riesgo de progresión establecida y confirmada a los 3 meses del 33%. Finalmente, se estableció una eficacia a nivel radiológico con una reducción en la aparición de nuevas lesiones en T1 con captación de gadolinio del 85,7%. En este ensayo clínico se reflejó una linfopenia como efectos adverso esperable por el propio mecanismo de acción que llegó a ser de grado 3 y 4 en el 25,6% de los pacientes. Sin embargo, solo se incrementaron las infecciones por virus herpes zóster con respecto a placebo¹⁴⁶.

Finalmente no fue hasta el año 2017 cuando recibió la aprobación de la EMA. En ficha técnica se establece el tratamiento en dos ciclos separados por un año con una dosis de 1,75 mg/kg por año (en total, 3,5 mg/kg). Cada curso de tratamiento consiste en dos semanas de tratamiento, una al inicio del primer mes y otra al inicio del segundo mes de cada año de tratamiento. La dosis que recibe el paciente en cada semana de tratamiento consiste 10 mg o 20 mg (uno o dos comprimidos de cladribina oral) en dosis diaria única durante cuatro o cinco días¹⁴⁷.

1.9.3 Fármacos de eficacia de categoría 3

1.9.3.1 Natalizumab

Natalizumab (NTZ) fue el primer fármaco de alta eficacia comercializado con el nombre de Tysabri® para los pacientes con EM en el año 2006. Consiste en una infusión intravenosa de 300 mg de NTZ. Se trata de un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que actúa contra la α -4- β 1-integrina, que inhibe selectivamente la interacción de los linfocitos con su receptor análogo, la molécula de adhesión VCAM-1 localizado en las células endoteliales que configuran la BHE, impidiendo su ingreso en el SNC¹⁴⁸. En el ensayo clínico fase III AFFIRM demostró la reducción relativa en la tasa de brotes de un 68% contra placebo. También redujo el riesgo acumulado de progresión de la discapacidad durante los dos años de tratamiento que duró el ensayo del 42% con respecto al placebo. En cuanto a los resultados de actividad en resonancia, redujo el número de nuevas lesiones en T1 que captaban gadolinio en un 92% frente a placebo. Además, disminuyó el número de lesiones tipo black holes en un 76% con respecto a placebo¹⁴⁹. Los ensayos con NTZ fueron suspendidos por la aparición de los primeros casos de LMP. Fue el primer fármaco con el que se relacionó significativamente con el riesgo de desarrollar LMP. El riesgo aumentaba exponencialmente en los pacientes que habían tenido contacto con el virus JC y presentaban anticuerpos contra él. Más tarde se ha visto que aunque el virus JC es muy ubicuo y hasta el 50-60% de la población general ha tenido contacto con él, no es sino después de mutaciones genéticas que le confieren la capacidad de introducirse y acantonarse en el SNC. Cuando se produce una situación de inmunodepresión severa del SNC es cuando se reactiva sin control produciendo la enfermedad. El riesgo de sufrir LMP se ha estratificado en varios niveles según el título de anticuerpos anti-JC. Los pacientes

seronegativos tienen un riesgo de <1/10.000 casos. No es completamente de 0 debido a que el test puede dar un falso negativo, que el paciente tenga títulos justo en el umbral de la detección y que pueda dar resultados discordantes según el momento de su realización o que el paciente presente una seroconversión durante el tratamiento. Hoy en día, el riesgo se reestratifica tras una medición de anticuerpos anti-JC cada 6 meses¹⁵⁰.

Además, NTZ también es el primer fármaco con el que se describió el fenómeno de rebote tras el cese del tratamiento. Reaparece a los pocos meses de su interrupción una actividad de la enfermedad en grado superior a la que tenía basalmente antes del tratamiento. Para evitarlo, habría que iniciar un siguiente TME incluso antes de la finalización del periodo de lavado que estipula el NTZ en ficha técnica. Habitualmente se realiza a los 2 meses de la suspensión de NTZ¹⁵¹.

1.9.3.2 *Alemtuzumab*

Alemtuzumab (Lemtrada®) es un anticuerpo monoclonal humanizado que actúa contra el receptor CD52+ que se expresa en los linfocitos T y B maduros, pero no en los precursores linfoides, y apenas en los granulocitos, por lo que se produce una rápida e intensa depleción de los linfocitos que circulan en sangre periférica y en parte de los que se sitúan en los órganos linfoides secundarios. La lisis de los linfocitos se produce bien por acción del complemento bien por lisis mediada por anticuerpos. Se produce después una reconstitución de las poblaciones linfocitarias donde se genera una reprogramación con un aumento del ratio de células reguladoras frente a las efectoras¹⁵².

Con respecto a la forma de administración se trata de una infusión intravenosa de Alemtuzumab (12 mg/día) que se administra durante 5 días consecutivos el primer año (dosis primer ciclo: 60 mg) y 12 meses después se administra otro ciclo de 3 días consecutivos (dosis segundo ciclo: 36 mg). Si posteriormente los pacientes presentan reactivación de la actividad de la EM se puede administrar hasta dos ciclos más de tratamiento. En el ensayo clínico fase III (CARE-MS I) contra placebo consiguió una reducción de la tasa anual de brotes en un 54,9%. Sin embargo, durante los 5 años de seguimiento Alemtuzumab consiguió que el 75,1% de los pacientes se mantuvieron libres de progresión de la discapacidad e incluso el 42,9% mostró mejoría de su puntuación EDSS y el 90%

consiguió mantenerse libre de presentar nuevas lesiones en T1 con captación de gadolinio¹⁵³. Con respecto a la tolerabilidad, el fármaco provocó reacciones durante la infusión en el 90% de los casos. Se relacionó con un riesgo muy aumentado de infecciones (debido a la depleción linfocitaria) que se reportaron en un 66-77% (según el ensayo clínico de referencia: CAMMS223, CARE-MS I y II) a lo largo de los 5 años de seguimiento según el ensayo clínico de alemtuzumab de referencia. Se estableció que durante el primer mes después de un ciclo de tratamiento los pacientes debían recibir profilaxis contra el virus herpes con aciclovir vía oral. A pesar del mecanismo de acción en el que se intenta disminuir la presencia de linfocitos autoreactivos que provocan la EM, en los ensayos clínicos se detectaron un alto número de trastornos autoinmunes. Desde alteraciones tiroideas (26, 16 y 18%, según el ensayo) a glomerulonefritis autoinmunes (0,3%) pasando por casos de púrpura trombocitopénica inmune entre un 1 y un 1,9% (según el ensayo)¹⁵⁴. Finalmente, en el año 2019 se emitió una alerta desde los organismos reguladores por nuevos casos de hepatitis autoinmune con desenlace mortal, eventos cardiovasculares con una relación temporal estrecha con la infusión de alemtuzumab como hemorragias pulmonares alveolares, infartos de miocardio, ictus y disección arterial cervicocefálica. Por este motivo, se estableció que Alemtuzumab solo podría indicarse de forma seleccionada en pacientes que hubieran sufrido el fracaso de dos o más TMEs¹⁵⁵.

1.9.3.3 *Anticuerpos monoclonales con efecto anti-CD20*

El primer fármaco biológico que se empleó en la EM fue el Rituximab (MabThera®). Sin embargo, nunca ha tenido indicación formal para la misma. Se trata de un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano que actúa contra el receptor CD20 que se encuentra en la membrana de los linfocitos B desde el estadio pre-B hasta el linfocito B maduro. No afecta a sus precursores ni a las células plasmáticas por lo que no afecta la inmunidad humoral preexistente. Se trata de una infusión intravenosa que se administra cada 6 meses en dosis de 500-1000 mg en dosis única, salvo el primer ciclo, que se administra el primer día 1000 mg iv y 14 días después una segunda dosis de 1000 mg. Rituximab consiguió en un ensayo clínico fase II (HERMES) una reducción relativa del número de nuevas lesiones en T1 con captación de gadolinio del 91% así como una reducción significativa de la tasa anualizada de brotes (tras 24 semanas postratamiento) en el grupo tratado era

de 0,37 frente a 0,84 del grupo placebo¹⁵⁶. Este fármaco también fue ensayado para los pacientes con EM primaria progresiva (OLYMPUS) que fue negativo para conseguir el objetivo primario (retrasar el tiempo hasta la confirmación de progresión de discapacidad) pero que en el estudio por subgrupos se observó que sí que se retrasaba la progresión en los pacientes más jóvenes (<51 años) y con presencia de lesiones en T1 con captación de gadolinio¹⁵⁷. Durante los ensayos clínicos y los estudios observacionales existentes (rituximab ha sido un fármaco administrado fuera de indicación en ficha técnica de forma frecuente en aquellos pacientes con alta actividad o con formas progresivas activas que no respondían a otras terapias o bien cuando no existían otras terapias para este grupo de pacientes. Tras OLYMPUS no se intentó ningún ensayo fase III con Rituximab¹⁵⁸. Sin embargo, se realizaron ensayos clínicos con otro fármaco con acción anti-CD20: el ocrelizumab.

El ocrelizumab (Ocrevus®) fue el primer fármaco que ha demostrado eficacia en reducir el tiempo hasta la confirmación de progresión confirmada en pacientes con EM primaria progresiva. Por este motivo, antes de su comercialización a finales de 2018, fue posible administrarlo en pacientes seleccionados de EMPP ya que hasta entonces no existían tratamientos eficaces en esta forma de enfermedad eminentemente neurodegenerativa. El fármaco se administra en forma de infusión intravenosa de 600 mg cada 6 meses salvo el primer ciclo que se administran dos dosis de 300 mg separadas por dos semanas¹⁵⁹. Se realizaron ensayos clínicos en fase III (OPERA I y II) para pacientes con formas recurrentes en el ocrelizumab demostró eficacia en reducir la tasa anualizada de brotes en un 46% contra placebo y el número de nuevas lesiones con captación de gadolinio en un 94%¹⁶⁰. En el ensayo clínico fase III (ORATORIO) para pacientes con EMPP consiguió demostrar una reducción significativa del riesgo relativo de progresión de la discapacidad confirmada a las 12 semanas del 24% y del 25% con respecto a la progresión confirmada a las 24 semanas¹⁶¹, en comparación con placebo. De entre los efectos adversos más frecuentes que se han reportado en un estudio observacional multicéntrico realizado en nuestro medio fueron las reacciones relativas a la infusión que disminuyeron en las infusiones sucesivas (22,3 % en la primera infusión, 11,7 % en la segunda infusión y 7,3%% las siguientes). Al ser un anticuerpo monoclonal humanizado, los efectos adversos relacionados con la infusión son menores que con rituximab. Otro efecto adverso frecuente fueron las

infecciones entre las que se encontraron las infecciones urinarias, las respiratorias y la COVID19, en orden de frecuencia. No se detectaron otros efectos adversos significativos¹⁶².

Recientemente se ha comercializado un nuevo fármaco con acción anti-CD20, el ofatumumab, un anticuerpo monoclonal completamente de origen humano, de tipo inmunoglobulina IgG1, que se administra por vía subcutánea y cada jeringa precargada contiene 20 mg. Se pauta una dosis semanal las semanas 0, 1 y 2 y a partir de la semana 4 las dosis se administran mensualmente. En el ensayo clínico fase III (ASCLEPIOS) frente a placebo (teriflunomida) se demostró una reducción relativa de la tasa anualizada de brotes del 50%, un retraso en la adquisición de progresión confirmada a los 6 meses del 46% y un descenso de la probabilidad de presentar progresión no asociada a brotes (fenómeno PIRA) del 56%. Por otro lado, consiguió reducir la aparición de nuevas lesiones en T1 con captación de gadolinio en un 95% comparado con el brazo placebo. Con respecto a los efectos adversos sobre todo los sujetos manifestaron reacciones del lugar de la inyección e infecciones, aunque la proporción entre el brazo de ofatumumab y el brazo comparador (teriflunomida) fue similar¹⁶³.

Por último indicar que, de entre todas las terapias sin aprobación para esclerosis múltiple que se han intentado (inmunosupresores como azatioprina, anticuerpos monoclonales como rituximab, etc) el que tiene más impacto en la vida de los pacientes es el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. Consiste en la movilización de células madre de la sangre periférica con la administración de ciclofosfamida 4 g/m² con una única dosis, y posteriormente con factor estimulante de colonias de granulocitos a diario hasta recolectar las células. Después, los pacientes se someten a un régimen de acondicionamiento de los siguientes fármacos quimioterápicos: BCNU, Etopósido, Arabinósido de citosina, Melfalán y Timoglobulina de conejo (fase ablativa). Posteriormente se procede a la repoblación linfocitaria con las células madre de sangre periférica del propio paciente. En este reacondicionamiento del sistema inmune del paciente se busca, como hemos explicado para otras terapias como alemtuzumab o cladribina, que surgan nuevos linfocitos que no sean autoreactivos y así disminuir la actividad de la enfermedad. No se ha demostrado que sea curativo. Debido a la significativa morbimortalidad que presenta este procedimiento (efecto mieloablativo), solo se realiza en determinados pacientes con un curso muy agresivo de la enfermedad

tanto en formas recurrentes como en EMSP, que no han respondido a otras terapias. En un estudio español que recoge la experiencia de dos centros de referencia para el tratamiento de la EM con 38 pacientes. No se produjo ningún fallecimiento. Entre los efectos adversos más frecuentes reportados en el estudio se encuentra la toxicidad gastrointestinal en un 63,1 %, seguida de toxicidad cutánea (47,3 %). El 55,2% presentaron síntomas de enfermedad injerto contra huésped. Además, se detectaron 3 neoplasias de órgano sólido con una mediana de tiempo de aparición desde el trasplante de 5,1 años. En cuanto a la eficacia, la tasa anualizada de brotes presentó una reducción relativa del 92% en el segundo año tras el trasplante. Con respecto a los pacientes con EMRR el 60% mejoró el grado de discapacidad y el resto no presentó empeoramiento durante los 7 años de seguimiento postrasplante. Ninguno de los pacientes con EMRR experimentó progresión confirmada de la discapacidad. Sin embargo, los pacientes con EMSP permanecieron estables durante el primer año postrasplante pero continuaron empeorando progresivamente a lo largo del seguimiento. En cuanto a la actividad radiológica, solo 2 pacientes presentaron nuevas lesiones en la RM de control tras cinco años de seguimiento¹⁶⁴.

A lo largo de la historia de la EM se ha advertido una notable mejoría en el pronóstico de los pacientes conforme se han ido introduciendo nuevas terapias modificadoras de la enfermedad. Otro factor igual de importante que ha influido notoriamente es la actualización y optimización de los criterios diagnósticos de la EM. Un mejor diagnóstico, cada vez más precoz en la historia natural de la enfermedad, junto con la individualización del tratamiento de cada paciente, en la que se escogen cada vez antes tratamientos de alta eficacia, consigue que un alto porcentaje de pacientes consigan la situación de NEDA (del inglés, *no evidence of disease activity*) para conseguir un estado de ausencia de actividad inflamatoria y ausencia de progresión de la discapacidad.

Gráfico 7. Algoritmo terapéutico propuesto para la elección individualizada del tratamiento modificador de la enfermedad en la EM (de Rotstein, D and Montalban, X. Nat. Rev. Neurol. 2019)

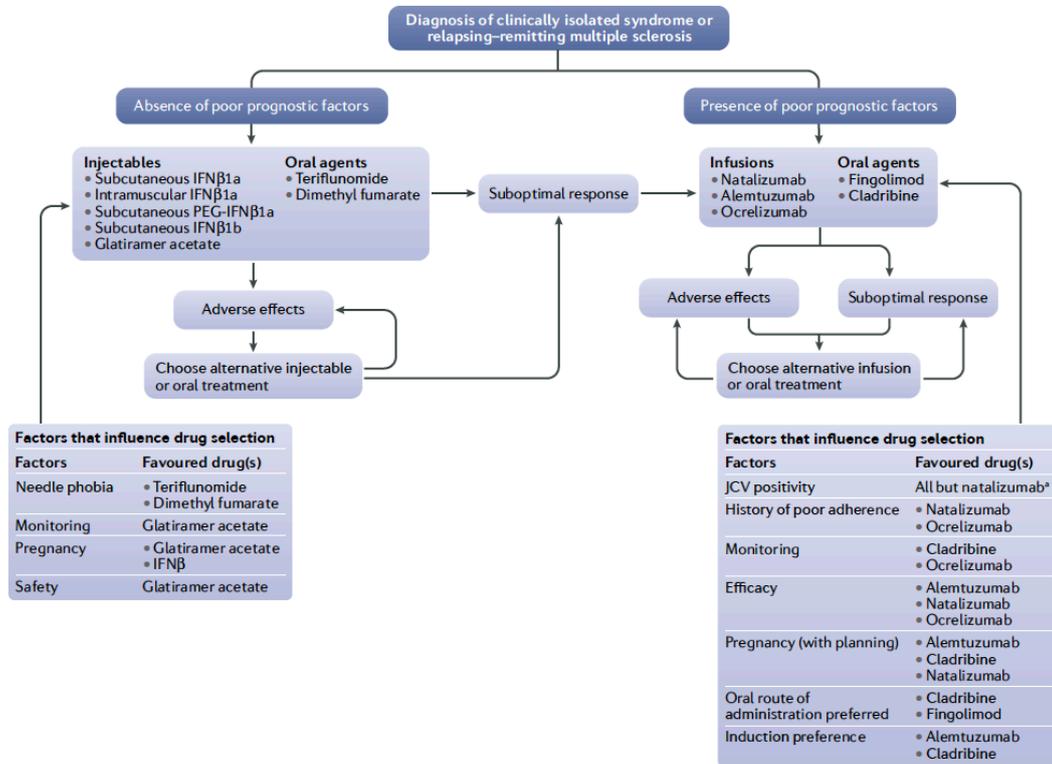
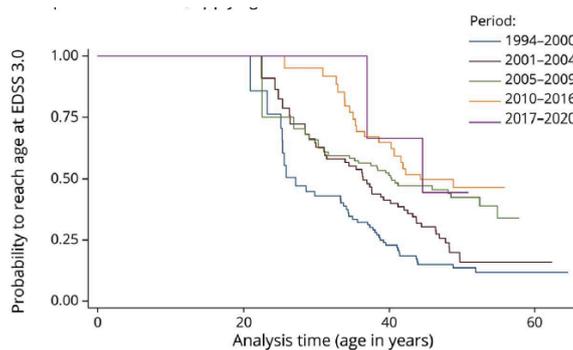


Gráfico 8. Diferencias en el pronóstico según el periodo de tiempo en el que se realiza el diagnóstico



Curvas de Kaplan-Meier que reflejan la proporción de pacientes que, siendo diagnosticados de síndrome clínico aislado según los criterios McDonald 2017, se mantendrían libres de alcanzar una EDSS de 3.0 puntos, en función del periodo de tiempo en el que se realizó el diagnóstico de EM. Las líneas de “supervivencia” se muestran en un código de color según cada periodo de tiempo. Este gráfico refleja la mejoría indudable en el pronóstico de los pacientes no solo por la mejora en el diagnóstico sino también a la introducción de nuevos fármacos eficaces para la EM (de Tintoré et al. Neurology 2021)

II – MARCO TEÓRICO

2 MARCO TEÓRICO

LA MICROBIOTA INTESTINAL

2.1 GENERALIDADES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

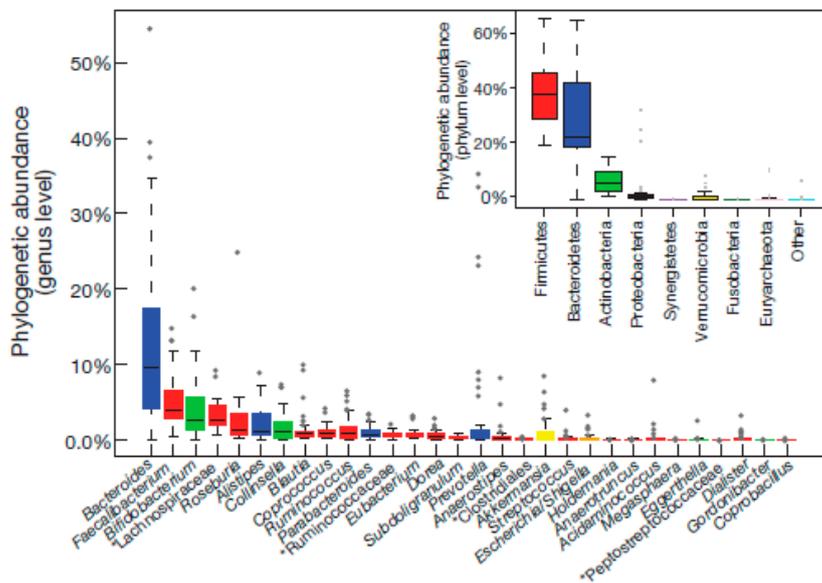
La microbiota de los seres humanos se localiza en el sistema digestivo (en especial, en el colon), en la piel y otras mucosas como la del aparato genitourinario. En total se calcula que existen más de 100 billones (10^{14}) de bacterias en nuestro organismo, unas 10 veces más que el número total de células propias¹. Existen más de 400 especies bacterianas descritas que componen la microbiota intestinal. También se compone de otros organismos como los hongos eucariotas, el reino archa y los virus. Teniendo en cuenta la proporción de cada componente en la microbiota intestinal, en orden descendente se correspondería con 92.9%, 0.5%, 0.8% y 5.8%, respectivamente¹⁶⁵.

En el momento de nuestro nacimiento no estamos colonizados por estos microorganismos (el útero es un medio estéril). Es, a través del canal del parto o de la piel, en el caso de una cesárea, cuando el intestino del recién nacido se coloniza por los microorganismos procedentes de la microbiota de la madre¹⁶⁶. Según el modo del nacimiento, predomina inicialmente los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, si nacen a través de un parto vaginal, o *Clostridium* y *Enterobacteriaceae* si nacen por cesárea¹⁶⁷. Se realizó un estudio de la composición de la microbiota intestinal de recién nacidos denominado INFANTMET en función de la edad gestacional en el momento del nacimiento (pretérmino/a término) y el modo del nacimiento (parto vaginal/cesárea). Los hallazgos mostraron que la biodiversidad de la microbiota intestinal en las primeras semanas en los recién nacidos a término era la más alta y que la de los pretérmino nacidos por parto vaginal tenían la biodiversidad más baja. A lo largo del tiempo la biodiversidad aumenta, igualándose en la semana 24 en todos los grupos. El estudio de la composición de la microbiota en la semana 1 determinó que los nacidos vía vaginal tenían una alta proporción de *Bacterioides*, y en concreto del género *Bifidobacterium* (éste último no

fue estadísticamente significativo) en comparación con los nacidos por cesárea, que al igual que los recién nacidos pretérmino que presentaban un predominio de Firmicutes. En este grupo también existía una mayor proporción de *Proteobacteria* en comparación con los recién nacidos a término. También se demostró que la lactancia materna prolongada más de 4 meses influye significativamente en la composición de la microbiota de los recién nacidos por cesárea¹⁶⁸.

La microbiota intestinal no es constante y cambia a lo largo del tiempo. En los primeros meses de vida en los que la alimentación del recién nacido es por lactancia predominan numerosas bacterias fermentadoras de hidratos de carbono (*Bacteroides*, *Prevotella* y *Clostridium cluster XIV*)¹⁶⁹. En la infancia predomina el género *Bifidobacterium* que irá disminuyendo a lo largo de la vida. Especies bacterianas como *E. rectale* son abundantes en la adolescencia y disminuyen en la vida adulta. El género *Bacteroides* van incrementándose a lo largo de la infancia y la adolescencia, hasta hacerse predominantes en la vida adulta¹⁷⁰.

Gráfico 9. Composición de la microbiota intestinal en el adulto sano.



Existen factores que condicionan cambios en la microbiota y que dependen en gran medida del estilo de vida y la dieta adoptada. La mayoría de personas tienen una microbiota que esencialmente se compone de los filum *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. El género más abundante es *Bacteroides*. La abundancia y riqueza en la biodiversidad de las especies bacterianas se relaciona con una buena situación de

salud. Por el contrario, las personas que presentan enfermedades inflamatorias crónicas suele tener disminuida la biodiversidad microbiana⁷².

Mantenemos con la microbiota intestinal una relación mutualista en la que realiza algunas funciones no codificadas genéticamente de las que se beneficia el ser humano, entre las que destacan las funciones metabólicas, las inmunológicas y las relacionadas con el desarrollo del SNC, entre otros.

2.1.1 Función metabólica de la microbiota intestinal.

Las funciones principalmente metabólicas de la microbiota intestinal son: la facilitación de la absorción de nutrientes al metabolizar algunos componentes indigeribles de la dieta como la degradación de polisacáridos vegetales hasta ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato, el propionato o el acetato, que se postula están implicados en la modulación del sistema inmune; la participación en el metabolismo de algunos fármacos, antibióticos o productos bioactivos, condicionando su farmacocinética, así como el metabolismo del colesterol, la vitamina K y las vitaminas del grupo B por parte de algunas bacterias (género lactobacilli) así como el metabolismo de los ácidos biliares^{171,172}.

2.1.2 Función inmunológica de la microbiota intestinal.

2.1.2.1 Función de barrera intestinal

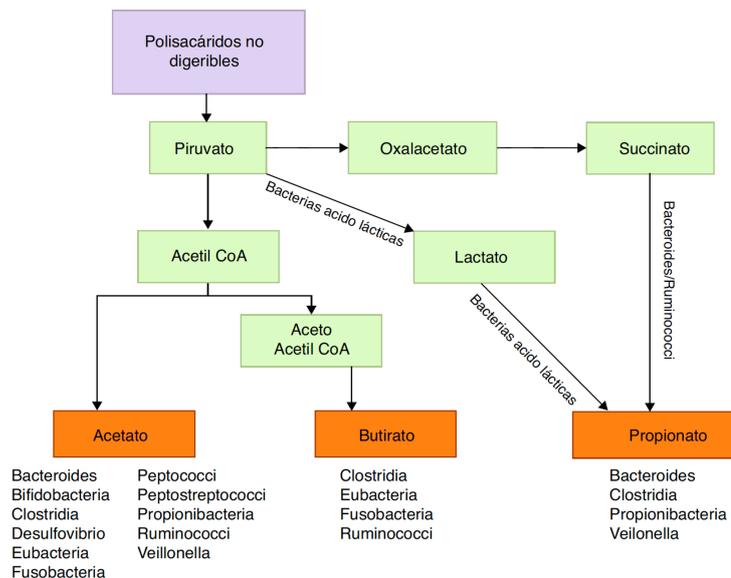
Recientemente, se ha reforzado su papel inmunológico, destacando varias funciones: evita la colonización de bacterias patógenas por medio de una acción competitiva con los nutrientes del lumen intestinal, genera sustancias con propiedades antiinflamatorias, participa en el mantenimiento de la integridad de la barrera de la mucosa intestinal e induce la síntesis de inmunoglobulina IgA por parte de los linfocitos B locales para limitar el acceso de bacterias patógenas dentro de los tejidos adyacentes¹⁷³. Se conoce que durante las infecciones entéricas participan diferentes componentes del sistema inmune, a destacar los receptores tipo toll (TLR) de los linfocitos T y los nucleótidos receptores similares al dominio de oligomerización (NOD). En este sentido, el ADN bacteriano de la microbiota intestinal es capaz de estimular directamente el receptor TLR9, induciendo una protección contra la colonización por parásitos¹⁷⁴. Por otro lado, los peptidoglicanos

derivados de las bacterias gramnegativas son reconocidos por el nucleótido intracelular NOD1 que favorece el aclaramiento por parte de los neutrófilos de las bacterias *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Son dos ejemplos de las funciones antibacterianas de la microbiota intestinal¹⁷⁵.

2.1.2.2 Modulación del sistema inmune.

La microbiota intestinal también modula la expresión de genes relacionados con el sistema inmune a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta, productos de la fermentación anaeróbica de los carbohidratos indigeribles de la dieta⁷⁸. Concretamente el butirato, regula la función de los linfocitos T reguladores (Treg), promueven el aumento de la síntesis de interleucinas antiinflamatorias (IL-10, IL-4), reducen la adherencia vascular de los linfocitos (mediada por VCAM-1) e inhiben la función del IFN- γ (proinflamatorio). Además, son la principal fuente de energía de las células que componen la mucosa intestinal por lo que contribuyen a mantener la barrera intestinal, pueden modular la expresión génica de genes que participan en el ciclo celular y promueven la hiperacetilación de las proteínas histonas y proteínas no histonas¹⁷⁶.

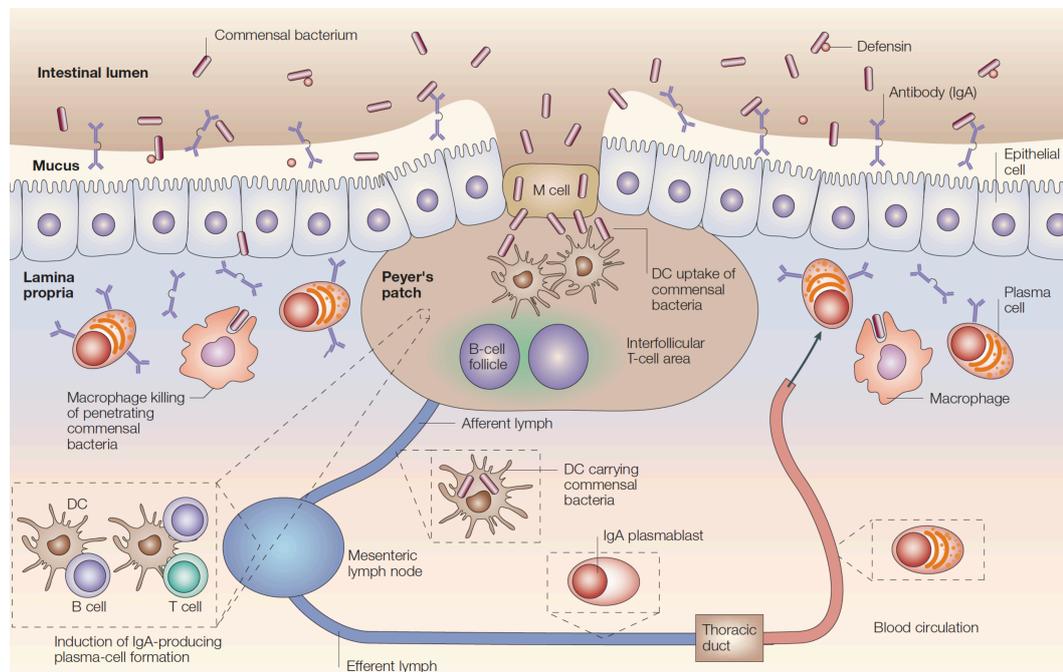
Figura 10. Vías metabólicas para la formación de ácidos grasos de cadena corta



La respuesta inmune comienza con los linfocitos T CD4+ naïve (aquellos que no han tenido ningún contacto con un antígeno) que salen del timo y se dirigen a la circulación periférica donde se pondrán en contacto con señales desarrolladas debido a la presencia de un antígeno. Al establecer contacto a través de las células presentadoras de antígenos continuará con su diferenciación y maduración. La respuesta inmune desarrollada contra antígenos intracelulares suele ser predominantemente respuesta Th1 y la que se forma contra antígenos extracelulares suelen ser las respuestas Th2 y Th17 que se encargarán de controlar la infecciones provocadas por microorganismos. Sin embargo, una respuesta incontrolada e indiscriminada conduce a patologías autoinmunes en el huésped como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) o la propia esclerosis múltiple¹⁷⁷.

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios en ratones para evaluar la influencia de la microbiota en la formación y el desarrollo del sistema inmune del huésped. Se ha comprobado que los ratones que nacen y se crían sin microbiota intestinal en un ambiente estéril, denominados ratones *GF* (del inglés, *germ-free*) tienen un menor desarrollo de su sistema inmunológico, en comparación con aquellos ratones que si que son portadores de una microbiota simple de una única cepa no patógena, llamados *SPF* (del término inglés, *specific-pathogen-free*). Los ratones *GF* presentan placas de Peyer (nódulos linfoides situados en la pared intestinal) hipoplásicas con menos centros germinales y reducción significativa del número de células plamáticas productoras de inmunoglobulina IgA así como una reducción del número de linfocitos T CD4+ en la lamina propia y en la región intraepitelial¹⁷⁸. La influencia sobre la formación del sistema inmune del huésped puede verse en otros órganos, como la relativa desestructuración del bazo y de los ganglios linfáticos con una deficiente formación de las zonas de linfocitos B y T¹⁷⁹. Además, expresan niveles más bajos de los receptores TLR, las moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) tipo II y determinan unos niveles bajos de inmunoglobulinas (hipogammaglobulinemia) a expensas sobre todo de la inmunoglobulina IgG¹⁸⁰. Estas anomalías pueden revertirse en los ratones *GF* si se colonizan con la microbiota de los ratones *SPF*, por ejemplo, manteniéndolos en convivencia en un mismo espacio¹⁸¹.

Figura 11. Relación entre la microbiota intestinal y la respuesta inmune del individuo.



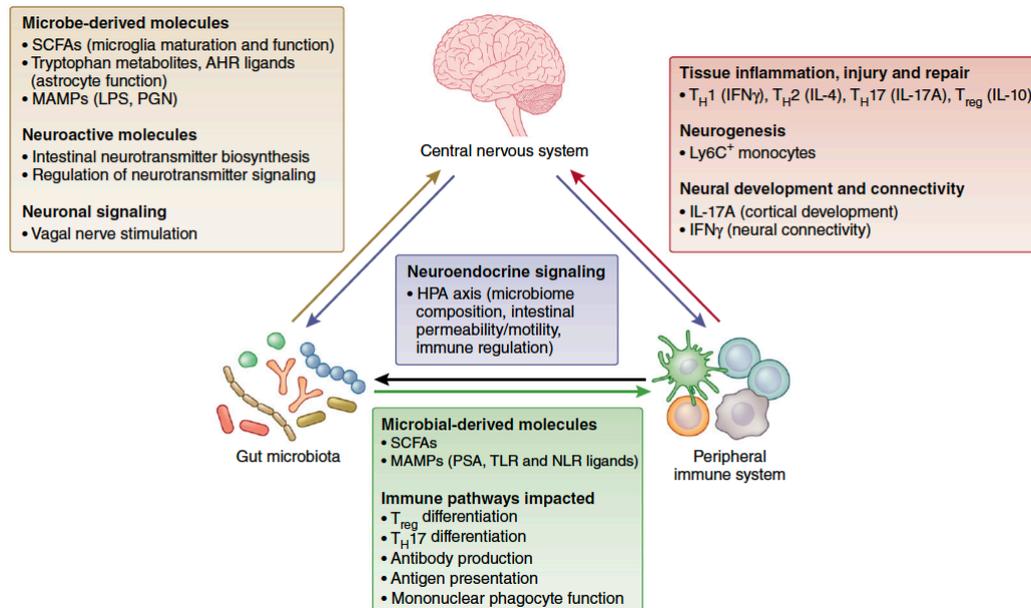
Relación entre la microbiota intestinal y la respuesta inmune del individuo. Las bacterias que componen la microbiota están presentes en el lumen intestinal (la mayoría reside fuera de la capa de moco que recubre a las células epiteliales). Algunas pueden erradicarse en los diferentes estratos: por las defensinas (moléculas antibacterianas producidas por el epitelio), por los macrófagos de la lámina propia al introducirse en el epitelio o bien por las células M de los folículos linfoides si consiguen llegar hasta ellos. Sin embargo, algunas pueden sobrevivir unos días en las células dendríticas, lo que permite la interacción entre la microbiota y los linfocitos T y B de las placas de Peyer, y la migración de las células dendríticas por la circulación linfática hasta los ganglios linfáticos mesentéricos. Estos ganglios funcionan como una barrera y las DC no pueden seguir circulando hasta otros órganos linfoides. La inducción de respuesta inmunitaria se limita a la mucosa intestinal. Son los linfoblastos B y T estimulados los que alcanzan estos órganos secundarios a través de la linfa eferente, que regresa al torrente sanguíneo por el conducto torácico, volviendo de nuevo a la mucosa intestinal (de MacPherson, A.J. Nat. Rev. Immunol. 2004.

2.1.3 Función eje-cerebro-intestino.

En los últimos años se ha establecido el concepto de eje cerebro-intestino. Se ha implicado a la microbiota intestinal en el desarrollo del SNC. Este eje funciona con aferencias y eferencias entre ambas estructuras a través de señales neuroendocrinas, nutrientes y señales inmunológicas. Participan en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, en la expresión de receptores de serotonina 5-HT₁, en el recambio de neurotransmisores como la serotonina, dopamina o

noradrenalina y en la regulación de proteínas que modulan las sinapsis neuronales¹⁸².

Figura 12. Representación del eje microbiota-intestino-cerebro



Representación del eje microbiota-intestino-cerebro. El eje microbiota-cerebro-sistema inmune es un sistema con estimulación bidireccional. La microbiota puede liberar moléculas que activan al plexo neuroentérico, estimulan la producción cerebral de neuropéptidos y aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Las moléculas producidas a nivel cerebral estimulan la función del plexo neuroentérico y el intestino. El nervio vago envía señales tanto ortodrómicas como antidrómicas (de <https://www.fmthealth.com.au/neurological-diseases>).

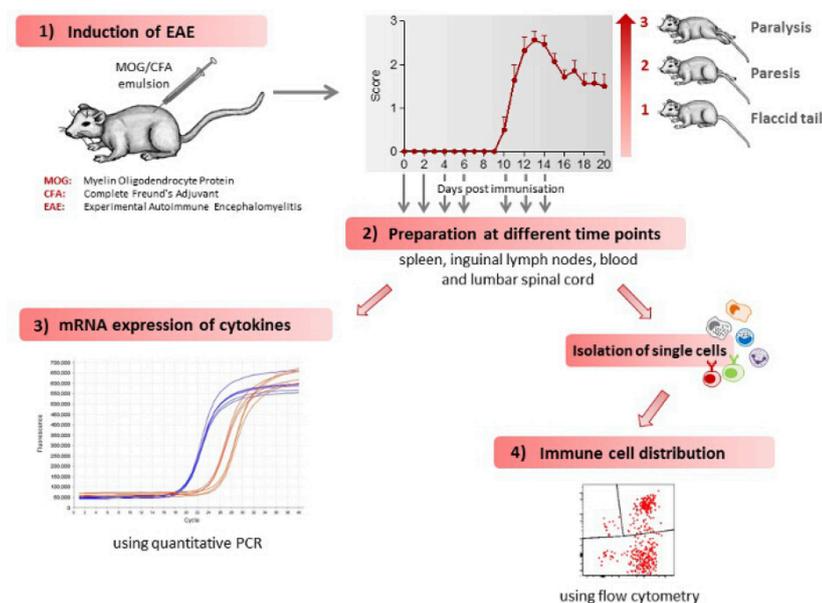
2.2 LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL MODELO ANIMAL DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Como hemos indicado antes, la microbiota intestinal ejerce una importante influencia en el desarrollo y maduración del sistema inmunitario de los seres humanos. Se cree que su alteración puede promover la aparición de patologías autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1, el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple.

En investigación de laboratorio se ha utilizado el modelo animal de encefalitis autoinmune experimental (EAE) para el estudio de la EM. Existen varios

modelos de EAE según qué tipo de la proteína se emplee para la inmunización y la clase de animal (roedores) que participe. En el caso de los ratones C57BL/6, se utiliza la glicoproteína asociada a la mielina del oligodendrocito (MOG) provocando una EAE de curso crónico progresivo sin brotes. En el caso de los ratones SJL, se emplea la proteína proteolipídica (PLP), consiguiendo en este caso inducir una EAE crónica de carácter remitemente-recurrente, que es la forma más frecuente la EM en los pacientes. Por último, si se emplean las ratas Lewis o Dark Agouti, la inmunización se realiza con la proteína básica de mielina (MBP) de origen animal, que determina un curso monofásico agudo. De igual modo se conoce que se deben coadministrar algunas sustancias que ejerzan de adyuvantes bacterianos para poder desarrollar la EAE en los animales. Se utilizan los extractos de *Mycobacteria tuberculosis* o la toxina pertussis^{183, 184}. La severidad de los síntomas de la EAE en roedores se determina con una escala o score según la aparición de síntomas motores y su gravedad¹⁸⁵.

Figura 13. Inducción y evaluación de la encefalitis autoinmune experimental.



Proceso de desarrollo de la EAE en investigación. 1) La EAE se induce en ratones con la glicoproteína asociada al oligodendrocito y el adyuvante completo Freund. 2) Los ratones comienzan a desarrollar los síntomas de la EAE en diferentes grados. Se realiza la preparación de las muestras biológicas pertenecientes al bazo, ganglios linfáticos inguinales, sangre y LCR en diferentes momentos desde la inmunización para su posterior estudio. 3) Se estudia la expresión de ARNm para diversas citocinas en los diferentes tejidos, determinada por PCR cuantitativa. 4) Se realiza una citometría de flujo para determinar la distribución de células inmunes pertenecientes a estos órganos/muestras biológicas (de Barthelmes, J. J. Vis. Exp. 2016)

Tabla 1. Score clínico de la severidad de la EAE.

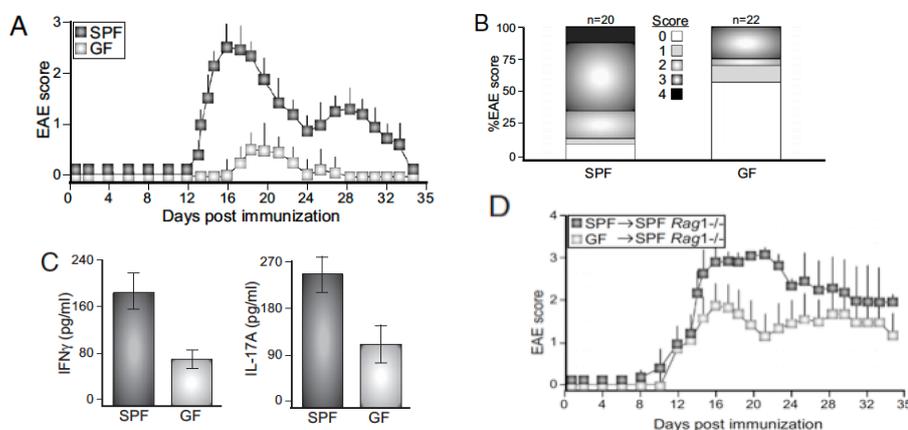
EAE score	Déficit neurológico
0 puntos	Sin signos clínicos
0,5 puntos	Pérdida de tono en la mitad distal de la cola
1 punto	Cola flácida
1,5 puntos	Marcha inestable
2 puntos	Paresia parcial de las extremidades traseras
2,5 puntos	Parálisis completa de las extremidades traseras
3 puntos	Parálisis completa de la parte inferior del cuerpo hasta el diafragma
4 puntos	Paraplejia
5 puntos	Muerte debida a EAE

Score de signos clínicos para la evaluación de la severidad de la EAE en animales (modificado de Shahi, S. K. Sci. Rep. 2017).

Uno de los estudios más significativos que reflejaban la importante relación entre la microbiota intestinal y la fisiopatología de la esclerosis múltiple como enfermedad autoinmune se publicó en el año 2010 por parte del equipo del investigador **Kyung Lee**. Realizó un estudio experimental ratones *C57BL/6* a los que indujeron la EAE. Un grupo de ratones fueron criados bajo condiciones *germ-free* (*GF*), es decir, sin presencia de microbiota intestinal, y otro grupo de ratones creció bajo condiciones *specific-pathogen-free* (*SPF*), es decir, con una microbiota intestinal simple con bacterias no patógenas. En el estudio se observó que los animales bajo condiciones *SPF* desarrollaban la EAE aproximadamente a los 8-10 días post-inmunización. Por el contrario, solo algunos ratones criados bajo condiciones *GF* desarrollaron la enfermedad. Estos pocos ratones que mostraban signos y síntomas de EAE lo hacían de forma menos severa y más acotada en el tiempo (*ver gráfico 16, apartado A y B*). También se comprobó que los ratones *SPF* sufrían una mayor infiltración de leucocitos en el SNC y sufrían una mayor destrucción de la mielina. Por el contrario, en los animales *GF* no se detectó respuesta inflamatoria en el SNC. Asimismo, se determinaron las citoquinas proinflamatorias habituales en la respuesta inmune Th1 (IFN- γ) y Th17 (IL-17A) y se observó que los ratones *GF* tenían un menor nivel de citoquinas que los ratones

SPF (*ver apartado C*). Esta disminución de citoquinas se detectó en varias localizaciones: en los órganos linfáticos, en la lamina propia de la mucosa intestinal y en la médula espinal. Ante estas observaciones, decidieron estimular *in vitro* con el péptido MOG a los linfocitos CD4⁺ procedentes de ambos grupos de ratones y transferirlos a un tercer grupo de ratones SPF modificados genéticamente para no expresar el gen Rag 1 (genes activadores de recombinación) que los hacía incapaces de generar linfocitos T o células B. Los linfocitos procedentes de ratones GF eran capaces de promover el desarrollo de EAE en este grupo de ratones con inactivación de Rag 1 pero con una menor severidad, en comparación con los linfocitos provenientes de los ratones SPF (*ver apartado D*). Todo ello sugiere que los linfocitos de ratones GF no son arreactivos, sino que es la propia microbiota intestinal la que regula activamente su respuesta inflamatoria. En un siguiente paso se comprobó que si los ratones que no tenían microbiota (ratones GF) eran colonizados por bacterias segmentadas filamentosas (SFB) desarrollaban una EAE también menos agresiva y de inicio más tardío. También se evaluó la población de linfocitos T reguladores (Treg) Foxp3⁺ en diferentes momentos del ensayo: inicialmente antes del inicio de los síntomas de la EAE y posteriormente durante el pico de máxima severidad de los síntomas. Resultó que los ratones GF tenían niveles más altos de linfocitos Treg al inicio del ensayo con respecto a los ratones SPF. Sin embargo, durante el pico de severidad de la EAE los ratones GF presentaron una disminución significativa en los niveles de Treg y de linfocitos Th17, lo que contribuye a la teoría de que la microbiota intestinal es necesaria para desarrollar una respuesta inmunitaria en el SNC¹⁸⁶.

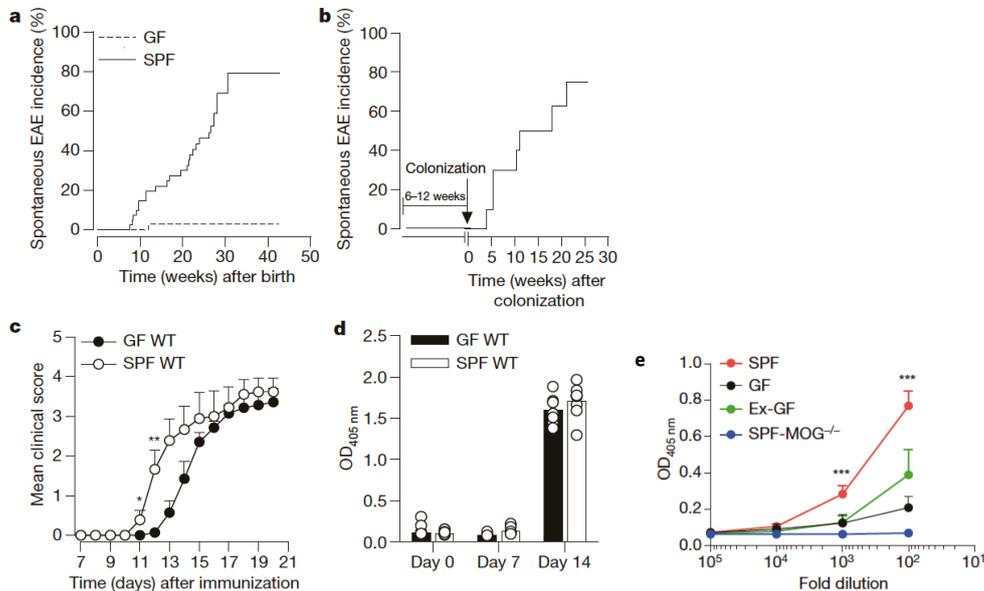
Gráfico 10. Estudio de Lee, et al. EAE inducida en ratones *Germ free* y colonizados por SPB



Comparación del desarrollo de la EAE entre ratones criados en condiciones de *Germ free* y ratones criados en condiciones de un entorno de bacterias no patógenas (SPF) (de Lee, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015)

Estos hallazgos también se replicaron en un estudio publicado posteriormente en el año 2011 por el equipo investigador dirigido por **Kerstin Berer**. Estudiaron la influencia de la microbiota intestinal de los ratones SPF en el desarrollo espontáneo de la EAE. En este caso se producía en los siguientes 3-8 meses tras la inmunización. Sin embargo, los ratones *GF* en ningún momento desarrollaron los síntomas de la EAE (*ver gráfico 10, sección a*). Como en el estudio anterior, si se producía la recolonización de su microbiota por bacterias segmentadas filamentosas (*SFB*), la respuesta inmune de la EAE se reproducía aunque siempre con una menor severidad (*ver gráfico 10, sección b y c*). No obstante, los niveles de anticuerpos anti-MOG (péptido empleado para la inmunización y desarrollo de la EAE) en suero generados en la respuesta inmune fueron comparables en ambos grupos (el de *GF* recolonizado por *SFB* y el de ratones *SPF* originales) (*ver gráfico 10, sección d*). También se pudo comprobar que en los ratones *GF* existía un déficit de linfocitos Th17 más pronunciado en la pared intestinal, la lámina propia y las placas de Peyer. Por el contrario, no habían diferencias en órganos linfoides distantes. Sin embargo, sí que existía una menor producción de IL-17 en comparación con el grupo *SPF*. Tampoco se encontraron diferencias entre las proporciones del resto de células linfoides (incluyendo los linfocitos Treg, CD8+, TCRgd+, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células NK (Natural Killer) y los granulocitos Gr1+. En este estudio además se demuestra que los linfocitos B tienen un papel importante en la autoinmunidad del SNC. Para desarrollar completamente la EAE en estos ratones se necesita, no solo la activación de linfocitos T contra la glicoproteína MOG con la que se inmunizan los ratones, sino la colaboración necesaria de los linfocitos B anti-MOG. Son los linfocitos T reactivos los que seleccionan los linfocitos B autoreactivos del repertorio de linfocitos B naïve (sin haber tenido contacto antigénico aún) y promueven la diferenciación y producción de autoanticuerpos de clase IgG anti-MOG⁹⁷. Precisamente los ratones *GF* producen niveles muy bajos de estos anticuerpos, hecho que se revierte parcialmente tras la recolonización intestinal con bacterias (*ver gráfico 10, sección e*)¹⁸⁷.

Gráfico 11. Desarrollo de la EAE en ratones germ free y SPF.

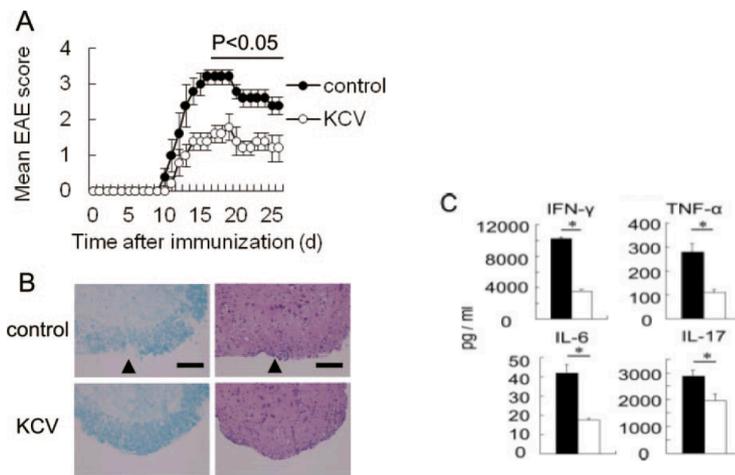


Estudio comparativo de la inducción de EAE entre un grupo de ratones Germ free y un grupo de ratones SPF.: (a) Incidencia de EAE espontánea en la población de ratones SPF a lo largo del tiempo. Los ratones GF no desarrollaron EAE. (b) Al recolonizar los ratones GF con bacterias SFB desarrollaron finalmente EAE. Sin embargo, (c) el inicio de la EAE del grupo GF recolonizado está retrasado y su severidad es menor en comparación con el grupo SPF. (d) Los niveles de anticuerpos anti-MOG de ambos grupos son similares. (e) Se muestran los niveles de anticuerpos anti-MOG en los diferentes grupos: SPF > GF recolonizados > GF > SPF con una mutación del gen MOG (MOG^{-/-}) (de Berer, et al. Nature 2011)

Unos años antes, en el 2008, el equipo del investigador **Hiroaki Yokote** en Tokio, realizó un estudio sobre la influencia de la microbiota intestinal en el desarrollo de enfermedades autoinmunes a través de la modificación de la misma población bacteriana de ratones ratones *C57BL/6* (*B6*) inducidos con la proteína MOG para desarrollar la EAE, con la administración oral de una mezcla de antibióticos con pobre absorción sistémica (kanamicina 1 mg/ml, colistina 2000 U/ml y vancomicina 0.1 mg/ml) denominada KCV. Este tratamiento se administraba desde el día -7 del inicio de la inmunización y se continuaba a lo largo del experimento. A través de la modificación de la flora intestinal ejercida por la mezcla de antibióticos se demostró que se producía una EAE con menor severidad (ver figura 14, sección A). En los cortes histológicos realizados sobre la médula espinal de los ratones se detectó un menor grado de infiltración de células mononucleares y fenómenos de desmielinización, en comparación con los animales

que no habían recibido el tratamiento antibiótico (*ver figura 14, sección B*). También se demostró una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF α , IL-6 e IL-17) detectadas en el drenaje de los ganglios linfáticos, así como una disminución del número linfocitos Th17 en los ganglios linfáticos mesentéricos (*ver figura 14, sección C*). En el estudio específico de la microbiota intestinal que se realizó se detectó una significativa disminución de *Lactobacillus murinus* y *Bacteroides fragilis* mientras que se evidenció un incremento de *Bacteroides thetaiotaomicron*¹⁸⁸.

Figura 14. Estudio del efecto inhibitor de la administración de antibióticos sobre la EAE.



Estudio comparativo entre un grupo de ratones tratados con una combinación de antibióticos (KCV) y un grupo control. (A) reducción en el score de la EAE en los ratones tratados con los antibióticos KCV. (B): Estudio histológico de cortes de médula espinal. A la izquierda, tinción Luxol fast blue específica de la mielina. A la derecha, hematoxilina-eosina. Abajo, ratones que recibieron tratamiento KCV con menor grado de desmielinización e infiltración linfocitaria, en comparación con las secciones de arriba correspondientes a ratones que no recibieron antibióticos KCV. (C): Reducción citoquinas proinflamatorias en grupo KCV (de Yokote et al. Am. J. Pathol. 2008).

2.3 LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Como el devenir natural de la investigación médica, tras la valoración de la hipótesis de la microbiota intestinal como factor determinante en la etiopatogenia de la EM en el modelo animal, los investigadores se han propuesto estudiar la microbiota en los pacientes con EM y así determinar si es una nueva vía de investigación para comprender su posible rol en la etiología de la enfermedad y completar una visión integral en el manejo de los pacientes.

Se han publicado varios estudios sobre microbiota intestinal en pacientes con EM. Sin embargo, no son tan numerosos como los realizados en el modelo animal hasta el día de hoy. En muchos de ellos se ha conseguido demostrar que en los pacientes con EM existe una disbiosis intestinal, es decir, una alteración de la biodiversidad y composición de la microbiota intestinal en la comparación con sujetos de la población general sana.

En general, son estudios costosos con una importante limitación en el número de sujetos que componen la muestra, tanto en el grupo de pacientes como el grupo control. Al igual que ocurre en nuestro estudio, se enfrentan a la dificultad de reclutar sujetos y realizar el estudio de secuenciación de ARN ribosomal bacteriano dado su coste.

2.3.1 Los helmintos y su influencia en la esclerosis múltiple

2.3.1.1 *El papel de los helmintos en la inmunidad*

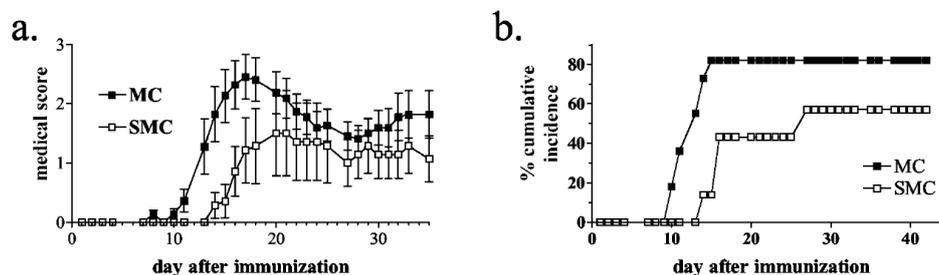
Inicialmente se publicaron estudios relacionados con las infecciones por helmintos en pacientes con EM. Debido a la teoría de la higiene expuesta en el marco teórico, se postula que los países desarrollados tienen una alta prevalencia de enfermedades autoinmunes, en comparación con los países en desarrollo. Incluso cuando se realiza un estudio comparativo entre áreas urbanas y áreas rurales también se observa esta diferencia en la incidencia de trastornos autoinmunes. Se considera que puede ser debido a varios factores entre los que se encuentra el aumento de las medidas de higiene y la consiguiente reducción de las enfermedades infecciosas como las causadas por helmintos o parásitos, que suelen cursar de forma subaguda o crónica. Se cree que estos organismos estimulan de forma continuada al sistema inmune del huésped, contribuyendo a la correcta

diferenciación de los linfocitos B y T hacia una respuesta Th2 y así disminuir la promoción de la respuesta proinflamatoria tipo Th1 y Th17, predominante en los trastornos autoinmunes como la esclerosis múltiple. La respuesta Th2 se caracteriza por la producción de citoquinas de perfil antiinflamatorio como la IL-4, IL-5 así como la IL-10 y el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β) segregados por los linfocitos T reguladores, predominantes en la respuesta Th2¹⁸⁹. También se produce la inducción de otras células del sistema inmune como los linfocitos B con la consiguiente producción de anticuerpos, entre los que destaca la inmunoglobulina IgE y los eosinófilos, que aumentan claramente en proporción y número durante la respuesta inmune contra los helmintos¹⁹⁰. Así pues, se ha observado una clara disminución de la incidencia de las enfermedades autoinmunes y las alergias en zonas endémicas donde predominan infecciones parasitarias¹⁹¹. De forma paralela, se sabe que los tratamientos antiparasitarios para las infecciones por helmintos pueden desencadenar episodios de alergias¹⁹².

2.3.1.2 Helmintos en el modelo animal (EAE)

Por este motivo se iniciaron estudios en laboratorio en el modelo animal de EAE en el que por ejemplo se observó que los ratones que se exponen o lo habían estado en el pasado, a la infección por un helminto llamado *Schistosoma mansoni* presentaban una menor incidencia y retraso del inicio de la enfermedad y el grado de severidad de sus síntomas (*ver gráfico 22*). Se amplió con un estudio de citoquinas en el que se observó una reducción de la concentración de IFN γ , TNF α y de la producción de óxido nítrico¹⁹³.

Gráfico 12. Estudio de *Schistosoma mansoni* sobre la EAE.



Comparación entre pacientes con EM con infección por el helminto *Schistosoma mansoni* y pacientes sin la infección (grupo control). (a.) la infección por *S. mansoni* produce una menor severidad de la EAE. (b) No solo reduce la incidencia si no que el inicio de la EAE está retrasado con respecto al control (de La Flamme et. *Infect Immun* 2003)

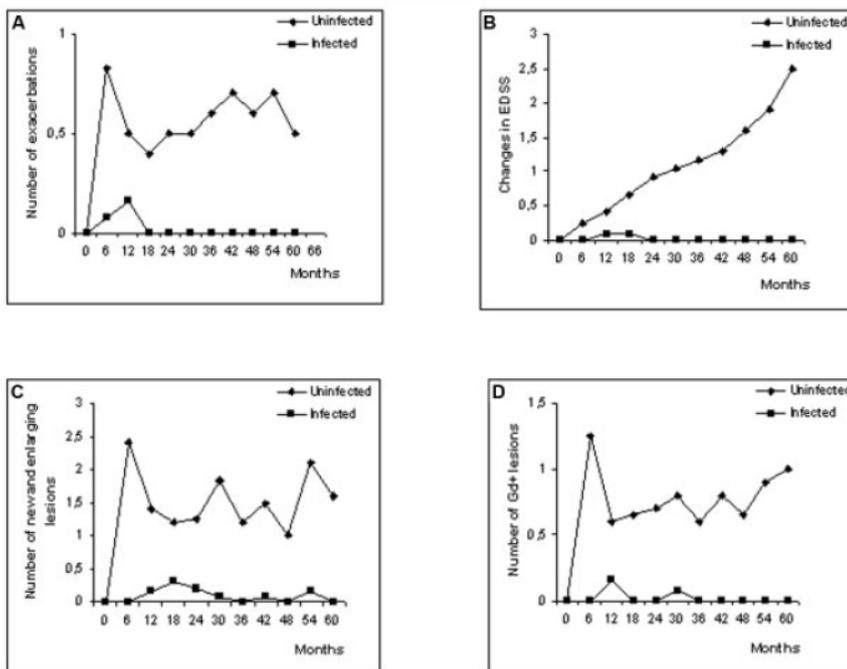
2.3.1.3 Estudios experimentales con infección por helmintos en pacientes con EM

Más adelante, la contribución de esos conocimientos influyeron en la realización de varios estudios ya en pacientes de esclerosis múltiple. **Jorge Correale** y colaboradores publicaron en el año 2007 un estudio en el que se investigó si la presencia de una infección por helmintos en el intestino hacía que los pacientes con EM tuvieran un diferente curso de la enfermedad. Se realizó un estudio prospectivo de casi 5 años de seguimiento de media en el que evaluaron parámetros clínicos y radiológicos. Como se muestra en el siguiente *gráfico 12, parte A*, los pacientes infectados por helmintos presentaban un significativo menor número de brotes, al igual que se mantenían más tiempo sin progresión de la discapacidad (según la escala EDSS) al contrario que los pacientes sin presencia de helmintos (*ver parte B*). Desde el punto de vista radiológico, estos pacientes presentaban un menor número de lesiones en T2 (*parte C*) y de lesiones en T1 con captación de gadolinio (*parte D*). También se demostró que existía un significativo aumento de las citoquinas antiinflamatorias IL-4 y TGF β , y un aumento del número de linfocitos Treg FoxP3+. Por el contrario, presentaban una disminución de IFN α en estos pacientes, en comparación con los no infectados por helmintos¹⁹⁴.

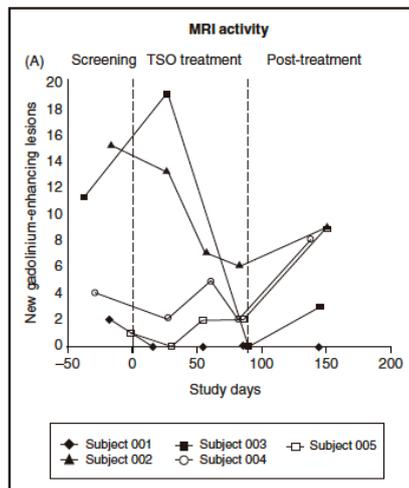
Poco después un equipo investigador liderado por **John Fleming** fue el primero que realizó un ensayo clínico con terapia de helmintos en pacientes con EMRR, denominándolo estudio HINT (terapia de inmunomodulación inducida por helmintos). Se realizó sobre 5 pacientes con EMRR que recibieron la terapia con 2.500 óvulos de *Trichura suis ova* (TSO), administrados por vía oral cada 2 semanas durante 3 meses. Este ensayo inicial obtuvo buenos resultados aunque su endpoint primario se enfocó en la seguridad y en general no hubo ningún efecto adverso grave y los que presentaron los pacientes fueron leves síntomas gastrointestinales. Con respecto a los cambios en la actividad de la enfermedad se comprobó que el número medio de lesiones en T1 con captación de gadolinio descendió de 6,6 lesiones en el momento del reclutamiento a 2 lesiones de media al final de los 3 meses de la terapia TSO. Como cabía esperar, a los dos meses de suspender la fase de tratamiento, la actividad radiológica se reactivó volviendo a cifras similares al momento inicial del ensayo con una media de 5,8 lesiones. También se comprobó que la terapia TSO aumentó los niveles de citoquinas antiinflamatorias, el número de linfocitos Treg, la proteína C reactiva (marcador de infección/inflamación) y los

anticuerpos IgG e IgA contra *T. suis*, lo que traducía una respuesta inmune contra la colonización por *T. suis*¹⁹⁵.

Gráfico 13. Diferencias clínicorradiológicas entre pacientes con EM con infección por helmintos y un grupo de pacientes sin infección.



Comparación entre el grupo de pacientes con EM con infección de helmintos y grupo sin infección. Se evaluó el número de brotes (A), los cambios en la discapacidad medida según la escala EDSS (B), el número de nuevas lesiones en T2 y enlarging lesions en T2 (C) y finalmente, el número de lesiones en T1 con captación de gadolinio (D) (de Correale et al. *Ann Neurol* 2007)

Gráfico 14. Estudio HINT realizado con la administración de *Trichura suis ova* (TSO) en pacientes con EM.

Estudio HINT. Lesiones T1 con captación de gadolinio de nueva aparición en 5 pacientes con EMRR que han recibido terapia con T. suis (TSO) en diferentes momentos del ensayo (inicio -observación-, tratamiento TSO durante 3 meses, observación de 2 meses tras suspender TSO). En el estudio se muestran diferencias con claro descenso del número de lesiones durante el tratamiento con TSO (no informan del nivel de significación)

Dados los buenos resultados se diseñó un segundo ensayo clínico llamado HINT 2 con 16 pacientes EMRR naïve con la misma terapia TSO que el anterior estudio, también administrada por vía oral cada 2 semanas. No se registraron efectos adversos de gravedad (la mayoría también gastrointestinales). En la evaluación de la respuesta radiológica se comprobó que se produjo una reducción relativa del número medio de nuevas lesiones T1 con captación de gadolinio del 35% (3,25 nuevas lesiones de media en el periodo de observación comparado con 2,10 lesiones de media durante la fase de tratamiento) pero no alcanzó la significación plena si que se demostró esta tendencia a la mejoría con un valor de $p=0,08$. Con respecto a los cambios en cuanto a la discapacidad medida según la escala EDSS se observó que los pacientes presentaban una EDSS de $1,3 \pm 0,9$ de media al inicio del ensayo y que después del periodo de tratamiento descendió hasta $1,1 \pm 1,3$ puntos (no significativo). Sin embargo, empleando una escala más actualizada, la MSFC (*Multiple Sclerosis Functional Composite*) que mide la destreza bimanual con el test de los 9 palitos, evalúa la marcha con el test de los 25 pasos y la cognición a través de la prueba de serial auditiva llamada PASAT¹⁹⁶, los pacientes presentaron una

mejoría de su discapacidad funcional inicial de $0,52 \pm 0,34$ a $0,86 \pm 0,28$ al final del periodo de la terapia TSO ($p=0,007$)¹⁹⁷.

En esta línea se han realizado varios estudios clínicos con el mismo nemátodo (TSO): el estudio TRIMS A que mostró buena tolerabilidad pero sin obtener beneficios en los parámetros clínicorradiológicos¹⁹⁸, y el estudio Charite, que lo realizó Bezel y su equipo con 4 pacientes con EM secundariamente progresiva. En este estudio se detectó actividad radiológica en 1 de 4 pacientes y en la valoración de monocitos de sangre periférica se observó un repunte de citoquinas proinflamatorias (IL-2 y IFN γ) en el primer mes para luego disminuir significativamente después de dos meses de intervención¹⁹⁹. Con *T. suis* también se elaboró un protocolo de ensayo clínico (TRIOMS) del que aún no están publicados los resultados²⁰⁰.

El uso de otros helmintos se empleó en el estudio WIRMS de **Radu Tanasescu** y colaboradores publicado en el año 2020, en el que estudiaron la seguridad y la eficacia de la colonización de 25 larvas de *Necator americanus*, un tipo de anquilostoma, a través de la piel en 63 pacientes con EM repartidos en dos grupos, el de tratamiento (n=35) que duró 9 meses y el grupo placebo (n=36). En cuanto a los resultados, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el número acumulado de lesiones en T2 en ambos grupos. Sin embargo, el 51% de los pacientes tratados con *N. americanus* vs. 28% en el grupo placebo, no presentaron nuevas lesiones en resonancia (aunque no fue significativo). Sí que se demostró un aumento en los linfocitos Treg tras el tratamiento, y no hubo efectos adversos significativos salvo un aumento de síntomas cutáneos en el grupo de tratamiento por la vía de introducción del helminto²⁰¹. Derivado de este ensayo se generó otro estudio publicado por **Jenkins** y colaboradores en el año 2021 que utilizó las muestras de heces recogidas en diferentes momentos del ensayo para el estudio de las variaciones que han podido determinar el tratamiento con el helminto *Necator americanus* en la microbiota intestinal de los pacientes con EM. No hubo diferencias en cuanto a la diversidad alfa. Se determinaron los niveles de las diferentes familiares y género y se detectó que cinco géneros (*Roseburia*, *Dorea*, *Tyzzarella*, *Anaerostipes* y *Agathobacter*) pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae* (potente inductor de ácidos grasos de cadena corta con propiedades antiinflamatorias), *Peptostreptococcaceae*, *Carnobacteriaceae* y *Coriobacteriaceae* tenían significativamente más presencia en el grupo de pacientes que recibieron placebo que en el grupo que

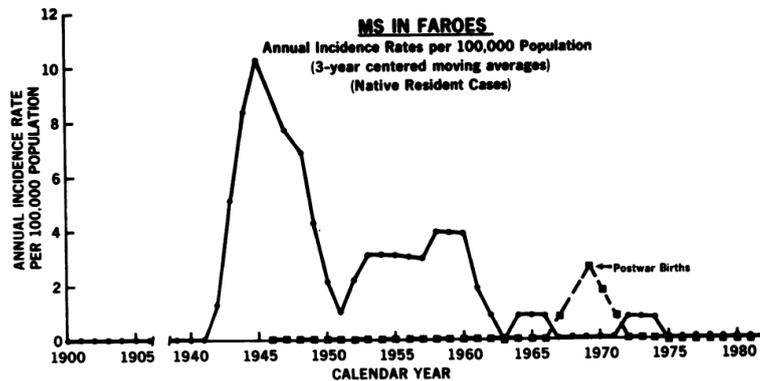
recibió la terapia con *N. americanus*. Sin embargo, en este grupo fueron más abundantes dos órdenes (*RF39* y *Izimaplasmatales*) pertenecientes al filum *Tenericutes* (clase *Mollicutes*)²⁰².

2.4 ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Tras detectar disbiosis intestinal en el modelo animal con ratones inducidos inmunológicamente para desarrollar la encefalitis autoinmune experimental (EAE), se realizaron los primeros estudios clínicos en pacientes con EM. El primer estudio conocido en este sentido fue el publicado en el año 2013 por el equipo investigador de **Kareem R. Rumah**. Fue la primera vez que se identificó en la microbiota intestinal humana la especie *Clostridium Perfringens Tipo B* y en concreto, fue en una paciente de EM durante su primer brote desmielinizante. Esta especie bacteriana era una conocida colonizadora única de animales rumiantes. Se conoce que es productora de una toxina denominada épsilon que, cuando crece de forma incontrolada en el tracto gastrointestinal de los animales o hay una sobrecarga de hidratos de carbono en su dieta, prolifera, invade la mucosa y consigue adentrarse en el organismo hasta alcanzar la barrera hematoencefálica. Allí se une a un receptor desconocido situado en el endotelio y consigue dañar la sustancia blanca cerebral, provocando lesiones ovoideas perpendiculares a los ventrículos laterales y síntomas similares a la EM. Teniendo en cuenta la similitud que tenían en cuanto a las características de las lesiones desmielinizantes (dedos de Dawson) específicas de la EM, los autores de este trabajo postularon que la especie *Clostridium Perfringens Tipo B* podría ser un posible factor desencadenante (trigger) de la respuesta inmune patogénica de la EM. En este sentido, investigaciones clásicas de anatomía patológica realizada a las lesiones desmielinizantes en su etapa temprana de pocas horas o días de existencia, observaron que existía en ellas una marcada apoptosis de los oligodendrocitos con preservación de la mielina, disrupción de la BHE y una activación precoz de la microglía. Sin embargo, en estas fases iniciales no se objetivaba ningún infiltrado linfocitario ni de macrófagos, dando lugar a la hipótesis de que el origen causal de estas lesiones podía ser un agente externo como un microorganismo²⁰³. Estos hallazgos, junto a la teoría del origen infeccioso-contagioso de la EM que deriva del aumento de incidencia en lugares como las Islas Faroe que en la Segunda Guerra Mundial con la llegada de tropas inglesas pasó de

no tener ningún caso registrado de esclerosis múltiple a presentar una “epidemia” de casos de EM, contribuyen al postulado de un origen infeccioso para la activación de los mecanismos patogénicos que subyacen a la EM^{204,205}.

Gráfico 15. Incidencia de EM en las Islas Feroe



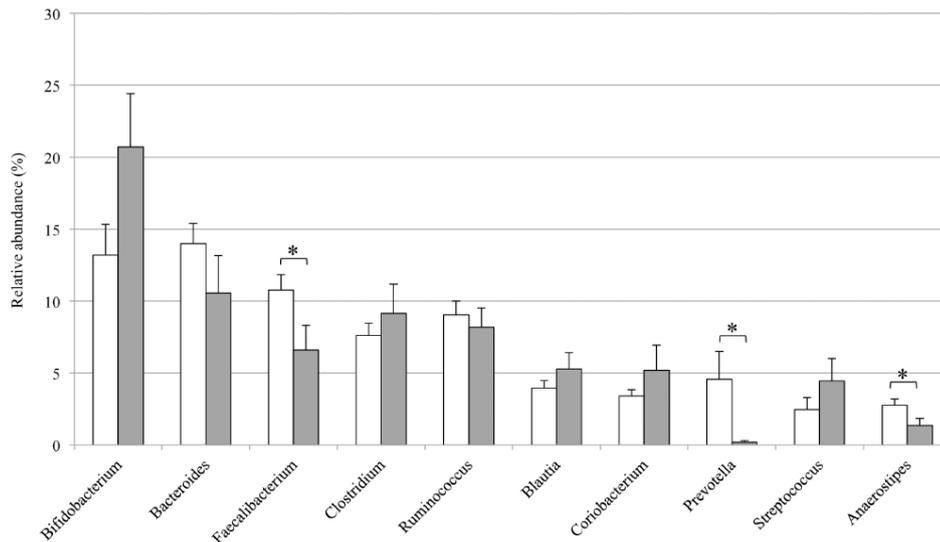
Incidenia anual de esclerosis múltiple (n° casos/100.000 habitantes) en los residentes nativos de las Islas Feroe a partir de 1900. En este gráfico se muestra el pico de incidencia (de la llamada epidemia de EM) que surgió tras la ocupación de las tropas durante la Segunda Guerra Mundial en 1943 (de Kurtzke, Clin. Microbiol. Rev. 1993)

En el estudio de Rumah y colaboradores se investigó la presencia de otra especie del género *Clostridium* (*C. perfringens* tipo A) que es un comensal habitual en la microbiota intestinal humana. Se realizó por tanto una búsqueda específica entre las muestras de 30 pacientes con EM y 31 controles sanos. Se encontró solo en el 23% de las muestras de EM en comparación con el 52% de las muestras de sujetos sanos. Asimismo, evaluaron la inmunoreactividad a la toxina épsilon en ambos grupos teniendo diez veces más reactividad los pacientes con EM²⁰⁶.

Posteriormente, se publicó otro de los primeros estudios realizados en la investigación de la microbiota intestinal en pacientes de esclerosis múltiple. Se trata del estudio llevado a cabo por **Sachiko Miyake** y colaboradores, que en 2015 mostró los resultados del estudio de la microbiota intestinal de 20 pacientes con EMRR (MS20) y dos subgrupos de sujetos sanos (40 en el subgrupo HC40 y 18 en el subgrupo HC18). Los controles sanos de este último subgrupo aportó muestras de heces repetidamente a lo largo del seguimiento (para conseguir que fuera un seguimiento longitudinal prospectivo se recogieron muestras de heces cada 2 semanas en 9 ocasiones). Tras el procesamiento de los datos de lectura del RNA

ribosomal bacteriano detectado en el estudio de las muestras de heces se obtuvo un total de 163.691 lecturas siendo 109.891 procedentes de los sujetos control (HC40) y 53.800 del grupo de EM (MS20). No hubo diferencias en la diversidad alfa. En cuanto a la variabilidad interindividual fue superior en el grupo de EM. Se encontraron sobre todo bacterias pertenecientes a estos cuatro filums: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacterias*. El grupo de EM tenía una mayor representación de *Actinobacterias* mientras que estaban reducidas las abundancias relativas de las especies pertenecientes a *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En cuanto al nivel taxonómico género, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotella* y *Anaerostipes* fueron menos abundantes en el grupo de EM en comparación con el de HC40, y éste, tuvo mayor proporción de los géneros *Bifidobacterium* y *Streptococcus*. Al comparar las muestras se encontraron diferencias estadísticamente significativas en 21 especies bacterianas entre ambos grupos, de las que 19 especies tenían disminuida su abundancia relativa de forma significativa en el grupo de EM. Entre ellas, 14 pertenecen al *cluster Clostridia XIVa y IV*, que engloba a muchas especies bacterianas que son productoras de ácidos grasos de cadena corta con efecto antiinflamatorio. Las otras 5 especies deplecionadas en el grupo de EM fueron *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides coprocola*, *Bacteroides coprophilus*, *Prevotella copri* y *Sutterella wadsworthensis*. Entre las especies bacterianas que se presentaban con un aumento en abundancias relativas con respecto al grupo control fueron *Streptococcus thermophilus* y *Eggerthella lenta*. Los hallazgos también fueron congruentes con el grupo control de seguimiento longitudinal²⁰⁷.

Gráfico 16. Composición de la microbiota intestinal (géneros bacterianos) de pacientes y controles del estudio de Miyake, et al.



Composición a nivel de género en muestras de microbiota intestinal obtenidas de los sujetos de los grupos HC40 y MS20 del estudio de Miyake y colaboradores. El eje vertical representa la abundancia relativa (%) de cada género en la microbiota de sujetos HC40 (barra blanca) y MS20 (barra gris) con $*p < 0,05$.

Los estudios de microbiota intestinal en la EM se trasladaron a los pacientes pediátricos debido a su interés genuino por detectar cambios en la microbiota precisamente en la población en la que solo tiene unos años de evolución y la más cercana al momento inicial del desarrollo de la autoinmunidad asociada a la EM, contribuyendo a la adquisición de más conocimientos a nivel etiopatogénico. **Helen Tremlett** es la autora que ha aunado los esfuerzos de la investigación de la microbiota en la EM pediátrica. En el año 2015 publicó su primer estudio en el que se incluyeron 18 pacientes con EM pediátricos y 17 controles. La edad media de los pacientes en su inclusión en el estudio fue de 13 años y la duración media de la enfermedad fue de 10,6 meses. La mitad recibían tratamientos modificadores de la enfermedad y un tercio recibieron corticoides en los dos meses previos a su inclusión. No se encontraron diferencias en la diversidad alfa entre ambos grupos. Se identificaron dos filums *Synergistetes* y *Lentisphaerae* únicamente en los pacientes con EM. Cuando se tenían en cuenta los subgrupos de pacientes tratados y los no tratados, se observaba la influencia de los TME sobre la microbiota intestinal. En el grupo que estaba tratado presentaban 3,7 veces más abundancia de *Actinobacteria* en comparación con los pacientes no tratados (que presentaban una disminución

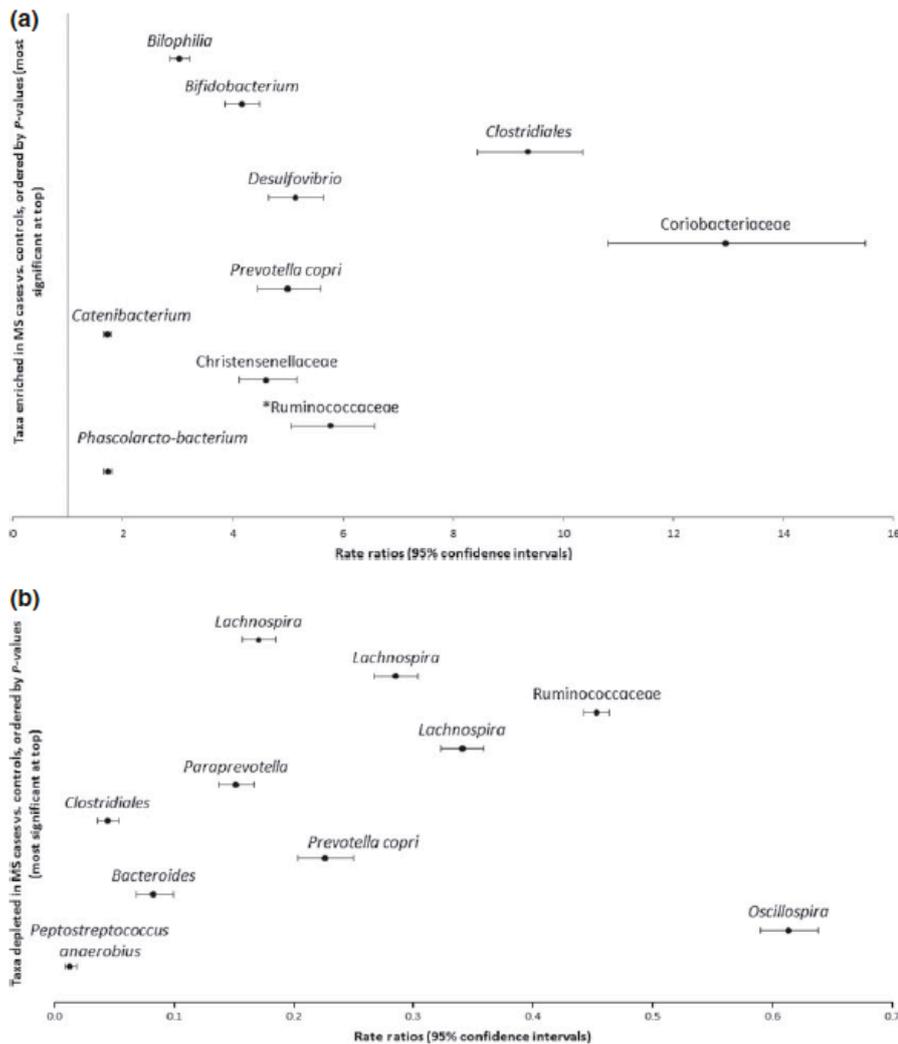
en la abundancia) y el grupo control. Por otra parte, el grupo de pacientes presentaron 3 veces más abundancia del género *Bilophila* del orden *Desulfovibrionales*) en comparación con los controles, así como las familias *Bifidobacterium*, *Desulfovibrio* y *Christensenellaceae* que estaban aumentadas en el grupo de EM. En este estudio se objetivó el descenso de algunos microorganismos bacterianos productores de ácidos grasos de cadena corta como las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*. En este grupo de EM también se detectó un aumento en los niveles de *Akkermansia*, *Parabacteroides*, *Methanobrevibacter* (Archaea) y *Bacteroides* así como un descenso del orden *Bacteroidales* y *Clostridiales* (también conocido productor de AGCC como el butirato). También se detectó un enriquecimiento en microorganismos relacionados con el metabolismo del glutatión relacionado con el sistema antioxidante endógeno, y del lipopolisacárido A en el caso concreto de los pacientes no tratados, que se ha relacionado con un curso más severo en la EAE²⁰⁸.

El mismo grupo de trabajo continuó el seguimiento de esta cohorte de pacientes pediátricos. En un segundo artículo donde se incluyeron 17 de los 18 pacientes con EMRR en edad pediátrica del estudio original se estudió la asociación entre la microbiota intestinal y la aparición de nuevos brotes en el seguimiento del estudio que duró de media 19,8 meses. El 25% de los pacientes presentó brotes dentro de los primeros 166 días. Varios géneros determinaron un mayor riesgo de presentar un brote prevoz en el seguimiento: la depleción de *Fusobacteria*, el aumento de *Firmicutes* y la presencia de la Archaea *Euryarchaeota*. Sin embargo, la ausencia de *Fusobacteria* fue el único factor de riesgo es el que se mantuvo con significación estadística tras el ajuste por edad y tratamiento con TMEs, aumentando el riesgo relativo de presentar un brote en un 76% (Hazard ratio de 3,2 (IC 95%: 1,2-9,0, p=0,024)²⁰⁹.

En el año 2016, **Sushrut Jangi** y colaboradores publicaron un extenso estudio sobre la microbiota intestinal para el que usó las muestras recogidas de 60 pacientes con EMRR (que no tenían EM activa en el momento del reclutamiento) y 43 sujetos sanos empleando dos métodos de detección y análisis de DNA bacteriano (plataformas *Roche 454* y *MiSeq Illumina*). Se observaron cambios estadísticamente

significativos incluso en el nivel taxonómico de filum con una mayor abundancia de *Euryarchaeota* y *Verrucomicrobia*.

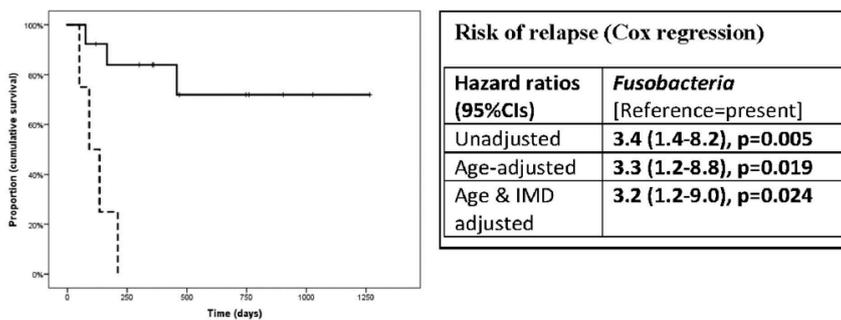
Gráfico 17. Géneros bacterianos más significativos de la microbiota de EM pediátrica



Abundancias relativas de los 10 géneros bacterianos más representativos que se encuentran aumentados (parte a) o disminuidos (parte B) en el grupo de pacientes con EM en edad pediátrica en el estudio. En el eje de las abscisas se muestran los intervalos de confianza del 95% y el eje de ordenadas las razones de tasas de los diferentes géneros cuando se compara el grupo de pacientes con el de controles (de Tremlett, et al. Eur. J. Neurol 2016).

Por el contrario, el género *Butyricimonas* (procedente del filum *Bacteroidetes*) estaba disminuido con respecto al grupo control. Todos estos cambios se mantenían cuando se analizaba por subgrupos de pacientes tratados y no tratados. Este último grupo presentaba una disminución en las abundancias relativas de los géneros *Collinsella* y *Slackia* (filum *Actinobacteria*) y *Prevotella* (filum *Bacteroidetes*). Por otro lado, los pacientes con EM tratados tenían niveles mayores de *Prevotella* y *Sutterella*. Estos resultados mantenían su significación estadística en alguno de los dos métodos de análisis cuando se ajustaban por edad, género e IMC en el modelo multivariante. No hubo diferencias entre la microbiota procedente de pacientes tratados con interferón beta o acetato de glatirámico.

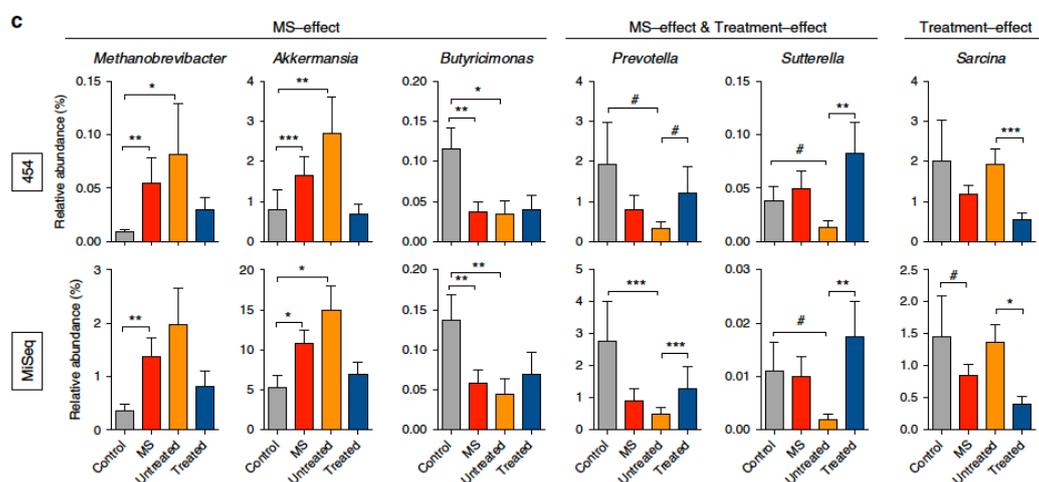
Gráfico 18. Relación entre brotes clínicos y la ausencia de *Fusobacteria* en población pediátrica



A la izquierda, curva de Kaplan-Meier que refleja la proporción de pacientes que están libres de recaídas o brotes a lo largo del tiempo del estudio, y a la derecha, tabla de la obtención de Hazard ratios con IC 95% para el factor de riesgo ausencia de *Fusobacteria* en la muestra de microbiota de un paciente pediátrico (de Tremlett, et al. *J Neurol Sci* 2016)

Aunque en nuestro estudio no hemos podido elaborar un análisis comparativo de pacientes tratados o no debido al número bajo de participantes de nuestra muestra, en otros estudios publicados han determinado que los fármacos inmunomoduladores influyen en la microbiota intestinal. En el estudio realizado por el *Consortio Internacional de Microbioma de la Esclerosis Múltiple* se observó que los pacientes que sí recibían tratamiento con interferón beta tenían un aumento de los transportadores de ácidos grasos de cadena corta en el subestudio realizado en el metaboloma.

Gráfico 19. Diferencias en la composición de la microbiota entre pacientes con EM y sujetos sanos



Diferencias en la composición de la microbiota fecal entre 60 pacientes con EM y 43 sujetos sanos adultos. En el eje de ordenadas se representan las abundancias relativas y en el eje de abscisas están representados los grupos control (barra gris), pacientes con EM (barra roja), subgrupo de pacientes no tratados (barra naranja) y pacientes tratados (azul) (de Jangi et al. Nat. Commun. 2016)

Esta investigación continuó con el estudio de los monocitos en sangre periférica para responder a la pregunta de si la microbiota intestinal podía modular la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune. Se detectó una correlación positiva para todos los sujetos del estudio entre los niveles de *Methanobrevibacter* y *Akkermansia* con la expresión en linfocitos T de los genes CASP1, TRAF5 (modulador de la activación de linfocitos T que está sobreexpresado en la EM) y STAT5B, que están implicados en la señalización de IFN γ e IL-2, y la activación de los factores de transcripción PPAR, que participa en el metabolismo energético sobre todo en el catabolismo de los ácidos grasos, y el factor de transcripción RXR que participa en el mantenimiento y diferenciación de las células inmunes. Por el contrario, *Butyricimonas* presentó una correlación negativa con estos genes. En la misma dirección se detectó una correlación negativa entre los niveles de *Methanobrevibacter* y *Akkermansia* con la expresión de TNFA1P3 (una citocina antiinflamatoria con papel en la desmielinización) y el inhibidor alfa del NF κ B, que modula la expresión de genes de la inmunidad y que está disminuido en la población de pacientes con EM. En este caso, *Butyricimonas* se correlacionó positivamente con ellos. Todas estas relaciones se mantuvieron cuando se evaluó

de forma separada las muestras de pacientes no tratados. El grupo control, presentó niveles de correlación cercanos a cero para todos los genes estudiados.

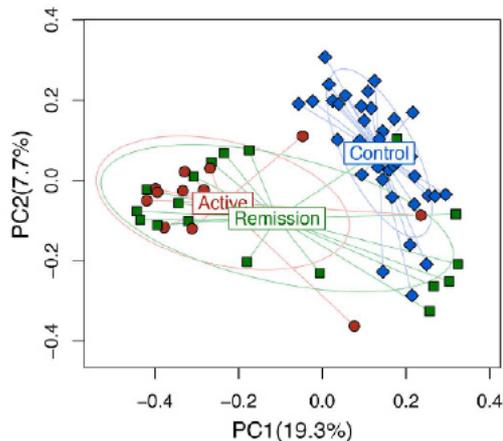
También se identificó una correlación positiva de *Methanobrevibacter* y *Akkermansia* con los genes MAPK14 y MAPK1 (implicados en el inicio de la inmunidad innata y adaptativa), LTBR, STAT5B, CASP1 y HLA-DRB1 cuando se estudiaron los monocitos del grupo de pacientes con EM. Estos genes están implicados en la maduración de células dendríticas y las vías de señalización de IFN γ y de TREM, al contrario que sucedió con *Butyricimonas* que mostró una correlación negativa. Estos hallazgos se confirmaron cuando se evaluó el grupo de no tratados y no se encontró una correlación cuando el grupo a estudio fue el de sujetos sanos. Asimismo, en el grupo de EM no tratados, *Methanobrevibacter* y *Akkermansia* presentó una correlación negativa con los genes HLA-A, HLA-B y BCL2 (gen que participa en la apoptosis celular).

Por último, en el estudio se determinó un test diagnóstico para determinar si los sujetos participantes tenían la presencia de *Methanobrevibacter* (en este caso la especie *M. smithii*, una conocida bacteria productora de metano) en su microbiota intestinal. Se determinó la cantidad de metano exhalado en una prueba de aliento de una cohorte de pacientes con EM y un grupo control. Los niveles de metano exhalado fueron superiores significativamente en el grupo de pacientes que en el control, lo que da pie a nuevas formas de estudio de microbiota intestinal para la investigación médica²¹⁰.

Ese mismo año se publicó otra investigación comparativa de la microbiota intestinal, en la que colaboraba el equipo de **Jun Chen** de la Clínica Mayo, que reclutó a 31 pacientes con EMRR (12 EM activa y 19 EM no activa) y 36 controles sanos. No hubo diferencias en la riqueza de las especies, pero si analizaban el subgrupo de pacientes activos y no activos, los primeros tenían una tendencia a tener menos riqueza (diversidad alfa). En cuanto al análisis principal de componentes (PCoA) la microbiota intestinal de los pacientes (activos o no activos)

presentaba diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.

Gráfico 20. Análisis Principal de Componentes Principal en pacientes EM (activa, no activa) y controles



Análisis Principal de Componentes Principal. Cada punto representa una muestra de microbiota intestinal de cada sujeto del estudio (en rojo los pacientes con EM activa, en verde los pacientes con EM no activos o en remisión y en azul los controles). Se observa que las muestras de los controles son significativamente diferentes con respecto a los pacientes con EM. Las muestras de EM en remisión muestran mayor heterogeneidad con subconjuntos que se asemejan a muestras de control o de enfermedad activa. Las elipses no representan ninguna significación estadística, sino que sirven como guía visual para las diferencias de grupo (de Chen, et al. Sci. Rep. 2016)

Este estudio consiguió mostrar diferencias estadísticamente significativas para 35 géneros bacterianos cuando se comparaban pacientes y controles. Entre el grupo de pacientes con EM destacó una disminución en la abundancia relativa de los géneros *Adlercreutzia* y *Collinsella* (del filum Actinobacteria), *Parabacteroides* (del filum Bacteroidetes), algunos géneros pertenecientes a las familias *Erysipelotrichaceae*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, y los géneros *Lactobacillus* y *Coprobacillus*. Por el contrario, mostraron más abundancia los géneros *Pedobacter* y *Flavobacterium*, y los géneros *Blautia* y *Dorea* (del filum Firmicutes). Asimismo, había más representación de *Proteobacteria*, *Pseudomonas* y *Mycoplana* y al contrario, *Haemophilus* presentó un incremento en las abundancias relativas en el grupo control. En un segundo estudio con un modelo predictivo se detectó igualmente niveles elevados de *Prevotella* en los controles. No obstante, los géneros *Adlercreutzia*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Coprobacillus*, *Dorea*, *Flavobacterium*, *Parabacteroides*, *Mycoplana*, *Haemophilus*, *Blautia* y *Collinsella* consiguieron ser

predictivos para identificar a aquellos pacientes con la enfermedad basándose en el análisis de microbiota fecal en estos pacientes²¹¹.

Gráfico 21. Comparación de abundancias relativas de especies bacterianas entre pacientes y controles

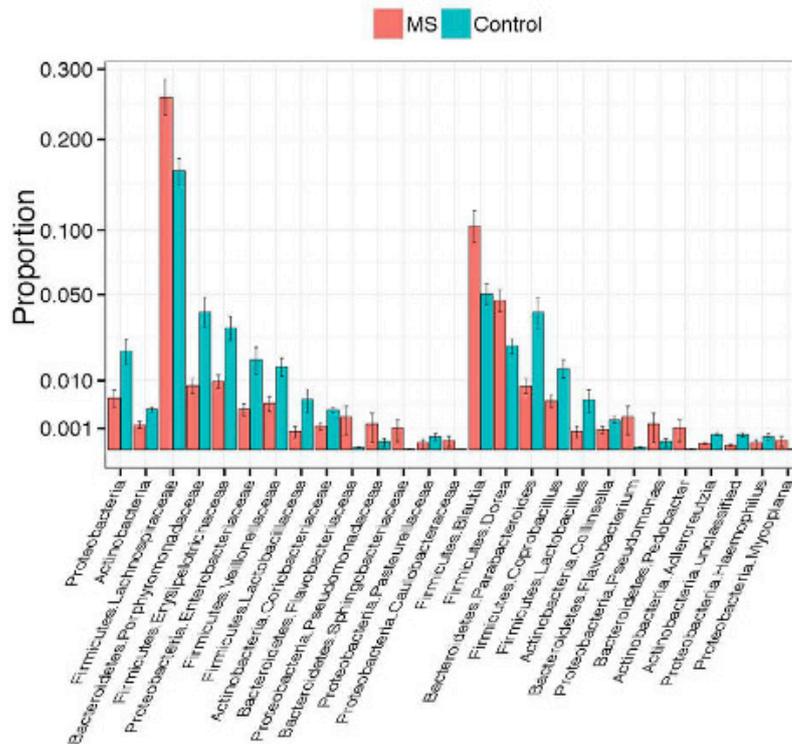
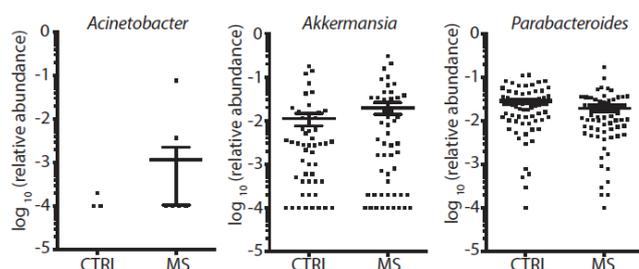


Gráfico de barras que compara las abundancias relativas (proporción) de las diferentes especies bacterianas que muestran diferencias estadísticas entre el grupo de EM (tanto activa como inactiva) y el grupo control. (de Chen, et al. Sci. Rep. 2016)

Más adelante, en el año 2017 el equipo de **Egle Cekanaviciute** publicó los resultados de un estudio clínico en el que participaron pacientes con EM no tratados. También se realizaron valoraciones empleando el modelo animal de EAE. Inicialmente estudiaron la microbiota intestinal de 71 pacientes con EMRR no tratados y 71 controles sanos. Aunque en este estudio no se detectaron diferencias en la biodiversidad (alfa o beta), sí que se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la composición de la microbiota intestinal, con diferencias en 25 géneros bacterianos. Destaca una disminución de la especie *Parabacteroides distasonis* y un aumento del género *Akkermansia* (en su mayoría de la especie *Akkermansia muciniphila*) y del género *Acinetobacter*. El hallazgo del aumento de

Acinetobacter es sorprendente porque no se encuentra habitualmente en la composición de la microbiota intestinal humana.

Gráfico 22. Abundancias relativas de algunos géneros bacterianos entre los grupos EM y control

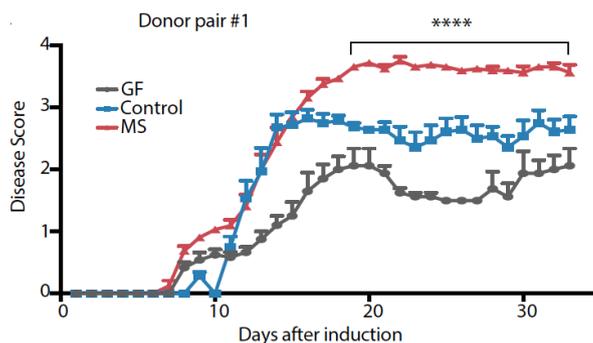


Abundancias relativas de los géneros bacterianos *Acinetobacter*, *Akkermansia* y *Parabacteroides* en el grupo de EM (71 pacientes) y grupo control (71 sanos). Destaca el aumento de proporción de *Acinetobacter* dado que es un género bacteriano que no se encuentra habitualmente en la microbiota intestinal humana (de Cekanaviciute, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2017)

Los investigadores continuaron el estudio extrayendo células mononucleares de sangre periférica tanto de pacientes con EM como de controles sanos que posteriormente fueron estimuladas *in vitro*. Las células procedentes de pacientes con EM no tenían la capacidad de diferenciarse a linfocitos Treg. Las células mononucleares que venían de los sujetos sanos fueron cultivadas con extractos bacterianos de *Acinetobacter calcoaceticus*. Tras esta estimulación se observó que había una restricción para que se diferenciaran en linfocitos Treg. Por el contrario, se generó un aumento de linfocitos efectores proinflamatorios T CD4+ productores de IFN α . Esta diferenciación hacia una respuesta Th1 se potenciaba si los extractos bacterianos que se empleaban pertenecían a la especie bacteriana *Akkermansia muciniphila*. Sin embargo, cuando los investigadores seleccionaban extractos de *Parabacteroides distasonis* la situación cambiaba y se inducía una respuesta reguladora con el incremento de linfocitos Treg. Este experimento se realizó con otros géneros como el de *Eggerthella lenta* que estaban aumentados en el grupo de EM pero *in vitro* no se demostró que tuvieran influencia para la diferenciación a un tipo de respuesta inmunitaria de tipo Th1 o Th2.

Por último, se trasplantaron las especies bacterianas más significativas (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Akkermansia muciniphila* y *Parabacteroides distasonis*) al intestino de ratones criados en condiciones germ-free (GF) o que habían recibido tratamiento con antibióticos. Como cabía esperar, los ratones colonizados con *A. calcoaceticus* no presentaron inducción de linfocitos Treg (respuesta inhibida) mientras que los colonizados con *P. distasonis* sí que produjeron el cambio de respuesta inmune a linfocitos T reguladores. En un segundo paso, se realizó un trasplante de la microbiota intestinal procedente tanto de pacientes con EM como de sujetos sanos, a ratones C57BL/6 en condiciones GF. Los ratones con microbiota de pacientes EM desarrollaron una EAE más severa y se detectó una disminución del género *Sutterella* y un aumento de *Ruminococcus*²¹².

Gráfico 23. Estudio sobre el trasplante de microbiota intestinal de pacientes con EM a ratones

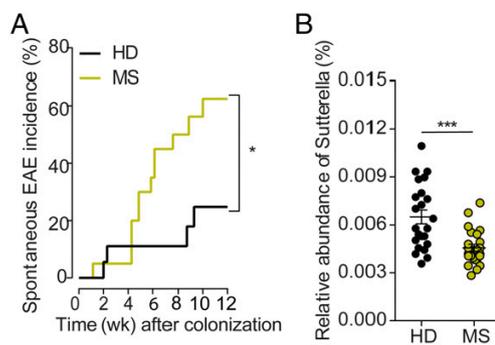


Estudio experimental en el que se realizó el trasplante de la microbiota intestinal procedente de pacientes con EM y de controles sanos y se compara con un grupo de control de ratones criados en condiciones germ free que no han recibido ningún trasplante. Se observa que la EAE inducida en los tres grupos de ratones difiere significativamente en severidad de los síntomas. La EAE inducida en los ratones con microbiota procedente de donantes de EM es mayor que la inducida en el grupo que recibió la microbiota de sujetos sanos. A su vez, ésta fue más severa que los ratones GF que no recibieron trasplante de microbiota, como se ha demostrado en otros estudios experimentales anteriores (de Cekanaviciute, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2017)

En el año 2017 se publicaron los resultados de un estudio realizado de nuevo por **Kerstin Berer** y colaboradores con gemelos monocigotos en los que no de ellos estaba afectado por una EM clínicamente definida, pero el otro era sano. Se realizó el estudio de la microbiota que, sin embargo no encontró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Únicamente cuando se realizó

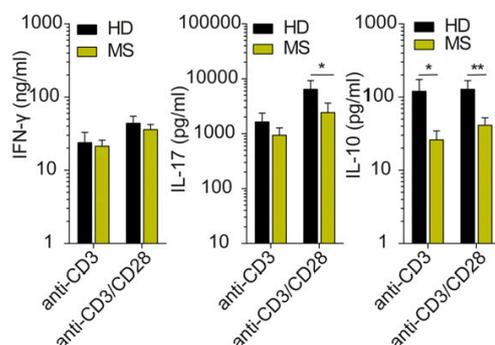
el estudio por subgrupos, los pacientes con EM no tratados tenían niveles más elevados de *Akkermansia muciniphila* que los controles. La microbiota intestinal de los gemelos fue transplantada a ratones crecidos en condiciones germ-free. De forma significativa, la EAE que desarrollaron espontáneamente los ratones GF colonizados por microbiota de gemelos con EM fue más frecuente (incluso que en estudios previos con ratones GF colonizados por microbiota simple o bacterias filamentosas segmentarias). Comparando la microbiota intestinal derivada de la procedente de gemelos donantes sanos y afectados por EM, se observó que los géneros *Adlercreutzia* y *Tannerella* eran más abundantes y el de *Ruminococcus* presentaba niveles bajos en la población de ratones con microbiota procedente de gemelos sanos. Sin embargo, los procedentes de gemelos con EM presentaban niveles reducidos del género *Sutterella*. Como en otros estudios, se detectó niveles disminuidos de IL-10 en el estudio de linfocitos de sangre periférica en los gemelos con EM²¹³.

Gráfico 24. Trasplante de microbiota procedente de gemelos (EM/sano) a ratones GF



Estudio experimental que se realiza a través del trasplante de material fecal (microbiota intestinal) procedente de gemelos (unos pacientes con EM y sus hermanos sanos) a ratones RR SJL/J humanizados criados en condiciones germ-free. A. Incidencia de EAE espontánea en ratones tras la colonización con microbiota procedente de los gemelos sanos (HD) e incidencia claramente superior en ratones tras la colonización de microbiota procedente de los gemelos con EM. B. Disminución significativa de *Sutterella* en la microbiota intestinal de ratones tras colonización de material procedente de donantes de gemelos con EM (de Berer, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2017)

Gráfico 25. Producción de citoquinas antiinflamatorias en estudio de trasplante fecal



Estudio experimental que se realiza a través del trasplante de material fecal (microbiota intestinal) procedente de gemelos (unos pacientes con EM y sus hermanos sanos) a ratones RR SJL/J humanizados criados en condiciones germ-free. A. Incidencia de EAE espontánea en ratones tras la colonización con microbiota procedente de los gemelos sanos (HD) e incidencia claramente superior en ratones tras la colonización de microbiota procedente de los gemelos con EM. B. Disminución significativa de *Sutterella* en la microbiota intestinal de ratones tras colonización de material procedente de donantes de gemelos con EM (de Berer, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2017)

2.5 ENSAYOS CLÍNICOS INTERVENCIÓNISTAS CON TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS

2.5.1 Ensayos clínicos con Vitamina D

El conocimiento sobre la disbiosis de la microbiota intestinal como posible factor etiológico de la esclerosis múltiple ha derivado en varios ensayos clínicos usando productos no farmacológicos como los suplementos de vitamina D o probióticos específicos.

En primer lugar se realizó un estudio piloto en el año 2011²¹⁴ que posteriormente se publicó en el año 2016 por el grupo de **Brandi L. Cantarel** y colaboradores. Se reclutaron 7 pacientes con EMRR y 7 controles sanos, con la condición de presentar niveles de vitamina D3 por debajo de 30 ng/dl. Los pacientes no debían estar recibiendo tratamiento modificador de la enfermedad o bien ser tratados con acetato de glatirámico, circunstancia que se dio en 5/7 pacientes, todo ello para reducir la posible influencia del TME sobre la microbiota. Los sujetos del estudio entregaron una primera muestra de heces al inicio del estudio y una segunda muestra tras haber recibido 90 días de suplementación con 5.000UI/día de

vitamina D3. Cuando se comparó la composición bacteriana de la microbiota intestinal de pacientes y controles antes de la suplementación se observó que el grupo de pacientes tenía menos niveles de *Bacteroidaceae* y *Faecalibacterium*, y una mayor cantidad de *Ruminococcus*. En cuanto a las diferencias encontradas entre los propios pacientes con EM según recibiesen tratamiento o no, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los siguientes géneros bacterianos: *Bacteroidaceae*, *Ruminococcus*, *Lactobacillaceae*, *Clostridium* y otros *Clostridiales*.

En las muestras de microbiota recibidas tras el periodo de suplementación de 90 días se detectó un aumento de las abundancias relativas de los géneros *Faecalibacterium* (microorganismo productor de butirato, un ácido graso de cadena corta -AGCC- con efectos antiinflamatorios) y *Enterobacteriaceae* mientras que disminuyó el de *Ruminococcus*, en el grupo de pacientes con EM. En concreto, los pacientes con EM no tratados experimentaron un aumento de los géneros *Akkermansia*, *Faecalibacterium* y *Coprococcus* después de la suplementación con vitamina D, en comparación con el grupo control y el de EM tratado con acetato de glatirámero. Por otro lado, los pacientes con EM tratados con acetato de glatirámero presentaron un aumento en los niveles de *Janthinobacterium* y una disminución de *Eubacterium* y *Ruminococcus* tras la suplementación de vitamina D.

Por otro lado, este estudio señala que el hallazgo de un grupo de géneros bacterianos en conjunto puede predecir si la muestra ante la que nos encontramos será de un paciente de EM o de un sujeto sano. Los géneros bacterianos implicados son *Rikenellaceae* II, *Lachnospiraceae*, *Porphyrromonadaceae*, *Bacteroides* y *Oscillibacter*²¹⁵.

Gráfico 26. Abundancias relativas de géneros bacterianos en pacientes tratados con vitamina D

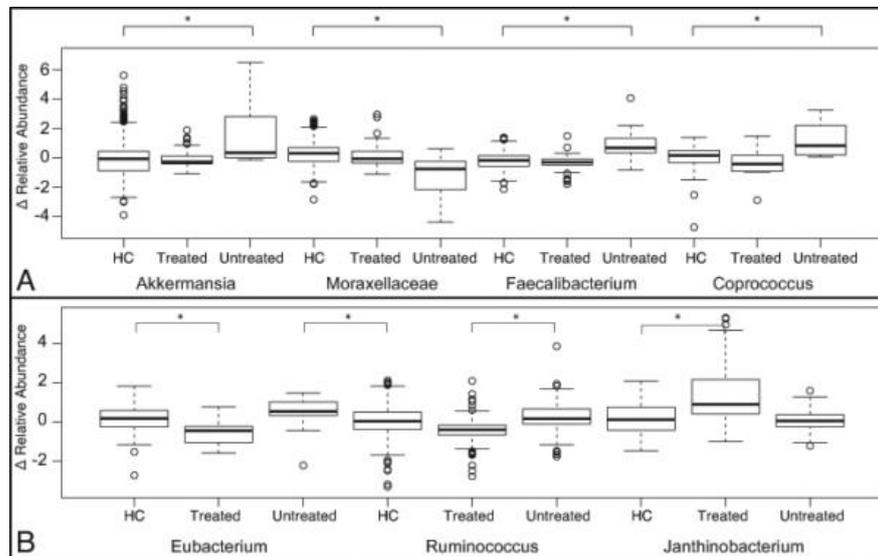


Diagrama de cajas que refleja la distribución de las abundancias relativas de los siguientes géneros bacterianos: *Akkermansia*, *Moraxellaceae*, *Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Janthinobacterium*, que se determinaron antes y después de recibir la suplementación con vitamina D el grupo de pacientes con EM tratados, pacientes con EM no tratados y controles sanos (de Cantarel, et al. *J Investig Med*. 2016)

Por último mencionar que se ha creado un consorcio entre múltiples países para aunar esfuerzos en la investigación de la microbiota intestinal en los pacientes de esclerosis múltiple como factor etiopatogénico de la enfermedad y así poder obtener información de su posible rol en el diagnóstico y manejo de los pacientes. Se trata del *MS Microbiome Consortium (MSMC)* cuyo primer artículo tenía como primer autor a **Sergio Baranzini**. En el año 2014 fueron publicados sus resultados iniciales que mostraron diferencias estadísticamente significativas en algunos géneros bacterianos detectados en la población de pacientes con EM tratados con acetato de glatirámero en comparación con controles sanos. Se observó un aumento en las abundancias relativas de la familia *Enterobacteriaceae* en las pacientes mujeres así como diferencias estadísticamente significativas entre diferentes áreas geográficas de residencia (*Nueva York vs. San Francisco*). Además, cuando transfirieron la microbiota de pacientes con EM a ratones criados en condiciones

germ-free, éstos desarrollaron una EAE más severa, como ha ocurrido en otros estudios previos²¹⁶.

2.5.2 Ensayos clínicos con probióticos

En cuanto a los ensayos clínicos con probióticos en pacientes con EM destaca el estudio realizado por el grupo investigador iraní de **Ebrahim Kouchaki** publicado a finales del 2015. Se trata de un ensayo clínico en el finalmente participaron a 54 pacientes con EM que recibían terapia con interferón beta 1a que se aleatorizaron en dos grupos, el de tratamiento, que consistía en la administración de un mix de probióticos que contenía *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus fermentum* (cada uno con una dosis de 2×10^9 CFU/g) en una cápsula diaria durante 12 semanas, y un grupo placebo. Durante la duración del estudio se evaluaron parámetros clínicos, metabólicos y de salud mental, antes y después del ensayo terapéutico. Ningún paciente experimentó brotes durante el estudio. Se observó una mejoría significativa de la discapacidad medida por EDSS de $0,3 \pm 0,6$ puntos. También experimentaron mejoría en los cuestionarios de salud mental de estrés y depresión. Por otro lado, mejoraron significativamente los parámetros metabólicos como los niveles de la proteína C reactiva y los metabolitos del óxido nitroso así como el ácido malondialdehído (producto de la peroxidación lipídica implicada en el estrés oxidativo)²¹⁷. Se redujo asimismo los niveles de insulina en plasma, de la propia resistencia a la insulina y la función de células beta así como se mejoraron los niveles HDL-colesterol de forma significativa, cuando compararon el grupo del mix de probiótico con el grupo placebo²¹⁸.

Tabla 2. Marcadores biológicos y escalas de síntomas asociados en EM tras tratamiento con probióticos

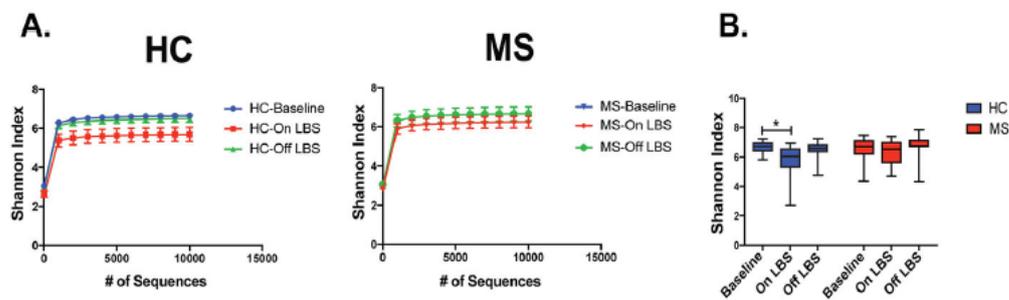
	Placebo group (n = 30)	Probiotic group (n = 30)	p ^b
EDSS	0.05 ± 0.1	-0.4 ± 0.1	0.003
BDI total scores	-1.3 ± 0.8	-5.5 ± 0.8	<0.001
GHQ scores	-3.2 ± 1.1	-8.5 ± 1.1	0.002
DASS scores	-7.6 ± 2.2	-15.0 ± 2.2	0.02
hs-CRP (µg/mL)	0.2 ± 0.4	-1.1 ± 0.4	0.02
NO (µmol/L)	-7.2 ± 0.8	2.1 ± 0.8	<0.001
TAC (mmol/L)	23.7 ± 21.9	21.2 ± 21.9	0.93
GSH (µmol/L)	45.3 ± 14.2	-9.0 ± 14.2	0.01
MDA (µmol/L)	0.3 ± 0.1	-0.006 ± 0.1	0.003
FPG (mg/dL)	2.5 ± 0.9	2.0 ± 0.9	0.70
Insulin (µIU/mL)	1.4 ± 0.7	-2.9 ± 0.7	<0.001
HOMA-IR	0.2 ± 0.2	-0.6 ± 0.2	<0.001
HOMA-B	3.9 ± 2.7	-11.6 ± 2.7	<0.001
QUICKI	-0.005 ± 0.003	0.01 ± 0.003	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	3.0 ± 4.8	-5.5 ± 4.8	0.21
VLDL-cholesterol (mg/dL)	0.6 ± 1.0	-1.1 ± 1.0	0.21
Total cholesterol (mg/dL)	7.9 ± 3.3	6.2 ± 3.3	0.71
LDL-cholesterol (mg/dL)	6.4 ± 3.0	4.6 ± 3.0	0.66
HDL-cholesterol (mg/dL)	1.1 ± 0.5	2.6 ± 0.5	0.06
Total-/HDL-cholesterol	0.08 ± 0.05	-0.09 ± 0.05	0.03

Estudio clínico experimental en pacientes con EM que recibieron tratamiento con interferón beta 1 a, que fueron randomizados para ser tratados con una combinación de probióticos y otro grupo control de pacientes con EM que no recibieron este tratamiento. Se determinaron las puntuaciones de las escalas de síntomas asociados a EM como discapacidad (EDSS) y síntomas de depresión y ansiedad (BDI= Beck depression inventory-cuestionario de depresión-; DASS=escala de depresión y ansiedad) junto con el análisis de marcadores biológicos de inflamación y estrés oxidativo (FPG= Glucosa en plasma; GHQ=cuestionario de salud general; GSH=glutación total; HOMA-IR=homeostasis model of assessment-estimated insulin resistance (medición de resistencia a la insulina); HOMA-B=homeostasis model of assessment-estimated B cell function (función de células B); hs-CRP=Proteína C reactiva de alta sensibilidad; MDA=malondialdehído; NO=óxido nítrico; QUICKI=quantitative insulin sensitivity check index (insulina); TAC=Capacidad antioxidante total) (de Kouchaki, et al. Clin Nutr. 2017)

En el ensayo clínico de **Stephanie Tankou** y colaboradores publicado en el año 2018 también se realizó una intervención con un mix de probióticos. Se establecieron dos grupos, uno de pacientes con EMRR (n=9) que en su mayoría estaban tratados con acetato de glatirámico (7/9) y otro grupo control con sujetos sanos (n=13). El mix de probióticos (LBS) se administró dos veces al día a lo largo de dos meses de seguimiento. Cada sobre contenía en total 900 billones de UFC de los siguientes géneros bacterianos: *Lactobacillus* (*L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subspecies bulgaricus*), *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*) y *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*). Se recogieron muestras de heces para el estudio de microbiota intestinal y de sangre para el estudio de los monocitos de sangre periférica, en diferentes momentos del estudio: antes de la

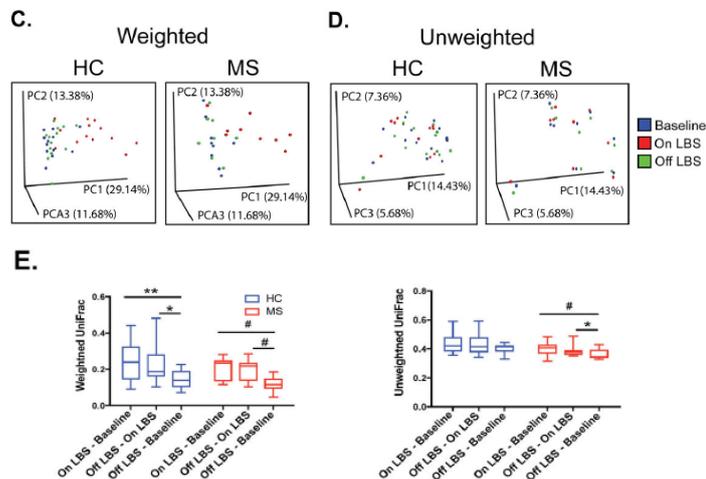
intervención, justo al finalizar la administración del probiótico y tres meses después de haberlo suspendido. En el caso de la microbiota intestinal, se recogieron dos muestras de heces separadas por una semana en cada uno de los momentos de recogida de muestras del estudio. Tras la administración del probiótico LBS se observó una reducción en la diversidad alfa en el grupo de controles, pero no hubo cambios en la del grupo de pacientes EM.

Gráfico 27. Estudio de diversidad alfa en muestras de pacientes tras recibir probióticos



En este estudio se determinan las diferencias que existen entre las muestras de sujetos sanos y pacientes con EM en cuanto a la diversidad en especies bacterianas. La diversidad alfa mide la diversidad de especies bacterianas en una misma muestra de microbiota. A. Se muestran las curvas de rarefacción de las muestras de controles y pacientes con EM que muestran el número de lecturas (OTUs encontrados) en las muestras de controles y pacientes con EM que muestran el número de lecturas (OTUs encontrados) en las muestras que llegan a una zona de plateau en la que por más análisis que realicemos en la muestra no aumentan el número de OTUs detectados. Muestra el número de especies bacterianas de una muestra. B. El índice de Shannon (medida de diversidad alfa) disminuye tras la intervención del probiótico, volviendo a su nivel basal tras la suspensión en el grupo de sujetos sanos. No se encuentran diferencias en el grupo de EM (de Tankou, et al. Ann Neurol. 2018)

Gráfico 28. Estudio de la diversidad beta en muestras de pacientes que recibieron probióticos



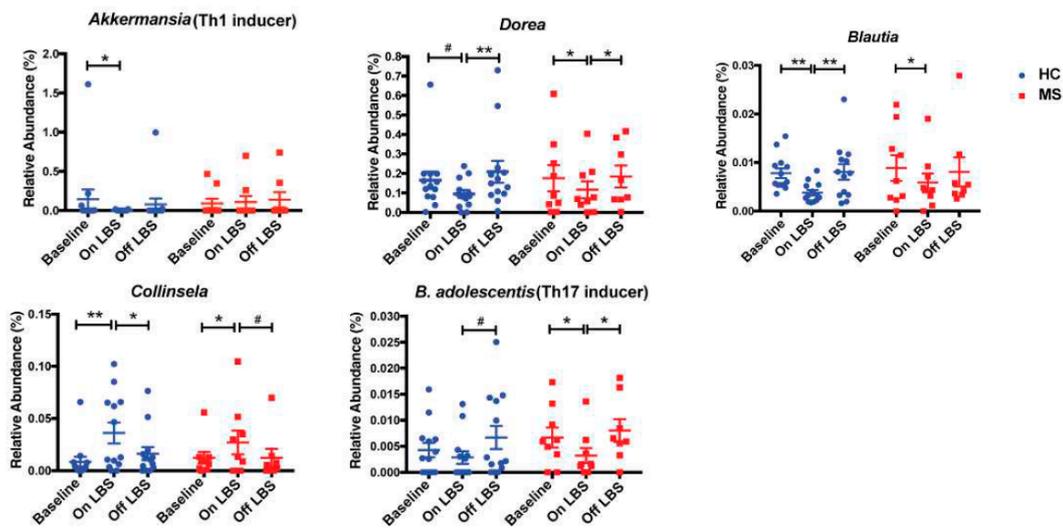
El estudio de diversidad beta consiste en comparar la composición bacteriana entre varias muestras determinando cómo de diferentes o similares son las especies bacterianas entre muestras de diferentes sujetos. C y D. Se analiza la métrica UniFrac ponderada y no ponderada en ambos grupos (pacientes y controles) en los diferentes momentos del estudio (basal, tras recibir probióticos y tres meses después de su finalización). En el grupo control se observó una disminución significativa de la variabilidad de la estructura general de la microbiota y en el grupo de pacientes se observó una tendencia similar no significativa ($p=0,10$). Tras el periodo de observación al finalizar el tratamiento con probióticos la estructura general de la microbiota intestinal volvió a sus niveles basales en el grupo control y de pacientes ($p = 0,58$, $p = 0,54$ respectivamente). E. Se comparan las distancias UniFrac ponderada y no ponderada de parejas de muestras en diferentes momentos del estudio de cada individuo, es decir, la muestra basal con la del final del tratamiento, la del tratamiento con la posterior a la suspensión del probiótico, y la posterior a la suspensión con la basal. En esta última se observan los valores más bajos, dando a entender que la microbiota intestinal de los controles y los pacientes posterior a la suspensión del tratamiento volvía a ser más similar que la muestra basal (de Tankou, et al. Ann Neurol. 2018)

En cuanto a la composición de la microbiota intestinal se observó un aumento en la abundancia de los géneros bacterianos *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* en ambos grupos del estudio. Por otra parte, se constató un aumento en los niveles de la familia *Veillonellaceae* y el género *Collinsela* en el grupo control. Concretamente estos dos microorganismos apenas se encontraban representados en la microbiota de los pacientes recogida en el momento inicial antes de la intervención. Asimismo, la suplementación con LBS disminuía los géneros *Akkermansia* (un conocido inductor de la respuesta inmune Th1), *Blautia* y *Dorea*, microorganismos que se habían encontrado con niveles elevados en pacientes con EM; y también se relacionó con un decremento en ambos grupos de los niveles de *Bifidobacterium adolescentis* (otro inductor de la respuesta proinflamatoria, en este caso de Th17). Sin embargo, al finalizar la administración del mix de probiótico los

cambios generados en la microbiota intestinal tendieron a volver a su composición inicial.

En cuanto al estudio de los monocitos plasmáticos no se demostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de linfocitos T reguladores (CD4+CD127^{low}CD25^{high} Tregs y CD4+IL-10⁺ Tregs). Sin embargo, tras la discontinuación del LBS se observó una tendencia a la disminución de estas células inmunes en el grupo control. También se encontró una tendencia al aumento de las células T de memoria CD8⁺ en el grupo de EM y una tendencia a la disminución de las frecuencias relativas de las células Th1 y Th17 tras la administración del LBS en ambos grupos.

Gráfico 29. Impacto del tratamiento con probióticos en algunos géneros bacterianos de pacientes con EM

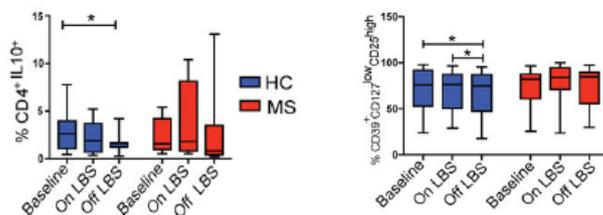


Estudio experimental sobre un grupo de pacientes con EM y otro grupo de sujetos sanos en el que se evalúa el impacto de un tratamiento con una combinación de probióticos LBS sobre las abundancias relativas de los géneros bacterianos *Akkermansia*, *Dorea*, *Blautia*, *Collinsela* y *B. Adolescentis*, en muestras recogidas en diferentes momentos (basal, al final de las 12 semanas de la intervención con LBS y tres meses después de haberlo suspendido) (de Tankou, et al. *Ann. Neurol.* 2018)

Por último, los resultados mostraron que al final de la toma del mix de probióticos LBS se disminuía la expresión del alelo HLA-DQA1, relacionado con el riesgo de EM, en el grupo de sujetos sanos, así como también en la expresión de genes proinflamatorios HLA-DPA1 e IL6ST en el estudio de monocitos de sangre periférica. Al interrumpir el tratamiento, se detectó una disminución de la expresión del gen PTNP2 de carácter antiinflamatorio y una mayor expresión de

HLA-DPA1 y del alelo HLA-DPB1, también marcador de riesgo de EM. En el mismo sentido, en el grupo de pacientes con EM se encontró un aumento en la expresión de genes antiinflamatorios (IL-10RA, LILRB2 y CYBB) y un decremento en genes proinflamatorios (MALT1 y LGALS3) tras la administración de LBS en pacientes con EM. Este fenómeno se relacionó con el aumento en la abundancia de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* por el mix de probiótico LBS²¹⁹.

Gráfico 30. Efectos del mix de probiótico sobre los linfocitos Treg y la producción de IL-10



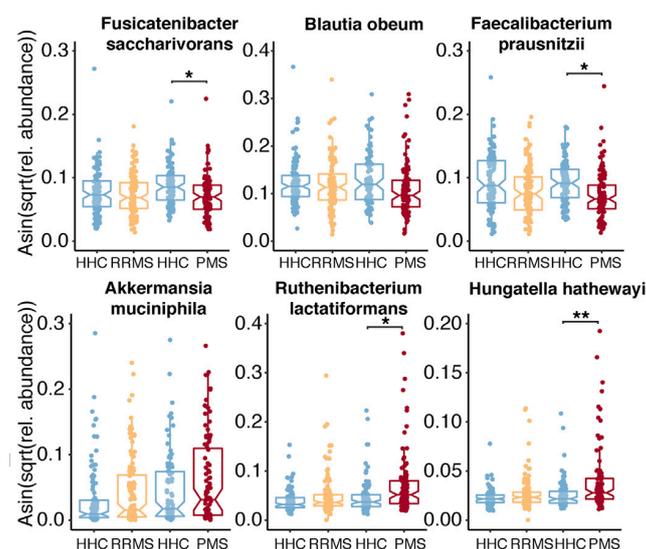
Tras la suplementación con un mix de probióticos no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la determinación del número de linfocitos Treg y la citoquina antiinflamatoria IL-10. No obstante, tras la suspensión del probiótico, se observó una tendencia a la reducción de los Treg una reducción de los niveles IL-10 en los controles (de Tankou, et al. Ann. Neurol. 2018)

En el año 2022 el consorcio internacional que dirige el **Estudio Internacional del Microbioma de la Esclerosis Múltiple (iMSMS)** publicó otro estudio que consiguió muestras de 576 pacientes con EM (de los cuales el 36% no tenía tratamiento en el momento de la recogida de muestras) pareados con controles sanos convivientes pero genéticamente no relacionados (1152 sujetos en total). En el grupo de pacientes con EM no tratados se detectó el aumento de 16 especies bacterianas cuando fueron comparadas con el grupo control, al igual que se detectó la reducción en las abundancias relativas de 7 especies. La tendencia era similar con los pacientes de formas progresivas de EM aunque no se alcanzó la significación estadística por el pequeño tamaño muestral de este grupo. Cuando compararon el grupo de EMP no tratada y el de EMRR no tratada detectaron una disminución de *Faecalibacterium saccharivorans* y *Faecalibacterium prausnitzii* y una mayor representación de *Ruthenibacterium lactatiformans*, *Hungatella hathewayi* y *Eisenbergiella tayi* en las formas progresivas, lo que sugiere que estas especies bacterianas podrían relacionarse con la progresión de discapacidad en los pacientes con EM. Con respecto al grupo control se observó un aumento de la proporción en

el grupo control de *Akkermansia muciniphila*, *Ruthenibacterium lactatiformans*, *Hungatella hathewayi* y *Eisenbergiella tayi* y una disminución de *Faecalibacterium prausnitzii* y *Blautia*. En el grupo de EM no tratada, los resultados arrojaron que la vía de degradación del fitato estaba sobrerrepresentada de forma significativa y la vía del metabolismo de los carbohidratos productores de piruvato estaba disminuida. En este estudio se observó que los pacientes tratados con interferón- β presentaban un aumento en los transportadores de ácidos grasos de cadena corta²²⁰.

Y finalmente, el estudio más recientemente publicado ha sido el del equipo investigador danés encabezado por **Florence Thirion** en el actual año 2023, en el

Gráfico 31. Abundancias relativas de algunos géneros bacterianos en formas progresivas de EM



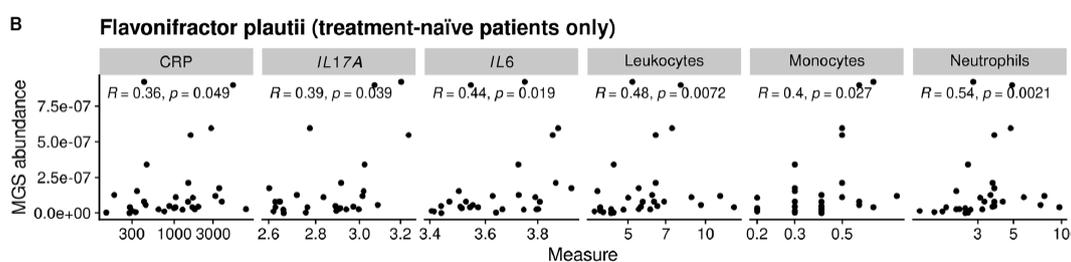
Estudio de la microbiota intestinal de muestras procedentes de varios grupos del estudio (pacientes con EMRR tratados, EMRR no tratados, pacientes con EM con formas progresivas no tratadas y controles sanos ajustados por edad, sexo e IMC). Se observaron diferencias estadísticamente significativas con un aumento de *Akkermansia muciniphila*, *Ruthenibacterium lactatiformans*, *Hungatella hathewayi* y *Eisenbergiella tayi* en el grupo control con respecto al resto, así como la disminución de *Faecalibacterium prausnitzii* y *Blautia* en este mismo grupo. Además se observó una disminución de *F. saccharivorans* y *F. prausnitzii* y un aumento de *R. lactatiformans*, *H. hathewayi* y *E. tayi* en el grupo de EM progresiva no tratada con respecto al grupo de pacientes con EMRR no tratada (de Zhou, et al. Cell 2022).

que se evaluó la microbiota intestinal junto a otros marcadores biológicos en 148 pacientes con EM y 148 controles sanos emparejados por edad y género. En el grupo de pacientes, 48 casos tenían una EM activa en el momento del reclutamiento, es decir, habían presentado un brote en los últimos dos años; y los otros 100 pacientes no eran activos. Cuando el análisis de comparación se ajustó

con las variables edad, género, tabaquismo y tratamiento modificador de la enfermedad, 61 especies bacterianas emergieron con diferencias estadísticamente significativas, y en concreto, 31 especies se encontraban con mayor abundancia en el grupo de pacientes con EM: *Ruminococcus torques*, *Dysosmobacter welbionis*, *Flavonifractor plautii*, *Lawsonibacter phoceensis*, *Hungatella*, *Bilophila wadsworthia*, *Gordonibacter urolithinfaciens*, *Anaerobutyricum hallii*, *Pseudoflavonifractor capillosus*, *Blautia wexlerae*, *Blautia massiliensis*, *Anaerotruncus colihominis*, *Erysipelatoclostridium ramosum*, *Ruminococcus gnavus*, *Sellimonas intestinalis*, *Coprobacillus cateniformis* y *Clostridium innocuum*. Por otra parte, las especies relacionadas con los controles sanos fueron *Haemophilus parainfluenzae*, *Veillonella rogosae*, *Victivallis vadensis*, *Bifidobacterium angulatum* y *Streptococcus australis*.

Las especies relacionadas con la EM presentaban una correlación negativa con la riqueza de especies, y al contrario, las relacionadas con los controles sanos se correlacionaron positivamente con la riqueza. Las primeras se relacionaron con los marcadores biológicos proinflamatorios como el recuento de leucocitos, la proteína C reactiva, IL-17A e IL-6, siendo *Flavonifractor plautii* la especie que más potente presentaba esta correlación. Estos marcadores se relacionaron de forma inversa con las especies relativas al grupo control. Por otra parte, *Clostridium leptum* (relacionada con la EM), también presentó una correlación directa con la expresión de genes de células inmunes inducidas por IFN: MX1, IFIT1, IFI44L e IFI27.

Gráfico 32. Correlación entre la abundancia de *F. plautii* con los niveles de marcadores de inflamación



Estudio de microbiota intestinal en pacientes con EM activa, EM no activa y controles sanos. Se realizó la determinación de marcadores biológicos de inflamación y se encontró una correlación positiva con los niveles detectados de algunos géneros bacterianos siendo Flavonifractor plautii su principal representante y se asoció a aumento de proteína C reactiva, IL-17A, IL-6, recuento de leucocitos, monocitos y neutrófilos (de Thirion, et al. Genome Med. 2023)

Con respecto al estatus de EM activa y EM no activa no hubo correlación de la riqueza con el tiempo desde el último brote antes del reclutamiento o el primer brote desde el momento basal. En el grupo de EM activa había más niveles de *Methanobrevibacter smithii* y *Victivallis vadensis*. Sin embargo, en el grupo de EM no activa se encontró más abundancia relativa de las especies *Faecalibacterium prausnitzii* (conocido productor de butirato) y *Gordonibacter urolithinfaciens* (productor de urolitina que tiene propiedades antiinflamatorias en el modelo animal amiloraba los síntomas de la EAE)²²¹.

A nivel metabólico, en este grupo había aumento del acetilneuraminato y de los potenciales de degradación de acetilmanosamina. Sin embargo, en el grupo de EM activa estaba elevada la metanogénesis. El subgrupo de EM activa sin tratamiento previo presentó una correlación positiva con los niveles de IL-22, IL-17A, IFN- β , IL-33 y TNF- α , y negativa con la proteína C reactiva y expresión génica de IL6. Al contrario se manifestaron los hallazgos en el grupo de EM no activa sin tratamiento previo (no significativamente estadístico). En concreto, *F. prausnitzii* fue inversamente proporcional a los niveles de IL-10 y *G. urolithinfaciens* lo fue al recuento de linfocitos la expresión génica de IL10. Las especies predominantes en la EM activa si que tuvieron una correlación positiva con la riqueza (al contrario de lo que cabría esperar por estudios anteriores).

Gráfico 33. Estudio del metaboloma en la microbiota intestinal de pacientes con EM

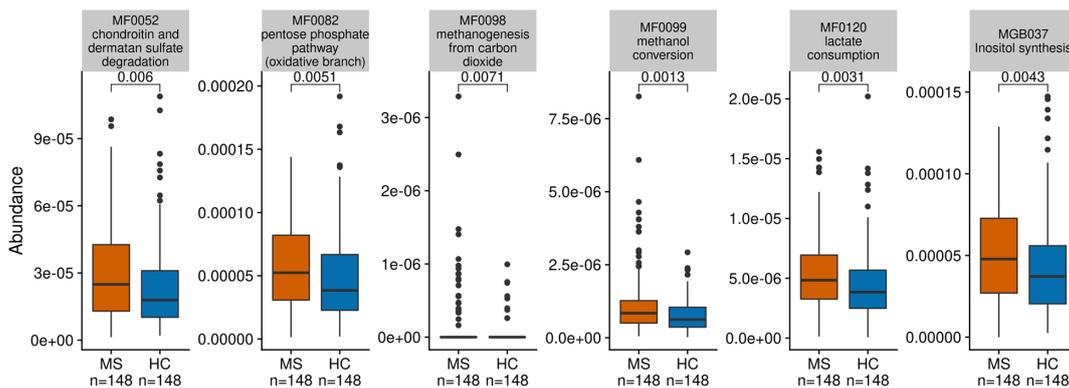
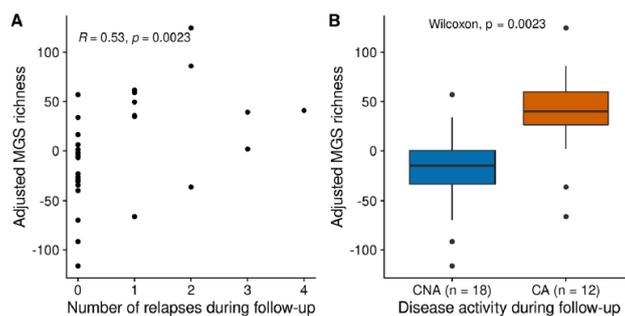


Diagrama de cajas en el que se representan los niveles de los metabolitos encontrados en las muestras de microbiota intestinal de pacientes con EM y los controles sanos. Se trata de metabolitos implicados en diferentes vías metabólicas (vía condroitín, vía pentosa fosfato, vía metanogénesis, vía conversión metanol, vía consumo de lactato, vía síntesis inositol). Se analiza pues la riqueza de las especies bacterianas relacionadas con estas vías metabólicas ajustando por las siguientes variables: edad, género, tabaquismo y tratamiento TME, y se determina que están elevadas en el grupo de EM con respecto al control (de Thirion, et al. Genome Med. 2023)

Finalmente, este fue el primer estudio que se publicó sobre el viroma (los virus comensales de la microbiota intestinal) en la EM. El orden más abundante en el conjunto de sujetos del estudio fue *Caudovirales bacteriophages*. Aquí se encontró más riqueza de especies virales en el grupo de casos. Cuando se compararon las especies entre casos y controles solo se halló diferencias estadísticamente significativas con el *Enterococo fago EFC-1* (un bacteriófago del *Enterococcus faecalis* de la microbiota humana) que se encontraba en menor proporción entre los pacientes con EM. Este virus presentaba una relación positiva con la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias como IL-1B y TNF α , y una correlación inversa con la variable tratamiento. Por otro lado, la *Enterobacteria fago cdtI* (un bacteriófago de *Escherichia coli*), presentó precisamente una correlación positiva con esta variable²²².

Gráfico 34. Estudio del viroma en la microbiota intestinal en pacientes con EM activa



Primer estudio publicado del viroma en la microbiota intestinal de pacientes con EM activa. En los gráficos se refleja la relación que existe entre la actividad de la enfermedad y la riqueza de especies analizando los subgrupos de EM con actividad y sin actividad ajustado a edad, género, tabaquismo y tratamiento. A. Se muestra el número de brotes que han presentado todos los casos durante el seguimiento y la riqueza de las especies bacterianas metagenómicas. B. Relación entre la riqueza de especies y la actividad de la EM (muestras de pacientes con brotes o sin brotes), que es menor en el grupo de EM activa. (de Thirion, et al. *Genome Med.* 2023)

A continuación, se muestra un cuadro resumen de la evidencia científica de las alteraciones de la microbiota intestinal en los pacientes con esclerosis múltiple recogida de entre todos los hallazgos significativos de los diferentes estudios realizados hasta el momento actual²²³.

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Abundance	Effects on the immune system
	Bacilli	Lactobacillales	Streptococaceae	Streptococcus	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Increased in MS		
					<i>Streptococcus salivarius</i>	Increased in MS		
					<i>Streptococcus oralis</i>	Increased in MS		
					<i>Streptococcus mitis</i>	Increased in MS	Promotes Th17 differentiation and participates in cell-mediated tissue damage in autoimmunity	
	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	<i>Megasphaera</i>	Decreased at MS onset			
				<i>Mitsuokella</i>	Decreased at MS onset			
				<i>Lactobacillus</i>	Decreased in MS			
	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiales	Akermansiaceae	<i>Akkermansia</i>	Increased in MS	Associated with SCFA production and pro-inflammatory effects		
				<i>Akkermansia muciniphila</i>	Increased in PPMS			
				<i>Eggerthella</i>	Increased in MS			
Coriobacteriidae	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	<i>Eggerthella</i>	Increased in MS				
			<i>Collinsella</i>	Decreased in MS				
			<i>Adlercrantzia</i>	Decreased in MS	Affects M2 polarization, IL-10 expression in M2 macrophages, and inhibition of CD4 ⁺ T-cd1 priming by DCs			
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobrevibacter</i>	Increased in MS	Recruitment of inflammatory cells and DCs	
Heunggongviriae	Uroviricota	Caudovirales				Increased in MS		

III- JUSTIFICACIÓN

Y OBJETIVOS

ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

La microbiota intestinal como marcador diagnóstico en pacientes con esclerosis múltiple

3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica de naturaleza inflamatoria y degenerativa del sistema nervioso central. En la mayoría de los pacientes cursa en forma de brotes o recaídas, que son la manifestación clínica de la aparición de una o más lesiones inflamatorias que traducen un proceso de desmielinización en un área circunscrita del SNC. Más tarde, mecanismos autorreguladores de la inflamación intentan frenarla, entrando en juego también los fenómenos de reparación (remielinización) del área afectada. Sin embargo, con el tiempo estos mecanismos fracasarán en la remodelación de la mielina y el área de sustancia blanca quedará afectada en alguna medida de forma irreversible. Según la gravedad y localización de la lesión, las manifestaciones clínicas se revertirán por completo o quedarán síntomas irreversibles (secuelas). Los síntomas irreversibles pueden estar presentes desde el primer brote o manifestarse más adelante, pero dado que los pacientes sufren numerosos brotes a lo largo de la evolución, estos síntomas tienen carácter acumulativo, por lo que los pacientes presentarán cada vez más discapacidad neurológica a lo largo de sus vidas.

Lo anterior expuesto responde al esquema de la fase inicial de la enfermedad que presenta un notorio componente inflamatorio. No obstante, en las últimas décadas se ha hecho énfasis en el descubrimiento de que la neurodegeneración está presente desde los primeros momentos de la enfermedad y no solo cuando los mecanismos de autoregulación fracasan y los pacientes entran en la segunda fase

de la enfermedad caracterizada por la progresión de la discapacidad (EMSP). Esta neurodegeneración puede incluso ser independiente a la aparición de brotes o lesiones inflamatorias (PIRA) y es precisamente la causante de la discapacidad progresiva en la EMSP. En esta fase avanzadas, el componente inflamatorio disminuye drásticamente y perdura la neurodegeneración crónica.

Todo ello conlleva a la aparición de discapacidad neurológica que afecta al normal desarrollo de las capacidades físicas de los pacientes, quedando con dificultad para caminar, llegando a necesitar silla de ruedas o incluso quedando encamado sin posibilidad de movilizar su cuerpo, en la fase final de la enfermedad. Asimismo, experimentan gran dificultad para la manipulación de objetos o destreza manual, afectación del habla con dificultad en la comunicación oral, disfagia, deterioro cognitivo subcortical y alteraciones esfinterianas, entre otros, de manera que la EM es la segunda causa de discapacidad en personas jóvenes tras los accidentes de tráfico¹⁴.

A lo largo de la historia de la atención a los pacientes con EM se ha pasado de ser meros observadores de la aparición de brotes y discapacidad progresiva, pasando por el tratamiento únicamente sintomático con la aplicación de bolos de corticoides que mejoraban y aceleraban la recuperación neurológica de los pacientes hasta conseguir una variedad no conocida hasta ahora de tratamientos modificadores de la historia natural de la enfermedad. No fue hasta el año 1993 cuando la investigación médica dio sus frutos y apareció el primer fármaco inmunomodulador que reducía la tasa de brotes. A lo largo de los últimos 30 años se han diseñado múltiples fármacos modificadores de la enfermedad (TME) que contemplan desde los primeros inmunomoduladores con un perfil de seguridad alto y relativa moderada eficacia, a fármacos inmunosupresores de alta eficacia que conducen a una depleción de estirpes celulares inmunes. A pesar de todas las aportaciones farmacológicas, tan solo hemos conseguido controlar en cierta medida el componente inflamatorio de la enfermedad. Aún queda un largo recorrido de aciertos y fracasos de fármacos que actúen sobre la neurodegeneración y la remielinización. No obstante, en el año 2019 se comercializó el primer fármaco inmunosupresor con capacidad para reducir significativamente la progresión en la población de pacientes con EM primaria progresiva.

Es este el motivo principal que promueve todas las investigaciones sobre el origen de la patogenia de la enfermedad. Conocer los agentes causales o los factores

influyentes en el inicio (trigger) y mantenimiento de la respuesta autoinmune sobre la mielina del SNC nos facilitará el conocimiento sobre la historia natural de la enfermedad y mejorarán los objetivos de la investigación médica para la obtención de fármacos que mejoren la neuroprotección o incluso sean preventivos de la EM, como los recientes hallazgos en la relación causal con el virus Epstein-Barr, que plantean el beneficio teórico de una vacuna específica.

En esta línea se han sucedido las investigaciones en el ámbito de la microbiota intestinal. En los diferentes estudios experimentales tanto en modelo animal como en pacientes con EM se ha obtenido una clara evidencia de la influencia que tiene la microbiota intestinal en la modulación del sistema inmunitario del huésped y el desarrollo de la enfermedad.

3.2 OBJETIVOS

Nuestro estudio se propone investigar la diferencia de la microbiota intestinal en pacientes de esclerosis múltiple comparándolos con un grupo de sujetos sanos así como determinar si existe relación entre la evolución de la EM (presencia de brotes o lesiones) con algunos microorganismos residentes en la microbiota intestinal. De esta forma, contribuirá a determinar si la microbiota intestinal puede ser tanto un factor iniciador (etiológico) como un factor pronóstico de la esclerosis múltiple, para así identificar futuras dianas terapéuticas.

3.3 HIPÓTESIS

La microbiota intestinal constituye un nuevo potencial agente etiológico en los pacientes con EM. En nuestro estudio queremos investigar si la composición y la biodiversidad de la microbiota intestinal es diferente en los pacientes de esclerosis múltiple comparándolos con una muestra de sujetos sanos que comparten los mismos hábitos de vida y dieta, seleccionados de entre sus familiares y convivientes.

Asimismo, estudiaremos las características clínicas y radiológicas de los pacientes con EM para averiguar si la microbiota intestinal puede influir en la actividad de la enfermedad, determinándose como factor pronóstico para la aparición de brotes y nuevas lesiones (EM activa).

IV - MATERIAL Y MÉTODO

4 MATERIAL Y MÉTODO

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio de investigación llevado a cabo durante el doctorado es un estudio de casos-controles prospectivo, elaborado en varios centros sanitarios (multicéntrico) que se ha llevado a cabo en varias fases. En primer lugar, se realizó un estudio de la microbiota intestinal en pacientes con EM y se comparó su composición y biodiversidad ecológica con un grupo de sujetos sanos, ajustados por la dieta (procedentes de convivientes o familiares con los que compartían hábitos de vida y dieta). En segundo lugar se realizó un seguimiento longitudinal de 24 meses de duración del grupo de pacientes con EM, monitorizando variables clínicas y radiológicas. Finalmente, se realizó el análisis estadístico para determinar si existía relación entre los microorganismos encontrados en la microbiota intestinal y la evolución presentada en los pacientes con EM, atendiendo a la presencia de nuevos brotes o recaídas o la aparición de nuevas lesiones desmielinizantes en los controles realizados por resonancia magnética.

4.2 POBLACIÓN DEL ESTUDIO

4.2.1 Selección de la muestra

Para el reclutamiento de los sujetos candidatos a participar en el estudio se evaluaron las características sociodemográficas y los datos clínico-radiológicos de los pacientes que eran atendidos en las consultas de Neurología de los Hospitales Universitarios de Torre Vieja y de Vinalopó. La selección de la muestra del grupo de pacientes se realizó con un muestreo no probabilístico consecutivo, es decir, se seleccionaron los pacientes que, cumpliendo los criterios de inclusión y no presentando ninguna circunstancia excluyente, fueron valorados en las consultas y de forma consecutiva fueron siendo incluidos en el estudio. Este proceso se inició en el mes de mayo de 2016.

Los sujetos sanos que participarían en el estudio como grupo control fueron seleccionados de entre sus familiares y/o convivientes que compartiesen la misma dieta habitual. Para confirmar su idoneidad, tanto los pacientes como los controles cumplimentaron un cuestionario sobre su dieta y estilo de vida, con el objetivo de evitar el sesgo de confusión que suponía el papel de la dieta dada la marcada influencia que tiene sobre la composición de la microbiota intestinal.

Los sujetos del estudio fueron seleccionados entre varios centros sanitarios. La gran mayoría de pacientes con EM (y sus controles sanos) se seleccionaron del Servicio de Neurología del Hospital Universitario de Torrevieja (Alicante) y en segundo lugar, se seleccionaron algunos pacientes en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario del Vinalopó (Elche, Alicante). El reclutamiento se hizo por neurólogos experimentadas en el estudio y manejo de pacientes con EM durante los meses de junio y julio del año 2016. Los participantes del estudio proporcionaron información sociodemográfica que incluía la edad, el género y el lugar de origen así como se obtuvo el peso, la talla, el IMC, y la información sobre la dieta habitual, entre otros. Asimismo, se recogieron las variables clínicas y radiológicas de los pacientes con EM. Por último, tras la confirmación de su inclusión en el estudio y firma del consentimiento informado, se recogieron las muestras de heces para su posterior análisis.

4.2.1.1 *Criterios de inclusión*

Los pacientes de esclerosis múltiple deben cumplir los criterios diagnósticos de McDonald 2017 y haber presentado uno o más brotes clínicos y/o una o más nuevas lesiones desmielinizantes en resonancia magnética (con o sin captación de gadolinio) durante al menos los últimos tres años antes de su inclusión en el estudio. Además, deberán haber firmado el formulario de consentimiento informado del estudio.

4.2.1.2 *Criterios de exclusión*

Los pacientes deben estar diagnosticados de la forma clínica recurrente remitente (EMRR). Quedan excluidas las formas progresivas de la enfermedad. Se excluyeron las pacientes embarazadas o con deseo de gestación. No deben tener el diagnóstico concomitante de enfermedad inflamatoria intestinal ni haber recibido tratamiento con fármacos anti-TNF α . Tampoco se incluyeron aquellos pacientes

que habían recibido terapia con corticoides sistémicos en el último mes, así como otros fármacos inmunosupresores como metotrexate, ciclofosfamida, mitoxantrona o ciclosporina A como tratamiento de la EM o de cualquier otra comorbilidad en los tres meses anteriores a su inclusión. Dado que los pacientes con actividad reciente eran los más idóneos, si presentaban un brote en el momento de inclusión en el estudio se agilizaba en ese momento la recogida de muestras y se administraba posteriormente el tratamiento corticoideo necesario, no afectando por tanto a la composición de la microbiota intestinal. Igualmente, para todos los sujetos del estudio se excluyeron aquellos que en los últimos 30 días previos a su inclusión habían sufrido una infección bacteriana activa demostrada o habían recibido antibióticos.

4.2.1.3 *Grupo control*

Se seleccionaron como controles a individuos sanos que convivían con los pacientes compartiendo la misma dieta, ya fueran familiares o no. Los sujetos no debían tener enfermedades autoinmunes ni antecedentes familiares de casos de esclerosis múltiple. No debían haber recibido tratamiento inmunosupresor por cualquier otra comorbilidad así como tampoco haber recibido tratamiento antibiótico en el último mes o bien tratamiento corticoideo en los últimos tres meses.

4.2.1.4 *Tamaño muestral*

Para calcular el tamaño muestral hay que tener en cuenta la prevalencia de EM en áreas sanitarias de población similar a la correspondiente a los hospitales donde se realiza el reclutamiento, aproximadamente de menos de 200.000 habitantes. En estas áreas no había sido calculada la prevalencia, pero de otras áreas cercanas sí que hay publicados resultados de prevalencia como San Vicent del Raspeig (provincia de Alicante), que llega a tener considerado de alta prevalencia con 102 casos/100.000 habitantes (IC al 95%: 79,1-132,2)²²⁴. Igualmente hay que considerar la incidencia de esta área con 4,6 casos/100.000 habitantes-año. En el momento de su diseño no habían publicados apenas trabajos sobre la composición de la microbiota intestinal en pacientes con EM por lo que tampoco se conocía la proporción de pacientes que podían presentar disbiosis intestinal. El cálculo del

tamaño muestral se hace en base al área sanitaria y se prevee que puedan ser incluidos 30 pacientes y sus correspondientes sujetos sanos como controles.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo de investigación fue evaluado por el Comité Ético de investigación clínica del Hospital Universitario del Vinalopó de Elche (Alicante) en el año 2016 y por el Comité de Ética de la Universidad Católica San Antonio de Murcia en el año 2019 durante su inclusión en los estudios de doctorado, obteniéndose su aprobación por ambos organismos.

El trato de los datos sobre la información sociodemográfica, clínica y radiológica de los sujetos del estudio se realizó de forma anónima y confidencial, cumpliendo la ley de Protección de Datos (Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales).

La manipulación de las muestras biológicas empleadas en este estudio se realizó atendiendo a los principios éticos en investigación con muestras biológicas según lo establecido en la ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biométrica; la ley 41/2002, de 14 de noviembre, reguladora de la Autonomía del Paciente; y la ley 14/1986, Ley General de Sanidad.

Este estudio cumple todos los principios éticos de investigación biomédica recogidos en la Declaración de Helsinki y en la Declaración Universal de los Derechos Humanos de la UNESCO.

Asimismo, todos los sujetos incluidos en el estudio firmaron el consentimiento informado.

4.4 CRONOGRAMA

4.4.1 Fase de inclusión de los participantes

Durante la visita basal se informó extensamente a los sujetos candidatos a entrar en el estudio sobre el protocolo del estudio con los procedimientos a seguir durante el mismo. Igualmente, se hizo entrega de la hoja de información del estudio y el formulario del consentimiento informado para que lo evaluaran en su domicilio.

Más tarde, se realizó la primera visita donde se comprobó que los sujetos candidatos cumplieren los criterios de inclusión y exclusión. Si se confirmaba su idoneidad para ser participante en el estudio, el sujeto firmaba el documento de consentimiento informado y facilitaba los datos personales de contacto (teléfono y correo electrónico). Se iniciaba pues el protocolo de recogida de variables sociodemográficas, clínicas y radiológicas reflejadas en la historia clínica digital. Se comprueba también la idoneidad del sujeto del grupo control, seleccionado de entre sus convivientes (familiares o no) tras comparar los resultados del cuestionario de dieta y estilo de vida que entregaban por correo electrónico o personalmente en la consulta. En esta visita se realizaron las mediciones antropométricas como el peso, la talla y el IMC. Específicamente, se realizaba una exploración neurológica basal detallada según la escala de discapacidad Neurostatus²²⁵, una versión actualizada de medición de EDSS, a todos los pacientes con EM.

4.4.2 Fase de recogida de las muestras

Los sujetos del estudio fueron informados sobre los pasos a seguir para una correcta recogida de la muestra biológica. Para el estudio de la microbiota intestinal, la secuenciación de ADN bacteriano se debe realizar a partir de muestras de heces. Los sujetos deben realizar un protocolo específico para evitar la contaminación bacteriana durante la recogida. En primer lugar, antes de la recogida de muestra, los sujetos deben realizar una micción y después, se deben lavar adecuadamente la zona perineal con agua y jabón. Deben depositar la muestra en una área seca y limpia (sobre un papel o material estéril). Por último, tras haber realizado un lavado adecuado de manos y empleando posteriormente guantes estériles, deben abrir cuidadosamente el recipiente estéril de plástico específico para la obtención de muestras de heces (que porta una extensión de plástico en el interior de la tapa para facilitar la recogida), evitar la contaminación del exterior y recoger una pequeña muestra de las heces. Se deberá cerrar y cubrir el recipiente con papel aluminio y entregarlo inmediatamente en el hospital. Si la muestra fuera recogida fuera del horario laboral de apertura del centro, se congelará inmediatamente en el refrigerador de su domicilio a -26º siendo entregada en la siguiente mañana de día laborable. Una vez entregadas las muestras, se depositarán inmediatamente en un congelador que mantiene

temperaturas de -80º disponible en el hospital, que almacenará las muestras hasta su posterior procesamiento para análisis y secuenciación del ADN bacteriano.

4.4.3 Fase de seguimiento longitudinal de los pacientes

Durante los siguientes dos años se realizaron visitas de seguimiento de todos los pacientes cada 6 meses como mínimo, registrándose las variables clínicas significativas y la actividad de la enfermedad si la hubiera, es decir, se recogía la información de brotes clínicos o nuevas lesiones desmielinizantes en la resonancia, así como una exploración neurológica detallada según la escala Neurostatus. El seguimiento por resonancia se hacía según criterio del neurólogo.

4.4.4 Fase de análisis del estudio

Se realizó un registro digital de la información relevante de los pacientes en cada visita médica y los datos basales de los controles y se elaboró un archivo anonimizado para después realizar el análisis estadístico. Igualmente, se inició el análisis de la microbiota intestinal de las muestras obtenidas de pacientes y controles junto con un análisis bioinformático y la asignación taxonómica de los microorganismos bacterianos encontrados en las muestras para su posterior inclusión en el análisis estadístico que utiliza los datos sociodemográficos de ambos grupos y específicamente clínicos y radiológicos de los pacientes con EM.

4.4.5 Fase de evaluación de resultados

Una vez obtenidos los datos del análisis estadístico que compara la microbiota intestinal entre casos y controles y el análisis de regresión logística que se aplica a la cohorte de pacientes con EM, se procede a analizar los resultados obtenidos y extraer las conclusiones del estudio.

Por último, se ha elaborado un artículo científico con los contenidos más importantes. El manuscrito finalmente se publicó con el título “Gut Microbiota as a Potential Predictive Biomarker in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis”²²⁶ el pasado día 23 de mayo de 2022 en la revista Genes, situada en el cuartil Q2 con un factor de impacto de 4,141.

4.5 VARIABLES RECOGIDAS EN EL ESTUDIO

4.5.1 Variables demográficas:

Edad (en años), género (varón/mujer), etnia (caucásica/otros), forma de nacimiento (parto vaginal/cesárea), lactancia (materna/fórmula), hábitos tóxicos (tabaco/alcohol), estilo de vida (sedentario/activo si ejercicio regular >3 días a la semana), tipo de dieta (occidental/mediterránea) y datos antropométricos: peso, talla e índice de masa corporal (IMC)

4.5.2 Variables clínicas relacionadas con la EM:

Edad del momento del diagnóstico (en años), forma clínica en el momento del diagnóstico (síndrome clínico aislado/EMRR), puntuación en la escala de discapacidad EDSS en el momento de su inclusión en el estudio, tiempo de evolución de la enfermedad (en años), tiempo desde el último brote (en días), número de brotes en el año previo a su inclusión en el estudio y número de brotes a lo largo del seguimiento de 24 meses, tasa anualizada de brotes en el momento de su inclusión y al final del seguimiento de 24 meses, número de nuevas lesiones desmielinizantes en secuencias T2/FLAIR y lesiones en T1 con captación de gadolinio en resonancia realizadas durante el año previo a su inclusión y durante el seguimiento de los siguientes 24 meses, presencia de progresión sin relación a brotes en los últimos 3 meses antes de su inclusión en el estudio y durante los 24 meses de seguimiento. Se determinará progresión de discapacidad si se objetiva un aumento en 1 punto de la puntuación según la escala de discapacidad EDSS si la puntuación inicial estaba entre 0.5 y 3,5; o bien un aumento en 0.5 puntos si la puntuación inicial era ≥ 4.0 . Se incluirá información clínica acerca del primer brote que tuvieron (neuritis óptica/tronco/médula), la afectación o no de las diferentes localizaciones características como el nervio ópticos (afectación clínica en forma de neuritis óptica, lesiones inflamatorias en nervios ópticos en resonancia o alteración de las pruebas complementarias: OCT o potenciales evocados visuales), la médula espinal (episodios de mielitis, lesiones medulares en resonancia o afectación de los potenciales evocados somatosensoriales) o bien afectación del tronco del encéfalo (brotos con síntomas de afectación de tronco, lesiones en esta localización en resonancia o afectación de potenciales evocados auditivos de tronco). Se valorará

la presencia de bandas oligoclonales en LCR (tanto BOC IgG como IgM), el número de veces que han necesitado tratamiento corticoideo en el último año previo a su inclusión en el estudio y durante el seguimiento clínico de 24 meses así como otros fármacos para el tratamiento sintomático de otros síntomas asociados. Igualmente se incluirán todos los tratamientos modificadores de la enfermedad que hayan sido empleados en cada paciente previo a su inclusión, así como los que hubieran sido modificados o suspendidos en el seguimiento, anotando el motivo de retirada o cambio de tratamiento. Se añadirá también la información sobre efectos adversos.

4.5.3 Variables clínicas no relacionadas con la esclerosis múltiple:

Presencia de infecciones y/o toma de antibióticos en el último mes, y tratamiento de corticoides o fármacos inmunosupresores por cualquier otra comorbilidad en los últimos tres meses antes de su inclusión en el estudio (criterios de exclusión), afectación por síntomas gastrointestinales (reflujo gastroesofágico, gastritis, diarrea, estreñimiento, dispepsia, etc...), enfermedad inflamatoria intestinal u otras enfermedades autoinmunes (hipo/hipertiroidismo, artritis reumatoide, etc.).

4.5.4 Variables relacionadas con la microbiota intestinal

Se recogen los datos de biodiversidad ecológica (diversidad alfa y beta) así como los niveles taxonómicos de cada microorganismo bacteriano como filum, familia y género bacterianos.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables descriptivas cuantitativas se expresaron en términos de media \pm desviación estándar (SD) y mediana con el rango intercuartílico que incluye los cuartiles 25 y 75. Como frecuencias, se indican las variables cualitativas. En las comparaciones entre los grupos se realizó la prueba U Mann-Whitney para los datos cuantitativos. Las variables cualitativas se analizaron con las pruebas de Ji cuadrado y test exacto de Fisher. El odds-ratio (OR) se trató como medida del tamaño del efecto, con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p (2-cola) menor a 0,05. Todos los análisis

estadísticos se realizaron con el programa informático *IBM SPSS statistics versión 22* (SPSS Inc. Chicago, IL) y R versión 3.2.3. En el análisis de la microbiota intestinal, las estimaciones de la diversidad alfa y beta se llevaron a cabo usando el programa *Specaccum* en el paquete *Vegan* implementado para la *versión 3.2.3* de R.

4.7 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

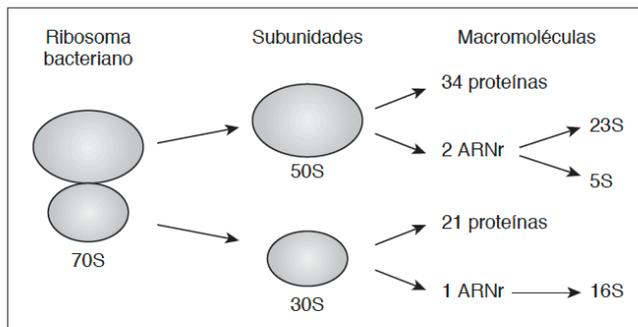
4.7.1 Procesamiento de la muestra para el estudio de la microbiota intestinal

4.7.1.1 El ADN y ARN bacteriano

A continuación, se describe el proceso de análisis de la microbiota intestinal a partir de las muestras de heces de los sujetos del estudio. Para determinar su composición, se realizará en primer lugar la ampliación del gen que codifica la subunidad 16S del ribosoma bacteriano, posteriormente se realizará la secuenciación masiva del ADN bacteriano y por último, se producirá la asignación taxonómica de los microorganismos encontrados.

El ARN ribosómico (ARNr) 16S procariótico tiene aproximadamente 1.500 pb de longitud y contiene nueve variables regiones intercaladas entre regiones conservadas. Es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación en la microbiología fue propuesta por **Carl Woese**²²⁷ en la década de los 70's. Es la comparación de las secuencias del ARNr 16S (o de los genes que los codifican) la que permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas de forma rápida y precisa, dando lugar al actual sistema de clasificación taxonómica. Hay que tener en cuenta que el proceso de identificación en el ámbito del microbioma intestinal está en plena expansión, pudiendo obtener especies bacterianas no descritas anteriormente²²⁸.

Figura 15. La estructura del ribosoma bacteriano



Se muestra un esquema de su estructura y se indican las subunidades y macromoléculas que lo componen. De donde se obtiene información del ARN ribosómico que se emplea en la identificación de las especies bacterianas (de Rodicio et al. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2004)

4.7.1.2 Extracción del ADN bacteriano de las muestras de heces

Para la extracción del ADN bacteriano procedente de las muestras biológicas de heces se utilizó el robot MagNA Pure 2.0 LC (Código 0519768600) y el kit MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Large Volume (Código 03264793001), ambos de la casa comercial Roche (Mannheim, Alemania)²²⁹.

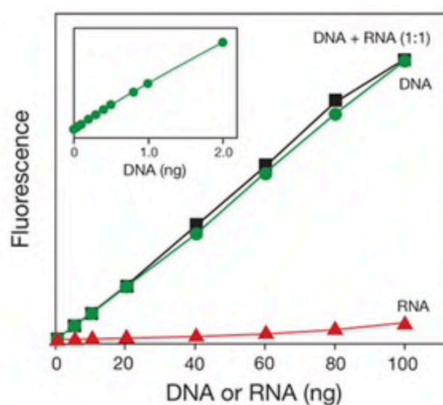
Figura 16. Magna-Pure-LC2 ROCHE para la extracción de ADN bacteriano



Al inicio del proceso, se añade el tampón fosfato salino o buffer (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) 1.5 veces en volumen a las muestras de heces de los participantes del estudio. El tampón PBS se compone de una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Su osmolaridad y concentración en iones cloro, sodio y potasio es muy semejante al líquido extracelular de los mamíferos. La mezcla se vortea hasta conseguir una solución homogénea. A continuación, se centrifuga a 2000 rpm

durante 5 minutos y se recoge el sobrenadante. Del mismo se extraen 500 μl que serán sometidos a una extracción automatizada de ADN procariota bacteriano, siguiendo las instrucciones del fabricante de acuerdo al protocolo *total NA external lysis*. Con objeto de asegurarnos de que se realiza una adecuada extracción se procede a la cuantificación del ADN obtenido de cada una de las muestras. Este procedimiento se realiza mediante el lector *Qubit Fluorometric Quantitation*²³⁰ (Código Q33226) proporcionado por el kit *Qubit 1x dsDNA HS Assay*²³¹ (Código Q33231) de la casa comercial *ThermoFisher Scientific* (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El lector realiza la medición de la concentración de ADN a través de la técnica de emisión de fluorescencia, que proporciona una mayor especificidad de lectura de cadenas ADN sobre las de ARN. La concentración mínima que se acepta es de 5 ng/dL²³². Durante la purificación del ADN bacteriano procedente de bacterias Gram positivas se siguió el método de **Yuan** y colaboradores²³³ con modificaciones menores.

Gráfico 35. Rendimiento del ensayo *Qubit dsDNA HS*.



El ensayo *Invitrogen Qubit dsDNA HS* realiza la selección de cadenas de ADN sobre ARN mediante fluorescencia del lector *Qubit Fluorometric Quantitation*. Tiene un rango de detección lineal de 0,2 a 100 ng y es selectivo para ADN de doble cadena, incluso en presencia de una masa igual de ARN.

4.7.1.3 Amplificación y secuenciación del ADN bacteriano

4.7.1.3.1 Uso de amplicones y primers

16S Amplicon PCR Forward Primer = 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Los amplicones (fragmentos de ADN amplificado en copias por la reacción en cadena de la polimerasa-PCR-) del gen ADNr 16S bacteriano se obtienen utilizando el ADN genómico para la preparación de librerías y posterior secuenciación metagenómica siguiendo el protocolo de *16S rDNA gene Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina protocol*²³⁴ (Código 15044223 Revisión A) de la casa comercial *Illumina* (San Diego, California, Estados Unidos).

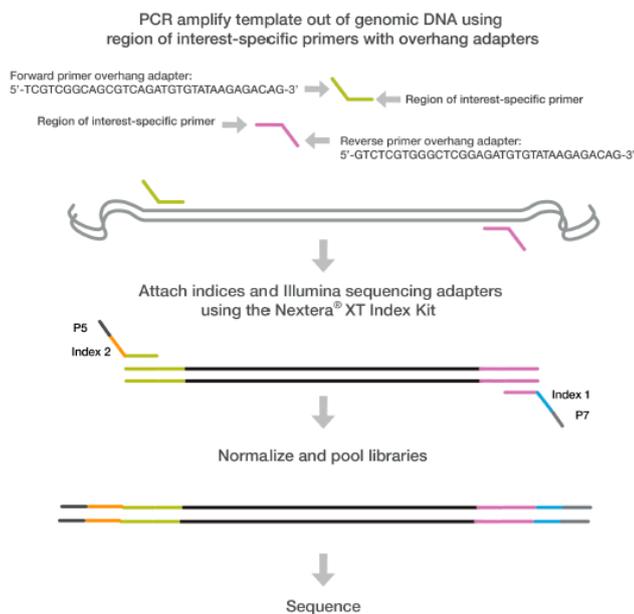
Los *primers* (cebadores o iniciadores) específicos fueron seleccionados a partir de bibliografía vigente al respecto (**Klindworth** y colaboradores de 2013²³⁵) con la adición de adaptadores que permiten mejorar el rendimiento del proceso de secuenciación. Las secuencias específicas utilizadas en este protocolo codifican para las regiones V3 y V4 del gen 16S ADNr con el resultado de un amplicon único de 460 pb. Una vez realizada la amplificación del gen 16S ADNr, se desarrolla la secuenciación del ADN en el secuenciador *Miseq*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*Illumina*) usando el protocolo con un control pareado de 2x300 pb²³⁶. Las secuencias de nucleótidos que sobresalen del adaptador de *Illumina* se agregan a las secuencias específicas del gen. Por otro lado, en este proceso se emplean los *primers*, secuencias de fragmentos de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción. En nuestro estudio, los *primers* que se utilizaron fueron descritos según la nomenclatura de nucleótidos estándar de la Unión Internacional de Química Pura

y Aplicada (IUPAC, del inglés *International Union of Pure and Applied Chemistry*) para seguir el protocolo dirigido a esta región²³⁷.

Cuadro 5. Primers empleados en la amplificación de fragmentos de ADNr

<p>16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'</p> <p>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG</p> <p>16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'</p> <p>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC</p>
--

Figura 17. Flujo de trabajo de amplicones 16S V3 y V4



Cebadores directos e inversos definidos por el usuario que son complementarios corriente arriba y corriente debajo de la región de interés se diseñan con adaptadores de voladizo y se utilizan para amplificar plantillas de ADN genómico. Se realiza un paso de amplificación de ciclo limitado posteriormente para agregar índices de multiplexación y adaptadores de secuencia de Illumina. Las bibliotecas se normalizan, agrupan y secuencian en MiSeq sistema utilizando reactivos v3.

4.7.1.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Una vez concluida la preparación, se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN bacteriano²³⁷. Para ello se utiliza la polimerasa de ADN

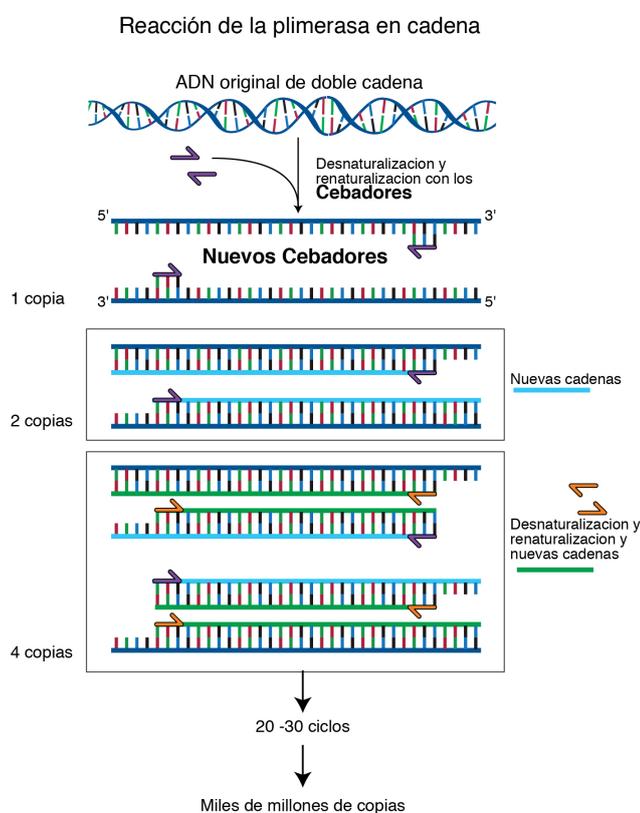
procedente del kit *KAPA HiFi HotStart ReadyMixPCR* (Código KK2602) de la casa comercial *Kapa Biosystems* (Wilmington, Massachusetts, Estados Unidos). Se trata de una nueva ADN polimerasa de la familia B, diseñada para tener una mayor afinidad por el ADN, sin la necesidad de proteínas accesorias o dominios de unión al ADN²³⁸. Para ello, se distribuyó en cada pocillo (existen 96 pocillos por plato) el ADN bacteriano en concentración de 5 ng/dL, junto con los primers reverse y forward²³⁷ procedentes de una base de datos de la empresa Spin off Lifesequencing S.L. del Parc Científic de la Universitat de València²³⁹ según el protocolo diseñado por *Sim* y colaboradores²⁴⁰.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron con los siguientes componentes: 30 ng de DNA bacteriano obtenido de las muestras de heces de los sujetos, 200 μ M de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs): adenina (dATP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) y timina (dTTP), 400 nM de cada secuencia *primer* o iniciador y 2.5 U de polimerasa "HotStart HiFi". Además, se necesita un catalizador que se forma con los siguientes componentes: cloruro de magnesio (MgCl₂) suministrado por la empresa fabricante del secuenciador (*Roche*, Mannheim, Germany), un 4% de 20 g/mL de BSA (*Bovine serum albumin*) de la empresa *Sigma* (Dorset, Reino Unido) y 0.5 M de betaina. El proceso de la PCR se inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96°C para romper los puentes de hidrógeno que la unen. De este modo, cada cadena de la doble hélice queda disponible como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas, se alinean los *primers* (cebadores o iniciadores) a los sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región de ADN que se quiere amplificar. Para realizar este proceso de forma adecuada se necesita una temperatura entre 40 y 60°C que permite la unión (alineamiento o *annealing*) de los *primers*. Al final, se produce la síntesis de una nueva cadena en sentido 5' a 3' incrementándose la temperatura hasta los 72°C, que es la temperatura óptima a la que la ADN polimerasa se une a los *primers* y comienza la replicación. Estas tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión del ADN, se repiten sucesivamente en varios ciclos produciéndose en cada nuevo ciclo la amplificación simultánea de la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde

en los ciclos siguientes, dando lugar a millones de copias del fragmento seleccionado^{241,242}.

Los amplicones, copias de fragmentos de ADN obtenidos a través de la PCR, son combinados en un tubo a una concentración equimolar y sometidos a una purificación posterior de manera automática con *AMPure XP kit*²⁴³ (Agencourt,

Figura 18. Proceso de ADN polimerasa con uso de cebadores (de NHG Research Institute, 2021)



Takeley, United Kingdom). La muestra resultante es posteriormente lavada. Se realiza la cuantificación de los fragmentos del ADN obtenidos mediante el autoanализador *PicoGreen*²⁴⁴ (*Quant-iT, PicoGreen DNA assay, Invitrogen*). Finalmente el amplicón resultante es enviado para la final pirosecuenciación que se realiza por la empresa *Life Sequencing S.L.* (Parc Científic de la Universitat de Valencia, Spain) donde el estudio EmPCR es realizado y finalmente se obtienen los resultados de la pirosecuenciación masiva de todas las muestras de los participantes del estudio

mediante la base de datos “454 Life Sciences GS FLX+ instrument”²⁴⁵ (Roche) y la de “Roche Amplicon Lib-L protocol”.

Previamente a la secuenciación se tuvieron que preparar, adaptar, purificar y normalizar los amplicones al modelo de secuenciación *Illumina* mediante la fragmentación enzimática por el *Nextera XT index kit v2*²⁴⁶ (Código FC-131-2001). Para asegurar la normalización de tamaño se procesó 1µL del producto de la PCR en un *2100 Bioanalyzer instrument*²⁴⁷ usando el *Bioanalyzer DNA 1000 chip* de la casa comercial *Agilent* (Santa Clara, Estados Unidos). El tamaño esperado debía ser de 550 bp.

Las librerías de amplicones fueron secuenciadas en un *MiSeq Sequencer*²⁴⁸ de la casa comercial *Illumina* (San Diego, California, Estados Unidos) siguiendo las especificaciones del fabricante, utilizando el *MiSeq Reagen kit v3*²⁴⁹ (Código MS-10223001). El Sistema *Illumina* aplica un método de secuenciación basado en la polimerización del ADN, donde la incorporación de un nucleótido marcado con fluorescencia y protegido en la cadena naciente impide que siga creciendo. Después de detectar la señal fluorescente, se elimina el grupo protector pudiéndose incorporar otro nucleótido marcado e iniciar un nuevo ciclo. Para ello, se emplea básicamente un cartucho de un solo uso que contiene reservorios con sello metálico prerrellenados con los reactivos de secuenciación y clustering, junto con una *flow cell*, que consiste en una placa con carriles hechos de vidrio donde las reacciones de secuenciación se producen. La secuenciación se realizó usando un ciclo 2x300pb *paired-end*, como recomienda el fabricante. El mix de amplicones fue reforzado con *PhiX control*²⁵⁰ (Código FC-110-3001) con el fin de mejorar la incorporación de bases durante la secuenciación como recomienda el fabricante *Illumina*²³⁵.

4.7.2 Análisis bioinformático de las secuencias de amplicones del gen bacteriano ADN_r 16S y análisis taxonómico

Se debe tener en cuenta que los sistemas *Illumina* proporcionan las secuencias desparejadas R1 y R2 (forward/reverse), y estas deben ser aparejadas para obtener el amplicón completo. Las secuencias resultantes de la corrección con *paired-end* del equipo *Illumina* generan dos archivos que llevan el nombre R1 y R2, que son las secuencias *en forwards* y *en reverse* y están desparejadas. Para obtener el amplicón completo deben ser aparejadas. Para conseguirlo, las secuencias resultantes de

Illumina se dividieron teniendo en cuenta el código de barras introducido durante la reacción de la PCR, mientras que las lecturas *R1* y *R2* se solaparon utilizando el programa *PEAR* (*Paired-End reAd mergeR*) versión 0.9.122 que proporciona un solo archivo *FASTQ* o *FASTA* para cada una de las muestras. Los archivos *FASTA* son formato de fichero informático basados en texto que se utilizan para representar secuencias ácidos nucleicos o proteínas. En estos archivos los pares de bases o bien, los aminoácidos, se representan usando códigos de una única letra. El programa *PEAR* evalúa todas las posibles superposiciones de lectura de extremo pareado, sin requerir el tamaño de fragmento de destino como entrada. Además, implementa una prueba estadística para minimizar los resultados falsos positivos. Por último deberá realizarse un control de calidad que se realiza en varios pasos²⁵¹.

4.7.2.1 Filtrado de calidad.

Es el primer paso y se realiza con un umbral mínimo de *Q20* utilizando el kit de herramientas rápido versión 0.013.

4.7.2.2 La eliminación de quimeras

Se utiliza el cebador (*primers* 16s rRNA), el recorte y la selección de longitud (lee más de 300 nucleótidos). Todo ello se ejecuta con la versión *cutadapt* 1.4.123²⁵². El formato de los archivos de las secuencias obtenidas en bruto es *FASTQ*, que suele ser el estándar actual y es el que proporciona el sistema de secuenciación *Illumina*. Estos archivos *FASTQ* se convierten en archivos *FASTA*. La eliminación de quimeras emplea al programa *UCHIME* versión 7.0.1001²⁵³ con el que se consigue eliminar las quimeras que puedan surgir durante la etapa de amplificación y secuenciación. Esos archivos *FASTA* limpios se traspasan a la base de datos de ARNr 16S de *NCBI* utilizando el programa *BLAST24* versión 2.2.29+²⁵⁴.

4.7.2.3 Asignación taxonómica.

Los archivos *XML* resultantes se procesan utilizando un script en *Python*²⁵⁵ por el Departamento de Estadística de *Bioithas S.L.* (Parc Científic de la Universitat d'Alacant, España) para asociar cada secuencia a diferentes niveles taxonómicos (filo, familia y género).

4.7.2.4 *Control de calidad*

Tiene como objetivo el filtrado y recorte (trimming) de las secuencias obtenidas con el fin de eliminar aquellas que sean cortas o de baja calidad. Tras este protocolo es posible obtener una buena asignación taxonómica (Schmieder, 2011²⁵⁶). En este caso, el proceso fue realizado mediante el programa *Prinseq-lite*²⁵⁷. Se aplica una longitud mínima de secuencia de 50 nucleótidos. Además, se aplica un recorte de base por base desde la derecha, midiendo que la calidad no bajara del umbral de 30 nucleótidos en una ventana de 20 nucleótidos usando la media. Como hemos comentado anteriormente, se debe tener en cuenta que los sistemas *Illumina* proporcionan las secuencias desaparejadas *R1* y *R2* (forward/reverse) y estas deben ser aparejadas para obtener el amplicón completo.

4.7.2.5 *Segundo control de calidad*

Se realiza mediante el programa *pipeline DADA2*²⁵⁸ que introduce un novedoso método de corrección de errores dado que es capaz de discriminar con mayor exactitud las variantes o secuencias quiméricas que produce el sistema *Illumina*. Estas secuencias quiméricas son productos erróneos de la amplificación detectables puesto que los extremos difieren mucho en cuanto a su asignación taxonómica. Durante la amplificación se realiza un *trimming* a 280 y 210 pb en *R1* y *R2*, se unen y se buscan las secuencias quiméricas para eliminarlas (Callahan, 2016)²⁵⁹.

4.7.2.6 *Análisis de los datos*

Los datos obtenidos mediante un pipeline ad-hoc se escriben en el entorno de *RStatistics* (*R Core Team*, 2012), haciendo uso de varias bibliotecas de código abierto como *gdata*, *vegan*, etc. Los datos se agrupan y estratifican según el archivo de metadatos proporcionado por el usuario. Los datos de las secuencias se analizaron utilizando la canalización *QIIME2* (Caporaso, et al. 2010).

4.7.2.7 *Análisis de metataxonomía*

El análisis de metataxonomía se realizó utilizando algunos de los complementos de *QIIME2*.

4.7.2.8 Eliminación de ruido y quimeras

La eliminación de ruido, la unión de extremos emparejados y el agotamiento de quimeras se realizaron a partir de datos de extremos emparejados utilizando la canalización DADA2 (Callahan, et al., 2016).

4.7.2.9 Anotación taxonómica

Las afiliaciones taxonómicas se asignan utilizando el clasificador *Naive Bayesian* integrado en los complementos de QUIIME2²⁶⁰. La base de datos utilizada para esta asignación taxonómica fue SILVA_release_132 (Quast, et al., 2013). Cada OTU (del inglés *Operational Taxonomic Unit* o *Unidad Taxonómica Operativa*) se correlacionó por definición en un 97% con la secuencia que se asignó de la base de datos. Los estudios ecológicos de diversidad y riqueza fueron realizados mediante el plugin *Community Ecology Package*²⁶¹.

4.7.2.10 Informe de coronas

La representación de *Krona* se generó utilizando el navegador jerárquico de *Krona* (Ondov, et al., 2011) y se integró en el informe final.

4.8 ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

4.8.1 Estudio de la diversidad y riqueza de la microbiota intestinal

En una comunidad ecológica de seres vivos existen diversas formas de expresar la riqueza o biodiversidad en cuanto a las especies que la componen. El procedimiento más sencillo es el conteo del número total de OTUs. Este número muestra la cantidad total de especies diferentes de una comunidad concreta. Sin embargo, no tiene en cuenta la abundancia relativa de las mismas. Para ello, debemos usar otro tipo de parámetros estadísticos como los índices de biodiversidad. Entre ellos, destacan los índices de diversidad alfa y beta. Son conceptos introducidos por el ecólogo y botánico **Robert H. Whittaker** por primera vez en el año 1960, quien clasificó a los seres vivos en los 5 diferentes reinos conocidos: *Monera*, *Protista*, *Fungi*, *Plantae* y *Animalia*²⁶².

Whittaker definió la diversidad alfa como la riqueza en especies de un sitio o comunidad particular, o de un estrato dado o grupo de organismos de un sitio. En

el concepto de microbiota, a igualdad de número de OTUs, la diversidad alfa es máxima cuando todas las OTUs se presentan en la misma proporción o abundancia. Por el contrario, si todas las OTUs están presentes con la misma proporción, la diversidad alfa será mayor cuanto de más número de OTUs diferentes se componga dicha comunidad ecológica. Por otro lado, Whittaker definió la diversidad beta como la magnitud de cambio en la composición de las comunidades o el grado de diferenciación entre comunidades, en relación con un gradiente ambiental complejo o a patrones ambientales; y por último explicó la diversidad gamma, como la diversidad de especies de un número de muestras o de comunidades para algún grupo de ambientes, los cuales están de tal forma combinados que el valor de diversidad gamma es el resultado tanto de la diversidad α como de la diversidad β de estas muestras^{235,263,264}.

4.8.1.1 *Curvas de rarefacción*

La evaluación de la riqueza de especies (biodiversidad) es muy sensible al número y tamaño de las muestras de las que partimos. Las curvas de rarefacción son un método estadístico propuesto por **Gotelli** y **Colwell** en el año 2011 para comparar el número de especies cuando estas pertenecían a muestras de diferente tamaño. Calculan el número esperado de OTUs si todas las muestras fueran reducidas a un tamaño estándar o al más pequeño, puesto que se sabe que la riqueza va a aumentar con el tamaño muestral y debemos descartar que las diferencias de riqueza obtenidas se deba a este hecho²⁶⁵.

4.8.1.2 *Diversidad alfa*

4.8.1.2.1 Índice de Shannon (Shannon-Weaver)

Fue descrito por **Shannon** y **Weaver** en el año 1949²⁶⁶. Se utiliza para cuantificar la diversidad específica de una comunidad ecológica. El índice se induce a partir de dos variables: el número de especies presentes en la comunidad y su abundancia relativa. Se trata de un índice que mide la entropía, reflejando una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo en una comunidad. Por ejemplo, si en una comunidad existe una especie dominante (S) y el resto de las especies están poco representadas (S-1), al ser una comunidad muy homogénea, el grado de incertidumbre será más bajo que si todas

las especies estuvieran igualmente representadas. Así, si seleccionamos al azar a un individuo tendremos un grado de certeza mayor o una menor incertidumbre que si eligiéramos en el segundo caso. La probabilidad de que un individuo pertenezca a la especie dominante será cercana al 1, en tanto en cuando la del segundo caso será igual para todas las especies²⁶⁷.

Ecuación 1. Índice de Shannon

$$D_{Si} = \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad p_i = \frac{n_i}{N}$$

El índice de Shannon se define como: (pi) = abundancia proporcional de la iésima especie; representa la probabilidad de que un individuo de la especie i esté presente en la muestra, siendo entonces la sumatoria de pi igual a 1. (ni) = número de individuos de la especie i. (N) = número total de individuos para todas las S especies en la comunidad

Ecuación 2. Diversidad máxima (diversidad alfa)

$$H = -\sum_{i=1}^S \pi_i \ln \pi_i$$

La diversidad máxima (Hmax= lnS) se alcanza cuando todas las especies están igualmente presentes. Un índice de homogeneidad asociado a esta medida de diversidad puede calcularse como el cociente H/Hmax=H/lnS, que será uno si todas las especies que componen la comunidad tienen igual probabilidad (pi = 1/S)(de Pla, Interciencia 2016)

4.8.1.2.2 Índice de Simpson

Se emplea para evaluar la diversidad alfa de las comunidades ecológicas. **Simpson** lo describió en el año 1949 y está basado en la estructura de las mismas, pero en un sentido opuesto al índice de Shannon, siendo en verdad un índice de dominancia (**Hill, 1973**)²⁶⁸ al tener más en cuenta las OTUs predominantes y dar menos importancia a las minoritarias²⁶⁹. El índice de Simpson corresponde a la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar de una población de N individuos provengan de la misma OTU y se define matemáticamente con la siguiente fórmula de **Oksanen**²⁷⁰:

Ecuación 3. Índice de Simpson

$$Si_D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2 = 1 - D_{Si}$$

Si_D = índice de diversidad de Simpson. Este índice le da un peso mayor a las especies abundantes subestimando las especies raras, tomando valores entre 0 (baja diversidad) hasta un máximo de [1-1/S]. Si el valor se acerca a 1, la diversidad alfa es mayor. Si el valor se acerca a 0, habrá una mayor dominancia por parte de una OTU y una menor heterogeneidad de OTUs

4.8.1.3 Estudio de la diversidad beta

La diversidad beta es la tasa de cambio o recambio de especies de dos comunidades adyacentes. Es un reflejo de la composición diferente que hay entre ambas comunidades. Ambos índices, la diversidad alfa y la beta son independientes. La diversidad beta puede calcularse teniendo en cuenta bien proporciones bien diferencias. Las proporciones pueden evaluarse con ayuda de índices y de coeficientes que nos indican cómo de similares o diferentes son dos comunidades estudiadas. Los coeficientes de similitud (o disimilitud) entre comunidades se emplean cuando solo consideramos la presencia o ausencia de especies y no sus proporciones^{271,272}.

4.8.1.3.1 Índice de Similitud de Jaccard o (coeficiente de similitud I_j)

Entre los métodos cualitativos se encuentra el índice de similitud de Jaccard que expresa la semejanza entre dos muestras solo considerando la composición de especies. El índice de Jaccard relaciona el número de especies compartidas con el número total de especies exclusivas.

Ecuación 4. Índice de Jaccard

$$I_j = \frac{c}{a + b - c}$$

a= número de especies u OTUs en la muestra A; b= número de especies u OTUs en la muestra B; c= número de especies u OTUs presentes en ambas muestras A y B, es decir que están compartidas. El rango del índice varía desde cero, cuando no hay especies u OTUs compartidas entre ambas muestras, hasta uno, cuando todas las especies u OTUs están por igual compartidas. Este índice mide diferencias en la presencia o ausencia de especies (Sánchez Pellicer, P. Doctorado 2020)

4.8.1.3.2 Índice de Sorensen (coeficiente de similitud-cuantitativo).

Relaciona el número de especies compartidas con la media aritmética de las especies de ambos sitios. Es un índice que tiene un valor de 0 a 1. Si el valor es de 0, no existen especies comunes en las dos comunidades. Si el valor se acerca a 1, las especies serán idénticas en ambas comunidades.

Ecuación 5. Índice de Sorensen

$$I_{Scuant} = \frac{2pN}{aN + bN}$$

aN= número total de especies u OTUs en la muestra A; bN= número total de especies u OTUs en la muestra B; pN= sumatoria de la abundancia más baja de cada una de las especies u OTUs compartidas entre ambas muestras. El rango del índice varía entre cero, cuando no hay especies u OTUs compartidos, y uno, cuando ambas muestras son idénticas en presencia de especies u OTUs.

4.8.2 Análisis Principal de Componentes

El análisis principal de componentes (PCoA, del inglés *Principal Component Analysis*) es una técnica multivariante para reducir el número de dimensiones (número de variables) de un conjunto. Se emplea en estadística para describir gráficamente a un conjunto de datos que se convierten en nuevas variables o componentes no correlacionadas. Los componentes se ordenan por el valor de su varianza original. Con esta técnica se consigue sintetizar la dimensionalidad de un conjunto de datos y dar una representación gráfica en dos dimensiones a través de la proyección de cada uno de los datos²⁷³ y así queden mejor representados en términos de mínimos cuadrados. El PCoA convierte un conjunto de observaciones (datos de variables posiblemente correlacionadas) en un conjunto de valores de variables sin correlación lineal llamadas componentes principales. En nuestro estudio, se emplea para representar la varianza en una nube de puntos multivariada que correspondería a cada una de las muestras de los sujetos del estudio. Con la representación gráfica de la proyección de una nube de puntos se consigue una visión global en la búsqueda de una relación lineal entre las muestras de los sujetos y las variables a estudio^{235,274,275}.

4.8.3 Evaluación de la microbiota intestinal como marcador diagnóstico

4.8.3.1 Curvas ROC y área bajo la curva

Las curvas ROC (del término inglés, *Receiver Operating Characteristic*) son la representación gráfica de una técnica estadística que permite visualizar, organizar y seleccionar marcadores para evaluar el comportamiento que tienen los sistemas de diagnóstico. Entre sus funciones destacan la habilidad de evaluar la capacidad de discriminación de un marcador diagnóstico continuo (o prueba diagnóstica) para la asignación correcta de los individuos a estudio en dos grupos diferentes (verdaderos positivos: VP y verdaderos negativos: VN), contribuye a encontrar el punto de corte óptimo entre la clasificación de VP y VN para minimizar los errores en su establecimiento (falsos positivos: FP y falsos negativos: FN). Por último, permite comparar la eficacia de dos o más pruebas diagnósticas y estudiar la variabilidad interobservador.

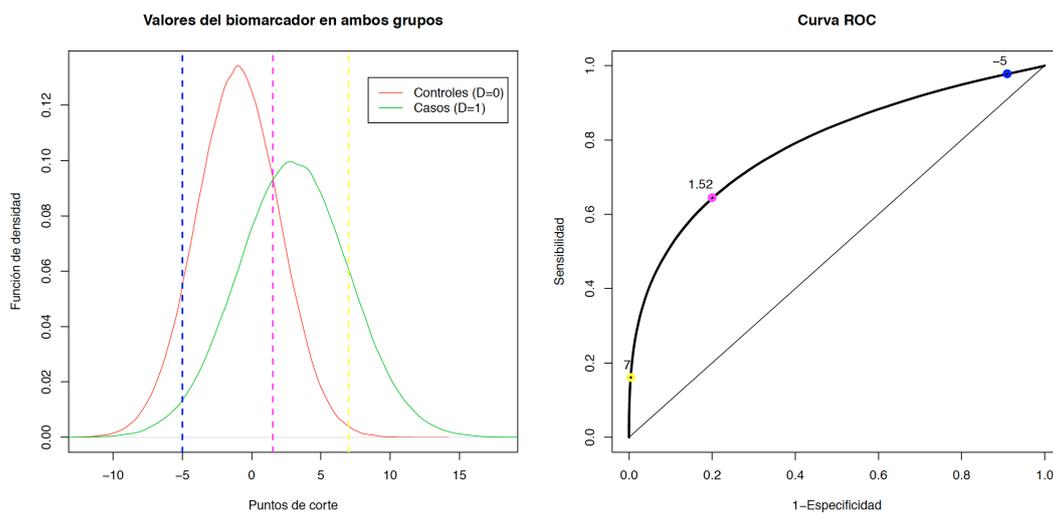
Una curva ROC es un gráfico bidimensional que representa la proporción de verdaderos positivos (VP) frente a la proporción de falsos positivos (FP) de un marcador diagnóstico según los distintos puntos de corte que puede tomar éste a lo largo de su distribución continua.

Para poder explicar la distribución de las variables en el gráfico hay que definir sensibilidad y especificidad de un test o marcador diagnóstico. La sensibilidad es la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo tiene la enfermedad (es decir, mide la capacidad del test diagnóstico para detectar la enfermedad cuando está presente). Se sitúa entre valores de 0 y 1 (que es igual a la probabilidad del 100% de identificar a todos los individuos enfermos). En cambio, la especificidad es la probabilidad de obtener en el test un resultado negativo cuando el individuo no tiene la enfermedad (mide por tanto su capacidad para descartar la enfermedad cuando no está presente). En consecuencia, un test diagnóstico dará positivo en los sujetos verdaderamente enfermos (verdaderos positivos: VP) y también en aquellos sujetos que aún no teniendo la enfermedad, el test da positivo (los falsos positivos: FP). De forma complementaria, el test diagnóstico dará negativo tanto en los sujetos sanos que no están enfermos (verdaderos negativos: VN) como en aquellos sujetos que, a pesar de tener la enfermedad, el test da negativo (los falsos negativos: FN).

Por tanto, en la distribución de las variables dentro de la curva ROC se muestra en el eje de ordenadas los valores de la sensibilidad establecidos para el test o marcador diagnóstico y en el eje de abscisas aparecen representados los valores de $1-e$, siendo e la especificidad. Por tanto, el test o marcador diagnóstico ideal sería aquel que presenta una sensibilidad y especificidad próximas a 1, que correspondería a una probabilidad muy alta de acertar al clasificar correctamente a los individuos en estudio tanto en el grupo de enfermos como el de sanos.

A continuación se expone el ejemplo de una curva ROC para explicar más detalladamente sus características.

Gráfico 36. Curva ROC para el estudio de marcadores diagnósticos



La curva roja refleja los individuos sanos (controles o $D=0$). La curva verde refleja a los sujetos enfermos o casos ($D=1$). Las distribuciones de estos dos distintos grupos de estudio se solapan en un área. Por tanto, cualquiera que sea el punto de corte que elijamos, habrá individuos incorrectamente clasificados. Para exponer la explicación se escogen varios puntos de corte que se sitúan en esta gráfica en la posición -5 (representado con una línea discontinua azul), $+1,52$ (representado con una línea discontinua rosa) y $+7$ (representado con una línea discontinua amarilla). Estos puntos concretos, y el resto de puntos de corte se representan posteriormente en la gráfica de la derecha que es una curva ROC. Analizando esta curva (se representan en el eje de ordenadas la sensibilidad y en el de abscisas $1-$

especificidad), se puede ver que si elegimos el punto de corte de +7, la sensibilidad será muy baja (la probabilidad de detectar sujetos enfermos estará en torno al 20%) mientras que si tomamos el punto de corte -5 la sensibilidad será muy alta (cerca del 95%). Esta correspondencia se puede evaluar más visualmente en la gráfica de la izquierda, en la que podemos ver que si escogemos este punto de corte (-5) el área bajo la curva verde (representa a los sujetos enfermos) que queda a la izquierda del punto de corte escogido es muy pequeña, por lo que este punto de corte puede identificar a casi todos los sujetos enfermos y es muy pequeña la proporción de sujetos que estarían mal clasificados como enfermos (1-especificidad). Sin embargo, el punto de corte de +7 solo puede identificar al 20% que se dispone a su derecha en el área bajo la curva verde.

Por otro lado, la especificidad será mayor si se escoge el punto de corte de +7 ya que el área bajo la curva roja que representa a los sujetos sanos que queda a su izquierda es muy pequeña, por lo que este punto puede descartar con casi el 100% de probabilidades que estos sujetos elegidos son sujetos sanos. Sin embargo, si escogiéramos el punto de corte -5 solo podríamos clasificar bien a los sujetos sanos que hay bajo la curva roja a la izquierda de dicho punto de corte, es decir, tan solo al 0.05% de la población sana. Por lo tanto, el punto de corte -5 es muy sensible (permite clasificar correctamente a casi todos los enfermos, pero también clasifica erróneamente a muchos sujetos que no tienen la enfermedad (falsos positivos) por lo que tiene una baja especificidad. Por el contrario, el punto de corte de +7 permite descartar la enfermedad en la mayoría de los sujetos sanos (alta especificidad) pero muchos sujetos enfermos serán igualmente clasificados como sanos (falsos negativos) por lo que tendría una baja sensibilidad. Y, aunque el punto de corte de +1,52 no alcanza los valores de sensibilidad y especificidad que los anteriores, sí que establece un punto de corte equilibrado con una sensibilidad y especificidad similares, proporcionando un test diagnóstico adecuado. Este punto de corte proporciona finalmente una sensibilidad de 0,63 (63% de probabilidades de clasificar correctamente a los sujetos enfermos) y una especificidad del 0,78 (78% de probabilidades de clasificar a los sanos de forma adecuada).

Para poder distinguir si un punto de corte (test o marcador diagnóstico) es bueno para clasificar a la población a estudio entre enfermos y sanos se procede también a evaluar la mencionada anteriormente como *área bajo la curva* o *AUC* (del inglés, Area Under Curve), que se define como la probabilidad de clasificar

correctamente a un par de individuos (uno sano y otro enfermo) seleccionados al azar. Toma valores entre el 0 y el 1, siendo mejor marcador diagnóstico conforme su valor se acerca al 1. En la práctica, el límite inferior real para el área bajo la curva es 0.5, que corresponde al área situada bajo el segmento diagonal que hay representado a la derecha del gráfico 87, que sería la curva ROC resultante de un marcador diagnóstico basado en el azar únicamente, sin ninguna capacidad intrínseca para discriminar entre sujetos sanos o enfermos. Conforme menos se solapan las curvas que representan a sujetos enfermos y sanos, más grande será el área bajo la curva (cercana a 1) ya que puede clasificar correctamente a ambos dos grupos con una mínima incertidumbre que se representaría con el área solapada entre ambos. Sin embargo, conforme los grupos y sus curvas representativas (las de la izquierda del gráfico 87) se solapan más, la incertidumbre aumenta al incrementarse el área en el que ambas curvas se solapan, y el área bajo la curva será menor, alejándose del 1.

Asimismo, el área bajo la curva no depende de la prevalencia de la enfermedad, al igual que los parámetros de sensibilidad y especificidad, por lo que no se verán afectados por las diferencias de tamaño muestral entre ambos grupos de estudio (enfermos y sanos)²⁷⁶.

4.8.3.2 Índice de Youden

Paralelamente a la curva ROC se puede calcular el índice de Youden o punto J, que fue descrito por primera vez por William Youden en el año 1950²⁷⁷ para determinar el rendimiento de una prueba diagnóstica. Se trata de un test estadístico que nos proporciona información sobre cómo de rentable es un punto de corte extraído de la curva ROC en términos de sensibilidad y especificidad. Tiene un valor entre el -1 a 1. Si da 0 significa que la prueba da resultado positivo a la misma proporción de enfermos y de no enfermos, no siendo útil en el diagnóstico correcto de los enfermos. Al contrario, cuánto más alto es, mejor clasificados estarán los individuos en un grupo o en otro y aumentará la rentabilidad diagnóstica²⁷⁸.

Ecuación 4. Índice de Youden

$$\gamma = S + E - 1$$

Ecuación 5. Índice de Youden o punto J

$$J = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} + \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} - 1$$

V – RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO

5.1.1 Selección de la muestra

Un total de 16 pacientes con EM recurrente remitente y 15 controles sanos fueron seleccionados. Los sujetos sanos incluidos en el grupo control se eligieron de entre sus familiares y/o convivientes para que fueran personas que compartiesen la misma dieta habitual. En la *figura 41 y 42* se muestra el registro de las frecuencias de consumo de los principales alimentos de la dieta que seguían los pacientes y los controles sanos y que era compartida.

Durante el seguimiento prospectivo de la cohorte de pacientes con EMRR de 24 meses, dos de los 16 pacientes se trasladaron a otras áreas sanitarias. Una de las pacientes continuó un seguimiento conjunto en ambos centros por lo que se pudo realizar un seguimiento correcto de su evolución en el estudio. Sin embargo, para la otra paciente no fue posible un seguimiento presencial por lo que fue excluida finalmente del estudio. Por consiguiente, la muestra se compone de 15 pacientes con EMRR y 15 controles sanos.

Figura 19. Registro de dieta habitual en el grupo de pacientes con EM

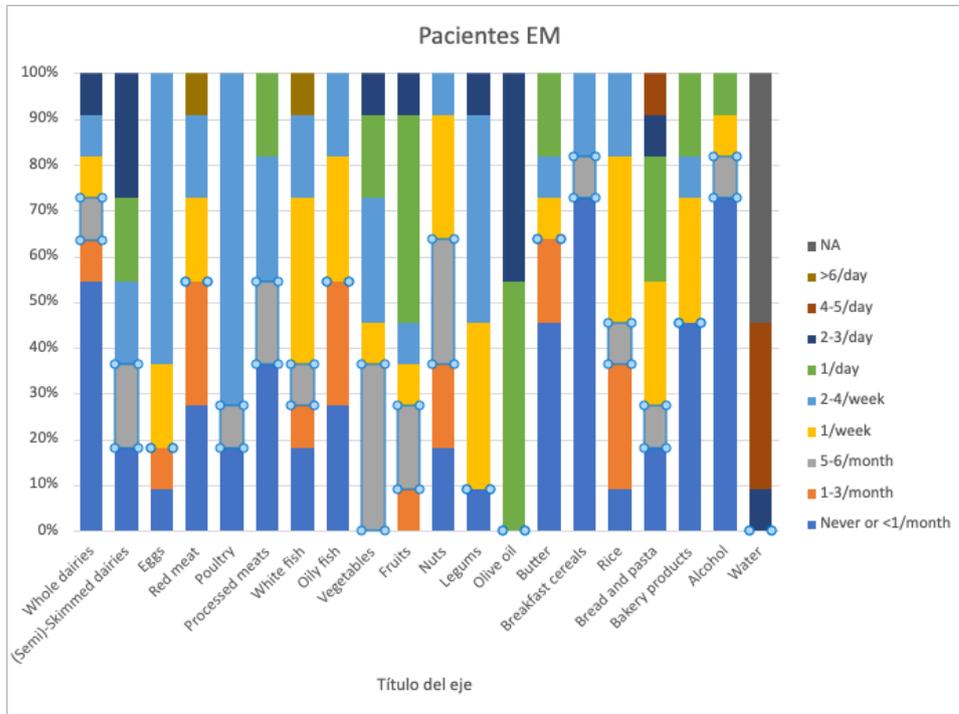
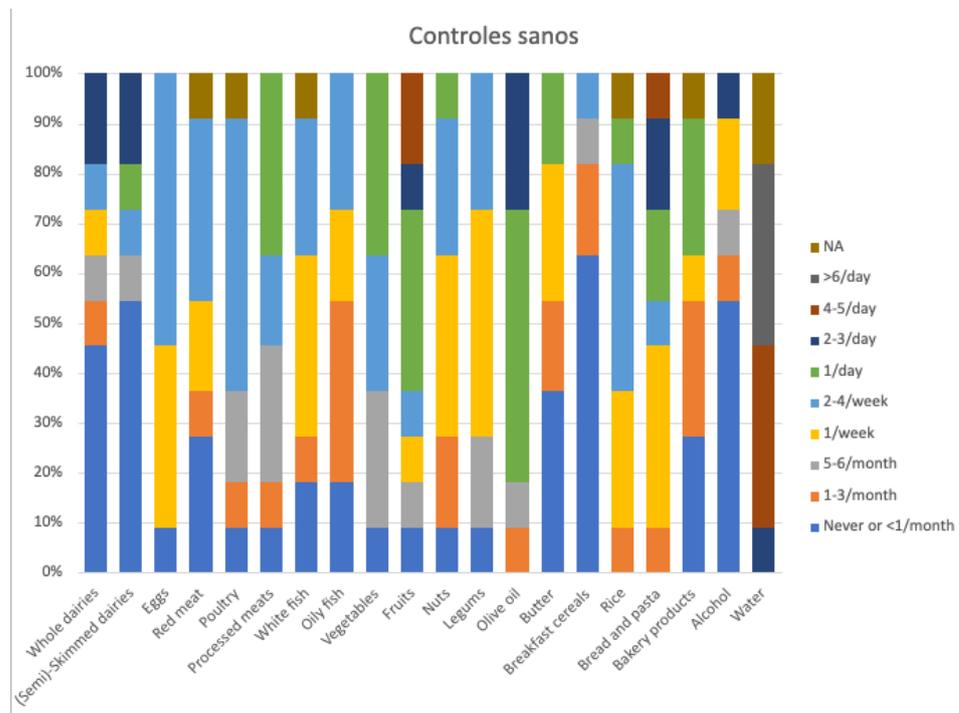


Figura 20. Registro de dieta habitual en el grupo de pacientes de controles sanos



5.1.2 Características del grupo de pacientes de esclerosis múltiple

En cuanto a las características demográficas de los sujetos del estudio (*ver tabla 4*) todos eran caucásicos. Dos pacientes (**EM1** y **EM13**) y sus convivientes eran de origen británico y holandés, respectivamente. Ambos residían en España desde hacía 1 y 4 años, respectivamente. La edad media de los pacientes en el momento de su inclusión fue de 37.2 ± 8.7 años. La mayoría de los pacientes eran mujeres (13/15; 86.7%). Con respecto al debut de su enfermedad, la edad media que tenían en el momento en que fueron diagnosticados de EMRR fue de $29,6 \pm 7,4$ años. La duración media de la enfermedad fue de $7,67 \pm 6,5$ años en el momento de su inclusión en el estudio. La semiología que describían como primer evento desmielinizante por orden de frecuencia fue: mielitis en 6/15 (40%) pacientes, afectación supratentorial en 4/15 (26,6%) pacientes, localización multifocal en 2/15 (13,3%) pacientes en el que lo más habitual era que tuvieran una neuritis óptica junto con otras manifestaciones, localización infratentorial en 2/15 (13,3%) pacientes y neuritis óptica aislada en 1/15 (6,6%). Dos de los 15 pacientes no tenían información del estudio de bandas oligoclonales. De entre ellos, 11/13 pacientes tenían presencia de BOC en LCR y 2/13 estaban ausentes. Esta información se encontraba registrada en informes previos elaborados por su neurólogo habitual. En la visita basal del estudio se realizó una exploración neurológica con la escala Neurostatus para determinar el grado de discapacidad que determinó una puntuación EDSS de $2,6 \pm 1,4$ puntos. Los pacientes tenían una tasa anualizada de brotes (TAB) basal considerando el año previo a su inclusión en el estudio de 1,6 brotes/paciente-año. Con respecto al número de nuevas lesiones en T2 detectadas en resonancia durante el año previo a su inclusión, presentaron una media de $2,33 \pm 2,87$ y una mediana de 2 (0-3) lesiones. Los pacientes mantuvieron el diagnóstico de EM recurrente remitente durante todo el seguimiento. Sin embargo, uno de los pacientes (**EM9**), que presentaba la puntuación de discapacidad más alta de la cohorte (EDSS 6,5), desarrolló progresión sin relación a brotes más allá del periodo del estudio, configurándose en el momento actual el diagnóstico de EM secundaria progresiva, aunque sin modificar la puntuación de EDSS inicialmente debido a que las puntuaciones más altas de la escala EDSS vienen determinadas principalmente por la capacidad de deambulación y no se influye tanto por cambios en la exploración neurológica del balance motor como ocurrió en este caso.

Con respecto al tratamiento, la mayoría de los pacientes (12/15; 80%) recibían tratamiento modificador de la enfermedad en el momento de su inclusión. De entre ellos, el fármaco más frecuentemente indicado fue interferón beta (6/15; 40%) seguido de fingolimod (4/15; 26.7%). Por otro lado, 3/15 (20%) pacientes no seguían ningún tratamiento en el periodo de reclutamiento por varios motivos. Dos de los pacientes (**EM1** y **EM13**) habían decidido suspenderlo por decisión propia años antes del estudio, sobre todo por efectos adversos molestos como el síndrome pseudogripal) e incluso también habían abandonado el seguimiento periódico con un neurólogo al cambiar de país de residencia. Una tercera paciente (**EM2**) se encontraba en el debut de la EM y aún no había iniciado ningún TME. Al mismo tiempo, otra paciente (**EM8**) se encontraba en un momento de cambio de TME debido a que se trataba de una EM muy activa con presencia de brotes y numerosas nuevas lesiones en resonancia con captación de gadolinio a pesar de recibir tratamiento con fingolimod. Antes de iniciar el siguiente TME (alemtuzumab) hubo que esperar un periodo de tiempo para que aumentara el recuento de linfocitos. Durante el tiempo de espera presentó varios brotes (efecto rebote descrito en los moduladores del receptor de la esfingosina 1-P), uno de ellos determinó un aumento de discapacidad importante del que mejoró notablemente tras tratamiento con bolos de metilprednisolona intravenosos, sin empeorar a la larga su grado de discapacidad (EDSS 3,5). El resto de pacientes sin TME no experimentaron ningún brote durante la espera al inicio de los nuevos fármacos.

A lo largo del seguimiento, 7/15 (46,6%) pacientes cambiaron su tratamiento, de los cuales 5/9 pacientes (55,5%) fue debido a falta de eficacia y 4/9 (44,4%) pacientes por efectos adversos. En concreto, la paciente **EM3** que estaba sin TME desde hacía 3 años inició interferón beta pegilado subcutáneo. Sin embargo, un año después experimentó un brote infratentorial por lo que se cambió a dimetil fumarato (ya había estado con natalizumab y fingolimod y rechazaba el perfil de seguridad de alemtuzumab). Esta paciente experimentó un aborto espontáneo en el periodo de tiempo en el que no recibió ningún fármaco. La paciente **EM7**, con seguimiento conjunto con otra área sanitaria durante el seguimiento, suspendió su TME, en este caso betaferon (INF beta 1b), debido a la presencia de síntomas persistentes de síndrome pseudogripal, sin desear iniciar otro TME. Debido a la alta actividad de la enfermedad con la aparición de numerosas nuevas lesiones en varias resonancias de control y tras presentar un brote, finalmente aceptó iniciar un

nuevo TME, en este caso, dimetil fumarato. La paciente **EM10** cambió de fingolimod a natalizumab debido a la presencia de actividad radiológica con varias lesiones con captación de gadolinio. Durante el seguimiento en el estudio no experimentó actividad de la enfermedad. Al alcanzar dos años de tratamiento se decidió cambiar a Ocrelizumab debido al riesgo aumentado de desarrollar LMP tras dos años de tratamiento con natalizumab aunque presentaba títulos bajos de anticuerpos de anti-JC. La paciente **EM11** cambió de Rebif® 44 µg a dimetil fumarato cuatro meses después de su inclusión en el estudio por efectos adversos. Unos siete meses después, volvió a cambiar por fingolimod. Desde entonces presenta estabilidad clínica y buena tolerancia al fármaco. También la paciente **EM15** realizó un cambio de Rebif® 22 µg a dimetil fumarato 7 meses después de iniciar el estudio debido a falta de eficacia por la presencia de lesiones en T2 en resonancia. El paciente **EM13** cambió teriflunomida por dimetil fumarato aproximadamente 15 meses después de iniciar el estudio por la aparición de numerosas lesiones cutáneas pseudofoliculares. Sin embargo, presentó notable intolerancia gástrica y se cambió por interferon beta pegilado con buena tolerancia. La paciente **EM14** cambió dimetil fumarato por fingolimod 14 meses después de iniciar el estudio por experimentar un brote clínico, no presentando actividad con el segundo fármaco. Por último, la paciente **EM6** cambió fingolimod por dimetil fumarato por persistencia de efectos adversos como pérdida ponderal progresiva y caída del cabello. Durante el seguimiento se trasladó de área sanitaria y hubo que excluirla del análisis final (no está incluida en los 15 pacientes). En las entrevistas telefónicas no refirió nuevos brotes ni lesiones en resonancia, aunque sí que presentó clínica sugestiva de pseudobrotes. En este tiempo no se efectuó ningún cambio de tratamiento. Al final del seguimiento los pacientes presentaron una tasa anualizada de brotes 0,4 brotes/paciente-año durante 24 meses. Esta disminución de la TAB basal con respecto a la del final del estudio es significativamente estadística ($p < 0,001$) y se debe a que se seleccionaron inicialmente pacientes esencialmente activos y tras la optimización del tratamiento se ha reducido notablemente la actividad de la enfermedad. Atendiendo al seguimiento radiológico por resonancia, los pacientes presentaron durante el seguimiento de 24 meses una media de $2,07 \pm 2,79$ lesiones y una mediana de 1 (0-3) de nuevas lesiones en T2. Las diferencias entre las lesiones de nueva aparición durante un año antes de su

inclusión y las que han aparecido durante el seguimiento no fueron estadísticamente significativas ($p=0,57$)

Todos los participantes del estudio (pacientes y controles) cumplieron un cuestionario sobre su dieta habitual y estilo de vida. Entre los pacientes, 5/15 (33,3%) eran fumadores y otros 5/15 habían consumido tabaco con anterioridad. Solo los 2/15 (13,3%) pacientes, de origen europeo, reconocieron un consumo de alcohol moderado. Se midieron los parámetros antropométricos en todos los sujetos. En el grupo de pacientes con EM presentaban un peso de $74,14 \pm 18,78$ kg [, una altura media de $1,66 \pm 0,07$ metros y un índice de masa corporal (IMC) de $26,51 \pm 5,64$.

Entre las comorbilidades referidas por el grupo de pacientes destaca la presencia de cefalea. En orden de frecuencia 3/15 (20%) pacientes presentaban migraña con aura, 2/15 (13,3%) pacientes cefalea tensional y un paciente (6,6%) migraña sin aura. De todos los pacientes, 3/15 (20%) fueron diagnosticados de depresión en los años anteriores a su inclusión en el estudio. Solo una de las pacientes (6,6%) presentaba otra enfermedad autoinmune neurológica (miastenia ocular) que se diagnosticó junto con la EMRR. Presentaba síntomas compatibles con miastenia ocular, confirmada por la presencia de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina y alteraciones típicas en el electromiograma, por la que recibía tratamiento sintomático con piridostigmina (no recibía tratamiento corticoideo o inmunosupresor). Poco tiempo antes de su inclusión en el estudio desarrolló síntomas sugestivos de un evento desmielinizante y se detectaron lesiones desmielinizantes típicas de EM en resonancia.

Tabla 3. Características del grupo de pacientes con EM (parte I)

Paciente	Género	Edad (años)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)	Tratamiento	Presentación clínica primer brote (SCA)
1 (S01000)	Mujer	38	96,2	1,73	32,14	Interferón Beta 1a 44 mcg*	Mielitis (Hipoestesia MII)
2 (S02000)	Mujer	18	58,4	1,71	19,97	Interferón Beta 1a 44 mcg	Mielitis
3 (S03000)	Mujer	38	61,2	1,58	24,52	Natalizumab*	Mielitis
4 (S04000)	Mujer	35	59	1,51	25,88	Fingolimod	Mielitis
5 (S05000)	Mujer	35	108,5	1,79	33,86	Dimetilfumarato	Mielitis
7 (S07000)	Mujer	34	65,7	1,6	25,66	Interferón Beta 1b	Neuritis óptica
8 (S08000)	Mujer	31	102,1	1,77	32,59	Fingolimod*	Supratentorial
9 (S09000)	Varón	33	75	1,68	26,57	Natalizumab	Mielitis
10 (S10000)	Mujer	45	58,5	1,66	21,23	Fingolimod	Mielitis
11 (S11000)	Mujer	53	93,5	1,57	37,93	Interferón Beta 1a 44 mcg	Multifocal (Infratentorial, n. óptica)
12 (S12000)	Mujer	37	63	1,69	22,06	Interferón Beta 1b	Infratentorial
13 (S13000)	Varón	44	92	1,73	30,74	Teriflunomida	Supratentorial
14 (S14000)	Mujer	29	52,2	1,62	19,89	Dimetilfumarato	Supratentorial
15 (S15000)	Mujer	51	63	1,66	22,86	Interferón Beta 1a 44 mcg	Multifocal (Infratentorial, n. óptica)
16 (S16000)	Mujer	37	63,9	1,71	21,85	Acetato de Glatirámero	Infratentorial

Tabla 4. Características clínico-radiológicas de los pacientes con EM (parte II)

Paciente	Edad de inicio	Duración (años)	BOC	EDSS	NºBrotos basal	NºBrotos seguimiento	RM basal	RM seguimiento
1	22	16	Sí	2,5	1	0	0	0
2	18	1	-	1	3	1	2	1
3	27	11	Sí	2,5	2	0	1	0
4	31	4	No	1	0	0	0	0
5	34	1	Sí	3,5	3	1	3	0
7	33	1	Sí	3	2	3	10	10
8	23	8	Sí	3,5	4	2	2	3
9	31	2	No	6,5	4	0	0	0
10	30	15	Sí	2,5	1	2	3	5
11	32	21	-	3,5	0	0	0	2
12	36	1	Sí	1,5	0	0	0	0
13	31	13	Sí	3,5	1	2	0	3
14	18	11	Sí	1	1	0	6	3
15	47	4	Sí	2,5	0	1	5	4
16	31	6	Sí	2	2	0	3	0

En esta tabla se representan las características habituales de los pacientes con EM. Edad en el momento del diagnóstico. Duración de la enfermedad (en años). Presencia de bandas oligoclonales (BOC). Puntuación en la escala de discapacidad EDSS en el momento de su inclusión. Número de brotes durante el año previo. Número de brotes que han presentado durante el seguimiento de 24 meses. Número de nuevas lesiones en T2 durante el año previo a su inclusión (basal) y número de nuevas lesiones que han aparecido en RM durante el seguimiento.

5.1.3 Características del grupo de controles sanos.

Fueron seleccionados de entre convivientes y/o familiares de los pacientes con los que compartían su dieta habitualmente. Se realizó una entrevista con un cuestionario de frecuencia de alimentos y estilo de vida. Finalmente, se reclutaron 15 controles sanos. La proporción hombres-mujeres varió con respecto a la del grupo de pacientes con 7/15 (46,7%) varones y 8 (53,3%) mujeres, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La edad media fue de $41,25 \pm 14,34$ años. Los controles presentaron un peso medio de $79,75 \pm 18,74$ kg, una altura media de $1,67 \pm 0,06$ m y un IMC medio de $28,86 \pm 8,14$. Las diferencias entre las características demográficas y antropométricas entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 5. Comparación de datos demográficos y medidas antropométricas entre ambos grupos

	Pacientes	Controles	Valor p
<i>Género</i>			
<i>Varón</i>	2	7	
<i>Mujer</i>	13	8	0.109 (n.s.)
<i>Edad (años)</i>	37,2 ± 8,7	41,25 ± 14,34	0,373 (n.s.)
<i>Peso (kg)</i>	74,14 ± 18,78	79,75 ± 18,74	0,438 (n.s.)
<i>Altura (m)</i>	1,667 ± 0,78	1,67 ± 0,06	0,922 (n.s.)
<i>IMC (kg/m²)</i>	26,51 ± 5,6	28,86 ± 8,14.	0,379 (n.s.)

5.2 PRIMERA PARTE: ESTUDIO DE CASOS-CONTROLES SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

5.2.1 Estudio de la diversidad ecológica de la microbiota intestinal

5.2.1.1 Número de OTUs

Para determinar la riqueza en la composición bacteriana de las muestras de los sujetos del estudio se procedió a cuantificar el número total de OTUs detectados en el análisis mediante secuenciación de nueva generación²⁷⁹, que es la forma más sencilla de determinar la biodiversidad de un sistema ecológico, en este caso, la microbiota intestinal. Los sujetos del estudio obtuvieron una mediana de secuencias encontradas (longitud de secuenciación) de 137.506,4 OTUs en el grupo de pacientes con EM (ver *Tabla 7*) y 128.305,1 OTUs en el grupo control (ver *Tabla*

Tabla 6. Cuantificación de las diferentes OTUs registradas en el grupo de pacientes

Reino	S01000	S02000	S03000	S04000	S05000	S07000	S08000	S09000	S10000	S11000	S12000	S13000	S14000	S15000	S16000
Archaea	65	0	0	337	519	0	0	949	1402	0	330	0	2344	304	549
Bacteria	144249	139605	145379	117409	148775	109671	143057	136412	153906	111978	130321	115065	157392	126900	175616
Eucariota	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	2	0	0
No designed	8	8	3	0	15	6	0	3	7	2	0	0	0	0	0

Análisis mediante secuenciación de nueva generación para la cuantificación de las diferentes OTUs según el Reino al que pertenecen en cada uno de los pacientes del estudio representados por el código alfanumérico (Sx000) correspondiente a la tabla de características de los pacientes (tabla 4)

8).

Tabla 7. Cuantificación de las diferentes OTUs registradas en el grupo de controles

Reino	S01777	S02777	S03777	S04777	S05777	S07777	S08777	S09777	S10777	S12777	S13777	S14777	S15777	S16777
Archaea	419	51	0	231	0	0	0	152	0	26	0	1013	125	150
Bacteria	109881	112287	123338	142796	126383	123713	120467	137387	130362	167735	121648	152512	118316	107184
Eucariota	0	2	3	0	0	0	0	0	2	9	0	0	0	2
No designado	4	8	14	0	0	3	3	3	17	9	0	2	0	15

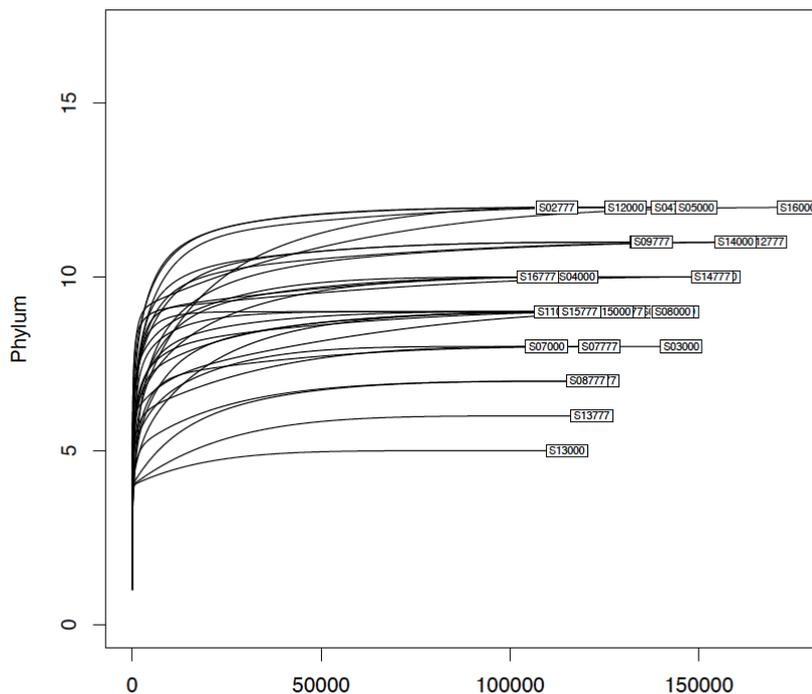
Análisis mediante secuenciación de nueva generación para la cuantificación de las diferentes OTUs según el Reino al que pertenecen en cada uno de los controles del estudio representados por el código alfanumérico en el que comparten la primera cifra con el paciente que le corresponde y se modifica la segunda cifra (Sx777)

La mayoría pertenecían al reino procariota (Bacteria) con una muy pequeña proporción de Archea. En total se obtuvieron 14 filums, 68 familias, 240 géneros y 318 especies bacterianas diferentes en la microbiota intestinal de los 15 pacientes con EM y 15 controles sanos. En un análisis inicial, se muestran las lecturas por muestra, que son todos los datos brutos obtenidos de la secuenciación de los amplicones completos del ADN ribosomal 16S, al que se aplicará un tratamiento bioinformático para realizar el filtrado de las secuencias y su asignación taxonómica.

5.2.1.2 *Curvas de rarefacción*

En la siguiente figura se muestra un análisis general del rendimiento de la secuenciación de RNA bacteriano obtenida de las muestras de los sujetos del estudio. El rendimiento de la amplificación de las librerías resultó óptimo dado que todas las muestras alcanzaron la zona de *plateau* en las curvas de rarefacción. Por consiguiente, se puede afirmar que disponemos de un número suficiente y representativo de OTUs de todos los rangos taxonómicos y que obtener un número mayor de secuencias no nos proporcionaría un mayor número de filums bacterianos en las muestras. Igual ocurre cuando estudiamos las curvas de rarefacción en los niveles taxonómicos de familia y género bacterianos. En las diferentes figuras se muestra el número de filums estadísticamente esperado según se incrementa el esfuerzo de muestreo.

Gráfico 37. Curvas de rarefacción de las muestras de todos los sujetos a nivel filum



Curvas de rarefacción de las muestras de microbiota intestinal de todos los sujetos del estudio en el nivel de Filum bacteriano. En el eje de ordenadas, el número total de filums bacterianos encontrados. En el eje de abscisas, el número de OTUs detectados conforme aumentamos el tamaño muestral de la secuenciación masiva de RNA16S. Los sujetos del estudio se representan con el código alfanumérico Sx000 o Sx777 según sean casos o controles.

Gráfico 38. Curvas de rarefacción de las muestras de todos los sujetos a nivel familia

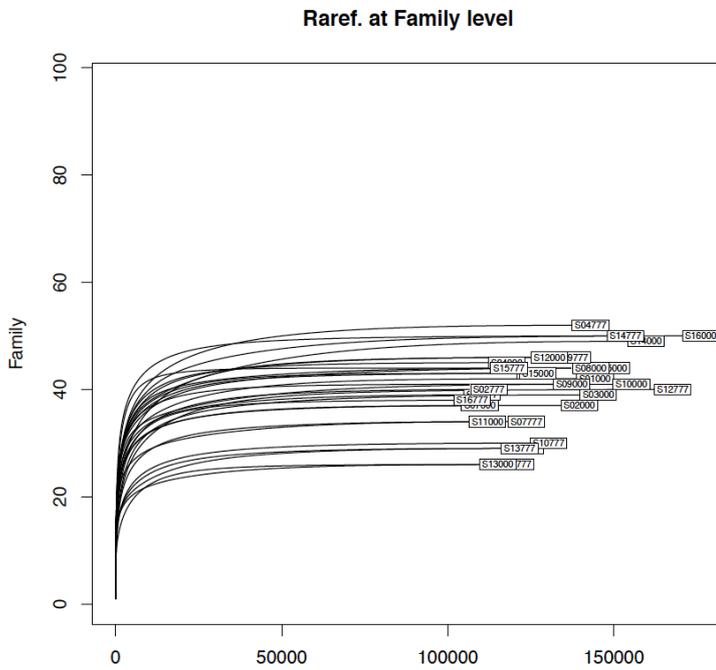
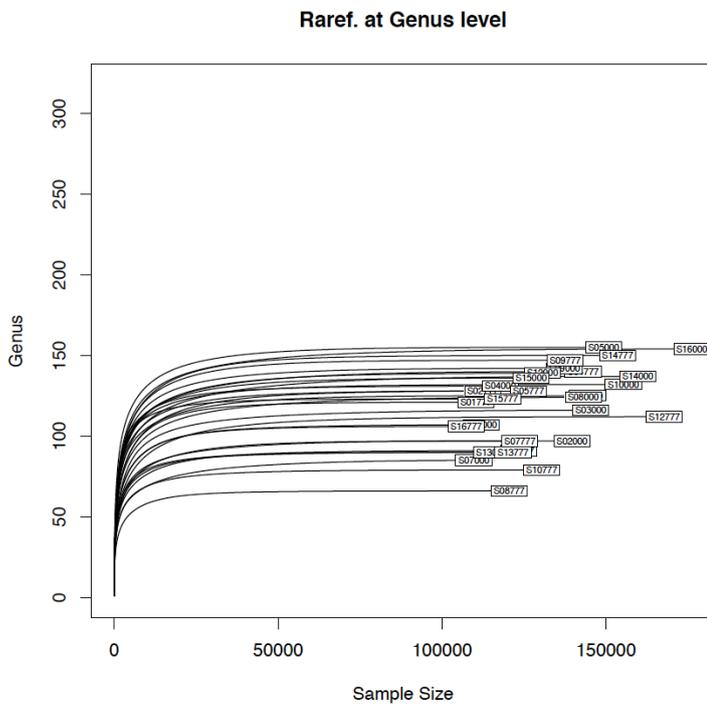


Gráfico 39. Curvas de rarefacción de las muestras de todos los sujetos a nivel género

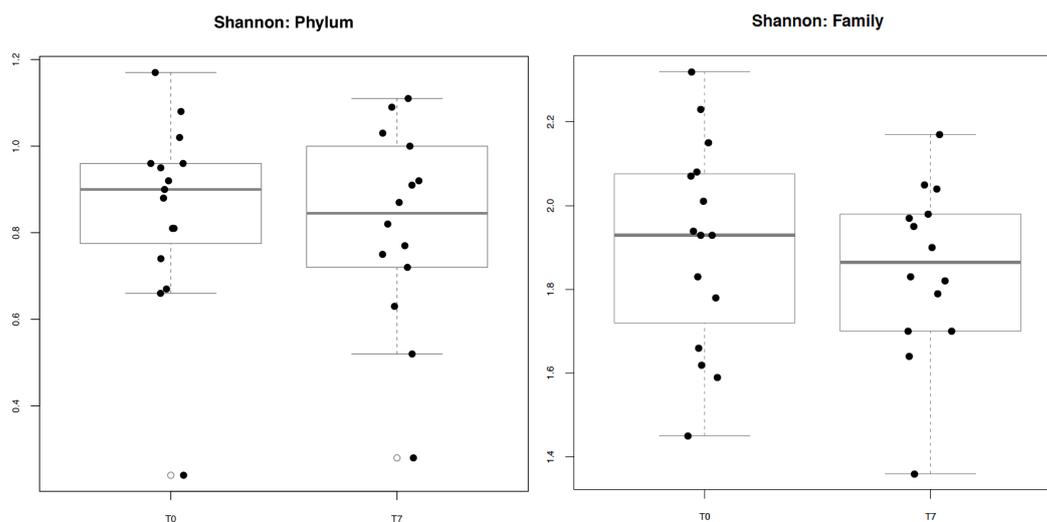


5.2.1.3 Diversidad alfa

5.2.1.3.1 Índice de Shannon

En el estudio se realizó el cálculo del índice de Shannon para cada nivel taxonómico (filum, familia, género) en cada una de las muestras, tanto del grupo de pacientes con EM (*representado a partir de ahora con el código T0*) como el de controles sanos (*representado por el código T7*) para cada nivel taxonómico (filum, familia, género). A través de diagramas de cajas o *boxplot* se representa la comparación de la media de los índices de Shannon de todas las muestras de cada grupo para el que se utilizó el no paramétrico de Wilcoxon.

Gráfico 40. Distribución en diagrama de cajas (Boxplot) de la comparación de medias del índice de Shannon del grupo de pacientes (T0) y grupo control (T7) a nivel de filum y familia



Para el estudio de la diversidad alfa de la microbiota intestinal de cada grupo se realizó una comparación de las medias correspondientes a los índices de Shannon de cada uno de los sujetos de ambos grupos del estudio para cada uno de los niveles taxonómicos más representativos (filum, familia, género). En las siguientes tablas se muestran las medias de los índice de Shannon y el nivel de significación conseguido con los test no paramétricos de Wilcoxon y de Kruskal-Wallis (tomando como nivel significativo de valor de $p < 0,05$)²⁸⁰. Según los resultados obtenidos, el grupo de pacientes obtuvo índices de diversidad alfa mayores que los controles, pero ninguna comparación de medias alcanzó el nivel

de significación estadística, por lo que se puede afirmar que ambos grupos muestrales presentan una diversidad alfa similar.

Gráfico 41. Boxplot de la comparación de medias del índice de Shannon a nivel de género

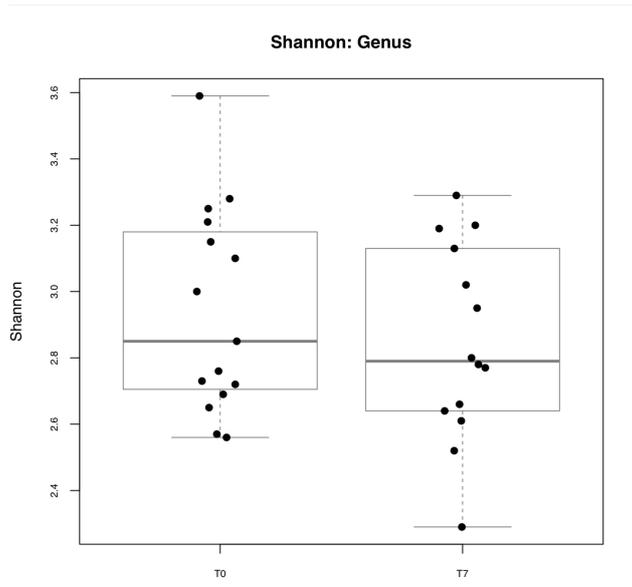


Tabla 8. Comparación de medias de índice de Shannon con test no paramétricos a nivel filum

Grupo Pacientes	Grupo Control	Índice	Media 1	Media 2	Test Wilcoxon	Test Kruskal-Wallis
T0	T7	Shannon	0.8513	0.8157	0.6944	0.6783

Tabla 9. Comparación de medias de índice de Shannon con test no paramétricos a nivel familia

Grupo Pacientes	Grupo Control	Índice	Media 1	Media 2	Test Wilcoxon	Test Kruskal-Wallis
T0	T7	Shannon	1.906	1.85	0.6003	0.5852

Tabla 10. Comparación de medias de índice de Shannon con test no paramétricos a nivel género

Grupo Pacientes	Grupo Control	Índice	Media 1	Media 2	Test Wilcoxon	Test Kurskal-Wallis
T0	T7	Shannon	2.9407	2.8464	0.5557	0.5412

5.2.1.3.2 Índice de Simpson

Para el estudio de la diversidad alfa también se calcularon los índices de Simpson de cada muestra de los participantes. A continuación, se muestran los diagramas de cajas que comparan los índices de Simpson para cada nivel taxonómico significativo (filum, familia, género) y más adelante se muestran las tablas donde se indican las medias obtenidas de los índice de Simpson y el nivel de significación conseguido con los test no paramétricos de Wilcoxon y de Kruskal-Wallis.

Gráfico 42. Boxplot con la comparación de los índices de Simpson a nivel de filum y familia

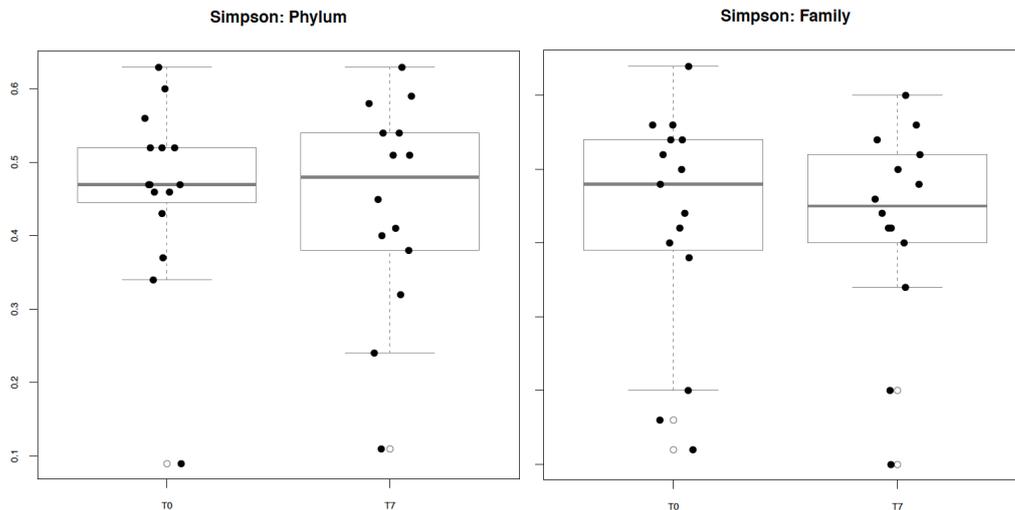
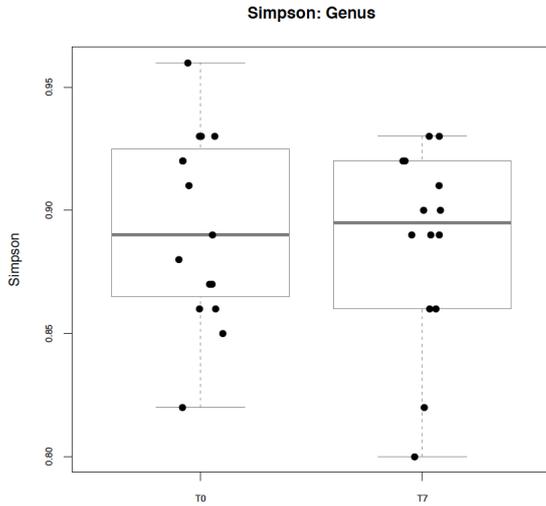


Gráfico 43. Boxplot con la comparación de los índices de Simpson a nivel de género



En este caso, el grupo de pacientes obtuvo un menor índice de Simpson tanto para los niveles de filum como de género, que traduce una mayor biodiversidad. Sin embargo, a nivel de familia el índice de Simpson fue mayor que en los controles. No obstante, ninguno de los resultados obtuvo significación estadística, lo que confirma que ambos grupos tienen una diversidad alfa similar

Tabla 11. Comparación de medias de índice de Simpson con test no paramétricos a nivel filum

Grupo Pacientes	Grupo Control	Índice	Media 1	Media 2	Test Wilcoxon	Test Kruskal-Wallis
T0	T7	Simpson	0.4607	0.4436	0.7931	0.7763

Tabla 12. Comparación de medias de índice de Simpson con test no paramétricos a nivel familia

Grupo Pacientes	Grupo Control	Índice	Media 1	Media 2	Test Wilcoxon	Test Kruskal-Wallis
T0	T7	Simpson	0.7653	0.7636	0.7762	0.7595

Tabla 13. Comparación de medias de índice de Simpson con test no paramétricos a nivel género

Grupo Pacientes	Grupo Control	Índice	Media 1	Media 2	Test Wilcoxon	Test Kurskal-Wallis
T0	T7	Simpson	0.8933	0.8871	0.7921	0.7752

5.2.1.4 Diversidad beta

5.2.1.4.1 Índice de Jaccard

En el análisis estadístico comparativo de la diversidad beta para cada uno de los grupos se calculó el índice de Jaccard y se comparó con test no paramétricos. Solo se muestran los diagramas de cajas que comparan las medias del índice de Jaccard que obtuvieron un resultado estadísticamente significativo. La diversidad beta fue mayor de forma estadísticamente significativa en el grupo de pacientes que en el grupo control tanto en el nivel taxonómico de familia como el de género. Se muestran también las tablas con los test no paramétricos y el grado de significación de $p < 0.05$), lo que traduce una microbiota más homogénea y menos diversa que en el grupo de control.

5.2.1.4.2 Índice de Sorensen

Igualmente se comparan las medias del índice de Sorensen, otro indicador de diversidad beta, que muestra de nuevo ser más alto en el grupo de pacientes con EM que en el de control en los niveles de familia y género y tiene la misma interpretación.

Gráfico 44. Boxplot con la comparación de las medias de los índices de Jaccard a nivel de familia

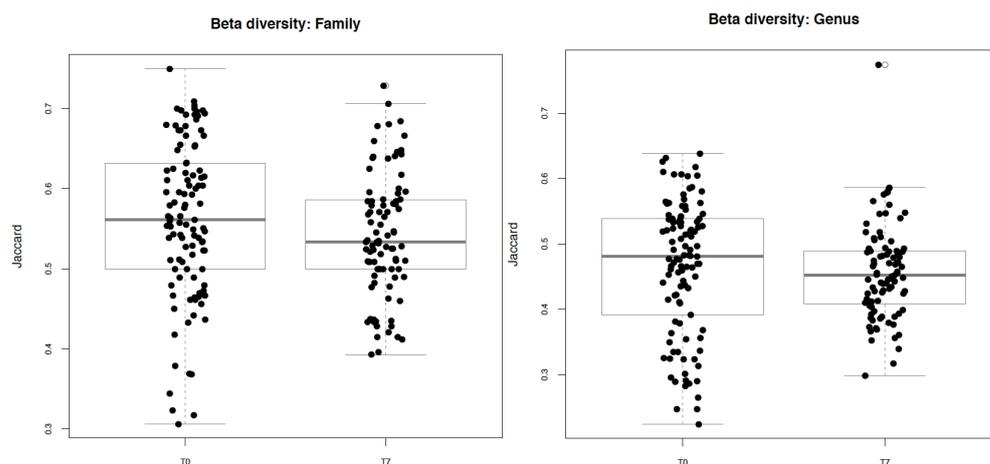
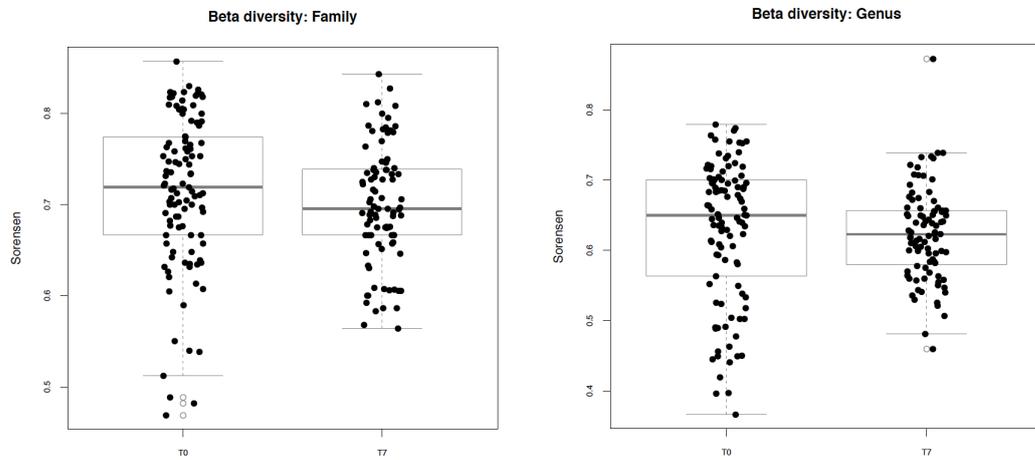


Gráfico 45. Boxplot con la comparación de las medias de los índices de Sorensen a nivel de familia

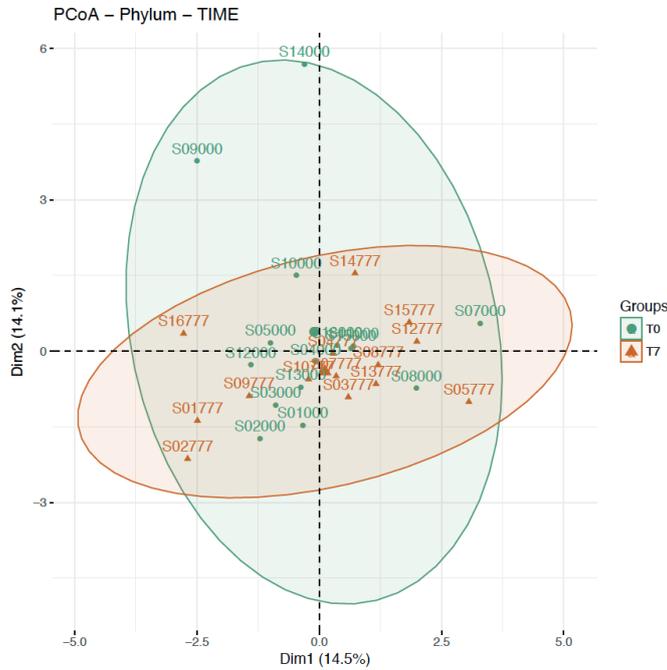


5.2.2 Análisis Principal de Componentes

A continuación mostramos el análisis principal de componentes (PCoA) de cada uno de los niveles taxonómicos. El PCoA ordena sus componentes por el valor de su varianza original. En nuestro estudio de diversidad de la microbiota intestinal se emplea para representar las abundancias relativas de cada uno de los microorganismos que se encuentran en cada nivel taxonómico.

En los siguientes gráficos se pueden observar las nubes de puntos que corresponden a cada sujeto del estudio en el estudio de la diversidad en los diferentes niveles taxonómicos (filum, familia y género). Los puntos verdes representan a los pacientes con EM y los triángulos naranjas representan al grupo control. Se puede observar que la mayoría de las muestras de ambos grupos se encuentran compartiendo un área solapada, lo que implica similitud entre las muestras, solo saliendo fuera de esta área algunas de las muestras, que en general corresponden a pacientes con EMRR.

Gráfico 46. Análisis Principal de Componentes a nivel de filum



En este gráfico de PCoA se puede observar la nube de puntos que corresponden a cada sujeto del estudio (puntos verdes representando al grupo de EM y triángulos naranjas representando al grupo control). Se puede observar que la mayoría de las muestras de ambos grupos se encuentran compartiendo un área (solapamiento), solo saliendo fuera de esta área algunas de las muestras, que en general corresponden a pacientes con EMRR.

Gráfico 47. Análisis Principal de Componentes a nivel de familia

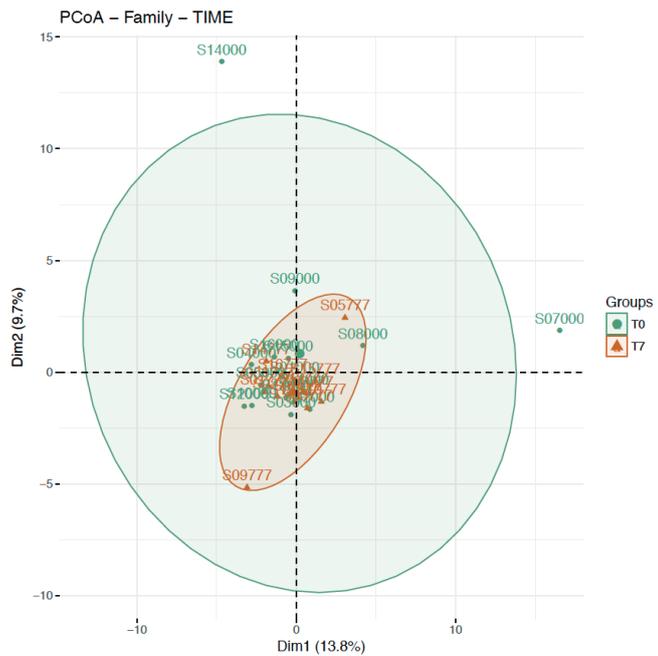
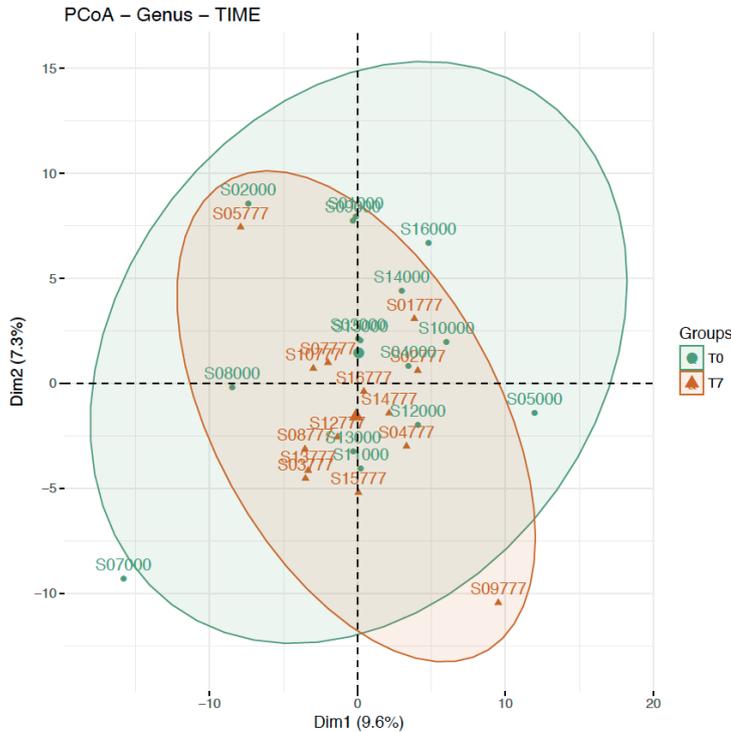


Gráfico 48. Análisis Principal de Componentes a nivel de género



5.2.3 Clasificación taxonómica de las muestras de microbiota intestinal

El filum más frecuentemente detectado en las muestras de microbiota intestinal del grupo de pacientes con EM fue *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Entre las diferentes familias bacterianas se detectaron principalmente *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* y *Bacteroidaceae*. Se encontraron más de 112 diferentes especies bacterianas. Los géneros bacterianos frecuentemente hallados en el análisis de microbiota fueron *Parabacteroides*, *Alistipes*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Christensenellaceae*, *Akkermansia*, *Christensenellaceae*, *Agathobacter*, el grupo *Coprostanoligenes*, *Dorea*, *Blautia*, *Streptococcus*, *Ruminiclostridium*, *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae*, *Phascolarctobacterium*, *Oscillibacter*, *Butyricoccus*, *Erysipelotrichaceae*, *Methanobrevibacter*, *Collinsella*, *Ruminococcaceae*, el grupo *Ventriosum* y *Roseburia*.

5.2.4 Descripción cuantitativa de la microbiota en pacientes con EM

Se exponen los datos de abundancias relativas para cada nivel taxonómico, representadas en gráficos de barras de los filums, familias y géneros bacterianos que se encuentran en diferente proporción de forma estadísticamente significativa entre los sujetos de ambos grupos.

A continuación, se muestran tablas con las medidas centrales (mediana y el rango intercuartílico) para los componentes de cada nivel taxonómico que mantienen las diferencias estadísticamente significativas. El resto se expone en los anexos 5 y 6.

Gráfico 49. Representación de la proporción de cada filum en el grupo de pacientes

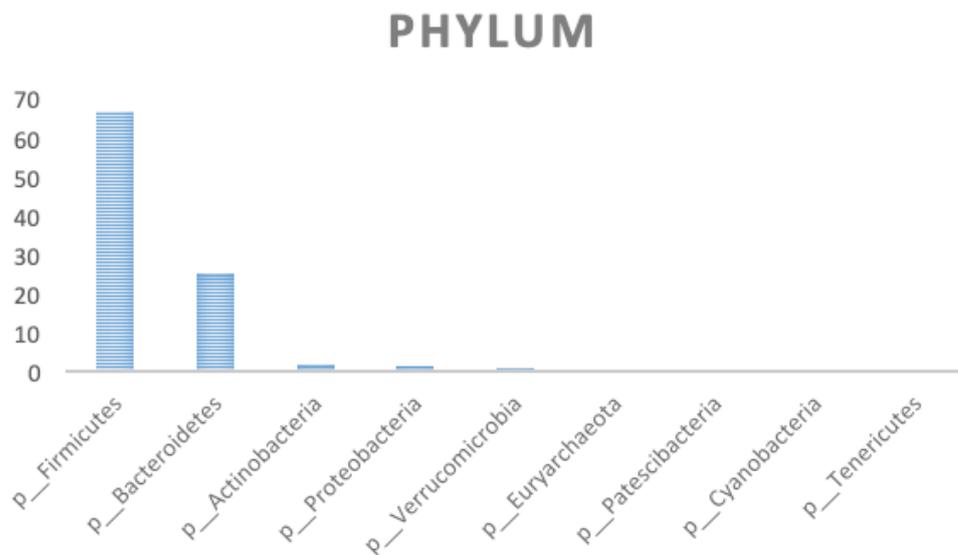


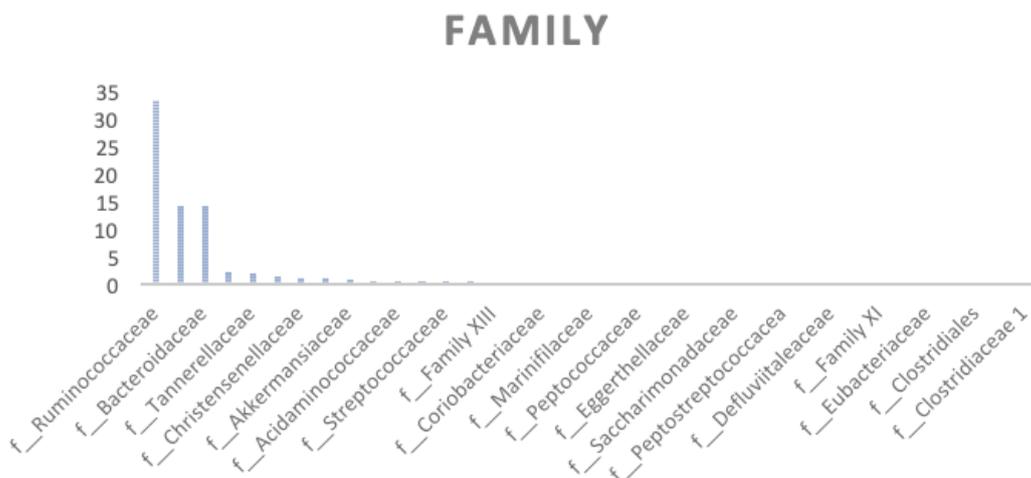
Gráfico de barras en el que se representan las proporciones en las que han sido encontrados los diferentes filums en las muestras de microbiota de los pacientes con EM (las proporciones en su conjunto suman 100). En la mayoría de muestras se encuentran predominantemente los filums Firmicutes y Bacteroidetes.

Tabla 14. Medidas centrales de los filums detectados en el grupo de pacientes

Filums Grupo Pacientes EM	Mediana	p25	p75
p__Firmicutes	66,55	0,00	0,02
p__Bacteroidetes	24,91	0,00	0,03
p__Actinobacteria	1,72	0,00	7,97
p__Proteobacteria	1,42	0,00	0,00
p__Verrucomicrobia	0,84	0,00	0,43
p__Euryarchaeota	0,25	0,00	0,00
p__Patescibacteria	0,06	0,00	0,04
p__Cyanobacteria	0,01	0,61	2,89
p__Tenericutes	0,01	1,05	3,21
p__Synergistetes	0,00	17,64	32,45
p__Lentisphaerae	0,00	0,00	0,00
p__Fusobacteria	0,00	59,06	72,06
p__Epsilonbacteraeota	0,00	0,01	0,08
p__Chloroflexi	0,00	0,00	0,06

Evaluación de medidas centrales de la composición de filums bacterianos de la microbiota intestinal del grupo de pacientes con EM. A la izquierda, todos los filums encontrados con presencia representativa. A la derecha, la mediana y el rango intercuartil de cada filum para el grupo completo de pacientes.

Gráfico 50. Representación de las familias más abundantes en el grupo de pacientes



Representación de la proporción de las diferentes familias bacterianas que componen la microbiota intestinal de pacientes con EM. En su mayoría se detecta Ruminococcaceae, Bacteroidaceae y Tannerellaceae.

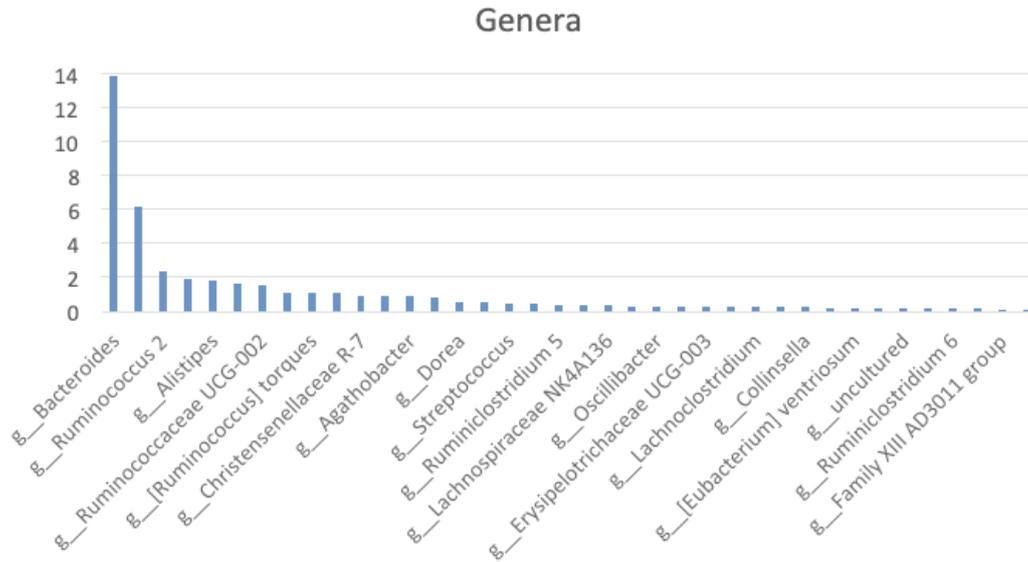
Tabla 15. Medidas centrales de las familias detectadas en el grupo de pacientes

Familias Grupo Pacientes EM	Mediana	p25	p75
f__Ruminococcaceae	33,27	28,45	44,58
f__Lachnospiraceae	14,19	9,67	21,70
f__Bacteroidaceae	14,14	7,81	23,27
f__Rikenellaceae	2,19	0,50	6,16
f__Tannerellaceae	1,96	1,38	2,78
f__Erysipelotrichaceae	1,40	0,51	3,63
f__Christensenellaceae	1,17	0,51	2,74
f__Bifidobacteriaceae	1,14	0,12	2,46
f__Akkermansiaceae	0,84	0,00	7,97
f__Veillonellaceae	0,58	0,04	11,58
f__Acidaminococcaceae	0,55	0,06	4,06
f__Enterobacteriaceae	0,46	0,02	1,03
f__Streptococcaceae	0,41	0,18	2,31
f__Desulfovibrionaceae	0,37	0,15	0,74
f__Family XIII	0,27	0,12	0,54
f__Methanobacteriaceae	0,25	0,00	0,43
f__Coriobacteriaceae	0,24	0,03	0,58
f__Prevotellaceae	0,21	0,03	1,92
f__Marinifilaceae	0,18	0,02	0,40
f__Burkholderiaceae	0,14	0,02	0,65
f__Peptococcaceae	0,11	0,00	0,17
f__Barnesiellaceae	0,08	0,03	0,85
f__Eggerthellaceae	0,06	0,02	0,27
f__Coriobacteriales Incertae Sedis	0,06	0,00	0,23
f__Saccharimonadaceae	0,05	0,01	0,08
f__Actinomycetaceae	0,04	0,01	0,07
f__Peptostreptococcaceae	0,04	0,01	0,07
f__Atopobiaceae	0,02	0,01	0,08
f__Defluviitaleaceae	0,02	0,00	0,05
f__Carnobacteriaceae	0,01	0,00	0,04
f__Family XI	0,01	0,00	0,04
f__Porphyromonadaceae	0,00	0,00	0,04
f__Eubacteriaceae	0,00	0,00	0,02
f__Family XI	0,00	0,00	0,03
f__Clostridiales vadinBB60 group	0,00	0,00	0,01
f__Candidatus Saccharibacteria bacterium UB2523	0,00	0,00	0,01
f__Clostridiaceae 1	0,00	0,00	0,01

CAPÍTULO V- RESULTADOS 197

f__Corynebacteriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Cellulomonadaceae	0,00	0,00	0,00
f__Microbacteriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Micrococcaceae	0,00	0,00	0,00
f__Propionibacteriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Muribaculaceae	0,00	0,00	0,01
f__Flavobacteriaceae	0,00	0,00	0,05
f__Anaerolineaceae	0,00	0,00	0,00
f__Clostridium sp, CAG:306	0,00	0,00	0,00
f__uncultured bacterium	0,00	0,00	0,01
f__Prototheca zopfii	0,00	0,00	0,00
f__Campylobacteraceae	0,00	0,00	0,00
f__Staphylococcaceae	0,00	0,00	0,00
f__Aerococcaceae	0,00	0,00	0,00
f__Lactobacillaceae	0,00	0,00	0,01
f__Leuconostocaceae	0,00	0,00	0,01
f__Fusobacteriaceae	0,00	0,00	0,02
f__Leptotrichiaceae	0,00	0,00	0,00
f__Victivallaceae	0,00	0,00	0,00
f__TM7 phylum sp, oral clone FR058	0,00	0,00	0,01
f__Rhizobiaceae	0,00	0,00	0,00
f__Neisseriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Cardiobacteriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Pasteurellaceae	0,00	0,00	0,00
f__Moraxellaceae	0,00	0,00	0,00
f__Pseudomonadaceae	0,00	0,00	0,00
f__Synergistaceae	0,00	0,00	0,06
f__Anaeroplasmataceae	0,00	0,00	0,00
f__Firmicutes bacterium CAG:822	0,00	0,00	0,00
f__Mycoplasmataceae	0,00	0,00	0,00
f__Puniceicoccaceae	0,00	0,00	0,00

Gráfico 51. Representación de los géneros bacterianos más abundantes en pacientes con EM



Representación en barras de la proporción de los diferentes géneros bacterianos que componen la microbiota intestinal de pacientes con EM. Como género más abundante se detecta Bacteroides.

Tabla 16. Medidas centrales de los géneros detectados en el grupo de pacientes

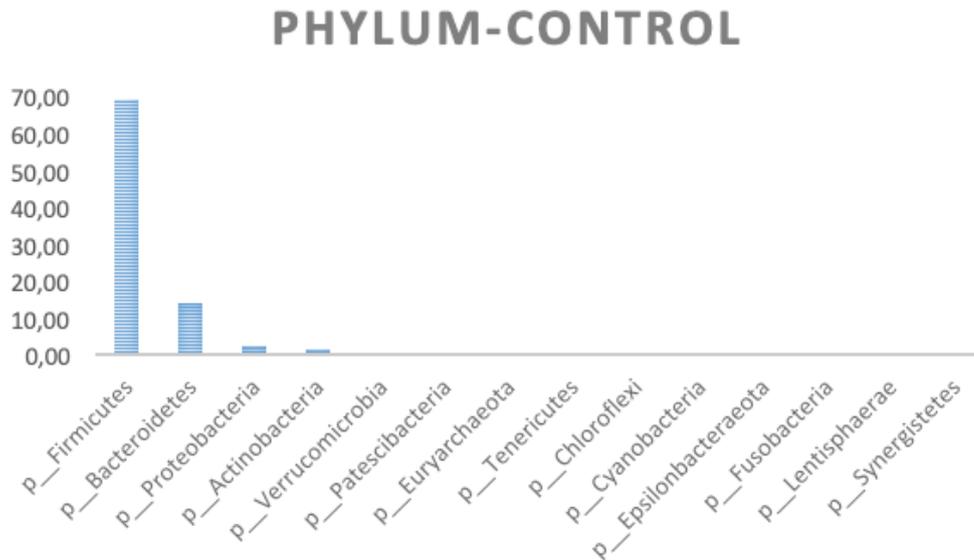
Géneros Grupo de pacientes	Mediana	p25	p75
g_Bacteroides	13,87	7,57	22,71
g_Faecalibacterium	6,22	2,67	15,70
g_Ruminococcus 2	2,37	1,24	11,68
g_Parabacteroides	1,86	1,24	2,72
g_Alistipes	1,80	0,51	5,95
g_Ruminococcaceae UCG-014	1,59	0,26	5,51
g_Ruminococcaceae UCG-002	1,54	0,01	4,10
g_Subdoligranulum	1,13	0,58	3,89
g_[Ruminococcus] torques group	1,11	0,34	1,87
g_Bifidobacterium	1,09	0,09	2,20
g_Christensenellaceae R-7 group	0,95	0,41	1,96
g_Akkermansia	0,90	0,00	7,85
g_Agathobacter	0,88	0,15	3,92

CAPÍTULO V- RESULTADOS 199

g__[Eubacterium] coprostanoligenes group	0,79	0,42	3,61
g__Dorea	0,55	0,29	1,15
g__Blautia	0,52	0,31	1,59
g__Streptococcus	0,45	0,18	3,58
g__Ruminococcaceae NK4A214 group	0,41	0,22	0,90
g__Ruminiclostridium 5	0,39	0,13	0,73
g__Ruminococcus 1	0,39	0,18	1,24
g__Lachnospiraceae NK4A136 group	0,35	0,09	1,90
g__Phascolarctobacterium	0,30	0,00	3,94
g__Oscillibacter	0,27	0,10	0,54
g__Butyricoccus	0,27	0,10	1,09
g__Erysipelotrichaceae UCG-003	0,27	0,00	1,07
g__Ruminococcaceae UCG-005	0,27	0,08	0,64
g__Lachnospiraceae UCG-005	0,25	0,12	0,85
g__Methanobrevibacter	0,24	0,00	0,35
g__Collinsella	0,23	0,01	0,46
g__Ruminococcaceae UCG-013	0,21	0,07	0,65
g__[Eubacterium] ventriosum group	0,21	0,03	0,44
g__Roseburia	0,20	0,05	0,99
g__uncultured	0,18	0,12	0,34
g__Fusicatenibacter	0,17	0,02	0,30
g__Ruminiclostridium 6	0,16	0,00	0,40
g__Coprococcus 3	0,14	0,00	0,39
g__Family XIII AD3011 group	0,12	0,05	0,25

5.2.5 Descripción cuantitativa de la microbiota en el grupo control

Gráfico 52. Representación de la proporción de cada filum en el grupo control

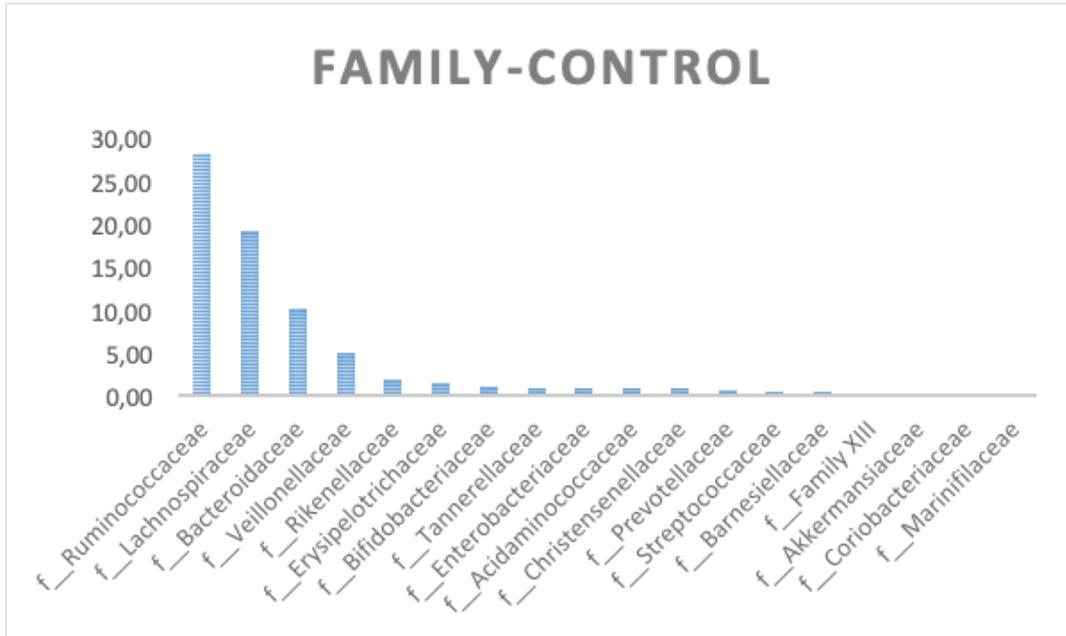


Representación de la proporción de los diferentes filums bacterianos que componen la microbiota intestinal del grupo de controles sanos (convivientes de los pacientes con EM con los que comparten la composición de la dieta). En su mayoría se detectan Firmicutes y Bacteroidetes, como en el grupo de pacientes (El total de sus proporciones suma 100)

Tabla 17. Medidas centrales de cada filum detectado en la microbiota del grupo control

Filums Grupo Control	Mediana	p25	p75
p__Firmicutes	68,86	54,65	78,27
p__Bacteroidetes	13,90	9,89	26,48
p__Proteobacteria	2,07	0,59	6,80
p__Actinobacteria	1,34	0,77	5,40
p__Verrucomicrobia	0,19	0,00	4,73
p__Patescibacteria	0,04	0,01	0,08
p__Euryarchaeota	0,03	0,00	0,15
p__Tenericutes	0,00	0,00	0,12
p__Chloroflexi	0,00	0,00	0,00
p__Cyanobacteria	0,00	0,00	0,02
p__Epsilonbacteraeota	0,00	0,00	0,00
p__Fusobacteria	0,00	0,00	0,00
p__Lentisphaerae	0,00	0,00	0,00
p__Synergistetes	0,00	0,00	0,02

Gráfico 53. Representación de la proporción de cada familia en el grupo control



Representación en barras de la proporción de las diferentes familias bacterianas que componen la microbiota intestinal del grupo control. En su mayoría se detectan Ruminococcaceae, Lachnospiraceae y Bacteroidaceae.

Tabla 18. Medidas centrales de cada familia detectada en la microbiota del grupo control

Familias Grupo Control	Mediana	p25	p75
f__Ruminococcaceae	28,05	23,40	40,81
f__Lachnospiraceae	19,17	10,06	28,56
f__Bacteroidaceae	9,99	5,63	17,40
f__Veillonellaceae	4,87	0,07	17,63
f__Rikenellaceae	1,88	0,75	4,21
f__Erysipelotrichaceae	1,31	0,66	2,92
f__Bifidobacteriaceae	1,00	0,37	2,86
f__Tannerellaceae	0,80	0,49	1,52
f__Enterobacteriaceae	0,77	0,03	6,23
f__Acidaminococcaceae	0,73	0,00	4,07
f__Christensenellaceae	0,71	0,03	2,13
f__Prevotellaceae	0,65	0,15	2,76
f__Streptococcaceae	0,39	0,24	1,12

f__Barnesiellaceae	0,39	0,05	0,63
f__Family XIII	0,23	0,11	0,47
f__Akkermansiaceae	0,19	0,00	4,73
f__Coriobacteriaceae	0,15	0,06	0,80
f__Marinifilaceae	0,10	0,01	0,44
f__Desulfovibrionaceae	0,07	0,01	0,40
f__Burkholderiaceae	0,07	0,04	0,24
f__Eggerthellaceae	0,06	0,01	0,10
f__Peptostreptococcaceae	0,03	0,00	0,13
f__Methanobacteriaceae	0,03	0,00	0,15
f__Saccharimonadaceae	0,03	0,01	0,08
f__Atopobiaceae	0,02	0,01	0,04
f__Actinomycetaceae	0,02	0,01	0,05
f__Coriobacteriales Incertae Sedis	0,01	0,00	0,06
f__Defluviitaleaceae	0,01	0,00	0,02
f__Carnobacteriaceae	0,01	0,00	0,02
f__Family XI	0,01	0,00	0,03
f__Clostridiaceae 1	0,00	0,00	0,01
f__Peptococcaceae	0,00	0,00	0,06
f__Corynebacteriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Cellulomonadaceae	0,00	0,00	0,00
f__Microbacteriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Micrococcaceae	0,00	0,00	0,00
f__Propionibacteriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Muribaculaceae	0,00	0,00	0,41
f__Porphyromonadaceae	0,00	0,00	0,01
f__Flavobacteriaceae	0,00	0,00	0,02
f__Anaerolineaceae	0,00	0,00	0,00
f__Clostridium sp, CAG:306	0,00	0,00	0,00
f__Prototheca zopfii	0,00	0,00	0,00
f__Campylobacteraceae	0,00	0,00	0,00
f__Staphylococcaceae	0,00	0,00	0,00
f__Aerococcaceae	0,00	0,00	0,00
f__Lactobacillaceae	0,00	0,00	0,02
f__Leuconostocaceae	0,00	0,00	0,02
f__Clostridiales vadinBB60 group	0,00	0,00	0,00
f__Eubacteriaceae	0,00	0,00	0,01
f__Family XI	0,00	0,00	0,00
f__Fusobacteriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Leptotrichiaceae	0,00	0,00	0,00
f__Victivallaceae	0,00	0,00	0,00

CAPÍTULO V- RESULTADOS 203

f__Candidatus Saccharibacteria bacterium UB2523	0,00	0,00	0,01
f__TM7 phylum sp, oral clone FR058	0,00	0,00	0,00
f__Rhizobiaceae	0,00	0,00	0,00
f__uncultured	0,00	0,00	0,01
f__Neisseriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Cardiobacteriaceae	0,00	0,00	0,00
f__Pasteurellaceae	0,00	0,00	0,04
f__Moraxellaceae	0,00	0,00	0,00
f__Pseudomonadaceae	0,00	0,00	0,00
f__Synergistaceae	0,00	0,00	0,02
f__Anaeroplasmataceae	0,00	0,00	0,00
f__Firmicutes bacterium CAG:822	0,00	0,00	0,00
f__Mycoplasmataceae	0,00	0,00	0,00
f__Puniceicoccaceae	0,00	0,00	0,00

Evaluación de medidas centrales de la composición de las familias bacterianas del grupo control. A la izquierda, todas las familias encontradas en la secuenciación. A la derecha, la mediana y el rango intercuartil de cada familia bacteriana en el grupo control.

Gráfico 54. Representación de los géneros bacterianos más abundantes en el grupo control

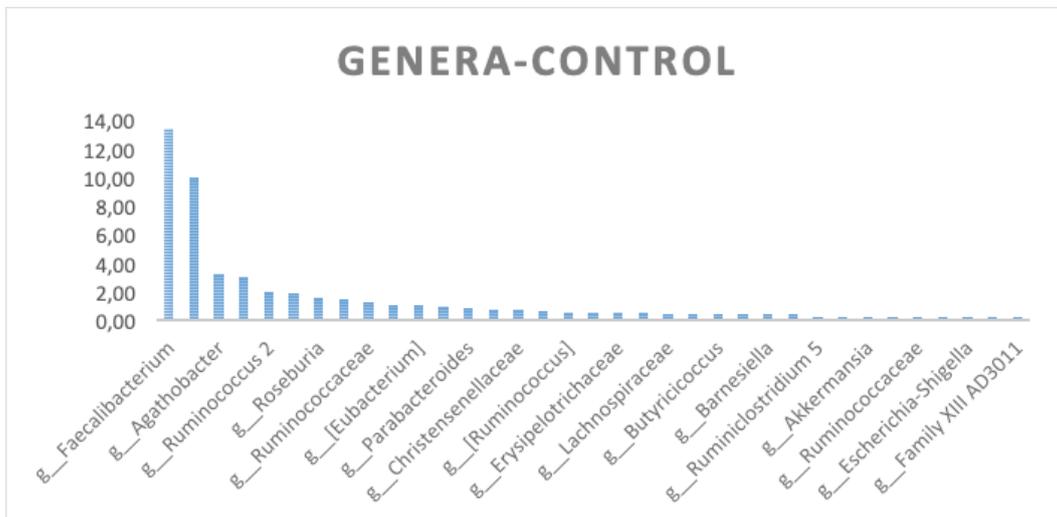


Tabla 19. Medidas centrales de los géneros más abundantes de la microbiota del grupo control

Géneros Grupo Control	Mediana	p25	p75
g__Faecalibacterium	13,33	5,74	15,43
g__Bacteroides	9,99	5,63	17,40
g__Agathobacter	3,18	0,28	11,78
g__Subdoligranulum	2,98	1,25	5,19
g__Ruminococcus 2	1,93	0,14	5,52
g__Alistipes	1,88	0,75	4,02
g__Roseburia	1,55	0,85	2,72
g__Ruminococcaceae UCG-002	1,37	0,10	3,65
g__Ruminococcaceae UCG-013	1,20	0,44	1,43
g__Bifidobacterium	1,00	0,37	2,85
g__[Eubacterium] coprostanoligenes group	0,99	0,16	1,55
g__Dialister	0,86	0,00	7,96
g__Parabacteroides	0,80	0,49	1,52
g__Phascolarctobacterium	0,71	0,00	4,07
g__Christensenellaceae R-7 group	0,66	0,03	2,10
g__Dorea	0,63	0,22	0,96
g__[Ruminococcus] torques group	0,53	0,07	1,16
g__Ruminococcaceae NK4A214 group	0,50	0,13	0,71
g__Erysipelotrichaceae UCG-003	0,47	0,03	1,43
g__Blautia	0,44	0,12	1,15
g__Lachnospiraceae NK4A136 group	0,42	0,03	2,74
g__Streptococcus	0,39	0,24	1,12
g__Butyricicoccus	0,38	0,21	1,08
g__Coprococcus 3	0,37	0,11	0,88
g__Barnesiella	0,37	0,03	0,58
g__Ruminococcaceae UCG-005	0,36	0,04	1,94
g__Ruminiclostridium 5	0,22	0,06	0,51
g__Ruminococcus 1	0,20	0,08	0,59
g__Akkermansia	0,19	0,00	4,73
g__Lachnospiraceae UCG-014	0,17	0,05	0,41
g__Ruminococcaceae UCG-014	0,16	0,00	1,76
g__Collinsella	0,15	0,06	0,80
g__Escherichia-Shigella	0,14	0,01	4,65
g__[Eubacterium] ventriosum group	0,13	0,02	1,19
g__Family XIII AD3011 group	0,12	0,05	0,34

Medidas centrales de la composición de los géneros bacterianos más representativos del grupo control. A la izquierda, todos los géneros encontrados. A la derecha, la mediana y el rango intercuartílico de los géneros bacterianos más abundantes del grupo de sujetos sanos.

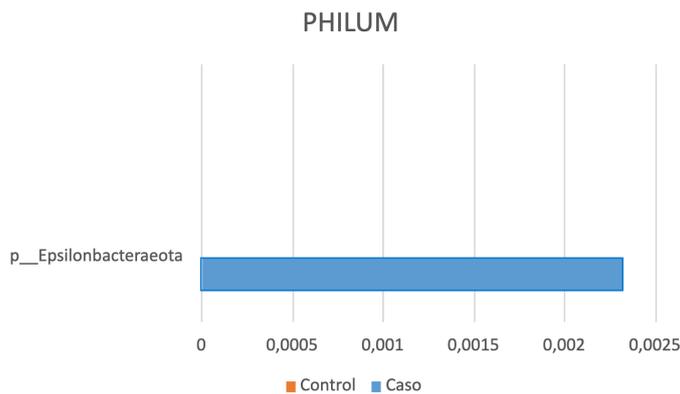
5.2.6 Diferencias en la composición entre el grupo de pacientes con EM y el grupo control. Comparación con test estadísticos para cada nivel taxonómico en ambos grupos.

Para comprobar si hay diferencias en la composición y abundancias relativas de los microorganismos hallados en la microbiota intestinal en el grupo de pacientes con EM con respecto a los controles sanos, expresamos las variables de cada nivel taxonómico (filum, familia y género bacterianos) a través de la mediana y el rango intercuartílico (p25-p75) como medida central al no seguir una distribución normal. A continuación, se realizará un análisis estadístico con los test no paramétricos U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon.

5.2.6.1 Diferencias a nivel de filum entre muestras de pacientes y controles

En el caso del nivel taxonómico FILUM, se han obtenido diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) solo en el siguiente caso: *Epsilonbacteraeota*. El resto de las filum detectados, al comparar las medidas centrales de las proporciones en las que se encuentran en el grupo de pacientes con EM y el grupo control, no se demostró diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos.

Gráfico 55. Filums que se encuentran en diferente proporción en ambos grupos



Representación en barras horizontales de las abundancias relativas (en %) del filum *Epsilonbacteraeota* procedente de las muestras del grupo de pacientes con EM (representado por una barra de color azul) y grupo control (representado por una barra de color naranja). Puede observarse una presencia predominante en el grupo de casos y una ausencia en el grupo control.

Tabla 20. Medianas de los filums que se encuentran en diferente proporción entre ambos grupos

	<i>p__Epsilonbacteraeota</i>
Caso	0,002327359
Control	0

Tabla 21. Comparación de medianas de filums detectados en ambos grupos

	<i>p__Epsilonbacteraeota</i>
U de Mann-Whitney	70,000
W de Wilcoxon	175,000
Z	-2,113
Sig. asintótica(bilateral)	0,035
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,210 ^b

En el análisis estadístico se comparan las medianas de las proporciones de los filum que se detectan en las muestras de los sujetos del estudio. Para este fin se realiza el test U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon. Se muestran solo los resultados del filum *Epsilonbacteraeota* siendo el único que muestra diferencias estadísticamente significativas, teniendo una clara presencia en el grupo de pacientes con EM, con ausencia en el grupo control.

5.2.6.2 Diferencias a nivel de familia entre muestras de pacientes y controles

En el caso del nivel taxonómico FAMILIA, se han obtenido diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los siguientes casos: *Familia XI*, *Campylobacteraceae*, *Tannerellaceae*, *Propionibacteriaceae* y *gut metagenome*. El resto de las familias encontradas no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos.

En primer lugar, se representan de forma gráfica las proporciones de cada una de estas familias tanto en el grupo de casos como el de controles. Las medidas

Composición de la microbiota intestinal en el nivel taxonómico de Familia, indicando su mediana y el rango intercuartilico (p25-p75), que han determinado diferencias estadísticamente significativas en los test no paramétricos.

Tabla 23. Comparación de medianas de las familias de ambos grupos con test no paramétricos

	<i>f__Propionibacteriaceae</i>	<i>f__Tannerellaceae</i>	<i>f__Campylobacteraceae</i>	<i>f__Family XI</i>	<i>f__gut metagenome</i>
U de Mann-Whitney	70,000	44,000	70,000	46,000	70,000
W de Wilcoxon	175,000	149,000	175,000	151,000	175,000
Z	-2,113	-2,481	-2,113	-2,554	-2,113
Sig. asintótica(bilateral)	0,035	0,013	0,035	0,011	0,035
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,210 ^b	,012 ^b	,210 ^b	,016 ^b	,210 ^b

Análisis estadístico con los test U de Mann-Whitney y test de Wilcoxon que determina que las diferencias encontradas en la representación de las diferentes familias más representativas de ambos grupos de estudio alcanzan la significación estadística con $p < 0.05$.

Tabla 24. Análisis comparativo de las medias de las familias bacterianas entre pacientes y controles

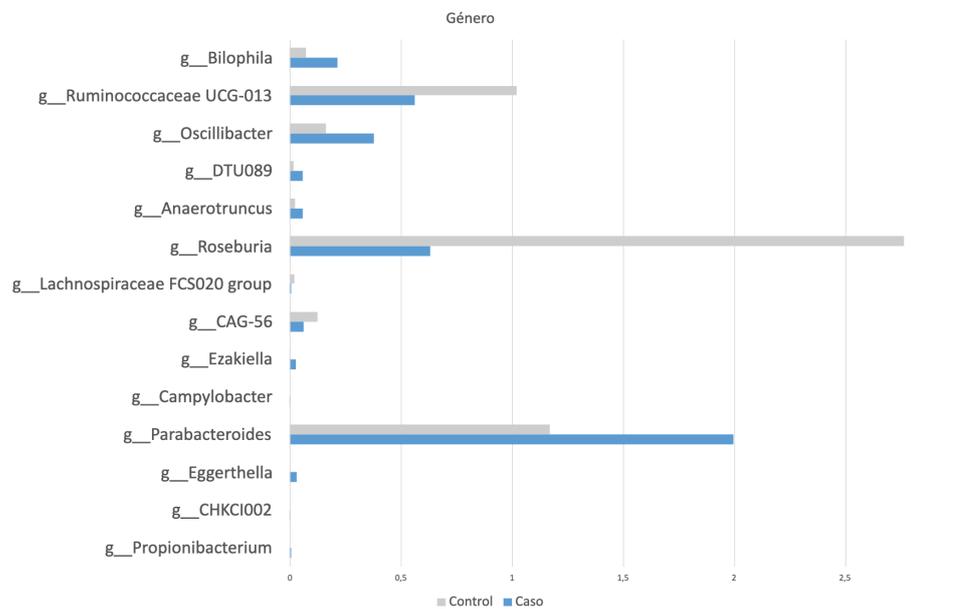
Grupo EM	Grupo Control	Familia	Media 1	Media 2	Wilcoxon	Kruskal-Wallis
T0	T7	<i>k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Propionibacteriales;f__Propionibacteriaceae</i>	0.0059	0	0.0453	0.0416
T0	T7	<i>k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Tannerellaceae</i>	1.9206	1.1698	0.0195	0.0184
T0	T7	<i>k__Bacteria;p__Epsilonbacteraeota;c__Campylobacteria;o__Campylobacterales;f__Campylobacteraceae</i>	0.0022	0	0.0453	0.0416
T0	T7	<i>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Family XI</i>	0.0358	0.0009	0.02	0.0188
T0	T7	<i>k__Bacteria;p__Tenericutes;c__Mollicutes;o__Mollicutes RF39;f__gut metagenome</i>	0	0.0112	0.0318	0.029

Análisis estadístico de comparación de medias de las proporciones de cada una de las familias que han mostrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de EM y el grupo control

5.2.6.3 Diferencias a nivel de género entre muestras de pacientes y controles

En el siguiente nivel taxonómico, GÉNERO, se han obtenido diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los siguientes casos: *Propionibacterium*, *CHKCI002*, *Eggerthella*, *Parabacteroides*, *Campylobacter*, *Ezakiella*, *Family XIII* (genero unassigned), *Lachnospiraceae FCS020 group*, *Roseburia*, *Anaerotruncus*, *DTU089*, *Oscillibacter*, *Ruminococcaceae UCG-013*, *gut metagenome*, *Bilophila*, *CAG-56* y *CHKCI002* cuando se han comparado las proporciones en las que se encuentran en las muestras de los sujetos de ambos grupos, salvo *Roseburia*, *Ruminococcaceae UCG-013*, *CAG-56*, *Family XIII*, *Lachnospiraceae FCS020 group*, del resto estaban aumentadas sus abundancias en el grupo de pacientes. Los demás géneros que se han encontrado en la microbiota intestinal de los grupos de estudio no han mostrado diferencias estadísticamente significativas.

Gráfico 57. Géneros que se encuentran en diferente proporción en ambos grupos



Representación en barras horizontales de las abundancias relativas (en %) de cada una de los géneros bacterianos detectados en ambos grupos del estudio que, tras realizar el análisis estadístico, se determina que tienen diferencias estadísticamente significativas entre la proporción en el grupo de casos y el grupo control ($p < 0.05$).

Tabla 25. Medianas y rangos intercuartílicos de los géneros en ambos grupos

GÉNERO	CASOS			CONTROLES		
	Mediana	p25	p75	Mediana	p25	p75
<i>Propionibacterium</i>	0,01	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00
<i>CHKCI002</i>	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
<i>Eggerthella</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Parabacteroides</i>	1,96	1,38	2,78	0,80	0,49	1,52
<i>Campylobacter</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Ezakiella</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Family XIII (genero unassigned)	0,12	0,05	0,25	0,12	0,05	0,34
Lachnospiraceae FCS020 group	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,04
<i>Roseburia</i>	0,20	0,05	0,99	1,55	0,85	2,72
<i>Anaerotruncus</i>	0,02	0,01	0,04	0,00	0,00	0,01
DTU089	0,02	0,01	0,09	0,01	0,00	0,02
<i>Oscillibacter</i>	0,27	0,10	0,54	0,09	0,01	0,22
Ruminococcaceae UCG-013	0,21	0,07	0,65	1,20	0,44	1,43
Gut metagenome	-	-	-	0,00	0,00	0,01
<i>Bilophila</i>	0,06	0,04	0,26	0,02	0,01	0,11
CAG-56	0,00	0,00	0,09	0,09	0,02	0,24
<i>CHKCI002</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Composición de la microbiota intestinal en el nivel taxonómico de género, indicando su mediana y el rango intercuartílico (p25-p75), que han determinado diferencias estadísticamente significativas con los test no paramétricos, en las proporciones detectadas en los dos grupos del estudio. Subrayado se muestran los géneros que presentan diferencias estadísticamente significativas pero no aparecen en la tabla 26.

Tabla 26. Comparación de medianas de las familias de ambos grupos

	g__Propionibacterium	g__CHKCI002	g__Eggerthella	g__Parabacteroides	g__Campylobacter	g__Ezakiella	g__CAG-56	g__Lachnospiraceae FCS020 group
U de Mann-Whitn	70,000	70,000	70,000	44,000	70,000	45,000	55,000	57,000
W de Wilcoxon	175,000	175,000	175,000	149,000	175,000	150,000	160,000	162,000
Z	-2,113	-2,113	-2,113	-2,481	-2,113	-2,936	-2,038	-1,985
Sig. asintótica (bilateral)	0,035	0,035	0,035	0,013	0,035	0,003	0,042	0,047
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,210 ^b	,210 ^b	,210 ^b	,012 ^b	,210 ^b	,014 ^b	,050 ^b	,062 ^b

g_Roseburia	g_Anaerotruncus	g_DTU089	g_Oscillibacter	g_Ruminococcaceae UCG-013	g_Bilophila	g_gut metagenome
43,000	54,500	54,000	54,000	54,000	54,500	70,000
148,000	159,500	159,000	159,000	159,000	159,500	175,000
-2,529	-2,022	-2,023	-2,022	-2,022	-2,001	-2,113
0,011	0,043	0,043	0,043	0,043	0,045	0,035
,011 ^b	,044 ^b	,044 ^b	,044 ^b	,044 ^b	,044 ^b	,210 ^b

En estas tablas de contingencia se muestran los resultados del análisis estadístico de U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon para las medianas de las abundancias de los géneros que se han encontrado en diferente proporción en los dos grupos del estudio (con significación estadística).

A continuación, se muestra en forma de tabla las medias de las abundancias en las que se encuentran cada uno de los géneros bacterianos en los dos grupos del estudio así como el nivel de significación de los test estadísticos W de Wilcoxon y Kruskal-Wallis que alcanzan el valor $p < 0,05$.

Tabla 27. Análisis comparativo de las medias de los géneros bacterianos entre pacientes y controles

Grupo Control	Grupo EM	Género	Media 1	Media 2	Wilcoxon	Kruskal-Wallis
T0	T7	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Propionibacteriales;f_Propionibacteriaceae; g_Propionibacterium	0.0059	0	0.0453	0.0416
T0	T7	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales;f_Eggerthellaceae; g_CHKCI002	0.0029	0	0.0453	0.0416
T0	T7	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales;f_Eggerthellaceae; g_Eggerthella	0.0279	0	0.0453	0.0416
T0	T7	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Tannerellaceae; g_Parabacteroides	1.9206	1.1698	0.0195	0.0184
T0	T7	k_Bacteria;p_Epsilonbacteraeota;c_Campylobacteria;o_Campylobacteriales; f_Campylobacteraceae; g_Campylobacter	0.0022	0	0.0453	0.0416
T0	T7	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Family XI;g_Ezakiella	0.024	0.0001	0.0056	0.0052
T0	T7	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales; f_Family XIII;_	0.0592	0.0128	0.0519	0.0492
T0	T7	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae; g_Lachnospiraceae FCS020 group	0.0055	0.02	0.0371	0.0351

T0	T7	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia; o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae; g__Roseburia	0.6297	2.7666	0.0106	0.01
T0	T7	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia; o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae; g__Anaerotruncus	0.0553	0.0235	0.0523	0.0497
T0	T7	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia; o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae; g__DTU089	0.0546	0.0165	0.0423	0.0401
T0	T7	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia; o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae; g__Oscillibacter	0.3634	0.162	0.0424	0.0402
T0	T7	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia; o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae; g__Ruminococcaceae UCG-013	0.5269	1.0201	0.0275	0.026
T0	T7	k__Bacteria;p__Tenericutes;c__Mollicutes; o__Mollicutes RF39;f__gut metagenome;g__gut metagenome	0	0.0112	0.0318	0.029

Comparación de las medias obtenidas de los diferentes géneros bacterianos detectados en ambos grupos de estudio a través de test no paramétricos como el test de Wilcoxon y el test de Kruskal-Wallis. Como se puede observar, los generos bacterianos incluidos en la tabla presentan diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$.

6.4.2. Estudio de la microbiota intestinal como marcador diagnóstico

Tras comprobar la existencia de diferentes filum, familias y géneros bacterianos que se encuentran en diferentes proporciones en los dos grupos del estudio, se realiza un análisis estadístico para averiguar cómo de frecuente puede ser la aparición de un determinado microorganismo cuando estudiamos las muestras del grupo de pacientes con esclerosis múltiple con respecto a la que encontraríamos si estuviéramos ante una muestra de sujetos sanos.

Se muestran diferentes tablas donde se indican los microorganismos que presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al ratio de frecuencia (*Multiplier*) u odds ratio en el grupo de pacientes en comparación con el grupo de sujetos sanos, en cada uno de los niveles taxonómicos. En cada tabla se muestran los primeros microorganismos con fondo sombreado de diferentes colores, son aquellos cuyo coeficiente de incremento de frecuencia entre ambos grupos del estudio presenta un nivel de significación estadísticamente significativo con $p < 0.05$. Seguidamente, se exponen aquellos microorganismos que presentan diferencias entre ambos grupos pero que no se ha alcanzado el nivel de significación estadística, siendo el valor de $p < 0,1$. Se muestran en orden decreciente

de nivel de significación. En el anexo VIII se pueden encontrar las tablas con el resto de familias y géneros bacterianos con un nivel de significación $p > 0,1$.

Tabla 28. Odds ratio de diferencias en proporciones a nivel de familia entre pacientes y controles

Familia	Multiplier (IC 95%)	Valor-p	AUC (IC 95%)
f__Peptococcaceae	11.02 (2.18 to 55.68)	0.00376	67.6 (47.6 to 87.6)
f__Porphyromonadaceae	6.00 (1.19 to 30.30)	0.03037	64.3 (46.0 to 82.5)
f__gut metagenome	0.18 (0.04 to 0.90)	0.03710	64.3 (52.0 to 76.6)
f__Desulfovibrionaceae	4.97 (0.98 to 25.12)	0.05247	69.0 (48.9 to 89.2)
f__Eubacteriaceae	4.83 (0.96 to 24.41)	0.05681	62.6 (42.5 to 82.7)
f__Coriobacteriales Incertae Sedis	4.37 (0.87 to 22.09)	0.07437	62.9 (42.4 to 83.3)

Coefficiente de incremento en la frecuencia u odds ratio de las familias en el grupo de pacientes con respecto al grupo control. En sombreado azul se identifican las familias cuyo coeficiente de incremento presenta un nivel de significación con $p < 0.05$. Además, se incluyen en esta tabla las familias que tienen una significación de $p < 0,1$. El resto de familias se incorporan al anexo VIII. AUC= Area Under Curve/Área bajo la curva.

Entre todos los análisis realizados cabe destacar los del género bacteriano. Los microorganismos que permiten diferenciar si las muestras biológicas de microbiota intestinal corresponden con más probabilidad a pacientes con EM frente a sujetos sanos son los siguientes: *Lachnospirae*, *Ezakiella*, *Ruminococcus* UCG-014, *Hungatella*, *Roseburia*, [*Clostridium*] *innocuum* group, *Shuttleworthia* y *Ruminococcus* UCG-009.

Tabla 29. Odds ratio de diferencias en proporciones a nivel de género entre pacientes y controles

Género	Multiplicador (IC 95%)	Valor-p	AUC (IC 95%)
g__Lachnospirae	0.06 (0.01 to 0.35)	0.00201	67.1 (46.7 to 87.6)
g__Ezakiella	13.08 (2.16 to 79.24)	0.00516	75.0 (60.6 to 89.4)
g__Ruminococcus UCG-014	12.65 (2.09 to 76.62)	0.00578	68.1 (47.9 to 88.3)
g__Hungatella	8.57 (1.41 to 51.89)	0.01946	68.3 (51.3 to 85.4)
g__Roseburia	0.12 (0.02 to 0.73)	0.02149	78.1 (60.2 to 96.0)
g__[Clostridium] innocuum group	7.26 (1.20 to 43.99)	0.03100	67.4 (47.5 to 87.2)
g__Shuttleworthia	6.32 (1.04 to 38.29)	0.04484	62.4 (42.5 to 82.3)
g__Ruminococcus UCG-009	6.23 (1.03 to 37.71)	0.04662	62.4 (42.1 to 82.7)
g__Porphyromonas	6.00 (0.99 to 36.33)	0.05129	64.3 (46.0 to 82.5)
g__Intestinimonas	5.97 (0.99 to 36.16)	0.05191	67.1 (48.0 to 86.3)
g__Bilophila	5.93 (0.98 to 35.91)	0.05282	70.2 (50.1 to 90.4)
g__UC5-1-2E3	5.85 (0.97 to 35.41)	0.05469	63.1 (43.0 to 83.2)

g__Prevotella	5.83 (0.96 to 35.29)	0.05518	64.8 (49.0 to 80.5)
g__Ruminococcus UCG-007	5.81 (0.96 to 35.19)	0.05557	62.4 (43.6 to 81.1)
g__Eggerthella	5.72 (0.94 to 34.62)	0.05786	63.3 (51.8 to 74.9)
g__Lachnospirae FCS020 group	0.18 (0.03 to 1.10)	0.06300	71.7 (52.7 to 90.7)
g__Ruminococcus UCG-010	5.39 (0.89 to 32.65)	0.06683	58.6 (37.4 to 79.7)
g__[Ruminococcus] gnavus group	5.25 (0.87 to 31.82)	0.07108	58.8 (39.2 to 78.4)
g__Anaerotruncus	5.16 (0.85 to 31.23)	0.07433	71.2 (51.5 to 90.9)
g__Ruminiclostridium	5.07 (0.84 to 30.67)	0.07755	69.5 (50.7 to 88.4)
g__Turcibacter	5.04 (0.83 to 30.51)	0.07854	65.0 (47.1 to 82.9)
g__Ruminococcus UCG-004	5.00 (0.83 to 30.27)	0.08002	54.5 (32.2 to 76.9)
g__Dielma	4.88 (0.81 to 29.55)	0.08461	69.0 (50.6 to 87.5)
g__Oscillibacter	4.86 (0.80 to 29.46)	0.08522	72.4 (53.1 to 91.7)
g__Coprococcus 3	0.21 (0.04 to 1.29)	0.09327	66.2 (45.1 to 87.2)
g__Tyzzerella 3	0.22 (0.04 to 1.31)	0.09549	59.5 (42.5 to 76.5)
g__Howardella	0.22 (0.04 to 1.31)	0.09611	58.1 (41.0 to 75.2)

Coefficiente de incremento en la frecuencia de los géneros bacterianos en el grupo de pacientes con respecto al grupo control. En sombreado azul se identifican los géneros cuyo coeficiente de incremento presenta un nivel de significación de $p < 0.05$. En color beige se identifican los géneros que no han logrado significación estadística pero que muestran una clara tendencia a la significación ($p < 0.06$) en cuanto a las diferencias de abundancia entre ambos grupos de estudio. Además, se incluyen en esta tabla los géneros que tienen una significación de $p < 0.1$.

5.3 SEGUNDA PARTE: LA MICROBIOTA INTESTINAL COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

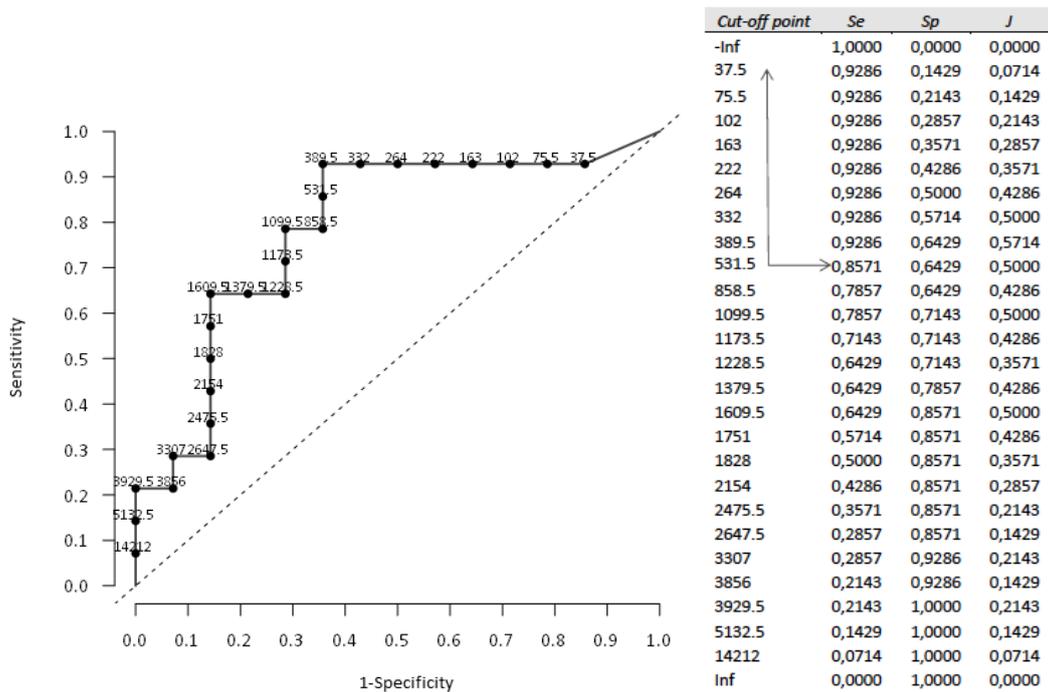
5.3.1 Curvas ROC y el área bajo la curva

En la búsqueda de un nuevo marcador para el diagnóstico de la esclerosis múltiple, se evalúa el papel de la microbiota intestinal como características diferenciadora entre los pacientes con EM y la población sana. Para determinar qué microorganismos pueden estar presentes significativamente más en los pacientes con EM que en la población sana, se realiza el análisis con curvas ROC y el área bajo la curva. Se trataría de diferenciar un punto de corte adecuado para cada género bacteriano con el que se pueda obtener una sensibilidad y una especificidad suficientemente altos como para poder distinguir si la muestra a estudio procede de un individuo con EMRR o si de lo contrario se trata de un sujeto sano. Es un análisis de regresión logística entre la presencia de enfermedad y el número de secuencias detectadas de cada género bacteriano para un individuo. En adelante,

se exponen aquellos géneros bacterianos que han sido identificados previamente en este estudio como potencialmente asociados a la esclerosis múltiple al presentar diferencias estadísticamente significativas de sus abundancias relativas presentes en ambos grupos.

5.3.1.1 Género *Roseburia*

Gráfico 58. Curva ROC del género *Roseburia*



En el gráfico anterior se representa a la izquierda la curva ROC para el cálculo del área bajo la curva del género *Roseburia*. A lo largo de la curva se representan con puntos el número de secuencias detectadas del género *Roseburia* en cada una de las muestras pertenecientes a los pacientes con EM. A la derecha, se observa la tabla con los puntos de corte (número de secuencias detectadas) y para cada uno de ellos viene determinada la sensibilidad, la especificidad y el punto J o índice de Youden. En el caso del género *Roseburia* el punto J de más rentabilidad diagnóstica es 389.5, valor que corresponde al número de secuencias de este género bacteriano por encima del cual, la muestra evaluada probablemente perteneciese al grupo de pacientes con EM.

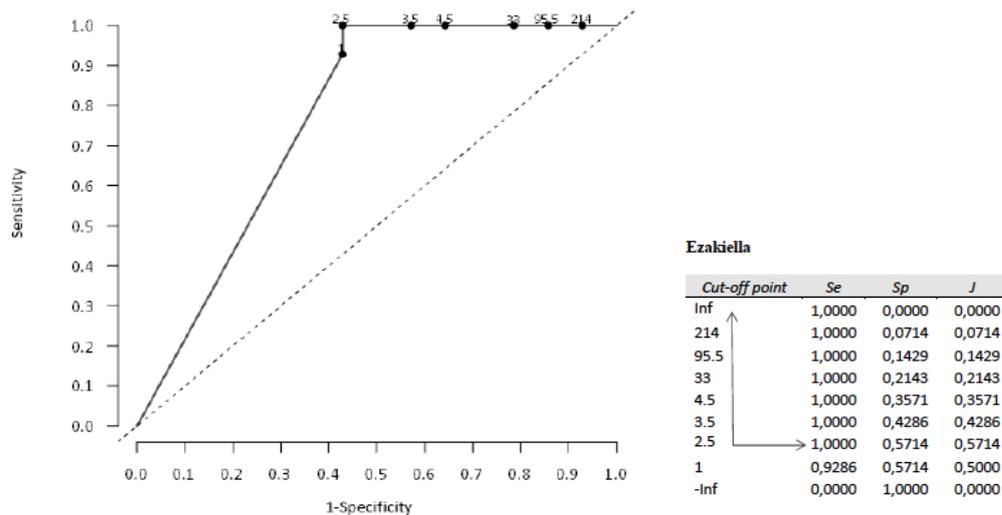
En la tabla siguiente se indica la medida central (mediana) en la que el número de secuencias del género *Roseburia* están presentes tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control junto con la diferencia entre ambos, el valor de significación (valor de p) y el cálculo del área bajo la curva.

Tabla 30. Área bajo la curva del género *Roseburia*

Género	Mediana Casos	Mediana Controles	Diferencia	Valor p	Área bajo la curva
Roseburia	264	1828	1564	0,0107	0,7857

5.3.1.2 Género *Ekaziella*

Gráfico 59. Curva ROC del género *Ekaziella*



En el gráfico anterior se muestra a la izquierda la curva ROC para el género *Ekaziella* con la representación de los distintos puntos de corte (número de secuencias de cada muestra de los pacientes). A la derecha, todos los puntos de corte representados con su correspondiente sensibilidad y especificidad así como el punto J. En este caso, el punto que mejor discrimina entre una muestra procedente de un paciente de EM y un sujeto sano es 2.5, valor que corresponde al número de secuencias del género *Ekaziella* por encima de las cuales la muestra en evaluación corresponda con la de un paciente.

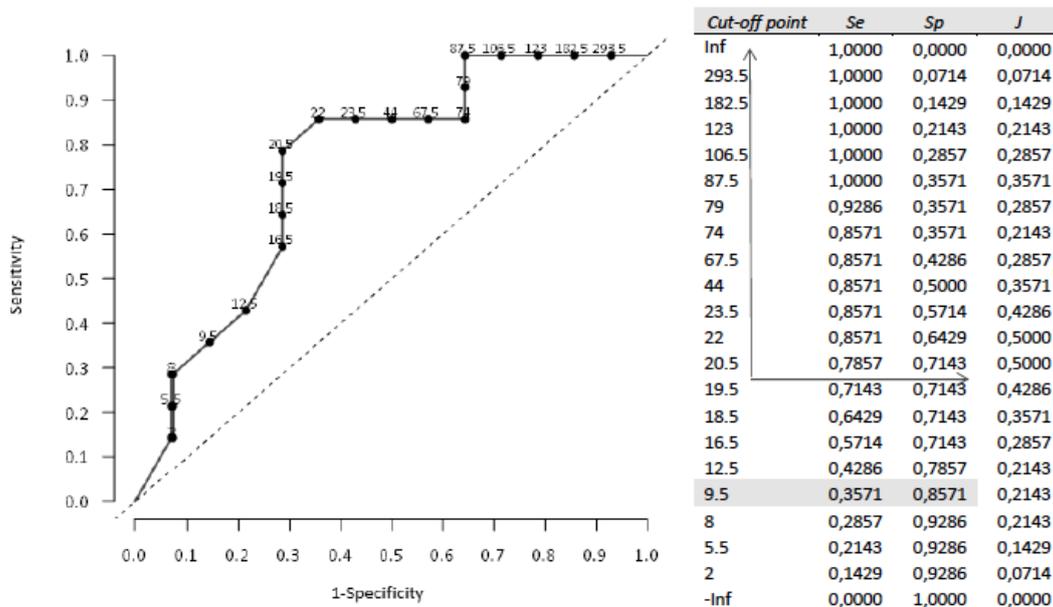
Abajo, se muestra una tabla donde se refleja la mediana del número de secuencias encontradas del género *Ezakiella* en la microbiota intestinal tanto del grupo de casos como el grupo control. Además, se indica la diferencia de valor de ambos, el valor de significación y el cálculo del área bajo la curva.

Tabla 31. Área bajo la curva del género *Ezakiella*

Género	Mediana Casos	Mediana Controles	Diferencia	Valor P	Área bajo la curva
<i>Ezakiella</i>	3	0	-3	0,0036	0,7704

5.3.1.3 Género *Ruminococcus*

Gráfico 60. Curva ROC del género *Ruminococcus*

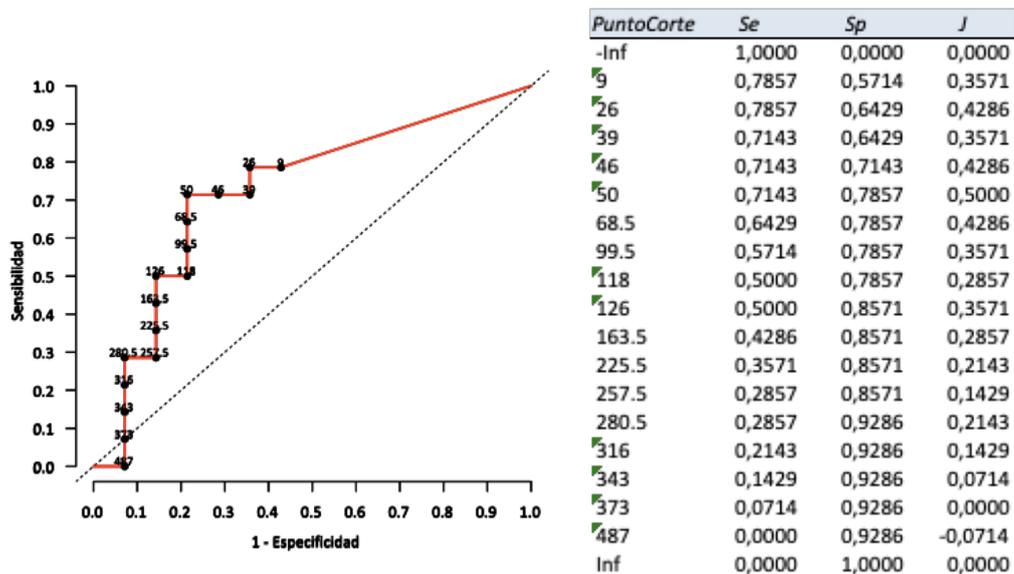


Para el caso del género *Ruminococcus* se ha determinado a través del estudio de la curva ROC un punto J de 22, valor que representa al número de secuencias por encima de las cuales la muestra a estudio tiene probabilidades altas de corresponder a la de un paciente con alta sensibilidad y especificidad.

En la siguiente tabla se refleja la mediana del número de las secuencias del género *Roseburia* detectadas en la microbiota intestinal del grupo de casos y controles, así como el valor de su diferencia, el valor de significación y cálculo del área bajo la curva.

Tabla 32. Área bajo la curva del género *Ruminococcus*

Género	Mediana Casos	Mediana Controles	Diferencia	Valor P	Área bajo la curva
Ruminococcus	44	15	-29	0,0241	0,7526

5.3.1.4 Género *Lachnospira* (CAG-56)Gráfico 61. Curva ROC del género *Lachnospira*

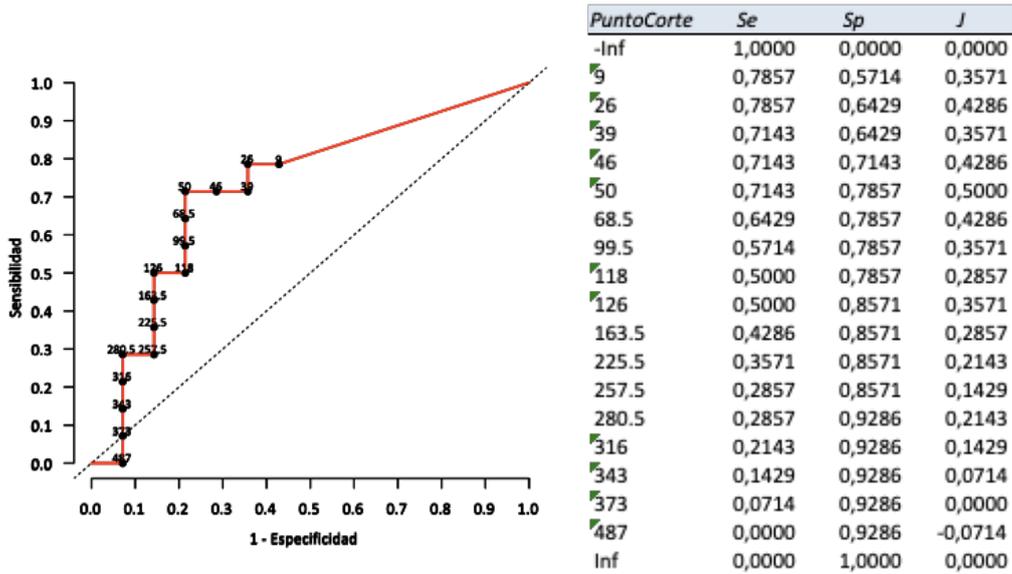
El punto J para la rentabilidad diagnóstica del test para el género *Lachnospira* es 50, valor que corresponde al número de secuencias del género *Lachnospira* en una muestra de microbiota por debajo del cual se puede clasificar a un sujeto como paciente de EM con la más alta probabilidad de acierto de entre todas.

Tabla 33. Área bajo la curva del género *Lachnospira*

Género	Mediana Casos	Mediana Controles	Diferencia	Valor P	Área bajo la curva
Lachnospira	0,000	122	122	0,00392	0,7245

5.3.1.5 Género *Bilophila*

Gráfico 62. Curva ROC para el género *Bilophila*



A lo largo de la curva ROC se representan los puntos de corte que corresponden al número de secuencias del género *Bilophila* que se ha determinado en todas las muestras del estudio. Se establece como punto J el valor 50, valor que corresponde al número de secuencias a partir del que se puede diferenciar bien si una muestra forma parte de la microbiota de un paciente o de un sujeto sano.

Tabla 34. Área bajo la curva del género *Bilophila*

Género	Mediana Casos	Mediana Controles	Diferencia	Valor P	Área bajo la curva
Bilophila	96	24	-72	0,0363	0,7347

En la tabla se refleja la mediana del número de secuencias encontradas del género *Bilophila* en la microbiota intestinal tanto del grupo de casos como el grupo control. Además, se indica la diferencia de valor de ambos, el valor de significación y el cálculo del área bajo la curva.

En resumen, los géneros bacterianos que hemos detallado con el estudio de las curvas ROC y el área bajo la curva han demostrado tener una asociación con la EM. Es decir, con el punto J para cada uno de ellos, se puede estimar si un sujeto a estudio pertenece al grupo de pacientes con EM o al grupo control con una sensibilidad y especificidad concretos para cada género.

En la siguiente tabla se resumen los géneros que presentan correlación con la presencia de EM (correlación positiva) o ausencia de la enfermedad (correlación negativa), el valor del punto de corte más óptimo y los valores de sensibilidad y especificidad para cada uno de ellos. Como tal prueba o test diagnóstico, se ha determinado el valor de la sensibilidad y de la especificidad para cada uno de los géneros bacterianos estudiados.

Tabla 35. Resumen de la correlación entre géneros bacterianos y la presencia o ausencia de EM

Género	Correlación (+ o -)	Punto J	Sensibilidad	Especificidad
Roseburia	-	390	0,93	0,64
Lachnospira	-	50	0,71	0,79
Ezakiella	+	2,5	1	0,57
Bilophila	+	52	0,71	0,86
Ruminococcus	+	22	0,86	0,64

VI - DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

6.1 LA ALTERACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

En los últimos años la comunidad científica ha mostrado un notable interés por el eje cerebro-intestino que vincula la microbiota intestinal como posible factor etiopatogénico a diferentes enfermedades neurológicas, entre ellas la esclerosis múltiple¹⁸².

Hay diversos factores que han contribuido a la sospecha de una alteración de la microbiota intestinal o disbiosis intestinal en los pacientes con EM. Se ha detectado un aumento de la prevalencia de otras enfermedades autoinmunes que afectan predominantemente al sistema digestivo como la enfermedad inflamatoria intestinal en los pacientes con EM, así como la presencia de síntomas gastrointestinales frecuentemente referidos a lo largo de la evolución de la enfermedad y no únicamente por la afectación esfinteriana que puede producirse en la EM⁷¹. En este sentido, *Banati* y colaboradores publicaron en el año 2013 un estudio piloto que demostró la presencia de autoanticuerpos contra antígenos gastrointestinales (presentes en otras enfermedades autoinmunes digestivas) en pacientes con enfermedades desmielinizantes del SNC. En este estudio se determinó que los pacientes de neuromielitis óptica (37%) y en menor proporción, los de EM (28%), presentaban más autoanticuerpos gastrointestinales en comparación con el grupo control (8%) y hasta una cuarta parte de los pacientes con EM referían síntomas gastrointestinales. Entre los autoanticuerpos que se relacionaban con estos síntomas se encontraban predominantemente los anticuerpos anti-células parietales y los anticuerpos antigliadina, y el resto correspondían a los anticuerpos anti-transglutaminasa, los anticuerpos ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae*) y los anticuerpos anti-factor intrínseco. El origen de estos autoanticuerpos en pacientes con EM se desconoce, pueden simplemente coexistir como parte de una situación de autoinmunidad generada en el individuo o se postula que puedan guardar relación con la patogenia de la enfermedad, sobre todo aquellos pacientes que presentan síntomas gastrointestinales de forma precoz²⁸².

Como se ha indicado con anterioridad, en el tracto gastrointestinal se encuentra una comunidad de 10^{14} bacterias que interactúan con el sistema inmune del individuo como los linfocitos y células dendríticas de la lamina propia del epitelio del tracto gastrointestinal²⁸³.

Este estudio confirma la presencia de disbiosis intestinal al igual que lo habían hecho otros anteriormente publicados detallados en el marco teórico. Una contribución importante de nuestro estudio ha sido una selección muy específica del grupo control, escogiéndolos de entre los individuos sanos convivientes y/o familiares de los pacientes con EM, para que fueran sujetos que compartieran la dieta habitual con ellos. Así, se evitaba uno de los sesgos más importantes para la investigación en microbiota intestinal, la influencia de la dieta en su composición²²³. Con la constitución de ambos grupos de estudio, por una parte 15 pacientes con EMRR que habían presentado actividad de la enfermedad al menos durante los dos años previos a su inclusión en el estudio, y por otra, el grupo control compuesto de 15 sujetos sanos seleccionados por compartir la misma dieta habitual, se realizó un análisis comparativo de las características demográficas y antropométricas (edad, género, peso, talla e IMC) entre ambos grupos en el que no se observó diferencias estadísticamente significativas, incluso a pesar de haber una proporción notablemente diferente entre ambos grupos en cuanto al género, debido a que en la mitad de los casos, los controles eran los compañeros de las pacientes. Sin embargo, creemos que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas por el pequeño tamaño muestral de la muestra.

Al finalizar la recogida de muestras de los sujetos de ambos grupos se realizó un estudio minucioso sobre la composición de la microbiota intestinal a través de la secuenciación de nueva generación del gen ARN ribosomal 16S, para su posterior comparación entre ambos grupos y finalmente determinar el posible papel de la microbiota como biomarcador diagnóstico.

Los estudios sobre microbiota intestinal comenzaron en el modelo animal de EAE en los que se demostró que la presencia de microbiota era esencial para que se diera una respuesta inmune robusta. Los ratones criados en condiciones estériles sin presencia de microorganismos (*germ free*) no desarrollaban EAE o si lo hacían, tenían síntomas más leves con un inicio más tardío¹⁸⁶. Cuando a estos ratones inmunizados para desarrollar espontáneamente la EAE se les trasplantaba microbiota formada por bacterias filamentosas simples¹⁸⁷ o incluso microbiota

procedente de pacientes con EM, enseguida desarrollaban una EAE con severidad similar aunque en este último caso con más frecuencia que la desarrollada por ratones colonizados con microbiota sencilla. Es por tanto necesaria la interacción entre las bacterias que habitan en el intestino con las células del sistema inmune del epitelio intestinal y de los ganglios linfáticos locales para que se de esta respuesta inflamatoria²¹³. Gracias a los estudios clínicos realizados con anterioridad sabemos que los pacientes con EM presentan una respuesta inmune proinflamatoria de tipo Th1 y Th17, y que por el contrario, tienen disminuida la respuesta reguladora⁶⁰. Con la investigación en microbiota intestinal no solo se ha observado que los pacientes con EM presentan menos niveles de linfocitos T reguladores e interleucinas anti-inflamatorias que los controles, sino que gracias a la modulación de la microbiota intestinal con intervenciones como la administración de probióticos o el trasplante de microbiota en el modelo animal, se ha conseguido potenciar esta respuesta inmunitaria Th2 reguladora. Así se pudo demostrar con estudios realizados con helmintos, que su colonización en el organismo determina una respuesta inmune mantenida controlada, reduciendo así las probabilidades del desarrollo de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple¹⁹⁴. En los pacientes con EM se han realizado intervenciones con la administración oral de helmintos como los *estudios HINT y HINT 2*, entre otros, y se ha comprobado que pueden jugar un papel en el tratamiento modulador del sistema inmune aumentando así la respuesta inmune reguladora, con el objetivo de reducir la actividad de la enfermedad^{195,197}. En la misma dirección han intentado investigar si la suplementación con vitamina D (que se encuentra deplecionada en muchos pacientes) favorece un mejor pronóstico en la EM, como el estudio que *Cantarel y colaboradores* realizaron en el que se detectaron cambios en la microbiota intestinal después de la administración durante 12 semanas de vitamina D. Durante ese periodo de tiempo se detectaron de forma global mayores abundancias relativas del género *Faecalibacterium*, conocido productor de ácidos grasos de cadena corta, y *Enterobacteriaceae*, y en concreto en el grupo de pacientes con EM no tratada, se observó un aumento de los géneros *Akkermansia*, *Faecalibacterium* y *Coprococcus* que estaban disminuidos al inicio. También se detectó una reducción de las abundancias relativas de los géneros *Eubacterium* y *Ruminococcus* tras la suplementación de vitamina D, incluso en el grupo de EM tratada con acetato de glatirámico²¹⁵. Sin embargo, en nuestro estudio se encontraron niveles aumentados

del género *Ruminococcus*. En el caso de los géneros *Ruminococcus*: UCG-014 y UCG-013, este aumento fue estadísticamente significativo, y en el caso de *Ruminococcus*: UCG-007 y UCG-010 solo presentaron una tendencia a la significación (ver tabla 29).

En los ensayos realizados con probióticos, se publicó en el año 2015 los efectos de la administración de un probiótico con 3 especies diferentes de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium bifidum* durante 12 semanas tras las que se objetivó la ausencia de nuevos brotes y una mejoría del grado de discapacidad de una media de 0,3 puntos. Aunque clínicamente no parezca claramente relevante, es un paso más en la investigación de la microbiota intestinal como factor pronóstico de la EM. Se observó además una mejoría en los parámetros en laboratorio del estrés oxidativo²¹⁸. Es decir, conseguir modificar la microbiota intestinal o aportar microorganismos que se han perfilado como anti-inflamatorios, promueve cambios a nivel metabólico y de composición de microbiota que probablemente influya positivamente en la evolución de los pacientes. Sin embargo, es posible que el efecto sea transitorio y finalice después de su interrupción²¹⁹.

Por otra parte, en todo estudio sobre una comunidad ecológica como la que compone la microbiota intestinal hay que realizar un estudio de diversidad ecológica. Los indicadores más usados son la diversidad alfa y la diversidad beta. En nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la diversidad alfa de ambos grupos. Sin embargo, sí que se demostró que nuestro grupo de pacientes tenía un nivel de diversidad beta significativamente mayor que los controles, lo que significa que los pacientes con EM tenían una microbiota más homogénea y menos diversa que la del grupo control. En este sentido, los estudios de *Miyake* y *Takewaki* y colaboradores²⁸⁴ tuvieron resultados similares. En este último estudio se valoraron pacientes de EMRR, EMSP y pacientes del espectro de neuromielitis óptica, con resultados similares en la biodiversidad en todos los subgrupos. En general, la mayoría de estudios de microbiota en pacientes con EM no han encontrado diferencias en la riqueza de especies bacterianas de las muestras estudiadas²⁰⁷. alguna publicación ha mostrado una disminución de la diversidad alfa, concretamente el artículo de *Chen* y colaboradores que evaluó las diferencias entre pacientes con EM activos o no activos²¹¹. No obstante, hay estudios que han tenido resultados inesperados como la reducción de la diversidad alfa en el grupo

control tras la administración de probióticos, mientras permanecía estable en la del grupo de pacientes²¹⁹.

En los diferentes estudios publicados hasta la fecha sobre la disbiosis intestinal en los pacientes con EM se ha observado que algunos géneros bacterianos que son conocidos productores de ácidos grasos de cadena corta están disminuidos en las muestras de los pacientes. Estos ácidos grasos tienen propiedades antiinflamatorias, lo que podría ser clave para entender el papel que podrían tener algunos de los microorganismos que componen la microbiota intestinal para la modulación del sistema inmune, al encontrarse disminuidos en la microbiota de los pacientes. Uno de los primeros estudios realizados de microbiota intestinal en pacientes con EM detectó que algunas especies bacterianas como las pertenecientes al *cluster Clostridia XIVa y IV*, productores de ácidos grasos de cadena corta, estaban disminuidas en el grupo de pacientes²⁰⁷. También se detectó una disminución de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* y el orden de *Clostridiales* en el estudio de EM pediátrica de Tremlett y colaboradores²⁰⁸ que contribuye a la teoría de que los factores desencadenantes que llevan a desarrollar la respuesta autoinmune en la EM se presentan en edades iniciales, incluso en la infancia, y que es la microbiota intestinal un actor principal en la interacción con el sistema inmune desde que nacemos, modificándose a lo largo de la vida en función de factores como la dieta. Estas premisas contribuyen a un teórico papel de la disbiosis en la microbiota intestinal como objetivo terapéutico en los pacientes con EM.

En nuestro estudio se han encontrado más de 112 especies bacterianas diferentes. Se han identificado varios géneros que se han podido detectar con diferentes abundancias relativas entre el grupo de pacientes con EM y el grupo control de forma estadísticamente significativa. Se trata de *Propionibacterium*, *CHKCI002*, *Eggerthella*, *Parabacteroides*, *Campylobacter*, *Ezakiella*, *Family XIII (genero unassigned)*, *Lachnospiraceae FCS020 group*, *Roseburia*, *Anaerotruncus*, *DTU089*, *Oscilibacter*, *Ruminococcaceae UCG-013*, *gut metagenome*, *Bilophila*, *CAG-56* y *CHKCI002*. Todos los hallazgos hasta ahora descritos nos llevan a poder describir un modelo de microbiota intestinal en pacientes con EMRR basado en los valores medios de los géneros bacterianos detectados en los sujetos del estudio. Algunos de ellos, ya se habían asociado a la EM como veremos a continuación.

Uno de los estudios que tiene más similitudes con nuestros hallazgos es el publicado por Forbes y colaboradores en el año 2018. En él se detectó una

disminución de *Faecalibacterium* entre los pacientes con EM. Se trata de un género bacteriano productor de ácidos grasos de cadena corta que se ha encontrado disminuido en otros estudios como el de *Cantarel* o el de *Miyake*. También productor de ácidos grasos de cadena corta es el género *Lachnospira* que estaba disminuido en su estudio y que en nuestro estudio, debía detectarse por debajo de un punto de corte de 50 secuencias para clasificar al sujeto a estudio como paciente. Hay más estudios que tuvieron hallazgos en el mismo sentido, como los publicados por *Tremlett*, *Cantarel* y *Chen*. Otros géneros que se encontraron disminuidos en el estudio de *Forbes* fueron *Butyricoccus*, *Dialister*, *Fusicatenibacter*, *Gemmiger*, *Sporobacter* y *Subdoligranulum*. Por otro lado, encontraron aumentados en el grupo de pacientes los géneros *Actinomyces*, *Anaerofustis*, *Clostridium group III*, *Clostridium group XIVa*, *Clostridium sensu stricto*, *Faecalicoccus*, *Streptococcus*, *Turicibacter* y finalmente *Eggerthella*²⁸⁵, que en éste último caso también encontramos aumentado en nuestro estudio. Del mismo modo, *Miyake* y colaboradores identificaron una especie bacteriana, *Eggerthella lenta*, como una de las que se encontraba aumentada en el grupo de pacientes²⁰⁷. Sin embargo, en el experimento del grupo de *Cekanaviciutea*, en el que cultivaban células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con EM entre extractos de diferentes especies bacterianas, *Eggerthella lenta* no fue capaz de promover la diferenciación hacia una respuesta inmune reguladora como sí lo consiguió otra especie bacteriana, *Parabacteroides distasonis*²¹². La presencia de *Parabacteroides* en una mayor proporción en el grupo de pacientes que en el grupo control es un fenómeno que también se dio en nuestro estudio, al igual que en el de otros como la cohorte de pacientes con EM en edad pediátrica de *Tremlett*, cuyo estudio presenta igualmente similitudes con el nuestro sobre la disbiosis intestinal en pacientes con EM²⁰⁸. Por otro lado, el estudio de *Chen* y colaboradores también relacionó el género *Parabacteroides* con la EM, en concreto como parte de un grupo de géneros bacterianos que eran capaces de predecir si la muestra pertenecía a un paciente de EM o a un sujeto sano. El resto de implicados fueron *Adlercreutzia*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Coprobacillus*, *Dorea*, *Flavobacterium*, *Mycoplana*, *Haemophilus*, *Blautia* y *Collinsella*²¹¹. Anteriormente, *Cantarel* y colaboradores también identificaron un grupo de géneros bacterianos que podían ser predictivos a la hora de identificar que una muestra procede de un paciente con EM. Se trata de los géneros *Rikenellaceae II*, *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Bacteroides* y *Oscillibacter*²¹⁵. Dos de estos microorganismos, el género *Oscillibacter* y

la familia *Porphyromonadaceae* también se encontraron aumentados en nuestra muestra de pacientes. Otros géneros encontrados en nuestro estudio con una fuerte asociación con la EM, *Bilophila*, también se encontraba aumentada en el estudio de *Thirion* en el que se mostraba aumentada la especie *Bilophila wadsworthia*²²² así como las abundancias relativas del género *Anaerotruncus*, hallazgo en el mismo sentido que en nuestro estudio. Además, detectamos niveles disminuidos del género *Roseburia*, pero en el único estudio en el que se había identificado este género como parte de la disbiosis intestinal en los pacientes, el estudio de *Jenkins* y colaboradores, se relacionó en sentido opuesto con un aumento de su presencia en las muestras²⁰².

En otros estudios se ha intentado investigar la influencia de los fármacos inmunomoduladores en la composición de la microbiota intestinal como el de *Cantarel* y *Castillo-Álvarez*²⁸⁶, aunque el primer ensayo clínico diseñado para evaluar la influencia de un fármaco en la microbiota intestinal fue el estudio *TECONGUT* en el que se aleatorizó a un grupo de pacientes a recibir tratamiento con dimetil fumarato o con fármacos inyectables (IFN o acetato de glatirámico) durante 12 semanas, para evaluar los cambios en la microbiota en el momento basal, a las 2 semanas y a las 12 semanas. Aunque se encontró una tendencia a la disminución de *Actinobacteria* (con predominio de *Bifidobacterium*) a las dos semanas del tratamiento, este cambio se revirtió a las 12 semanas cuando se observó un aumento de *Firmicutes*, sobre todo de *Faecalibacterium*, aunque estos hallazgos no fueron estadísticamente significativos. A las 2 semanas de tratamiento los pacientes que recibieron DMF y tenían efectos adversos gastrointestinales, presentaron con una disminución de *Bacteroides* y *Dialister*, en comparación con los que no tenían efectos gastrointestinales. Sin embargo, tampoco con el ajuste multivariante fueron diferencias estadísticamente significativas²⁸⁷.

En un estudio piloto publicado por *Tremlett* y colaboradores en el año 2018 se propuso a la microbiota intestinal como marcador pronóstico de la EM, de tal forma que si en las muestras había presencia de *Archaea Euryarchaeota*, estaba aumentado el género *Firmicutes* o se detectaba una depleción de *Fusobacteria*, el paciente del que procedía la muestra tenía un 76% más de posibilidades de presentar un brote clínico de forma precoz. Realizar estudios de microbiota intestinal en la población de pacientes pediátricos es muy importante, porque acerca el momento de inicio de la EM a los mecanismos patogénicos subyacentes puestos en marcha ya en la

infancia. Siguiendo esta dirección, *M. K. Horton* junto con otros investigadores como *Tremlett* publicaron en el año 2021 un estudio donde se estableció una asociación entre la aparición de brotes y/o nuevas lesiones en resonancia y la presencia de algunas especies bacterianas. De tal forma que detectar niveles altos de *Odoribacter splanchnicus*, un productor de butirato, un ácido graso de cadena corta, y *Butyricoccus desmolans* en las muestras de pacientes pediátricos se relacionaba con un menor riesgo de presentar brotes, lesiones en T2 en resonancia y lesiones T1 con captación de gadolinio con una HR para el riesgo de brotes de 0,46 (IC 95% 0.24-0.88) y 0.49 (IC 95% 0.2-0.88)], respectivamente. También se estableció como un factor protector el identificar niveles altos de una especie bacteriana de la familia *Lachnospiraceae* (NK4A136) sin identificar que presentaba una HR de 0.47 (CI 95% 0.24-0.89) y de *Ruminococcaceae* con una HR de 0.45 (IC 95% 0.22-0.91). Por el contrario, detectar cualquier secuencia de *SV_520*, un miembro no especificado del orden *Coriobacteriales*, se asoció con tener más del doble de riesgo de presentar actividad según los tres parámetros antes mencionados. Aunque previamente un estudio de los pacientes pediátricos de *Tremlett*²⁰⁸ había tenido importantes coincidencias con el nuestro, esta nueva cohorte de pacientes pediátricos presenta diferencias con la nuestra. En ella se identifican varios géneros bacterianos que pertenecen a las mismas familias que los géneros hallados en nuestro estudio pero con un sentido opuesto, salvando las diferencias que supone que ambos tengan objetivos diferentes: por un lado, la identificación de géneros bacterianos para evaluar pronóstico en el estudio de *Horton*, y por el otro, la clasificación de los individuos en pacientes o controles según el número de secuencias detectadas de algunos de ellos en nuestro estudio. Se trata del género *Lachnospiraceae* (NK4A136) que pertenece a la misma familia que *Lachnospira*, que se encontró disminuido en las muestras de los pacientes de nuestro estudio al comparar los resultados con los de sujetos sanos. En el caso del género *Ruminococcus*, de la familia *Ruminococcaceae*, la asociación en nuestro estudio fue positiva encontrando una mayor presencia en pacientes con EM comparado con sujetos del grupo control. Estos datos son contrarios a los comunicados por *Horton* y colaboradores. En otro estudio realizado por *Takewaki* y colaboradores, también se detectaron niveles disminuidos de una especie sin identificar *Ruminococcus sp. 5_1_39BFAA* entre las muestras de pacientes de EMRR²⁸⁴. Las diferencias encontradas con el estudio de *Horton* podrían deberse a que en su estudio fueron

incluidos pacientes de reciente diagnóstico y nuestra cohorte de pacientes presentaba una duración media de la enfermedad de $7,67 \pm 6,5$ años²⁸⁸.

Por último, en la segunda parte de nuestro estudio se realizó un seguimiento durante 24 meses de los pacientes con EMRR en el que se registraron los brotes y la aparición de nuevas lesiones en T2 en RM, con la finalidad de analizar la posible relación entre algunos géneros bacterianos que se encontraban en diferente proporción entre pacientes y controles, con la actividad clínico-radiológica de los pacientes, clasificándolos según presentaran alta actividad o no, que definimos como la presencia de tres o más brotes durante el seguimiento. Sin embargo, debido al pequeño tamaño muestral del grupo de pacientes que limitaba la generalización de las conclusiones que se obtuviesen, finalmente no se realizó este análisis.

6.2 LA MICROBIOTA INTESTINAL COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO DE LA EM

La importante aportación de nuestro trabajo se centra la identificación de un punto de corte del número de secuencias que podemos detectar de algunos géneros bacterianos, con una sensibilidad y especificidad determinada para cada uno de ellos, que es capaz de predecir si la muestra que estamos analizando pertenece a un paciente con esclerosis múltiple o bien a un sujeto sano. De entre todos los géneros bacterianos que se encontraron en diferentes proporciones entre los grupos del estudio, se realizó un análisis de correlación en el que se identificó a un grupo de géneros bacterianos: *Roseburia*, *Lachnospira*, *Ezakiella*, *Bilophila* y *Ruminococcus*, que estableciendo un punto de corte específico del número de secuencias detectadas de cada uno de ellos, determinaba la posibilidad de clasificar a un individuo a estudio como paciente con EM o sujeto sano. Algunos de estos géneros ya habían sido relacionados con la EM como hemos comentado anteriormente. El punto de corte se estableció en el análisis estadístico de la curva de ROC y el cálculo del área bajo la curva. Se trata del número de secuencias detectadas para cada género bacteriano que guarda la mejor relación entre sensibilidad y la especificidad para la correcta clasificación del individuo a estudio en paciente con EM o sujeto sano.

Nuestro estudio contribuye a la creación de un nuevo biomarcador que ayuda a identificar a los sujetos que tienen EM realizando la determinación del número de secuencias de los siguientes géneros bacterianos (*Roseburia*, *Lachnospira*,

Ezakiella, *Bilophila* y *Ruminococcus*) en el estudio de la microbiota intestinal. Los géneros *Ezakiella*, *Bilophila* y *Ruminococcus* presentan una correlación positiva con la presencia de EM y los géneros *Roseburia* y *Lachnospira* tienen una correlación negativa. De entre todos los géneros, el mejor identifica la presencia de EM de forma aislada es el género *Roseburia*, que con un punto de corte específico de 390 secuencias, si en la muestra a estudio de un sujeto en situación de pre-diagnóstico se detecta un número menor de secuencias, se podría establecer el diagnóstico de EM con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 63% (ver Tabla 36).

Asimismo, con una correlación positiva estableceríamos la identificación de los pacientes con EM con la determinación de los siguientes géneros bacterianos (*Ezakiella*, *Bilophila* y *Ruminococcus*). Si el individuo a estudio presenta más de 2,5 secuencias del género *Ezakiella* podremos clasificarlo como paciente de EM con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 57%. Si detectamos más de 52 secuencias del género *Bilophila*, la sensibilidad será del 71% y la especificidad del 85%. Y por último, si detectásemos más de 22 secuencias del género *Ruminococcus* estableceríamos el diagnóstico con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 65%.

En la misma línea pero en sentido opuesto se encuentra el género *Lachnospira* que tiene una correlación negativa, si en la muestra en estudio se detectan 120 secuencias o menos de este género, se establecerá el diagnóstico de EM con una sensibilidad del 35% y una especificidad del 86%. Tanto el género *Roseburia* como el de *Lachnospira* son productores de ácidos grasos de cadena corta como el butirato, con propiedades antiinflamatorias. Estos hallazgos, que coinciden con los descritos en trabajos anteriores, atribuyen un papel importante de la disbiosis intestinal en la etiopatogenia de la EM debido a la disminución de géneros bacterianos productores de ácidos grasos de cadena corta, que se han relacionado con la promoción de la respuesta inmune reguladora, como también así lo señala el estudio de Zeng y colaboradores²⁸⁹. Este estudio detectó niveles aumentados de *Streptococcus* en el grupo de pacientes con EM, que se correlacionó con la elevación de los niveles de linfocitos Th17 proinflamatorios e inversamente con el recuento de linfocitos T reguladores. Por otro lado, se detectaron niveles disminuidos de *Prevotella*, que se relacionó inversamente con los niveles de linfocitos Treg. El aumento de varias especies del género *Streptococcus* también se detectó en el estudio de Takewaki en el grupo de pacientes con EM de alta actividad y mayor

progresión de discapacidad en comparación con los más leves, así como los pacientes que presentaron actividad más reciente²⁸⁴. Estos hallazgos son un claro ejemplo de cómo influye la alteración de la microbiota intestinal en las enfermedades autoinmunes como la EM. En las muestras de los pacientes se encuentran aumentados géneros bacterianos con perfil proinflamatorio y al contrario, presentan menos proporción de géneros bacterianos productores de ácidos grasos de cadena corta con propiedades anti-inflamatorias.

En general, los estudios publicados de microbiota intestinal en la EM han intentado relacionar las diferencias en abundancias relativas de algunos géneros bacterianos entre pacientes y controles. Sin embargo, la única vez que se ha mencionado el término *biomarcador diagnóstico* fue en el estudio de Forbes y colaboradores. En él se estudia la microbiota intestinal de pacientes con cuatro enfermedades autoinmunes diferentes (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis reumatoide y esclerosis múltiple) y se refleja un estudio de área bajo la curva para la globalidad de los filums de bacterias gram positivas. Sin embargo, tampoco se obtuvieron resultados significativos en los pacientes con EM. En este estudio se detectó una mayor abundancia relativa de un género no identificado de la familia *Erysipelotrichaceae* y una menor proporción del género *Dialister* en el grupo de pacientes con EM en comparación con los controles²⁸⁵. Cuando se realizó el análisis de las curvas ROC y el cálculo del área bajo la curva para algunos de los géneros bacterianos detectados en nuestro estudio, aún no se habían publicado los resultados de este autor.

De cualquier modo, en la literatura científica no se había propuesto hasta la fecha la determinación cuantitativa del número de secuencias de un género bacteriano como biomarcador para la identificación de los pacientes con EM a través del estudio de la microbiota intestinal. En concreto, si el sujeto a estudio presentara un aumento en las secuencias detectadas de los géneros *Ezakiella*, *Bilophila* y *Ruminococcus* por encima de los valores del punto de corte específicos de cada uno, o si se detectara un descenso de las secuencias detectadas de *Roseburia* y *Lachnospira* por debajo del punto de corte, podríamos clasificar al individuo a estudio como paciente con EMRR.

Aunque en el momento de la puesta en marcha de nuestro estudio en el año 2016 apenas había estudios publicados de microbiota intestinal en pacientes con EM, nuestro estudio sigue siendo innovador en el estudio de la microbiota al

identificar un biomarcador diagnóstico de la enfermedad. Y, contemplando las similitudes con hallazgos de estudios anteriores, podemos considerar que hemos contribuido en la generación de conocimiento en esta área.

VII – CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

Aunando los esfuerzos que se han hecho hasta el momento para conocer la composición bacteriana de la microbiota intestinal, se puede establecer a día de hoy que existe una disbiosis intestinal en los pacientes con esclerosis múltiple, con alteración tanto de la riqueza o diversidad ecológica como de las abundancias relativas de los diferentes géneros bacterianos en la microbiota intestinal.

En este sentido, el estudio de la microbiota intestinal puede contribuir a la investigación de los posibles factores etiopatogénicos que pueden desencadenar la respuesta autoinmune en la esclerosis múltiple. Se ha demostrado en el modelo animal que la microbiota es necesaria para la diferenciación de los linfocitos a una respuesta inmune proinflamatoria y el desarrollo de síntomas de la encefalomiелitis autoinmune experimental. También se ha detectado que determinadas especies bacterianas pueden inducir *in vitro* tal respuesta inmune. En los diferentes estudios clínicos realizados hasta el momento se han aislado géneros bacterianos que tenían perfil proinflamatorio y se ha detectado una notable disminución de otros géneros, conocidos productores de ácidos grasos de cadena corta, que tienen propiedades anti-inflamatorias y que al estar depleccionados, contribuyen a la fisiopatología de la EM.

Por tanto, cabe seguir construyendo las bases del conocimiento de la alteración de la microbiota intestinal en la EM. Servirá no solo para descubrir cuál es su papel al inicio de la enfermedad, sino para plantear un objetivo terapéutico para intentar modificar la historia natural de la enfermedad.

En definitiva, los resultados de nuestro estudio contribuyen a la innovación de una prueba con la que puede identificarse la presencia de EM en un sujeto a estudio analizando el número de secuencias encontradas de 5 géneros bacterianos (*Ezakiella*, *Bilophila*, *Ruminococcus*, *Roseburia* y *Lachnospira*) en su muestra biológica con una sensibilidad y especificidad determinada para cada uno. La mayoría de estos microorganismos habían sido descritos previamente en la literatura científica relacionados con la EM con la misma tendencia que en nuestro estudio, lo que

aporta validez a nuestros hallazgos. En definitiva, esta prueba podría contribuir al diagnóstico de los pacientes con esclerosis múltiple.

VIII - LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

8 LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

8.1 LIMITACIONES

Aunque los métodos de secuenciación masiva de DNA bacteriano se han extendido a lo largo de los últimos años como se puede comprobar en la aparición de algunos estudios de microbiota intestinal en pacientes con esclerosis múltiple, siguen siendo costosos económicamente y no dejan de tener dificultades añadidas. Se han aislado cientos de géneros bacterianos pero muchos de ellos aún no disponen de identificación taxonómica, lo que supone un obstáculo para la correcta identificación de los microorganismos detectados en los estudios de microbiota, y por tanto, puede entorpecer la interpretación de los resultados obtenidos y las conclusiones derivadas de los mismos.

Por otro lado, existen dificultades para seleccionar un grupo de controles sanos adecuado para el estudio de la microbiota. Debido a la influencia que tienen factores como el modo del nacimiento, la edad, la dieta, las comorbilidades y los tratamientos que en ese momento reciben los sujetos. Para eliminar las interferencias de posibles diferencias en la dieta habitual, uno de los sesgos más importantes en el estudio de la microbiota, se decidió escoger los controles de entre familias y/o convivientes que compartiesen la misma dieta. Igualmente, para el resto de variables diferenciadoras de ambos grupos como la edad, el género, el peso, la altura o el índice de masa corporal, no se demostraron diferencias estadísticamente significativas, aunque consideramos que probablemente se da a un tamaño muestral pequeño.

Con respecto a la selección de pacientes, si bien es cierto que se incluyeron 4 pacientes de uno o menos años de evolución de la enfermedad, el grupo de pacientes refería una duración media de la enfermedad de $7,67 \pm 6,5$ años en el momento de su inclusión en el estudio. Por lo tanto, podría ser un factor limitante a la hora de trasladar los hallazgos que hemos obtenido con la detección de una prueba diagnóstica para identificar la presencia de EM, a un test diagnóstico para los sujetos a estudio en fase pre-diagnóstica. Dada la importancia de innovar un nuevo método diagnóstico o biomarcador, se podría realizar nuevos estudios con

pacientes con EM de reciente diagnóstico. Por otro lado, convendría aumentar el tamaño de la muestra para determinar si existe una relación con el pronóstico de la enfermedad y disponer de subgrupos de pacientes que reflejen los diferentes tipos de EM, para esclarecer si esta prueba diagnóstica tendría validez en las formas progresivas.

Sería igualmente interesante analizar el metaboloma de la microbiota intestinal para confirmar si existe una disminución de la producción de ácidos grasos de cadena corta en las muestras de pacientes, que se erige como elemento fundamental en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, específicamente la esclerosis múltiple, y quizás sea más notorio en aquellas áreas donde su incidencia ha aumentado notablemente en relación con el cambio de estilo de vida y dieta habitual que se han occidentalizado, como sugiere el estudio de *Takewaki* y colaboradores realizado sobre población japonesa²⁸⁴.

Por último, hay que tener en cuenta la influencia de los tratamientos modificadores de la enfermedad sobre la composición de la microbiota intestinal que en el nuestro estudio no se realizó. En publicaciones anteriores se ha mostrado la relevancia sobre la misma²⁸⁵.

8.2 LÍNEAS DE FUTURO

Dados los resultados tan notables que hemos extraído de este estudio, convendría realizar un estudio con un tamaño muestral más grande para poder confirmar los hallazgos obtenidos en relación a la identificación de 5 géneros bacterianos (*Ezakiella*, *Bilophila*, *Ruminococcus*, *Roseburia* y *Lachnospira*) como prueba de detección de la enfermedad. Se podría investigar si guardan relación con la evolución clínico-radiológica de los pacientes. Sería interesante no solo poder determinar si la microbiota intestinal tiene un papel en el pronóstico de la esclerosis múltiple, si no incluso averiguar si puede estar influyendo en la respuesta al tratamiento modificador de la historia natural de la enfermedad.

En este sentido, se propone que determinados microorganismos que se relacionan con los estados de salud puedan ser transferidos en forma de probióticos como parte del tratamiento inmunomodulador de la EM. Igualmente es preciso dilucidar cual es el papel del trasplante fecal en estos pacientes

IX – BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Amato MP et al. «Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016ECTRIMS focused workshop.» *Multiple Sclerosis Journal* 1-14.
- ² Moreira, M. A., Tilbery, C. P., Lana-Peixoto, M. A., Mendes, M. F., Kaimen-Maciel, D. R., & Callegaro, D. (2002). Aspectos históricos de la esclerosis múltiple. *Rev neurol*, 34(4), 378-383.
- ³ Carswell R. *Pathological Anatomy; Illustrations of the Elementary Forms of Disease*. London: Longman, Orme, Brown, Green and Longman. 1838.
- ⁴ Cruveilhier J. *Anatomie pathologique du corps hwnain; descriptions avecfigures lithographie'es et coloriees; des diverses alterations morbides dont le corps hwnain est susceptible*. Paris: JB Bailliere. 1835-42.
- ⁵ Compston A. The story of multiple sclerosis. In Compston A, Ebers G, McDonald I, Lassmann H, Matthews B, Wekerle H, eds. *McAlpine's multiple sclerosis*. London: Churchill Livingstone; 1999. p. 342.
- ⁶ Charcot JM. Histologie de la sclerose en plaque. *Gazette Hopital (Paris)* 1868; 41: 5546
- ⁷ Vulpian EFA. Note sur la sclérose en plaques de la moelle épinière. *Un Med Prat Franc* 1866; 30: 45965.
- ⁸ Marburg O. Die sogennante akute multiple Sklerose. *Mitt Ges Inn Med Kinderheilk Wien*. 1905;4:200.
- ⁹ Baló, J. (1928). Encephalitis periaxialis concentrica. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 19(2), 242-264.
- ¹⁰ Dawson, J. W. (1916). The histology of disseminated sclerosis. *Edinburgh Medical Journal*, 17(5), 311.
- ¹¹ Río J, Comabella M, Tintoré M and Montalbán X. Esclerosis Múltiple. En *Esclerosis Múltiple*. ed 1. Madrid: Luzán 5, S.A.; 2012.p. 583-610.
- ¹² Orton SM, Herrera BM, Yee IM, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 2006; 5: 932–936.
- ¹³ Pérez Carmona, N., Fernández Jover, E., & Sempere, A. P. (2019). Epidemiología de la esclerosis múltiple en España. *Rev Neurol*, 69(1), 32-38.
- ¹⁴ Ligouri, M., et al. "Age at onset in multiple sclerosis." *Neurological Sciences* 21.2 (2000): S825-S829.
- ¹⁵ Bove R, Healy BC, Musallam A, et al. Exploration of changes in disability after menopause in a longitudinal multiple sclerosis cohort. *Mult Scler* 2016; 22: 935–943.
- ¹⁶ Magyari M. Role of socio-economic and reproductive factors in the risk of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2015; 132: 20–23.

-
- ¹⁷ Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of MS 2013: mapping multiple sclerosis around the world. *Mult Scler Int Fed* 2013 (2013): 1-28.
- ¹⁸ Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., ... & Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), 1816-1821.
- ¹⁹ Kingwell E, Marriott JJ, Jette N, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* 2013; 13: 128
- ²¹ Compston, A., Confavreux, C. The distribution of multiple sclerosis. *McAlpine's Multiple Sclerosis* 2006:71-111.
- ²⁰ Evans C, Beland SG, Kulaga S, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review. *Neuroepidemiology* 2013; 40: 195–210.
- ²³ Casado, E., Blanch-Rubió, J., Peris, P., Neyro, J. L., Giner, M., Del Pino, J., et al. Recomendaciones de la SEIOMM en la prevención y tratamiento del déficit de vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 2021;13(2), 84-97.
- ²⁶ Riccio, P. and Rossano, R. Nutricion facts in multiple sclerosis. *ASN Neuro* 2015: 1-20
- ²⁷ Poser CM. Vikings voyages: the origin of multiple sclerosis? An essay in medical history. *Acta Neurol Scand* 1995; S161: 11-22.
- ²⁸ Koch-Henriksen, N., Sorensen, P.S. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010; 9 (5):520-32.
- ²⁹ Baranzini, S.E. and Oksenberg, J.R. The genetics of multiple sclerosis: From 0 to 200 in 50 years. *Trends Genet* 2017; 33(12):960-970.
- ³⁰ McLeod JG, Hammond SR and Kurtzke JF. Migration and multiple sclerosis in immigrants to Australia from United Kingdom and Ireland: a reassessment. I. Risk of MS by age at immigration. *J Neurol* (2011) 258:1140–1149.
- ³¹ Patsopoulos, N. A., Barcellos, L. F., Hintzen, R. Q., Schaefer, C., Van Duijn, C. M., Noble, J. A., and de Bakker, P. I. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS genetics*, 2013, 9(11), e1003926.
- ³² Okuda DT, Srinivasan R, Oksenberg JR, et al. Genotype-phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by IHMR spectroscopy and MRI measures. *Brain* 2009; 132 (pt 1): 250-259.
- ³³ Healy BC, Liguori M, Tran D, et al. HLA B*44: protective effects in MS susceptibility and MRI outcome measures. *Neurology*. 2010; 75(7):634–640.
- ³⁴ Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, et al.; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2013; 45: 1353–1360.
- ³⁵ Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J* 1989;299:1259-60.

- ³⁶ Rook GAW, Martinelli R, Brunet LR. Innate immune responses to mycobacteria and the downregulation of atopic responses. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2003; **3** (5): 337–342.
- ³⁷ Rook GAW, Lowry CA and Raison CL. Microbial ‘Old Friends’, immunoregulation and stress resilience. *Evolution, medicine, and public health* 2013; 1: 46-64.
- ³⁸ Omram AR. The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. *Bulletin of the World Health Organization* 2001; 79: 161-170.
- ³⁹ Armelagos GJ, Brown PJ and Turner B. Evolutionary, historical and political economic perspectives on health and disease. *Social Science & Medicine* 2005; 61.4: 755-765.
- ⁴⁰ Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM et al. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1966;29:60–8.
- ⁴¹ Rook GAW. Hygiene Hypothesis and Autoimmune Diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol* (2012) 42:5-15.
- ⁴² Lünemann, JD, Jelčić I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R and Münz C. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN- γ and IL-2. *The Journal of experimental medicine* 2008; 205(8): 1763-1773.
- ⁴³ Ascherio A, Munger KL and Lünemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2012;8 (11): 602-612.
- ⁴⁴ Hernan MA, Zhang SM, Lipworth L, et al. Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology* 2001; 12:301–306.
- ⁴⁵ Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: A meta-analysis. *Ann Neurol*. 2006; 59:499–503.
- ⁴⁶ Smith, C. and Khanna, R. Adoptive T-cell therapy targeting Epstein–Barr virus as a treatment for multiple sclerosis. *Clinical & Translational Immunology* 2023, 12(3), e1444.
- ⁴⁷ Bjornevik, K., Munger, K. L., Cortese, M., Barro, C., Healy, B. C., Niebuhr, D. W., Scher, A.I., Kuhle, J., and Ascherio, A. Serum neurofilament light chain levels in patients with presymptomatic multiple sclerosis. *JAMA neurology* 2020, 77(1), 58-64.
- ⁴⁸ Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 2022; 375(6578), 296-301.
- ⁴⁹ Munger KL, Levin LI, O’Reilly EJ, Falk KI and Ascherio A. Anti-Epstein–Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Multiple Sclerosis Journal* 2011; 17(10): 1185-1193.
- ⁵⁰ Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesion of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998; 338:278-2.
- ⁵¹ Correale, J., Farez, M.F. Patogenia de la esclerosis múltiple. En: Fernández y Fernández Ó, Rodríguez-Antigüedad A. XXIV Monografías en Esclerosis múltiple. Fundamentos inmunológicos del tratamiento de la esclerosis múltiple. 1ª Edición. Barcelona: Ed. Ambos, Marketing Services; 2018. p. 41-59.

- ⁵² Zalc, B. One hundred and fifty years ago Charcot reported multiple sclerosis as a new neurological disease. *Brain* 2018; 141.12: 3482-3488.
- ⁵³ Lublin, F.D, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996;46:907-911.
- ⁵⁴ Gran, B., Hemmer, B., Vergelli, M.M., McFarland, H.F. and Martín, R.R. Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann Neurol*. 1999;45:559-67.
- ⁵⁵ Archelos, J.J., Previtali, S.C. and Hartung, H.P. The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends in neurosciences* 1999;22(1):30-38.
- ⁵⁶ Guerrero-García, J. J. Participación de los astrocitos en la patogénesis de la esclerosis múltiple. *Neurología* 2020, 35(6), 400-408.
- ⁵⁷ Correale, J., and Villa, A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity* 2007, 40(2), 148-160.
- ⁵⁸ Burkhard B, Prat A and Antel JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 2000; 29(4): 293-304.
- ⁵⁹ Patel DD and Kuchroo VK. Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions. *Immunity* 2015; 43(6): 1040-1051.
- ⁶⁰ Fernández Ó and Fernández VE. Esclerosis múltiple. Concepto. Etiopatogenia. Fisiopatología. Manifestaciones clínicas. Investigaciones paraclínicas. Diagnóstico. Historia natural. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2007; 9 (76): 4867-4877.
- ⁶¹ McFarland HF and Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature immunology* 2007; 8(9), 913-919.
- ⁶² Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A. B cells in the multiple sclerosis central nervous system: trafficking and contribution to CNS-compartmentalized inflammation. *Front Immunol* 2015; 6: 636.
- ⁶³ Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G and Ramagopalan SV. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2012; 78(11), 823-832.
- ⁶⁴ Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-85.
- ⁶⁵ Correale, J., Gaitán, M.I., Ysrraelit, M.C., and Fiol, M.P. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain* 2017; 140(3), 527-546.
- ⁶⁶ Cuevas-García CF, Segura-Méndez NH and Herrera-Sánchez DA. Actualidades en la inmunopatología de la esclerosis múltiple. *Gaceta medica de Mexico* 2018;154 (5): 588-597.
- ⁶⁷ Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(11):647-56.
- ⁶⁸ Calvi, A., Carrasco, F.P., Tur, C., Chard, D.T., Stutters, J., De Angelis, F., and MS SMART Investigators. Association of slowly expanding lesions on MRI with disability in people with secondary progressive multiple sclerosis. *Neurology* 2022, 98(17), e1783-e1793.

-
- ⁶⁹ Tuñón, T. and Ayuso, T. Aspectos patofisiológicos de la esclerosis múltiple. *Revista Española de Esclerosis Múltiple* 2015;36:5-12.
- ⁷⁰ Longo, D.L., Reich, D.S., Lucchinetti, C.F., and Calabresi, P.A. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 2018, 378, 169-80.
- ⁷⁰ Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 2000, 47(6), 707-717.
- ⁷¹ Fernández O, Fernández VE and Guerrero M. Esclerosis múltiple. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2015;11(77):4610-4621.
- ⁷² García Moreno JM and Izquierdo G. Signo de Lhermitte. *Neurología* 2002;17 (3):143-150.
- ⁷³ Smith KJ, and McDonald WI. The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 1999; 354(1390):1649-1673.
- ⁷⁴ Matthews WB. Symptoms and signs of multiple sclerosis. En: Compston A, Ebers G, Lassmann H, Mc Donald I, Matthews WB, Wekerle H, editors. *Mc Alpine 's multiple sclerosis*. 3rd ed. Edinburgh & London: Churchill Livingstone; 1998. p. 145-90.
- ⁷⁵ Dobson R and Giovannoni G. Multiple sclerosis—a review. *European journal of neurology* 2019;26(1), 27-40.
- ⁷⁶ Mendibe MM, Boyero S, Rodrigo RM and Zarranz JJ. Esclerosis múltiple y encefalitis autoinmunes. Leucodistrofias y otras enfermedades desmielinizantes. En: Zarranz JJ. *Neurología*. 5ª edición. Barcelona;2013. 451-473
- ⁷⁷ Vidal-Jordana, A., Sastre-Garriga, J., & Montalban, X. Tomografía de coherencia óptica en esclerosis múltiple. *Rev Neurol*, 2012,54(9), 556-63.
- ⁷⁸ Jay, V. The sign of Babinski. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2000, 124(6), 806-807.
- ⁷⁹ Oreja-Guevara, C., Montalban, X., de Andrés, C., Casanova-Estruch, B., Muñoz-García, D., García, I., and Fernández, Ó. Documento de consenso sobre la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple. *Rev Neurol*, 2013,57(8), 359-373.
- ⁸⁰ Walz, L., Brooks, J. C., Shavelle, R. M., Robertson, N., and Harding, K. E. Life expectancy in multiple sclerosis by EDSS score. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 2022, 68, 104219
- ⁸¹ Alfaro Sáez A, Mallada Frechín J, Pérez Sempere Á, Sánchez Pérez R. Los síntomas de la enfermedad. En: Pérez Sempere Á (ed). *Esclerosis múltiple: preguntas y respuestas para pacientes y familiares*. 1ª edición. Alicante;2017. 35-42.
- ⁸² Díaz Marín C, Margarit Ferri C, Méndez Miralles M.A., Pérez Sempere Á. Dolor y Esclerosis Múltiple. En: Pérez Sempere Á (ed). *Esclerosis múltiple: preguntas y respuestas para pacientes y familiares*. 1ª edición. Alicante;2017. 75-79.
- ⁸⁴ Téllez, N. and Montalbán, X. Manifestaciones iniciales de la esclerosis múltiple. *FMC-Formación Médica Continuada En Atención Primaria* 2001, 8(9), 606–619

- ⁸⁵ Forslin Y, Granberg T, Jumah AA, Shams S, Aspelin P, Kristoffersen-Wiberg M and Fredrikson S. Incidence of radiologically isolated syndrome: a population-based study. *American journal of neuroradiology* 2016;37(6):1017-1022.
- ⁸⁶ Lebrun, C., Blanc, F., Brassat, D., Zephir, H. and de Seze, J. *Cognitive function in radiologically isolated syndrome. Multiple Sclerosis Journal* 2010, 16(8), 919–925.
- ⁸⁷ Fambiatos A et al. Risk of secondary progressive multiple sclerosis: A longitudinal study. *Multiple Sclerosis Journal* 2020; 26(1), 79-90.
- ⁸⁸ Krieger, S.C., et al. The topographical model of multiple sclerosis: a dynamic visualization of disease course. *Neurology-Neuroimmunology Neuroinflammation* 2016, 3.5.
- ⁸⁹ Kurtzke, JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983, 33.11: 1444-1444.
- ⁹⁰ Leray, E., Yaouanq, J., Le Page, E., Coustans, M., Laplaud, D., Oger, J., and Edan, G. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*, 2010, 133(7), 1900-1913.
- ⁹¹ Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., Adeleine, P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *New Engl J Med*. 2000;343:1430-8.
- ⁹² Lublin FD et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 2014;83:278–286.
- ⁹³ Allison R, Millard J. Prevalence and familial incidence of disseminated sclerosis. *Ulster Med*. 1954; 23:1-92.
- ⁹⁴ Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1965;122:552-68.
- ⁹⁵ Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald I, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13: 227-31.
- ⁹⁶ Velasco, P.B., Quílez, M.B., and Merino, A.G. Esclerosis múltiple. Criterios diagnósticos y pruebas complementarias. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2011, 10(75), 5087-5093.
- ⁹⁷ Barkhof, F., Filippi, M., Miller, D.H., Scheltens, P., Campi, A., Polman, C.H., et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997;120:2059-69.
- ⁹⁸ McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., Van Den Noort, S., Weinshenker, B.Y., and Wolinsky, J.S. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 2001, 50(1), 121-127.
- ⁹⁹ Polman, C. H., Reingold, S. C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H. P., Kappos, L., ... and Wolinsky, J. S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 2005, 58(6), 840-846.

- ¹⁰⁰ Tintoré, M., Rovira, A., Martínez, M.J., Río, J., Díaz-Villoslada, P., Brieva, L., et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol.* 2000; 21:702-6.
- ¹⁰¹ Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B. and Wolinsky, J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* (2011) 69: 292-302.
- ¹⁰² Swanton, J.K., Rovira, A., Tintoré, M., Altmann, D.R., Barkhof, F., Filippi, M., ... and Miller, D.H. MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *The Lancet Neurology* 2007, 6(8), 677–686.
- ¹⁰³ Thompson, A.J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 2018; 17(2): 162–173
- ¹⁰⁴ Tintoré, M., Cobo-Calvo, A., Carbonell, P., Arrambide, G., Otero-Romero, S., Río, J., Tur, C., ... and Montalban, X. Effect of Changes in MS Diagnostic Criteria Over 25 Years on Time to Treatment and Prognosis in Patients With Clinically Isolated Syndrome. *Neurology* 2021,97 (17), e1641-e1652.
- ¹⁰⁵ Rovira, Á. and Fernández de Moya, E.A. Enfermedades inflamatorio-desmielinizantes del sistema nervioso central. Demencias. En: Editorial Médica Panamericana, S.A (ed.). Radiología esencial. Sección VI Neurorradiología. 1ª edición. Madrid;2011.1199-1216.
- ¹⁰⁶ Filippi, M., Preziosa, P., Banwell, B.L., Barkhof, F., Ciccarelli, O., De Stefano, N., ... and Rocca, M.A. Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain* 2019, 142(7), 1858-1875.
- ¹⁰⁷ Wattjes, M.P., Ciccarelli, O., Reich, D.S., Banwell, B., de Stefano, N., Enzinger, C., ... and Rovira, A. 2021 MAGNIMS–CMSC–NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2021, 20(8), 653-670.
- ¹⁰⁸ Tuñón T and Ayuso T. Aspectos patofisiológicos de la esclerosis múltiple. *Revista Española de Esclerosis Múltiple* 2015;36:5-12.
- ¹⁰⁹ Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (1994) 57:897–902.
- ¹¹⁰ de Groot CJ, Koetsier JC, Sminia T, Veerman AJ. Cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis and other neurological diseases: an immunocytochemical study. *J Neurol.* (1987) 234:19–22.
- ¹¹¹ Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol.* 2005;62:865–70.
- ¹¹² Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2014;13:113–26.
- ¹¹³ Tintoré M, Rovira A, Brieva L, Grive E, Jardi R, Borrás C, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to CDMS. *Mult Scler* 2001;7:359–63.

- ¹¹⁴ Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013; 262:1–10.
- ¹¹⁵ Bosca I, Villar LM, Coret F, Magraner MJ, Simo-Castello M, Alvarez-Cermeno JC and Casanova B. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Multiple Sclerosis Journal*, 2010;16(7), 810-815.
- ¹¹⁶ Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*. 2005;115:187–94.
- ¹¹⁷ Wang H, Wu M, Zhan C, Ma E, Yang M, Yang X and Li Y. Neurofilament proteins in axonal regeneration and neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 2012;7(8): 620-626.
- ¹¹⁸ Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani M, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018;14:1.
- ¹¹⁹ Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012;18:552–556.
- ¹²⁰ Gunnarsson M, Malmstrom C, Axelsson M, Sundstrom P, Dahle C, Vrethem M, et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol*. (2011) 69:83–9.
- ¹²¹ Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017;81:857–70.
- ¹²² Cantó E et al. Chitinase 3-like 1 plasma levels are increased in patients with progressive forms of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 2011; 18(7): 983–990.
- ¹²³ Gil-Perotin S, Castillo-Villalba J, Cubas-Nuñez L, Gasque R, Hervas D, Gomez-Mateu J, Alcalá C, Perez-Miralles F, Gascon F, Dominguez JA and Casanova B. Combined Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Chain Protein and Chitinase-3 Like-1 Levels in Defining Disease Course and Prognosis in Multiple Sclerosis. *Front. Neurol*. 2019;10:1008.
- ¹²⁴ Axelsson M, Khademi M, Zetterberg H, Blennow K, Malmström C, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers as a measure of disease activity and treatment efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurochem*. 2017;141:296–304.
- ¹²⁵ Malmström C, Axelsson M, Lycke J, Zetterberg H, Blennow K and Olsson B. CSF levels of YKL-40 are increased in MS and decrease with immunosuppressive treatment. *Journal of neuroimmunology*, 2014; 269(1-2), 87-89.
- ¹²⁶ Tintoré M, Vidal-Jordana A and Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis—success from bench to bedside. *Nature Reviews Neurology*, 2019;15(1), 53-58.
- ¹²⁷ Fármacos modificadores de la enfermedad con indicación en esclerosis múltiple [Internet] 2023 [citado 6 junio 2023]. Disponible en: <https://www.medlink.com/articles/clinical-trials-in-multiple-sclerosis>
- ¹²⁸ Rotstein D and Montalban X. Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 2019; 15(5), 287-300.
- ¹²⁹ Wee Yong, V., Chabot, S., Stuve, O., and Williams, G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: Mechanisms of action. *Neurology* 1998, 51(3), 682–689.

- ¹³⁰ PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon b-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferonb-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998;352:1498–1504.
- ¹³¹ Trojano, M., Pellegrini, F., Fuiani, A., Paolicelli, D., Zipoli, V., Zimatore, G.B., ...and Amato, M.P. *New natural history of interferon-β-treated relapsing multiple sclerosis. Annals of Neurology* 2007, 61(4), 300–306.
- ¹³² Neilley LK, Goodin DS, Goodkin DE, Hauser SL. Side effect profile of interferon beta 1b in MS: Results of an open label trial. *Neurology* 1996; 46: 5524.
- ¹³³ Ruggieri, M., Avolio, C., Livrea, P., & Trojano, M. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: a review. *CNS drug reviews* 2007, 13(2), 178-191.
- ¹³⁴ Confavreux, C., O'Connor, P., Comi, G., Freedman, M.S., Miller, A.E., Olsson, T.P., ... and Kappos, L. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Neurology* 2014, 13(3), 247-256.
- ¹³⁵ Sartori, A., Carle, D., and Freedman, M. S. Teriflunomide: a novel oral treatment for relapsing multiple sclerosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2014, 15(7), 1019–1027.
- ¹³⁶ Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367(12):1098-107.
- ¹³⁷ Jordan, A.L., Yang, J., Fisher, C.J., Racke, M.K., and Mao-Draayer, Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy in dimethyl fumarate-treated multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis Journal* 2022, 28(1), 7-15.
- ¹³⁸ Naismith, R.T., Wundes, A., Ziemssen, T., Jasinska, E., Freedman, M.S., Lembo, A.J., ... and EVOLVE-MS-2 study group. Diroximel fumarate demonstrates an improved gastrointestinal tolerability profile compared with dimethyl fumarate in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: results from the randomized, double-blind, phase III EVOLVE-MS-2 study. *CNS drugs* 2020, 34, 185-196.
- ¹³⁹ Kappos, L., Radue, E. W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., ... and Burtin, P. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 2010, 362(5), 387-401.
- ¹⁴⁰ Ficha técnica de Gilenya de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. [Internet] 2023 [citado 7 junio 2023]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/11677005/FT_11677005.html
- ¹⁴¹ Sriwastava, S., Chaudhary, D., Srivastava, S., Beard, K., Bai, X., Wen, S., ... and Lisak, R.P. Progressive multifocal leukoencephalopathy and sphingosine 1-phosphate receptor modulators used in multiple sclerosis: an updated review of literature. *Journal of Neurology* 2022, 1-10.
- ¹⁴² Alcalá-Vicente, C., Pérez-Miralles, F.C., Gascón-Giménez, F., Boscá-Blasco, I., Navarré-Gimeno, A., Coret Ferrer, F. and Casanova-Estruch, B. Tratamiento de la esclerosis múltiple remitente recurrente con fingolimod en la práctica clínica habitual. *Rev Neurol* 2017, 64, 445-53.
- ¹⁴³ Fox, R., Kappos, L., Burcklen, M., Freedman, M., Havrdová, E., Hennessy, B., ... and Sprenger, T. (2020). Efficacy outcome measures of oral ponesimod compared to teriflunomide in patients with

relapsing multiple sclerosis: results of the randomized, active-controlled, double-blind, parallel-group phase 3 OPTIMUM study (3972).

¹⁴⁴ Comi, G., Kappos, L., Selmaj, K.W., Bar-Or, A., Arnold, D.L., Steinman, L., ... and Cohen, J.A. Safety and efficacy of ozanimod versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis (SUNBEAM): a multicentre, randomised, minimum 12-month, phase 3 trial. *The Lancet Neurology* 2019, 18(11), 1009-1020.

¹⁴⁵ Robles-Cedeño, R, Ramió-Torrentà, Ll. Cladribina en el tratamiento de la esclerosis múltiple recurrente. *Rev Neurol* 2018; 67: 343-54.

¹⁴⁶ Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Sorensen PS, et al. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010; 362: 416-26.

¹⁴⁷ Ficha técnica de Mavenclad por la Agencia Española del Medicamentos y Productos sanitarios [Internet]. 2023 [citado 10 julio 2023]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1171212001/FT_1171212001.html

¹⁴⁸ Von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2003;348:68-72.

¹⁴⁹ Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354:899-910.

¹⁵⁰ Plavina, T., Subramanyam, M., Bloomgren, G., Richman, S., Pace, A., Lee, S., ... and Ticho, B. Anti-JC virus antibody levels in serum or plasma further define risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Annals of neurology* 2014, 76(6), 802-812.

¹⁵¹ Fernández, O., García-Merino, J. A., Arroyo, R., Álvarez-Cermeño, J. C., Izquierdo, G., Saiz, A., ... and Montalbán, X. Consenso español actualizado sobre el uso del natalizumab (Tysabri®)-2013. *Neurología* 2015, 30(5), 302-314.

¹⁵² Meca-Lallana, J.E., Fernández-Prada, M., Vázquez, E.G., Guillén, S.M., Romero, S.O., Hidalgo, M.R., ... and Gairin, X.M. Consenso de expertos sobre el uso de alemtuzumab en la práctica clínica diaria en España. *Neurología* 2022, 37(8), 615-630.

¹⁵³ Coles, A.J., Cohen, J.A., Fox, E.J., Giovannoni, G., Hartung, H. ., Havrdova, E., ... and Arnold, D.L. Alemtuzumab CARE-MS II 5-year follow-up: efficacy and safety findings. *Neurology* 2017, 89(11), 1117-1126.

¹⁵⁴ Meca-Lallana, J.E., Fernández-Prada, M., Vázquez, E.G., Guillén, S.M., Romero, S.O., Hidalgo, M.R., ... and Gairin, X.M. Consenso de expertos sobre el uso de alemtuzumab en la práctica clínica diaria en España. *Neurología* 2022, 37(8), 615-630.

¹⁵⁵ Alemtuzumab: Restricciones de uso provisionales por motivos de seguridad por la Agencia Española del Medicamentos y Productos sanitarios [Internet]. 2019 [citado 10 julio 2023]. Disponible en: [https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumano-3/seguridad-1/alemtuzumab-lemtrada-restricciones-de-uso-provisionales-por-motivos-de-seguridad/#:~:text=Alemtuzumab%20\(Lemtrada®\)%20es%20un,ver%20ficha%20técnica%20de%20Lemtrada%20](https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumano-3/seguridad-1/alemtuzumab-lemtrada-restricciones-de-uso-provisionales-por-motivos-de-seguridad/#:~:text=Alemtuzumab%20(Lemtrada®)%20es%20un,ver%20ficha%20técnica%20de%20Lemtrada%20).

¹⁵⁶ Hauser, S., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 676-88.

- ¹⁵⁷ Hawker, K., O'Connor, P., Freedman, M.S., Calabresi, P.A., Antel, J., Simon, J., et al. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol* 2009; 66: 460-71.
- ¹⁵⁸ Midaglia, L., Mora, L., Mulero, P., Sastre-Garriga, J., and Montalban, X. Rituximab: eficacia, efectividad y seguridad en el tratamiento de la esclerosis múltiple. *Revista de neurología* 2018, 25-32.
- ¹⁵⁹ Ficha técnica de Ocrevus por la Agencia Española del Medicamentos y Productos sanitarios [Internet]. 2023 [citado 10 julio 2023]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1171231001/FT_1171231001.html
- ¹⁶⁰ Hauser, S.L., Bar-Or, A., Comi, G., et al. Ocrelizumab versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2017;376:221–234.
- ¹⁶¹ Montalban, X., Hauser, S.L., Kappos, L., et al. Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2017;376:209–220.
- ¹⁶² Fernandez, E., Perez, J.A., Villaverde, R., Berenguer, L., Candelieri, A., Martinez, M.L., Gracia, J., Romero, C.M., Alfaro, A., Diaz, I., Gimenez, J., Mendez, M.A., Millan, J., Jimenez, J., Mola, S. and Sempere, A.P. Real-world experience of ocrelizumab in multiple sclerosis in a Spanish population. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2021, 8(2), 385-394.
- ¹⁶³ Gärtner, J., Hauser, S.L., Bar-Or, A., Montalban, X., Cohen, J.A., Cross, A.H., ... and Kappos, L. Efficacy and safety of ofatumumab in recently diagnosed, treatment-naive patients with multiple sclerosis: Results from ASCLEPIOS I and II. *Multiple Sclerosis Journal* 2022, 28(10), 1562-1575.
- ¹⁶⁴ Casanova, B., Jarque, I., Gascón, F., Hernández-Boluda, J.C., Pérez-Miralles, F., de la Rubia, J., ... and Coret, F. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: comparison with secondary progressive multiple sclerosis. *Neurological Sciences*, 201738, 1213-1221.
- ¹⁶⁵ Pradhan B, Datzkiw D and Aich P. Gut microbiota and health: A review with focus on metabolic and immunological disorders and microbial remediation. *Biomedical Reviews* 2017;27: 1-18.
- ¹⁶⁶ Ramakrishna, B.S. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2013; 28: 9-17.
- ¹⁶⁷ Hesla, H.M., Stenius, F., Jäderlund, L., Nelson, R., Engstrand, L., Alm, J. and Dicksved, J. Impact of lifestyle on the gut microbiota of healthy infants and their mothers—the ALADDIN birth cohort. *FEMS microbiology ecology*, 2014; 90(3): 791-801.
- ¹⁶⁸ Hill, C.J., Lynch, D.B., Murphy, K., Ulaszewska, M., Jeffery, I.B., O'Shea, C.A., and Stanton, C. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome*, 2017;5(1): 1-18.
- ¹⁶⁹ Kabeerdoss, J., Ferdous, S., Balamurugan, R. et al. Development of the gut microbiota in southern Indian infants from birth to six months: a molecular analysis. *J. Nutr. Sci.* 2013;1-7.
- ¹⁷⁰ Balamurugan, R., Janardhan, H.P., George, S., Chittaranjan, S.P., Ramakrishna, B.S. Bacterial succession in the colon during childhood and adolescence: molecular studies in a southern Indian village. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 88: 1643–7.

- ¹⁷¹ Petra, A.I., Panagiotidou, S., Hatzigelaki, E., Stewart, J.M., Conti, P. and Theoharides, T.C. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation. *Clinical therapeutics* 2015; 37(5): 984-995.
- ¹⁷² Castillo-Álvarez, F. and Marzo-Sola, M.E. Papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la esclerosis múltiple. *Neurología* 2017;32.3: 175-184.
- ¹⁷³ Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 2008; 28:740–750.
- ¹⁷⁴ Hall, J.A., Bouladoux, N., Sun, C.M. et al. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity* 2008; 29:637–649
- ¹⁷⁵ Clarke, T.B., Davis, K.M., Lysenko, E.S., Zhou, A.Y., Yu, Y.M., Weiser, J.N. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* 2010; 16:228–231.
- ¹⁷⁶ Menzel, T., Lührs, H., Zirlik, S., Schaubert, J., Kudlich, T., Gerke, T., et al. Butyrate inhibits leukocyte adhesion to endothelial cells via modulation of VCAM-1. *Inflamm Bowel Dis.* 2004; 10:122-8.
- ¹⁷⁷ Bettelli, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH 17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441.7090: 235-238.
- ¹⁷⁸ Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K. and Lamarre, A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.* 2001;3:1021–1035.
- ¹⁷⁹ Bauer, H., Horowitz, R.E., Levenson, S.M. and Popper, H. The response of lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *Am. J. Pathol.* 1963;42: 471–479.
- ¹⁸⁰ Benveniste, J., Lespinats, G., Adam, C. and Salomon, J.C. Immunoglobulins in intact, immunized, and contaminated axenic mice: study of serum IgA. *J. Immunol.* 1971;107:1647–1655.
- ¹⁸¹ Macpherson, A.J. and Harris, N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2004;4.6:478-485.
- ¹⁸² Romijn, J.A., Corssmit, E.P., Havekes, L.M. and Pijl, H. Gut–brain axis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2018;11(4): 518-521.
- ¹⁸³ Moreno, B., Espejo, C., Mestre, L., Suardiaz, M., Clemente, D., De Castro, F., et al. Guía de uso adecuado de modelos animales para el desarrollo de terapias en esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 2012; 54: 114-24.
- ¹⁸⁴ Barthelmes J, Tafferner N, Kurz J, de Bruin N, Parnham MJ, Geisslinger G and Schiffmann S. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and evaluation of the disease-dependent distribution of immune cells in various tissues. *Journal of visualized experiments* 2016, *JoVE*, (111).
- ¹⁸⁵ Shahi, S.K., Freedman, S.N., Dahl, R.A., Karandikar, N. ., and Mangalam, A.K. Scoring disease in an animal model of multiple sclerosis using a novel infrared-based automated activity-monitoring system. *Scientific reports* 2019, 9(1), 19194.

- ¹⁸⁶ Lee YK, MEnezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108.Supplement 1: 4615-4622.
- ¹⁸⁷ Berer, K. et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 2011;479.7374: 538-541.
- ¹⁸⁸ Yokote, H., Miyake, S., Croxford, J.L., Oki, S., Mizusawa, H. and Yamamura, T. NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *The American journal of pathology* 2008;173(6): 1714-1723.
- ¹⁸⁹ Correale, J., Farez, M., and Razzitte, G. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 2008, 64(2), 187-199.
- ¹⁹⁰ Maizels, R.M., et al. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 1993; 365.6449: 797-805.
- ¹⁹¹ Yazdanbakhsh M., van den Biggelaar A., Maizels R.M. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol* 2001; 22:372–377.
- ¹⁹² Lynch N.R., Hagel I., Perez M., et al. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:404–411.
- ¹⁹³ La Flamme, A.C., Ruddenklau, K., Bäckström, B.T. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect Immun* 2003;71:4996–5004.
- ¹⁹⁴ Correale, J. and Farez, M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 2007, 61(2), 97-108.
- ¹⁹⁵ Fleming, J.O., Isaak, A., Lee, J.E., Luzzio, C.C., Carrithers, M.S., Cook, T.D., et al. Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Mult Scler.* 2011;17:743–54.
- ¹⁹⁶ Polman, C.H., and Rudick, R.A. The multiple sclerosis functional composite: a clinically meaningful measure of disability. *Neurology* 2010, 74 (17 Supplement 3), S8-S15.
- ¹⁹⁷ Fleming, J., Hernandez, G., Hartman, L., Maksimovic, J., Nace, S., Lawler, B., ... and Fabry, Z. Safety and efficacy of helminth treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of the HINT 2 clinical trial. *Multiple Sclerosis Journal* 2019, 25(1), 81-91.
- ¹⁹⁸ Voldsgaard, A., Bager, P., Kapel, C., Roepstorff ,A., Thamsborg, S., Soendergaard, H., et al. *Trichuris suis* ova therapy for relapsing Multiple Sclerosis- A safety study. *Neurology* 2012;78:S30.005.
- ¹⁹⁹ Benzel, F., Erdur, H., Kholer, S., Frentsch, M., Thiel, A., Harms, L., et al. Immune monitoring of *trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients. *J Helminthol.* 2012;86:339–47.
- ²⁰⁰ Rosche, B., Wernecke, K. D., Ohlraun, S., Dörr, J. M., and Paul, F. *Trichuris suis* ova in relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome (TRIOMS): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2013, 14, 1-6.

- ²⁰¹ Tanasescu, R., Tench, C.R., Constantinescu, C.S., Telford, G., Singh, S., Frakich, N., Onion, D., Auer, D.P., Gran, B., Evangelou, N., Falah, Y., Ranshaw, C., Cantacessi, C., Jenkins, T.P., Pritchard, D.I. Worms for immune regulation of multiple sclerosis (WIRMS): a randomised double-blinded placebo controlled trial. *JAMA Neurol.* 2020;77(9):1089–98.
- ²⁰² Jenkins, T.P., Pritchard, D.I., Tanasescu, R., Telford, G., Papaikovou, M., Scotti, R., ... and Cantacessi, C. Experimental infection with the hookworm, *Necator americanus*, is associated with stable gut microbial diversity in human volunteers with relapsing multiple sclerosis. *BMC biology* 2021, 19(1), 1-17.
- ²⁰³ Barnett, M.H., and Prineas, J.W. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Annals of neurology* 2004, 55(4), 458-468
- ²⁰⁴ Kurtzke, J.F. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clinical microbiology reviews* 1993, 6(4), 382-427.
- ²⁰⁵ Kurtzke, J.F., Hyllested K., Heltberg A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: transmission across four epidemics. *Acta neurologica scandinavica* 1995; 91(5): 321-325.
- ²⁰⁶ Rumah, K. R., Linden, J., Fischetti, V. A., & Vartanian, T. Isolation of *Clostridium perfringens* type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PloS one* 2013, 8(10), e76359.
- ²⁰⁷ Miyake, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T., ... and Yamamura, T. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to clostridia XIVa and IV clusters. *PloS one* 2015, 10(9), e0137429.
- ²⁰⁸ Tremlett, H., Fadrosh, D.W., Faruqi, A.A., Zhu, F., Hart, J., Roalstad, S., ... and Weinstock-Guttman, B. Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: a case– control study. *European journal of neurology* 2016, 23(8), 1308-1321
- ²⁰⁹ Tremlett, H., Fadrosh, D.W., Faruqi, A.A., et al. Gut microbiota composition and relapse risk in pediatric MS: A pilot study. *J Neurol Sci* 2016; 363: 153–157.
- ²¹⁰ Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L.M., Li, N., Von Glehn, F., Yan, R., ... and Weiner, H.L. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature communications* 2016, 7(1), 12015.
- ²¹¹ Chen, J., Chia, N., Kalari, K.R., Yao, J.Z., Novotna, M., Paz Soldan, M.M., ... and Mangalam, A.K. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific reports* 2016, 6(1), 1-10.
- ²¹² Cekanaviciute E., Yoo B.B., Runia T.F., Debelius J.W., Singh S., Nelson C.A., and Baranzini, S.E. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017; 114(40):10713-10718.
- ²¹³ Berer, K., Gerdes, L.A., Cekanaviciute, E., et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114: 10719-10724.
- ²¹⁴ Mowry EM, Waubant E, Chehoud C, DeSantis T, Kuczynski J, Warrington J. Gut bacterial populations in multiple sclerosis and in health (P05.106). *Neurology* 2012;78 (Meet Abstr 1):P05.106.

- ²¹⁵ Cantarel, B.L., et al. Gut microbiota in multiple sclerosis: possible influence of immunomodulators. *Journal of Investigative Medicine* 2015;63 (5): 729-734.
- ²¹⁶ Baranzini, S.E., Katz-Sand, I., Mazmanian, S.K., Becosme, Y., London, J., Farber, R., ... and Casaccia, P. The MS Microbiome Consortium (MSMC): an academic multi-disciplinary collaborative effort to elucidate the role of the gut microbiota in MS. *Multiple Sclerosis Journal* 2014, 20(S1), 339
- ²¹⁷ Wang P, Xie K, Wang C, Bi J. Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2014;72:249e54.
- ²¹⁸ Kouchaki, E., et al. Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical nutrition* 2017; 36(5): 1245-1249.
- ²¹⁹ Tankou, S.K., Regev, K., Healy, B.C., Tjon, E., Laghi, L., Cox, L.M., ... and Weiner, H.L. A probiotic modulates the microbiome and immunity in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 2018, 83(6), 1147-1161.
- ²²⁰ Zhou, X., Baumann, R., Gao, X., Mendoza, M., Singh, S., Sand, I.K., ... and Baranzini, S.E. Gut microbiome of multiple sclerosis patients and paired household healthy controls reveal associations with disease risk and course. *Cell* 2022, 185(19), 3467-3486.
- ²²¹ Selma, M.V., Tomás-Barberán, F.A., Beltrán, D., García-Villalba, R., Espín, J.C. *Gordonibacter urolithinifaciens* sp. nov., a urolithin-producing bacterium isolated from the human gut. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64:2346–52.
- ²²² Thirion, F., Sellebjerg, F., Fan, Y., Lyu, L., Hansen, T. H., Pons, N., ... and Pedersen, O. The gut microbiota in multiple sclerosis varies with disease activity. *Genome Medicine* 2023, 15(1), 1-17.
- ²²³ Bronzini, M., Maglione, A., Rosso, R., Matta, M., Masuzzo, F., Rolla, S. and Clerico, M. Feeding the gut microbiome: impact on multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 2023,14:1176016
- ²²⁴ Pérez Carmona N, Fernández Jover E and Sempere AP. Epidemiología de la esclerosis múltiple en España. *Rev Neurol*, 2019;69(1); 32-38.
- ²²⁵ Escala Neurostatus (discapacidad neurológica en pacientes de Esclerosis Múltiple) [Internet]. 2016 [citado 8 julio 2021]. Disponible en: https://www.neurostatus.net/media/specimen/Definitions_0410-2_s.pdf
- ²²⁶ Navarro López, V., Méndez Miralles, M.Á., Vela Yebra, R., Frías Ramos, A., Sánchez Pellicer, P., Ruzafa Costas, B., ... and Navarro Moratalla, L. Gut microbiota as a potential predictive biomarker in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Genes* 2022, 13(5), 930.
- ²²⁷ Fox GE, Magrum LJ, Balch WE, Wolfe RS and Woese CR. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977;74(10); 4537-4541.
- ²²⁸ del Rosario Rodicio, M. and del Carmen Mendoza, M. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 2004;22(4); 238-245.
- ²²⁹ MagNA Pure Compact Instrument [Internet]. 2018 [citado 29 junio 2021]. Disponible en: https://lifescience.roche.com/en_es/products/magna-pure-compact-instrument.html.

- ²³⁰ Qubit Fluorometric Quantification [Internet]. 2021 [citado 29 junio 2021]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>
- ²³¹ Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit [Internet]. 2021 [citado 29 junio 2021]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33230#/Q33230>
- ²³² Sánchez Pellicer, P. Estudio descriptivo de la microbiota intestinal en pacientes con infección por *Clostridium difficile* y en individuos colonizados por *Clostridium difficile* [Doctorado]. Murcia: Universidad Católica de Murcia; 2020; 464 p.
- ²³³ Yuan, S., Cohen, D.B., Ravel, J., Abdo, Z. and Forney, L.J. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PloS one* 2012;7(3); e33865.
- ²³⁴ 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation [Internet]. 2013 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: https://emea.support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html
- ²³⁵ Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glockner, F. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research* 2013; 41(1), e1-e1.
- ²³⁶ Folch Espinosa, W.I. Efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico en la diversidad y abundancia bacteriana de la biopelícula en un modelo in situ de caries [Trabajo de investigación]. Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2019; 69 p.
- ²³⁷ National Human Genome Research Institute [Internet] 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Iniciador-o-cebador>
- ²³⁸ KAPA HiFi DNA Polymerase (Hot Start and Ready Mix formulation) [Internet] 2017 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://rochesequencingstore.com/catalog/kapa-hifi-hotstart-readymix/>
- ²³⁹ Lifesequencing, S.L. Parc Científic de la Universitat de València. [Internet] 2017 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://pcuv.es/es/empresas/biotecnologia/LIFESEQUENCING>
- ²⁴⁰ Sim, N.L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G. and Ng, P.C. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic acids research* 2012;40(W1); W452-W457.
- ²⁴¹ Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México, 2007. pp. 517-526.
- ²⁴² Díaz, A.S., Rentería, L.F., Cortez, J.A. and Palacios, E.S. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 2014;53.
- ²⁴³ AMPure XP kit [Internet] 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.beckman.es/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr>
- ²⁴⁴ Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P7589#/P7589>

-
- ²⁴⁵ 454 Life Sciences GS FLX+ instrument [Internet]. 2011 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.rocke.com/media/releases/med-cor-2011-06-28t.htm>
- ²⁴⁶ Nextera XT index kit v2 [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/nextera-xt-dna.html>
- ²⁴⁷ 2100 Bioanalyzer Instrument [Internet]. 2013 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-instrument/2100-bioanalyzer-instrument-228250>
- ²⁴⁸ MiSeq System [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>
- ²⁴⁹ MiSeq Reagen kit v3 [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/miseq-reagent-kit-v3.html>
- ²⁵⁰ PhiX Control v3 [Internet]. 2013 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/phiX-control-v3.html>
- ²⁵¹ PEAR (Paired-End reAd mergeR) [Internet]. 2013 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://cme.h-its.org/exelixis/web/software/pear/doc.html>
- ²⁵² Cutadapt versión 1.4.123 [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>
- ²⁵³ UCHIME versión 7.0.1001 [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: https://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html
- ²⁵⁴ BLAST.24 versión 2.2.29+ [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download
- ²⁵⁵ Python [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://www.python.org>
- ²⁵⁶ Schmieder, R. and Edwards, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011;27(6);863-864.
- ²⁵⁷ Programa *prinseq-lite* [Internet]. 2013 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <http://prinseq.sourceforge.net>
- ²⁵⁸ Programa DADA2: Fast and accurate sample inference from amplicon data with single-nucleotide resolution [Internet]. 2016 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://benjjneb.github.io/dada2/index.html>
- ²⁵⁹ Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. and Holmes, S.P. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* 2016;13(7); 581.
- ²⁶⁰ QUIME 2 (q2-feature-classifier) [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://github.com/QIIME2/q2-feature-classifier>
- ²⁶¹ Plugin *Community Ecology Package* [Internet]. 2021 [citado 30 junio 2021]. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

- ²⁶² Whittaker, R.H. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 12:213–251.
- ²⁶³ Atlas, R.M.; Bartha, R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson-Addison Wesley, 2002.
- ²⁶⁴ Estimación de la diversidad específica. [Internet] citado el 14 de agosto de 2021. Disponible en: <https://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/ecocomunidades/TPN3Diversidad.pdf>.
- ²⁶⁵ Gotelli, N.J.; Colwell, R.K.. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology letters* 2001; 4(4): 379-391.
- ²⁶⁶ Shannon, C.E. A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal* 1948; 27 (3): 379-423.
- ²⁶⁷ Pla, L. Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia* 2006; 31 (8): 583-590.
- ²⁶⁸ Hill, M.O. Diversity and Evenness: a Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology* 1973; **54**: 427-432.
- ²⁶⁹ Simpson, E.H. Measurement of Diversity. *Nature* 1949; **163**: 688.
- ²⁷⁰ Oksanen, J., Blanchet F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens M.H.H., Wagner, H. Vegan: Community ecology package. [Internet] 2017 [citado 14 agosto 2021]. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>
- ²⁷¹ Ferriol Molina, M. Los componentes alfa, beta y gamma de la biodiversidad. Aplicación al estudio de comunidades vegetales. [Internet]. 2012 [citado 17 agosto 2021]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16285/Microsoft%20Word%20-%20articulo%20docente%20def.pdf?sequence=1>
- ²⁷² Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. [Internet]. 2021 [citado 17 agosto 2021]. Disponible en: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/humboldtAnálisisdatos.pdf>
- ²⁷³ Buttigieg, P. L., and Ramette, A. A guide to statistical analysis in microbial ecology: a community-focused, living review of multivariate data analyses. *FEMS microbiology ecology* 2014, 90(3), 543-550
- ²⁷⁴ Smith, L.I. A tutorial on Principal Components Analysis. [Internet] 2002. Citado el 17 de agosto de 2021. Disponible en: http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf
- ²⁷⁵ Lê, S., Josse, J. and Husson, F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software* 2008; 25 (1): 1-18.
- ²⁷⁶ Pérez Fernández, S. Estimación de la curva ROC acumulativa/dinámica [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Oviedo; 2015.
- ²⁷⁷ Youden, W. J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950, 3(1), 32-35.
- ²⁷⁸ Valle Benavides, A. R. D. Curvas ROC (Receiver-Operating-Characteristic) y sus aplicaciones [Doctorado]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2017.
- ²⁷⁹ Escribano, A.V. Técnicas de secuenciación de nueva generación para el estudio del microbioma humano. Tesis doctoral, Universidad Complutense, 2016.

-
- ²⁸⁰ Xia, Y. and Sun, J. Hypothesis testing and statistical analysis of microbiome. *Genes Dis.* 2017; 4(3): 138-48.
- ²⁸¹ Ondov, B.D., Bergman, N.H., Phillippy, A.M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 2011; 12, 385.
- ²⁸² Banati, M. et al. Antibody response against gastrointestinal antigens in demyelinating diseases of the central nervous system. *European journal of neurology* 2013; 20 (11):1492-1495.
- ²⁸³ Honda, K. and Littman D.R.. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 2016;535.7610: 75-84.
- ²⁸⁴ Takewaki, D., Suda, W., Sato, W., Takayasu, L., Kumar, N., Kimura, K., ... & Yamamura, T. Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2020, 117(36), 22402-22412.
- ²⁸⁵ Forbes, J. D., Chen, C. Y., Knox, N. C., Marrie, R. A., El-Gabalawy, H., de Kievit, T., ... and Van Domselaar, G. A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases-does a common dysbiosis exist. *Microbiome* 2018, 6, 221.
- ²⁸⁶ Castillo-Álvarez, F., Pérez-Matute, P., Oteo, J. A., & Marzo-Sola, M. E. Composición de la microbiota intestinal en pacientes con esclerosis múltiple. Influencia del tratamiento con interferón β -1b. *Neurología* 2021,36(7), 495-503.
- ²⁸⁷ Storm-Larsen, C., Myhr, K-M, Farbu, E., Midgard, R., Nyquist, K., Broch, L., et al. Gut microbiota composition during a 12-week intervention with delayed-release dimethyl fumarate in multiple sclerosis – a pilot trial. *Multiple Sclerosis Journal- Experimental, Translational and Clinical* 2019, October–December, 1–13
- ²⁸⁸ Horton, M. K., McCauley, K., Fadrosch, D., Fujimura, K., Graves, J., Ness, J., ... & US Network of Pediatric MS Centers. Gut microbiome is associated with multiple sclerosis activity in children. *Annals of clinical and translational neurology* 2021, 8(9), 1867-1883.
- ²⁸⁹ Zeng, Q., Gong, J., Liu, X., Chen, C., Sun, X., Li, H., ... and Lu, Y. Gut dysbiosis and lack of short chain fatty acids in a Chinese cohort of patients with multiple sclerosis. *Neurochemistry international* 2019, 129, 104468

X – ANEXOS

ANEXO 1. Hoja de información del estudio

HOJA DE INFORMACIÓN

Nos ponemos en contacto con usted para informarle de una ampliación del proyecto de investigación **“ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON TRATAMIENTO PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE-RECURRENTE”** en el que participó.

Para continuar con la investigación de la relación de la microbiota y la dieta con la esclerosis múltiple, necesitamos de nuevo de su colaboración.

Solicitamos una nueva muestra de heces, tanto de usted como de alguien que con quien conviva (ya sea pareja, familiar, etc.), así como información sobre la dieta que siguen habitualmente. Con esta nueva muestra pretendemos comparar si existen diferencias entre ambos.

Esta ampliación sigue las mismas directrices a las que se ajustaba el proyecto de investigación. Así mismo, el tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, de Protección de Datos de Carácter Personal. El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización.

Si finalmente deciden participar, es necesario que, tanto usted como la persona con la que convive, firmen un consentimiento.

Pueden realizar las preguntas y solicitar toda la información que consideren pertinente poniéndose en contacto con su médico:

Investigador: _____

Teléfono de contacto: _____

ANEXO 2. Consentimiento informado del estudio

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON TRATAMIENTO PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE-RECURRENTE”

Centro: _____

Investigador: _____

Yo, D/D^a _____, con DNI

_____, en calidad de: Paciente

Familiar sano

He sido informado sobre el estudio arriba indicado por el investigador

Declaro que:

- Se me ha propuesto participar.
- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio y mi participación.
- He recibido suficiente información, se me ha respondido convenientemente y lo he entendido.

Comprendo que:

- Mi participación es voluntaria.
- Puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Así, presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Accedo a que las muestras obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio):

SÍ NO

En _____, a ____ de _____ de _____

Participante

(Nombre y firma)

Investigador

(Nombre y firma)

Fdo.: _____

Fdo.: _____

Este documento debe ser cumplimentado y firmado por duplicado.

Una de las copias debe permanecer en posesión del paciente, y la otra quedará bajo custodia del investigador.

ANEXO 3. Certificado de aprobación del comité de ética



COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

DATOS DEL PROYECTO

Título:	"La Microbiota Intestinal como Marcador Pronóstico en la Esclerosis Múltiple"	
Investigador Principal	Nombre	Correo-e
Dr.	Vicente Navarro López	vnavarro@ucam.edu

INFORME DEL COMITÉ

Fecha	28/02/2020	Código	CE022002
--------------	------------	---------------	----------

Tipo de Experimentación

Investigación experimental clínica con seres humanos	X
Investigación experimental no clínica con seres humanos	
Utilización de tejidos humanos procedentes de pacientes, personas sanas, tejidos embrionarios o fetales	X
Utilización de tejidos humanos, tejidos embrionarios o fetales procedentes de bancos de muestras o tejidos	
Investigación observacional con seres humanos, psicológica o comportamental en humanos	
Uso de datos personales, información genética, etc.	X
Experimentación animal	
Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o las plantas	
Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs)	

Comentarios Respecto al Tipo de Experimentación

Nada Obsta

Comentarios Respecto a la Metodología de Experimentación

Nada Obsta





COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

Sugerencias al Investigador

A la vista de la solicitud de informe adjunto por el Investigador y de las recomendaciones anteriormente expuestas el dictamen del Comité es:

Emitir Informe Favorable	<input checked="" type="checkbox"/>
Emitir Informe Desfavorable	<input type="checkbox"/>
Emitir Informe Favorable condicionado a Subsanación	<input type="checkbox"/>

MOTIVACIÓN
Incrementará conocimientos en su área

Vº Bº El Presidente,

Fdo.: José Alberto Cánovas Sánchez

El Secretario,



Fdo.: José Alarcón Teruel

ANEXO 4. Cuestionario de dieta y estilo de vida.

**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN
PACIENTES CON TRATAMIENTO PARA LA
ESCLEROSIS MÚLTIPLE RECURRENTE-
REMITENTE**

**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN
PACIENTES CON TRATAMIENTO PARA LA
ESCLEROSIS MÚLTIPLE RECURRENTE-
REMITENTE**

Nº Paciente	
Centro	
Fecha de recogida de datos	

VALORES ANTROPOMÉTRICOS

Peso (kg)	
Estatura (m)	
IMC (kg/m²)	
Perímetro (cm)	
Cintura	
Cadera	
Índice cintura-cadera	
Pliegues cutáneos (mm)	
Bicipital	
Tricipital	
Subescapular	
Supraileaco	
Muslo	
Abdominal	
Pecho	
Axilar	
Pierna	

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA¹

Por favor, responda de manera sincera al siguiente cuestionario sobre su dieta habitual y a las siguientes preguntas relacionadas con su actividad física y estilo de vida. Tenga en cuenta que no hay respuestas correctas/incorrectas, por lo que únicamente deberá contestar de forma fiel a la realidad.

Para cada alimento, señalar cuántas veces como media ha tomado la cantidad que se indica. Debe tener en cuenta las veces que toma el alimento solo y cuando lo añade a otro tipo de alimento o plato. Por ejemplo, en el caso del huevo, considere cuando lo toma solo (ej.: frito) y cuando lo toma añadido o mezclado con otros platos. Si en el último año ha venido comiendo una tortilla de 2 huevos cada semana, deberá marcar "2-4 por semana".

Para alimentos que se consumen por temporadas, rellenar la casilla "Observaciones" escribiendo cuántas veces lo consume de media y durante cuánto tiempo (ej.: si come melón 4 veces por semana solo en verano, escriba "melón: 4 veces/semana durante 3 meses").

GRUPO DE ALIMENTOS	CONSUMO MEDIO DURANTE EL ÚLTIMO AÑO								
	Nunca/ <1/mes	1-3/ mes	1/sem	2-4/ sem	5-6/ sem	1/día	2-3/ día	4-5/ día	>6/dí a
Lácteos enteros									
Lácteos semi/ desnatados									
Huevos									
Carnes magras									
Carnes grasas									
Pescado blanco									
Pescado azul									
Verduras									
Frutos secos									
Legumbres									
Aceite de oliva									
Otras grasas									
Cereales refinados									
Cereales integrales									
Repostería industrial									
Azúcares									
Alcohol									
Agua									

¹ Goni Mateos L, Aray Miranda M, Martínez A and Cuervo Zapatel M. Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo de grupos de alimentos basado en un sistema de intercambios. *Nutrición Hospitalaria* 2016;33(6): 1391-1399.

CUESTIONARIO

Por favor, rodee con un círculo la respuesta que más se ajuste a usted:

❖ *Alimentación*

1. **¿Ha seguido algún tipo de dieta en el último año?** *(Si responde NO, pase a la pregunta 3)*

- a. No b. Sí c. NS/NC

2. **¿Podría indicar el motivo de seguir esta dieta?** Puede marcar más de una respuesta.

- a. Para controlar su peso
 b. Porque tiene colesterol
 c. Porque tiene azúcar o diabetes
 d. Porque tiene problemas de estómago
 e. Porque tiene problemas de vesícula o hígado
 f. Porque tiene problemas de tensión alta o de corazón
 g. Porque tiene problemas de riñón
 h. Porque tiene alergia a algunos alimentos
 i. Porque tiene ácido úrico o gota
 j. Porque es vegetariana
 k. Por otro motivo. ¿Cuál?:

3. **Durante el último año, ¿ha cambiado su ingesta para los siguientes grupos de alimentos, con respecto al año anterior (2017)?** *(Marque con una X)*

	Eliminado	Reducido	Igual	Aumentado	NS/NC
a. Lácteos y derivados					
b. Huevos					
c. Carne					
d. Pescado					
e. Verduras					
f. Legumbres					
g. Frutas					
h. Pan					
i. Aceite de oliva					
j. Mantequilla/margarina					
k. Azúcar/dulces					
l. Bebidas alcohólicas					

4. **¿Con qué frecuencia come alimentos fritos?**
 a. A diario.
 b. 5-6 veces por semana.
 c. 2-4 veces por semana.
 d. 1 vez por semana.
 e. Menos de 1 vez por semana.
5. **¿Qué hace con la grasa visible cuando come carne?**
 a. La quita toda.
 b. Quita la mayoría.
 c. Quita un poco.
 d. No quita nada.
 e. NS/NC
6. **¿Cómo suele comer la carne?**
 a. A la plancha
 b. Asada (horno)
 c. Frita en aceite
 d. Guisada

7. **¿Qué clase de grasa o aceite usa para...? (Marque con una X)**

	Mantequilla	Margarina	Aceite de oliva	Aceite de oliva virgen	Otro aceite vegetal	Mezcla de aceites
ALI ÑAR						
COC INAR						
FRE ÍR						

◆ *Actividad física y ejercicio*

1. Durante el último año, ¿podría indicar cuántas horas al día suele dormir, incluida la siesta?
 _____ horas
2. ¿Cuántos minutos de siesta suele dormir al día?
 _____ min

3. ¿Cuántas horas ve la televisión a la semana aproximadamente?

_____ horas

4. En su actividad en el trabajo u ocupación principal está...

- a. Casi siempre sentado
- b. Sentado la mitad del tiempo
- c. Casi siempre de pie, quieto
- d. Casi siempre caminando, levantando y llevando pocas cosas
- e. Casi siempre caminando, levantando y llevando muchas cosas
- f. Trabajo manual pesado

5. ¿Cuánto tiempo camina o hace bicicleta al día?

- a. Casi nunca
- b. Menos de 20 minutos al día
- c. 20-40 minutos al día
- d. 40-60 minutos al día
- e. Entre 1 y 1 hora y media al día
- f. Más de 1 hora y media al día

6. ¿Cuánto tiempo dedica a actividades o tareas en casa?

- a. Menos de 1 hora al día
- b. 1-2 horas / día
- c. 3-4 horas / día
- d. 5-6 horas / día
- e. 7-8 horas / día
- f. Más de 8 horas / día

7. En su tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a ver televisión, ordenador o leer?

- a. Menos de 1 hora al día
- b. 1 hora / día
- c. 2 horas / día
- d. 3 horas / día
- e. 4 horas / día
- f. 5-6 horas / día
- g. Más de 6 horas / día

8. En su tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a hacer ejercicio o deporte?

- a. Menos de 1 hora a la semana
- b. 1 hora / semana
- c. 2 horas / semana
- d. 3 horas / semana
- e. 4-5 horas / semana
- f. Más de 5 horas / semana

9. Considerando toda su actividad física (trabajo u ocupación principal, hogar y tiempo libre), ¿cómo se considera?

- a. Sedentario/a (sentado/a casi siempre, sin actividad física, sin deporte, bajo cuidados).
- b. Poco/a activo/a (profesiones o actividades sentadas, amas de casa con electrodomésticos, escaso deporte).
- c. Moderadamente activo/a (trabajos manuales, amas de casa sin electrodomésticos, deporte ligero).
- d. Bastante activo/a (trabajos o actividades de pie-andando, deporte intenso).
- e. Muy activo/a (trabajo muy vigoroso, deporte fuerte diario).
- f. NS/NC



Otras cuestiones de interés

1. ¿Convive con alguna mascota?

- a. Sí. ¿Cuál/es?: _____
- b. No.

2. ¿Vive en un entorno urbano (ciudad) o rural (casa en el campo)? ¿Desde cuándo aproximadamente?

- a. Urbano. Tiempo: _____
- b. Rural. Tiempo: _____

3. Sobre sus primeros años de vida:

a. Nació mediante:

- Parto natural
- Cesárea
- NS/NC

b. La alimentación recibida durante sus primeros meses de vida fue:

- Lactancia materna
- Leche de fórmula
- NS/NC

ANEXO 5. Modelo NEUROSTATUS (escala EDSS)

1. VISUAL (OPTIC) FUNCTIONS

VISUAL ACUITY

The visual acuity score is based on the line in the Snellen chart at 20 feet (5 meters) for which the patient makes no more than one error, using best available correction. Alternatively, best corrected near vision can be assessed, but this should be noted and consistently performed during follow-up examinations. Switching from near to distance visual acuity measurements should be avoided in follow-up examinations.

VISUAL FIELDS

- 0** **normal**
- 1** **signs only:** deficits present only on formal (confrontational) testing
- 2** **moderate:** patient aware of deficit, but incomplete hemianopsia on examination
- 3** **marked:** complete homonymous hemianopsia or equivalent

SCOTOMA

- 0** **none**
- 1** **small:** detectable only on formal (confrontational) testing
- 2** **large:** spontaneously reported by patient

* DISC PALLOR

- 0** **not present**
- 1** **present**

NOTE

When determining the EDSS step, the Visual FS score must be converted to a lower score as follows:

Visual FS Score		6	5	4	3	2	1
Converted Visual FS Score	4	3	3	2	2	2	1

FUNCTIONAL SYSTEM SCORE

- 0** normal
- 1** disc pallor and / or small scotoma and / or visual acuity (corrected) of worse eye less than 20 / 20 (1.0) but better than 20 / 30 (0.67)
- 2** worse eye with maximal visual acuity (corrected) of 20 / 30 to 20 / 59 (0.67 – 0.34)
- 3** worse eye with large scotoma and/or moderate decrease in fields and/or maximal visual acuity (corrected) of 20 / 60 to 20 / 99 (0.33 – 0.21)
- 4** worse eye with marked decrease of fields and/or maximal visual acuity (corrected) of 20 / 100 to 20 / 200 (0.2 – 0.1); grade 3 plus maximal acuity of better eye of 20 / 60 (0.33) or less 5 worse eye with maximal visual acuity (corrected) less than 20 / 200 (0.1); grade 4 plus maximal acuity of better eye of 20 / 60 (0.33) or less 6 grade 5 plus maximal visual acuity of better eye of 20 / 60 (0.33) or less

2 BRAINSTEM FUNCTIONS

EXTRAOCULAR MOVEMENTS (EOM) IMPAIRMENT

- | | |
|---|---|
| 0 | none |
| 1 | signs only: subtle and barely clinically detectable EOM weakness, patient does not complain of blurry vision, diplopia or discomfort |
| 2 | mild: subtle and barely clinically detectable EOM weakness of which patient is aware; or obvious incomplete paralysis of any eye movement of which patient is not aware |
| 3 | moderate: obvious incomplete paralysis of any eye movement of which patient is aware; or complete loss of movement in one direction of gaze in either eye |
| 4 | marked: complete loss of movement in more than one direction of gaze in either eye |
-

NYSTAGMUS

- | | |
|---|--|
| 0 | none |
| 1 | signs only or mild: gaze evoked nystagmus below the limits of "moderate" (equivalent to a Brainstem FS score of 1) |
| 2 | moderate: sustained nystagmus on horizontal or vertical gaze at 30 degrees, but not in primary position, patient may or may not be aware of the disturbance |
| 3 | severe: sustained nystagmus in primary position or coarse persistent nystagmus in any direction that interferes with visual acuity; complete internuclear ophthalmoplegia with sustained nystagmus of the abducting eye; oscillopsia |
-

TRIGEMINAL DAMAGE

- | | |
|---|---|
| 0 | none |
| 1 | signs only |
| 2 | mild: clinically detectable numbness of which patient is aware |
| 3 | moderate: impaired discrimination of sharp / dull in one, two or three trigeminal branches; trigeminal neuralgia (at least one attack in the last 24 hours) |
| 4 | marked: unable to discriminate between sharp / dull or complete loss of sensation in entire distribution of one or both trigeminal nerves |
-

FACIAL WEAKNESS

- | | |
|---|---|
| 0 | none |
| 1 | signs only |
| 2 | mild: clinically detectable facial weakness of which patient is aware |
| 3 | moderate: incomplete facial palsy, such as weakness of eye closure that requires patching overnight or weakness of mouth closure that results in drooling |
| 4 | marked: complete unilateral or bilateral facial palsy with lagophthalmus or difficulty with liquids |
-

HEARING LOSS

- 0 none
 - 1 signs only: hears finger rub less in one or both sides and has lateralized Weber test but does not complain of any hearing problem
 - 2 mild: as in 1 but is aware of hearing problem
 - 3 moderate: does not hear finger rub on one or both sides, misses several whispered numbers
 - 4 marked: misses all or nearly all whispered numbers
-

DYSARTHRIA

- 0 none
 - 1 signs only
 - 2 mild: clinically detectable dysarthria of which patient is aware
 - 3 moderate: obv. dysarthria during ordinary conversation that impairs comprehensibility
 - 4 marked: incomprehensible speech
 - 5 inability to speak
-

DYSPHAGIA

- 0 none
 - 1 signs only
 - 2 mild: difficulty with thin liquids
 - 3 moderate: difficulty with liquids and solid food
 - 4 marked: sustained difficulty with swallowing; requires a pureed diet
 - 5 inability to swallow
-

OTHER CRANIAL NERVE FUNCTIONS

- 0 normal
 - 1 signs only
 - 2 mild disability: clinically detectable deficit of which patient is usually aware
 - 3 moderate disability
 - 4 marked disability
-

FUNCTIONAL SYSTEM SCORE

- 0 normal
 - 1 signs only
 - 2 moderate nystagmus and / or moderate EOM impairment and / or other mild disability
 - 3 severe nystagmus and / or marked EOM impairment and / or moderate disability of other cranial nerves
 - 4 marked dysarthria and / or other marked disability
 - 5 inability to swallow or speak
-

3 PYRAMIDAL FUNCTIONS

REFLEXES

0	absent
1	diminished
2	normal
3	exaggerated
4	nonsustained clonus (a few beats of clonus)
5	sustained clonus

CUTANEOUS REFLEXES

0	normal
1	weak
2	absent

* PALMOMENTAL REFLEX

0	absent
1	present

PLANTAR RESPONSE

0	flexor
1	neutral or equivocal
2	extensor

LIMB STRENGTH

The weakest muscle in each group defines the score for that muscle group. Use of optional functional tests (hopping on one foot and walking on heels / toes), is highly recommended in order to assess BMRC grades 3 – 5.

BMRC RATING SCALE

0	no muscle contraction detected
1	visible contraction without visible joint movement
2	visible movement only on the plane of gravity
3	active movement against gravity, but not against resistance
4	active movement against resistance, but not full strength
5	normal strength

FUNCTIONAL TESTS

* Pronator Drift (upper extremities) Pronation and downward drift:

- 0 none
- 1 mild
- 2 evident

* Position Test (lower extremities – ask patient to lift both legs together, with legs fully extended at the knee)

Sinking:

- 0 none
- 1 mild
- 2 evident
- 3 able to lift only one leg at a time (grade from the horizontal pos. at the hip joints ...°)
- 4 unable to lift one leg at a time

* Walking on heels / toes

- 0 normal
- 1 impaired
- 2 not possible

LIMB SPASTICITY (AFTER RAPID FLEXION OF THE EXTREMITY)

- 0 none
- 1 mild: barely increased muscle tone
- 2 moderate: moderately increased muscle tone that can be overcome and full range of motion is possible
- 3 severe: severely increased muscle tone that is extremely difficult to overcome and full range of motion is not possible
- 4 contracted

GAIT SPASTICITY

- 0 none
- 1 barely perceptible
- 2 evident: minor interference with function
- 3 permanent shuffling: major interference with function

OVERALL Motor performance

- 0 normal
 - 1 abnormal weakness (as compared to peers) in performing more demanding tasks, e.g. when walking longer distances, but no reduction in limb strength on formal (confrontational) testing
 - 2 Reduction in strength of individual muscle groups at confrontational testing
-

FUNCTIONAL SYSTEM SCORE

- 0 normal
 - 1 abnormal signs without disability
 - 2 minimal disability: patient complains of motor-fatigability or reduced performance in strenuous motor tasks (motor performance grade 1) and/or BMRC grade 4 in one or two muscle groups
 - 3 mild to moderate paraparesis or hemiparesis: usually BMRC grade 4 in more than two muscle groups; and/or BMRC grade 3 in one or two muscle groups (movements against gravity are possible); and/or severe monoparesis: BMRC grade 2 or less in one muscle group
 - 4 marked paraparesis or hemiparesis: usually BMRC grade 2 in two limbs or monoplegia with BMRC grade 0 or 1 in one limb; and/or moderate tetraparesis: BMRC grade 3 in three or more limbs
 - 5 paraplegia: BMRC grade 0 or 1 in all muscle groups of the lower limbs; and/or marked tetraparesis: BMRC grade 2 or less in three or more limbs; and / or hemiplegia;
 - 6 tetraplegia: BMRC grade 0 or 1 in all muscle groups of the upper and lower limbs
-

4 CEREBELLAR FUNCTIONS

HEAD TREMOR

- 0 none
 - 1 mild
 - 2 moderate
 - 3 severe
-

TRUNCAL ATAXIA

- 0 none
 - 1 signs only
 - 2 mild: swaying with eyes closed
 - 3 moderate: swaying with eyes open
 - 4 severe: unable to sit without assistance
-

LIMB ATAXIA (TREMOR/DYSMETRIA AND RAPID ALTERNATING MOVEMENTS)

- 0 none
 - 1 signs only
 - 2 mild: tremor or clumsy movements easily seen, minor interference with function
 - 3 moderate: tremor or clumsy movements interfere with function in all spheres
 - 4 severe: most functions are very difficult
-

TANDEM (STRAIGHT LINE) WALKING

- 0 normal
 - 1 impaired
 - 2 not possible
-

GAIT ATAXIA

- 0 none
 - 1 signs only
 - 2 mild: problems with balance realized by patient and/or significant other
 - 3 moderate: abnormal balance with ordinary walking
 - 4 severe: unable to walk more than a few steps unassisted or requires a walking aid or assistance by another person because of ataxia
-

ROMBERG TEST

- 0 normal
 - 1 mild: mild instability with eyes closed
 - 2 moderate: not stable with eyes closed
 - 3 severe: not stable with eyes open
-

OTHER CEREBELLAR TESTS

- 0 normal
- 1 mild abnormality
- 2 moderate abnormality
- 3 severe abnormality

NOTE

The presence of severe gait and/or truncal ataxia alone (without severe ataxia in three or four limbs) results in a Cerebellar FS score of 3. If weakness or sensory deficits interfere with the testing of ataxia, score the patient's actual performance. To indicate the possible role of weakness make an "X" after the Cerebellar FS score.

FUNCTIONAL SYSTEM SCORE

- 0 normal
 - 1 abnormal signs without disability
 - 2 mild ataxia and/or moderate station ataxia (Romberg) and / or tandem walking not possible
 - 3 moderate limb ataxia and / or moderate or severe gait/truncal ataxia
 - 4 severe gait/truncal ataxia and severe ataxia in three or four limbs
 - 5 unable to perform coordinated movements due to ataxia
 - X pyramidal weakness (BMRC grade 3 or worse in limb strength) or sensory deficits interfere with cerebellar testing
-

5 SENSORY FUNCTIONS

SUPERFICIAL SENSATION (LIGHT TOUCH AND PAIN)

- | | |
|---|---|
| 0 | normal |
| 1 | signs only: slightly diminished sensation (temperature, figure-writing) on formal testing of which patient is not aware |
| 2 | mild: patient is aware of impaired light touch or pain, but is able to discriminate sharp / dull |
| 3 | moderate: impaired discrimination of sharp / dull |
| 4 | marked: unable to discriminate between sharp / dull and / or unable to feel light touch |
| 5 | complete loss: anaesthesia |

VIBRATION SENSE (AT THE MOST DISTAL JOINT)

- | | |
|---|---|
| 0 | normal |
| 1 | mild: graded tuning fork 5 – 7 of 8; alternatively, detects more than 10 seconds but less than the examiner |
| 2 | moderate: graded tuning fork 1 – 4 of 8; alternatively, detects between 2 and 10 sec. |
| 3 | marked: complete loss of vibration sense |

POSITION SENSE

- | | |
|---|--|
| 0 | normal |
| 1 | mild: 1 – 2 incorrect responses, only distal joints affected |
| 2 | moderate: misses many movements of fingers or toes; proximal joints affected |
| 3 | marked: no perception of movement, astasia |

* LHERMITTE'S SIGN (Does not contribute to the Sensory FS score)

- | | |
|---|----------|
| 0 | negative |
| 1 | positive |

* PARAESTHESIAE (TINGLING) (Does not contribute to the Sensory FS score)

- | | |
|---|---------|
| 0 | none |
| 1 | present |

FUNCTIONAL SYSTEM SCORE

- | | |
|---|--|
| 0 | normal |
| 1 | mild vibration or figure-writing or temperature decrease only in one or two limbs |
| 2 | mild decrease in touch or pain or position sense or moderate decrease in vibration in one or two limbs; and/or mild vibration or figure-writing or temperature decrease alone in more than two limbs |
| 3 | moderate decrease in touch or pain or position sense or marked reduction of vibration in one or two limbs; and/or mild decrease in touch or pain or moderate decrease in all proprioceptive tests in more than two limbs |
| 4 | marked decrease in touch or pain in one or two limbs; and/or moderate decrease in touch or pain and/or marked reduction of proprioception in more than two limbs |
| 5 | loss (essentially) of sensation in one or two limbs; and/or moderate decrease in touch or pain and / or marked reduction of proprioception for most of the body below the head |
| 6 | sensation essentially lost below the head |

6 BOWEL AND BLADDER FUNCTIONS

URINARY HESITANCY AND RETENTION

- 0 none
- 1 mild: no major impact on lifestyle
- 2 moderate: urinary retention; frequent urinary tract infections
- 3 severe: requires catheterisation
- 4 loss of function: overflow incontinence

URINARY URGENCY AND INCONTINENCE

- 0 none
- 1 mild: no major impact on lifestyle
- 2 moderate: rare incontinence occurring no more than once a week; must wear pads
- 3 severe: frequent incontinence occurring from several times a week to more than once a day; must wear urinal or pads
- 4 loss of function: loss of bladder control

BLADDER CATHETERISATION

- 0 none
- 1 intermittent self-catheterisation
- 2 constant catheterisation

BOWEL DYSFUNCTION

- 0 none
- 1 mild: no incontinence, no major impact on lifestyle, mild constipation
- 2 moderate: must wear pads or alter lifestyle to be near lavatory
- 3 severe: in need of enemata or manual measures to evacuate bowels
- 4 complete loss of function

* SEXUAL DYSFUNCTION

MALE

- 0 none
- 1 mild: difficulty to maintain erection during intercourse, but achieves erection and still has intercourse
- 2 moderate: difficulty to achieve erection, decrease in libido, still has intercourse and reaches orgasm
- 3 severe: marked decrease in libido, inability to achieve full erection, intercourse with difficulty and hypoorgasmia
- 4 loss of function

FEMALE

- 0 none
 - 1 mild: mild lack of lubrication, still sexually active and reaches orgasm
 - 2 moderate: dysparunia, hypoorgasmia, decrease in sexual activity
 - 3 severe: marked decrease in sexual activity, anorgasmia
 - 4 loss of function
-

NOTE

When determining the EDSS step, the Bowel and Bladder FS score must be converted to a lower score as follows:

Bowel and Bladder FS Score	6	5	4	3	2	1
Converted Bowel and Bladder FS Score				5	4	3
				3	2	1

Sexual dysfunction can be documented but in general does not impact on FS score because of obvious difficulties in assessment by examining physician

FUNCTIONAL SYSTEM SCORE

- 0 normal
 - 1 mild urinary hesitancy, urgency and / or constipation
 - 2 moderate urinary hesitancy/retention and / or moderate urinary urgency/incontinence and /or moderate bowel disfunction
 - 3 frequent urinary incontinence or intermittent self-catheterisation; needs enemata or manual measures to evacuate bowels
 - 4 in need of almost constant catheterisation
 - 5 loss of bladder or bowel function; external or indwelling catheter
 - 6 loss of bowel and bladder function
-

7 CEREBRAL FUNCTIONS

° DEPRESSION AND EUPHORIA

- 0 none
- 1 present: Patient complains of depression or is considered depressed or euphoric by the investigator or significant other.

° depression and euphoria are documented on the scoring sheet but are not taken into consideration for FS and EDSS calculation.

DECREASE IN MENTATION

- 0 none
 - 1 signs only: not apparent to patient and / or significant other
 - 2 mild: Patient and / or significant other report mild changes in mentation. Examples include: impaired ability to follow a rapid course of association and in surveying complex matters; impaired judgement in certain demanding situations; capable of handling routine daily activities, but unable to tolerate additional stressors; intermittently symptomatic even to normal levels of stress; reduced performance; tendency toward negligence due to obliviousness or fatigue.
 - 3 moderate: definite abnormalities on brief mental status testing, but still oriented to person, place and time
 - 4 marked: not oriented in one or two spheres (person, place or time), marked effect on lifestyle
 - 5 dementia, confusion and/or complete disorientation
-

+ FATIGUE

- 0 none
- 1 mild: does not usually interfere with daily activities
- 2 moderate: interferes, but does not limit daily activities for more than 50 %
- 3 severe: significant limitation in daily activities (> 50 % reduction)

+ Because fatigue is difficult to evaluate objectively, in some studies it does not contribute to the Cerebral FS score or EDSS step. Please adhere to the study's specific instructions.

FUNCTIONAL SYSTEM SCORE

- 0 normal
 - 1 signs only in decrease in mentation; mild fatigue
 - 2 mild decrease in mentation; moderate or severe fatigue
 - 3 moderate decrease in mentation
 - 4 marked decrease in mentation
 - 5 dementia
-

8 AMBULATION

Unrestricted ambulation means the patient is able to walk a distance without assistance that is regarded as normal, compared with healthy individuals of similar age and physical condition. In this case the EDSS step can be anything between 0 and 5.0, depending on the FS scores.

Fully ambulatory means at least 500 meters of ambulation without assistance, but not unrestricted. The EDSS step can be anything between 2.0 and 5.0, depending on the FS scores. In this case, the pyramidal and / or cerebellar FS must be $\square 2$ to reflect this "restriction" of ambulation.

If ambulation is < 500 meters, the EDSS step must be > 4.5 depending on the walking ranges provided by the ambulation score (see next page) and combination of FS scores. EDSS steps 5.5 to 8.0 are exclusively defined by the ability to ambulate and type of assistance required, or the ability to use a wheelchair.

If assistance is needed, the definitions of EDSS steps 6.0 or 6.5 include both a description of the type of assistance required when walking and the walking range. Assistance by another person is equivalent to bilateral assistance.

NOTE

The ambulation score represents both a description of walking range and the type of assistance required for ambulation. The score replaces the former use of several checkboxes (paragraph 8 ambulation on the scoring sheet) but does NOT introduce new definitions.

The use of wheelchair can now be scored on the scoring sheet.

Please indicate the reported distance and time for the patient in the appropriate field on the scoring sheet, followed by the type of assistance and the walking distance measured during the assessment.

DISTANCE AND TIME REPORTED BY PATIENT

Maximal unassisted walking distance reported by patient (in meters) without rest or assistance and time required to walk max. distance according to patient (in minutes)

ASSISTANCE

- | | |
|---|--|
| 0 | Without help or assistance (allowing the use of an ankle foot orthotic device, without any other type of assistive device) |
| 1 | Unilateral assistance: one stick / crutch / brace |
| 2 | Bilateral assistance: two sticks / crutches / braces or assistance by another person |
| 3 | Wheelchair |

DISTANCE

Measure the distance the patient is able to walk in meters.

Unassisted: observe the patient walking unassisted for a minimum distance of 500 meters and measure the time needed, if possible.

Assisted: observe the patient walking with the assistive device or help by another person for a minimum distance of 130 meters, if possible.

AMBULATION SCORE

- | | |
|----|---|
| 0 | Unrestricted |
| 1 | Fully ambulatory |
| 2 | > 300 meters, but < 500 meters, without help or assistance (EDSS 4.5 or 5.0) |
| 3 | > 200 meters, but < 300 meters, without help or assistance (EDSS 5.0) |
| 4 | > 100 meters, but < 200 meters, without help or assistance (EDSS 5.5) |
| 5 | Walking range < 100 meters without assistance (EDSS 6.0) |
| 6 | unilateral assistance, > 50 meters (EDSS 6.0) |
| 7 | bilateral assistance, > 120 meters (EDSS 6.0) |
| 8 | unilateral assistance, < 50 meters (EDSS 6.5) |
| 9 | bilateral assistance, > 5 meters, but < 120 meters (EDSS 6.5) |
| 10 | Uses wheelchair without help; unable to walk 5 meters even with aid, essentially restricted to wheelchair; wheels self and transfers alone; up and about in wheelchair some 12 hours a day (EDSS 7.0) |
| 11 | Uses wheelchair with help; unable to take more than a few steps; restricted to wheelchair; may need some help in transferring and in wheeling self (EDSS 7.5) |
| 12 | essentially restricted to bed or chair or perambulated in wheelchair, but out of bed most of day; retains many self-care functions; generally has effective use of arms (EDSS 8.0) |
-

9 EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE

0	Normal neurological exam (all FS grade 0)
1.0	No disability, minimal signs in one FS (one FS grade 1)
1.5	No disability, minimal signs in more than one FS (more than one FS grade 1)
2.0	Minimal disability in one FS (one FS grade 2, others 0 or 1)
2.5	Minimal disability in two FS (two FS grade 2, others 0 or 1)
3.0	Moderate disability in one FS (one FS grade 3, others 0 or 1) though fully ambulatory; or mild disability in three or four FS (three / four FS grade 2, others 0 or 1) though fully ambulatory
3.5	Fully ambulatory but with moderate disability in one FS (one FS grade 3) and mild disability in one or two FS (one / two FS grade 2) and others 0 or 1; or fully ambulatory with two FS grade 3 (others 0 or 1); or fully ambulatory with five FS grade 2 (others 0 or 1)
4.0	Ambulatory without aid or rest for \$500 meters; up and about some 12 hours a day despite relatively severe disability consisting of one FS grade 4 (others 0 or 1) or combinations of lesser grades exceeding limits of previous steps
4.5	Ambulatory without aid or rest for \$300 meters; up and about much of the day, characterised by relatively severe disability usually consisting of one FS grade 4 and combination of lesser grades exceeding limits of previous steps
5.0	Ambulatory without aid or rest for \$200 meters (usual FS equivalents include at least one FS grade 5, or combinations of lesser grades usually exceeding specifications for step 4.5)
5.5	Ambulatory without aid or rest for \$100 meters
6.0	Unilateral assistance (cane or crutch) required to walk at least 100 meters with or without resting (see chapter 8, Ambulation)
6.5	Constant bilateral assistance (canes or crutches) required to walk at least 20 meters without resting (see chapter 8, Ambulation)
7.0	Unable to walk 5 meters even with aid, essentially restricted to wheelchair; wheels self and transfers alone; up and about in wheelchair some 12 hours a day
7.5	Unable to take more than a few steps; restricted to wheelchair; may need some help in transferring and in wheeling self
8.0	Essentially restricted to bed or chair or perambulated in wheelchair, but out of bed most of day; retains many self-care functions; generally has effective use of arms
8.5	Essentially restricted to bed much of the day; has some effective use of arm(s); retains some self-care functions
9.0	Helpless bed patient; can communicate and eat
9.5	Totally helpless bed patient; unable to communicate effectively or eat/swallow
10.	Death due to MS.

ANEXO 6. Medidas centrales de cada género de los pacientes*Tabla 36. Medidas centrales de cada género de los pacientes (continuación)*

Géneros Grupo de pacientes	Mediana	p25	p75
g__Erysipelatoclostridium	0,11	0,01	0,39
g__Ruminococcaceae UCG-010	0,10	0,00	0,54
g__Escherichia-Shigella	0,09	0,01	0,60
g__Barnesiella	0,09	0,02	1,21
g__Ruminiclostridium 9	0,09	0,05	0,13
g__UBA1819	0,08	0,03	0,24
g__[Eubacterium] xylanophilum group	0,08	0,00	0,27
g__Odoribacter	0,08	0,01	0,12
g__Flavonifractor	0,07	0,03	0,35
g__Desulfovibrio	0,07	0,00	0,47
g__Bilophila	0,06	0,04	0,26
g__[Eubacterium] eligens group	0,06	0,01	0,16
g__uncultured	0,06	0,01	0,21
g__Negativibacillus	0,05	0,00	0,10
g__[Eubacterium] nodatum group	0,04	0,00	0,10
g__Actinomyces	0,04	0,02	0,05
g__Ruminococcaceae UCG-004	0,04	0,03	0,11
g__Solobacterium	0,04	0,01	0,10
g__Romboutsia	0,04	0,00	0,06
g__Butyricimonas	0,03	0,00	0,16
g__Anaerostipes	0,03	0,00	0,12
g__Holdemania	0,03	0,02	0,05
g__Ruminococcaceae UCG-003	0,03	0,00	0,23
g__Dialister	0,03	0,00	8,50
g__GCA-900066225	0,02	0,01	0,11
g__Faecalitalea	0,02	0,00	0,13
g__Anaerotruncus	0,02	0,01	0,04
g__Lachnospiraceae UCG-010	0,02	0,00	0,20
g__DTU089	0,02	0,01	0,09
g__Intestinimonas	0,02	0,00	0,13
g__Candidatus Soleaferrea	0,02	0,01	0,03
g__Parasutterella	0,02	0,01	0,09
g__Lachnospira	0,02	0,00	0,10
g__Coprococcus 1	0,02	0,00	0,04
g__Family XIII UCG-001	0,02	0,00	0,03

g__Defluviitaleaceae UCG-011	0,02	0,00	0,05
g__GCA-900066575	0,02	0,01	0,04
g__UC5-1-2E3	0,02	0,00	0,03
g__Oxalobacter	0,02	0,00	0,06
g__[Ruminococcus] gnavus group	0,01	0,00	0,17
g__Shuttleworthia	0,01	0,00	0,05
g__Granulicatella	0,01	0,00	0,03
g__Ruminiclostridium	0,01	0,00	0,02
g__[Clostridium] innocuum group	0,01	0,00	0,06
g__Gemella	0,01	0,00	0,04
g__Sutterella	0,01	0,00	0,09
g__Papillibacter	0,01	0,00	0,02
g__Ruminococcaceae UCG-007	0,01	0,00	0,02
g__[Eubacterium] fissicatena group	0,01	0,00	0,02
g__Ruminococcaceae UCG-009	0,01	0,00	0,02
g__Veillonella	0,01	0,00	0,05
g__Catabacter	0,01	0,00	0,03
g__Dielma	0,01	0,00	0,03
g__Fournierella	0,01	0,00	0,02
g__Anaerofilum	0,01	0,00	0,02
g__Atopobium	0,01	0,00	0,02
g__Copro bacter	0,01	0,00	0,03
g__Porphyromonas	0,00	0,00	0,04
g__Hungatella	0,00	0,00	0,05
g__Anaerofustis	0,00	0,00	0,01
g__Ezakiella	0,00	0,00	0,00
g__Candidatus Saccharibacteria bacterium UB2523	0,00	0,00	0,01
g__[Eubacterium] brachy group	0,00	0,00	0,00
g__Lactococcus	0,00	0,00	0,01
g__Turicibacter	0,00	0,00	0,01
g__Arcanobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Mobiluncus	0,00	0,00	0,00
g__Alloscardovia	0,00	0,00	0,00
g__Gardnerella	0,00	0,00	0,00
g__Scardovia	0,00	0,00	0,00
g__Corynebacterium 1	0,00	0,00	0,00
g__Tropheryma	0,00	0,00	0,00
g__Microbacterium	0,00	0,00	0,00
g__Rothia	0,00	0,00	0,01
g__Cutibacterium	0,00	0,00	0,00
g__Propionibacterium	0,00	0,00	0,00

CAPÍTULO X- ANEXOS 299

g__Coriobacteriaceae UCG-002	0,00	0,00	0,01
g__Olsenella	0,00	0,00	0,07
g__Enorma	0,00	0,00	0,00
g__Raoultibacter	0,00	0,00	0,00
g__Adlercreutzia	0,00	0,00	0,01
g__CHKCI002	0,00	0,00	0,00
g__Cryptobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Eggerthella	0,00	0,00	0,01
g__Enterorhabdus	0,00	0,00	0,01
g__Gordonibacter	0,00	0,00	0,01
g__Senegalimassilia	0,00	0,00	0,00
g__Slackia	0,00	0,00	0,06
g__Sanguibacteroides	0,00	0,00	0,00
g__CAG-873	0,00	0,00	0,00
g__Alloprevotella	0,00	0,00	0,00
g__Paraprevotella	0,00	0,00	0,10
g__Prevotella	0,00	0,00	0,01
g__Prevotella 2	0,00	0,00	0,00
g__Prevotella 6	0,00	0,00	0,00
g__Prevotella 7	0,00	0,00	0,00
g__Prevotella 9	0,00	0,00	0,00
g__Prevotellaceae NK3B31 group	0,00	0,00	0,03
g__Prevotellaceae UCG-001	0,00	0,00	0,00
g__Rikenella	0,00	0,00	0,00
g__Rikenellaceae RC9 gut group	0,00	0,00	0,00
g__Flexilinea	0,00	0,00	0,00
g__Clostridium sp, CAG:306	0,00	0,00	0,00
g__Prototheca zopfii	0,00	0,00	0,00
g__Campylobacter	0,00	0,00	0,00
g__Staphylococcus	0,00	0,00	0,00
g__Abiotrophia	0,00	0,00	0,00
g__Alkalibacterium	0,00	0,00	0,00
g__Carnobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Lactobacillus	0,00	0,00	0,01
g__Leuconostoc	0,00	0,00	0,01
g__Weissella	0,00	0,00	0,00
g__Clostridium sensu stricto 1	0,00	0,00	0,01
g__Eubacterium	0,00	0,00	0,00
g__Anaerococcus	0,00	0,00	0,00
g__Murdochiella	0,00	0,00	0,00
g__Parvimonas	0,00	0,00	0,00

g__Peptoniphilus	0,00	0,00	0,00
g__Anaerovorax	0,00	0,00	0,00
g__Mogibacterium	0,00	0,00	0,00
g__S5-A14a	0,00	0,00	0,00
g__Acetitomaculum	0,00	0,00	0,00
g__Butyrivibrio	0,00	0,00	0,00
g__CAG-56	0,00	0,00	0,09
g__Coprococcus 2	0,00	0,00	0,02
g__Eisenbergiella	0,00	0,00	0,07
g__GCA-900066755	0,00	0,00	0,01
g__Howardella	0,00	0,00	0,00
g__Johnsonella	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae FCS020 group	0,00	0,00	0,01
g__Lachnospiraceae NC2004 group	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae ND3007 group	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae NK4B4 group	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae UCG-001	0,00	0,00	0,01
g__Lachnospiraceae UCG-003	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae UCG-004	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae UCG-008	0,00	0,00	0,01
g__Lactonifactor	0,00	0,00	0,00
g__Marvinbryantia	0,00	0,00	0,02
g__Moryella	0,00	0,00	0,03
g__Oribacterium	0,00	0,00	0,00
g__Sellimonas	0,00	0,00	0,06
g__Tyzzerella	0,00	0,00	0,01
g__Tyzzerella 3	0,00	0,00	0,00
g__Tyzzerella 4	0,00	0,00	0,00
g__[Bacteroides] pectinophilus group	0,00	0,00	0,00
g__[Eubacterium] hallii group	0,00	0,00	0,00
g__[Eubacterium] oxidoreducens group	0,00	0,00	0,00
g__[Eubacterium] ruminantium group	0,00	0,00	0,02
g__[Ruminococcus] gauvreauii group	0,00	0,00	0,03
g__Peptococcus	0,00	0,00	0,01
g__Clostridioides	0,00	0,00	0,00
g__Intestinibacter	0,00	0,00	0,00
g__Peptostreptococcus	0,00	0,00	0,00
g__Acetanaerobacterium	0,00	0,00	0,01
g__Angelakisella	0,00	0,00	0,01
g__CAG-352	0,00	0,00	0,00
g__Caproiciproducens	0,00	0,00	0,01

CAPÍTULO X- ANEXOS 301

g__Harryflintia	0,00	0,00	0,01
g__Hydrogenoanaerobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Oscillospira	0,00	0,00	0,01
g__Phocea	0,00	0,00	0,00
g__Pseudoflavonifractor	0,00	0,00	0,00
g__Pygmaibacter	0,00	0,00	0,00
g__Ruminiclostridium 1	0,00	0,00	0,01
g__Ruminococcaceae UCG-008	0,00	0,00	0,00
g__Ruminococcaceae V9D2013 group	0,00	0,00	0,00
g__uncultured bacterium	0,00	0,00	0,01
g__Bulleidia	0,00	0,00	0,00
g__Catenibacterium	0,00	0,00	0,00
g__Catenisphaera	0,00	0,00	0,00
g__Coprobacillus	0,00	0,00	0,01
g__Erysipelotrichaceae UCG-004	0,00	0,00	0,00
g__Erysipelotrichaceae UCG-006	0,00	0,00	0,00
g__Faecalibacterium	0,00	0,00	0,00
g__Holdemanella	0,00	0,00	0,00
g__Merdibacter	0,00	0,00	0,01
g__Acidaminococcus	0,00	0,00	0,06
g__Succiniclasticum	0,00	0,00	0,00
g__Allisonella	0,00	0,00	0,00
g__Megamonas	0,00	0,00	0,00
g__Megasphaera	0,00	0,00	0,00
g__Negativicoccus	0,00	0,00	0,00
g__Selenomonas 4	0,00	0,00	0,00
g__Cetobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Fusobacterium	0,00	0,00	0,01
g__Sneathia	0,00	0,00	0,00
g__Candidatus Saccharimonas	0,00	0,00	0,00
g__TM7 bacterium human oral taxon HOT-869	0,00	0,00	0,00
g__TM7 phylum sp, canine oral taxon 237	0,00	0,00	0,00
g__TM7 phylum sp, oral clone FR058	0,00	0,00	0,01
g__Mesorhizobium	0,00	0,00	0,00
g__Azospirillum sp, 47_25	0,00	0,00	0,00
g__Mailhella	0,00	0,00	0,00
g__Delftia	0,00	0,00	0,00
g__Neisseria	0,00	0,00	0,00
g__Cardiobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Citrobacter	0,00	0,00	0,00
g__Enterobacter	0,00	0,00	0,00

302 M^a ÁNGELES MÉNDEZ MIRALLES

g_Klebsiella	0,00	0,00	0,02
g_Kluyvera	0,00	0,00	0,00
g_Pantoea	0,00	0,00	0,00
g_Serratia	0,00	0,00	0,00
g_Haemophilus	0,00	0,00	0,00
g_Acinetobacter	0,00	0,00	0,00
g_Psychrobacter	0,00	0,00	0,00
g_Pseudomonas	0,00	0,00	0,00
g_Cloacibacillus	0,00	0,00	0,03
g_Synergistes	0,00	0,00	0,00
g_Anaeroplasm	0,00	0,00	0,00
g_Firmicutes bacterium CAG:822	0,00	0,00	0,00
g_Mycoplasma	0,00	0,00	0,00

ANEXO 7. Medidas centrales de cada género del grupo control

Tabla 37. Medidas centrales de cada género de los controles (continuación)

Géneros Grupo Control	Mediana	p25	p75
g_Faecalibacterium	13,33	5,74	15,43
g_Bacteroides	9,99	5,63	17,40
g_Agathobacter	3,18	0,28	11,78
g_Subdoligranulum	2,98	1,25	5,19
g_Ruminococcus 2	1,93	0,14	5,52
g_Alistipes	1,88	0,75	4,02
g_Roseburia	1,55	0,85	2,72
g_Ruminococcaceae UCG-002	1,37	0,10	3,65
g_Ruminococcaceae UCG-013	1,20	0,44	1,43
g_Bifidobacterium	1,00	0,37	2,85
g_[Eubacterium] coprostanoligenes group	0,99	0,16	1,55
g_Dialister	0,86	0,00	7,96
g_Parabacteroides	0,80	0,49	1,52
g_Phascalactobacterium	0,71	0,00	4,07
g_Christensenellaceae R-7 group	0,66	0,03	2,10
g_Dorea	0,63	0,22	0,96
g_[Ruminococcus] torques group	0,53	0,07	1,16
g_Ruminococcaceae NK4A214 group	0,50	0,13	0,71
g_Erysipelotrichaceae UCG-003	0,47	0,03	1,43
g_Blautia	0,44	0,12	1,15
g_Lachnospiraceae NK4A136 group	0,42	0,03	2,74
g_Streptococcus	0,39	0,24	1,12
g_Butyricoccus	0,38	0,21	1,08
g_Coproccoccus 3	0,37	0,11	0,88
g_Barnesiella	0,37	0,03	0,58
g_Ruminococcaceae UCG-005	0,36	0,04	1,94
g_Ruminiclostridium 5	0,22	0,06	0,51
g_Ruminococcus 1	0,20	0,08	0,59
g_Akkermansia	0,19	0,00	4,73
g_Lachnoclostridium	0,17	0,05	0,41
g_Ruminococcaceae UCG-014	0,16	0,00	1,76
g_Collinsella	0,15	0,06	0,80
g_Escherichia-Shigella	0,14	0,01	4,65
g_[Eubacterium] ventriosum group	0,13	0,02	1,19
g_Family XIII AD3011 group	0,12	0,05	0,34
g_Oscillibacter	0,09	0,01	0,22
g_CAG-56	0,09	0,02	0,24
g_Veillonella	0,06	0,00	0,13
g_UBA1819	0,06	0,03	0,11

304 M^a ÁNGELES MÉNDEZ MIRALLES

g_[Eubacterium] xylanophilum group	0,05	0,00	0,26
g__Odoribacter	0,05	0,00	0,22
g__Ruminococcaceae UCG-010	0,05	0,00	0,40
g__Fusicatenibacter	0,05	0,03	0,22
g__Negativibacillus	0,04	0,01	0,24
g__Family XIII UCG-001	0,04	0,01	0,06
g__Ruminiclostridium 9	0,04	0,02	0,09
g__Erysipelatoclostridium	0,04	0,00	0,18
g__Flavonifractor	0,03	0,02	0,14
g__Parasutterella	0,03	0,00	0,13
g__Romboutsia	0,03	0,00	0,13
g__Methanobrevibacter	0,03	0,00	0,15
g__Ruminococcaceae UCG-004	0,03	0,00	0,13
g__Faecalitalea	0,03	0,00	0,23
g__Ruminococcaceae UCG-003	0,03	0,00	0,14
g__Lachnospiraceae UCG-010	0,03	0,00	0,18
g__GCA-900066225	0,03	0,01	0,06
g__Paraprevotella	0,02	0,00	0,33
g__Candidatus Soleaferrea	0,02	0,01	0,04
g__Bilophila	0,02	0,01	0,11
g__Lachnospiraceae FCS020 group	0,02	0,00	0,04
g__Solobacterium	0,02	0,01	0,07
g__GCA-900066575	0,02	0,00	0,03
g__Holdemania	0,02	0,01	0,05
g__Ruminiclostridium 6	0,02	0,00	0,17
g__Actinomyces	0,02	0,01	0,05
g_[Eubacterium] eligens group	0,01	0,00	0,81
g__Anaerostipes	0,01	0,00	0,05
g_[Eubacterium] nodatum group	0,01	0,00	0,02
g__DTU089	0,01	0,00	0,02
g__Desulfovibrio	0,01	0,00	0,10
g__Atopobium	0,01	0,01	0,02
g__Butyricimonas	0,01	0,00	0,08
g__[Ruminococcus] gauvreauii group	0,01	0,00	0,03
g__Defluviitaleaceae UCG-011	0,01	0,00	0,02
g__Granulicatella	0,01	0,00	0,02
g__Gemella	0,01	0,00	0,03
g__Sutterella	0,00	0,00	0,08
g__Anaerotruncus	0,00	0,00	0,01
g__Lachnospira	0,00	0,00	0,13
g__Catabacter	0,00	0,00	0,02
g__Papillibacter	0,00	0,00	0,01
g__Clostridium sensu stricto 1	0,00	0,00	0,01
g_[Eubacterium] brachy group	0,00	0,00	0,02
g__Eisenbergiella	0,00	0,00	0,04

CAPÍTULO X- ANEXOS 305

g_Merdibacter	0,00	0,00	0,01
g_Anaerofilum	0,00	0,00	0,01
g_UC5-1-2E3	0,00	0,00	0,02
g_Coproccoccus 1	0,00	0,00	0,02
g_Marvinbryantia	0,00	0,00	0,02
g_Enterorhabdus	0,00	0,00	0,01
g_[Eubacterium] fissicatena group	0,00	0,00	0,01
g_Coprobacter	0,00	0,00	0,01
g_[Clostridium] innocuum group	0,00	0,00	0,01
g_Arcanobacterium	0,00	0,00	0,00
g_Mobiluncus	0,00	0,00	0,00
g_Alloscardovia	0,00	0,00	0,00
g_Gardnerella	0,00	0,00	0,00
g_Scardovia	0,00	0,00	0,00
g_Corynebacterium 1	0,00	0,00	0,00
g_Tropheryma	0,00	0,00	0,00
g_Microbacterium	0,00	0,00	0,00
g_Rothia	0,00	0,00	0,00
g_Cutibacterium	0,00	0,00	0,00
g_Propionibacterium	0,00	0,00	0,00
g_Coriobacteriaceae UCG-002	0,00	0,00	0,00
g_Olsenella	0,00	0,00	0,03
g_Enorma	0,00	0,00	0,00
g_Raoultibacter	0,00	0,00	0,00
g_Adlercreutzia	0,00	0,00	0,01
g_CHKCI002	0,00	0,00	0,00
g_Cryptobacterium	0,00	0,00	0,00
g_Eggerthella	0,00	0,00	0,00
g_Gordonibacter	0,00	0,00	0,01
g_Senegalimassilia	0,00	0,00	0,02
g_Slackia	0,00	0,00	0,02
g_Sanguibacteroides	0,00	0,00	0,00
g_CAG-873	0,00	0,00	0,00
g_Porphyrromonas	0,00	0,00	0,01
g_Alloprevotella	0,00	0,00	0,00
g_Prevotella	0,00	0,00	0,00
g_Prevotella 2	0,00	0,00	0,00
g_Prevotella 6	0,00	0,00	0,00
g_Prevotella 7	0,00	0,00	0,00
g_Prevotella 9	0,00	0,00	0,58
g_Prevotellaceae NK3B31 group	0,00	0,00	0,31
g_Prevotellaceae UCG-001	0,00	0,00	0,00
g_Rikenella	0,00	0,00	0,00
g_Rikenellaceae RC9 gut group	0,00	0,00	0,00
g_Flexilinea	0,00	0,00	0,00

306 M^a ÁNGELES MÉNDEZ MIRALLES

g__Clostridium sp, CAG:306	0,00	0,00	0,00
g__Prototheca zopfii	0,00	0,00	0,00
g__Campylobacter	0,00	0,00	0,00
g__Staphylococcus	0,00	0,00	0,00
g__Abiotrophia	0,00	0,00	0,00
g__Alkalibacterium	0,00	0,00	0,00
g__Carnobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Lactobacillus	0,00	0,00	0,02
g__Leuconostoc	0,00	0,00	0,01
g__Weissella	0,00	0,00	0,00
g__Lactococcus	0,00	0,00	0,01
g__Anaerofustis	0,00	0,00	0,01
g__Eubacterium	0,00	0,00	0,00
g__Anaerococcus	0,00	0,00	0,00
g__Ezakiella	0,00	0,00	0,00
g__Murdochiella	0,00	0,00	0,00
g__Parvimonas	0,00	0,00	0,00
g__Peptoniphilus	0,00	0,00	0,00
g__Anaerovorax	0,00	0,00	0,00
g__Mogibacterium	0,00	0,00	0,00
g__S5-A14a	0,00	0,00	0,00
g__Acetitomaculum	0,00	0,00	0,00
g__Butyrivibrio	0,00	0,00	0,00
g__Coprococcus 2	0,00	0,00	0,43
g__GCA-900066755	0,00	0,00	0,01
g__Howardella	0,00	0,00	0,16
g__Hungatella	0,00	0,00	0,00
g__Johnsonella	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae NC2004 group	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae ND3007 group	0,00	0,00	0,01
g__Lachnospiraceae NK4B4 group	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae UCG-001	0,00	0,00	0,08
g__Lachnospiraceae UCG-003	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae UCG-004	0,00	0,00	0,00
g__Lachnospiraceae UCG-008	0,00	0,00	0,00
g__Lactonifactor	0,00	0,00	0,00
g__Moryella	0,00	0,00	0,03
g__Oribacterium	0,00	0,00	0,00
g__Sellimonas	0,00	0,00	0,03
g__Shuttleworthia	0,00	0,00	0,02
g__Tyzzerella	0,00	0,00	0,01
g__Tyzzerella 3	0,00	0,00	0,12
g__Tyzzerella 4	0,00	0,00	0,00
g__[Bacteroides] pectinophilus group	0,00	0,00	0,00
g__[Eubacterium] hallii group	0,00	0,00	0,01

CAPÍTULO X- ANEXOS 307

g__[Eubacterium] oxidoreducens group	0,00	0,00	0,00
g__[Eubacterium] ruminantium group	0,00	0,00	0,00
g__[Ruminococcus] gnavus group	0,00	0,00	0,09
g__Peptococcus	0,00	0,00	0,00
g__Clostridioides	0,00	0,00	0,00
g__Intestinibacter	0,00	0,00	0,00
g__Peptostreptococcus	0,00	0,00	0,00
g__Acetanaerobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Angelakisella	0,00	0,00	0,00
g__CAG-352	0,00	0,00	0,04
g__Caproiciproducens	0,00	0,00	0,00
g__Fournierella	0,00	0,00	0,05
g__Harryflintia	0,00	0,00	0,01
g__Hydrogenoanaerobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Intestinimonas	0,00	0,00	0,03
g__Oscillospira	0,00	0,00	0,01
g__Phocea	0,00	0,00	0,01
g__Pseudoflavonifractor	0,00	0,00	0,00
g__Pygmaibacter	0,00	0,00	0,00
g__Ruminiclostridium	0,00	0,00	0,01
g__Ruminiclostridium 1	0,00	0,00	0,00
g__Ruminococcaceae UCG-007	0,00	0,00	0,01
g__Ruminococcaceae UCG-008	0,00	0,00	0,00
g__Ruminococcaceae UCG-009	0,00	0,00	0,01
g__Ruminococcaceae V9D2013 group	0,00	0,00	0,00
g__Bulleidia	0,00	0,00	0,00
g__Catenibacterium	0,00	0,00	0,09
g__Catenisphaera	0,00	0,00	0,00
g__Coprobacillus	0,00	0,00	0,00
g__Dielma	0,00	0,00	0,01
g__Erysipelotrichaceae UCG-004	0,00	0,00	0,00
g__Erysipelotrichaceae UCG-006	0,00	0,00	0,00
g__Faecalibacterium	0,00	0,00	0,00
g__Holdemanella	0,00	0,00	0,00
g__Turicibacter	0,00	0,00	0,00
g__Acidaminococcus	0,00	0,00	0,04
g__Succinoclasticum	0,00	0,00	0,00
g__Allisonella	0,00	0,00	0,00
g__Megamonas	0,00	0,00	0,00
g__Megasphaera	0,00	0,00	0,03
g__Negativicoccus	0,00	0,00	0,00
g__Selenomonas 4	0,00	0,00	0,00
g__Cetobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Fusobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Sneathia	0,00	0,00	0,00

308 M^a ÁNGELES MÉNDEZ MIRALLES

g__Candidatus Saccharibacteria bacterium UB2523	0,00	0,00	0,01
g__Candidatus Saccharimonas	0,00	0,00	0,00
g__TM7 bacterium human oral taxon HOT-869	0,00	0,00	0,00
g__TM7 phylum sp, canine oral taxon 237	0,00	0,00	0,00
g__TM7 phylum sp, oral clone FR058	0,00	0,00	0,00
g__Mesorhizobium	0,00	0,00	0,00
g__Azospirillum sp, 47_25	0,00	0,00	0,00
g__gut metagenome	0,00	0,00	0,01
g__Mailhella	0,00	0,00	0,00
g__Delftia	0,00	0,00	0,00
g__Oxalobacter	0,00	0,00	0,03
g__Neisseria	0,00	0,00	0,00
g__Cardiobacterium	0,00	0,00	0,00
g__Citrobacter	0,00	0,00	0,00
g__Enterobacter	0,00	0,00	0,00
g__Klebsiella	0,00	0,00	0,41
g__Kluyvera	0,00	0,00	0,00
g__Pantoea	0,00	0,00	0,00
g__Serratia	0,00	0,00	0,00
g__Haemophilus	0,00	0,00	0,04
g__Acinetobacter	0,00	0,00	0,00
g__Psychrobacter	0,00	0,00	0,00
g__Pseudomonas	0,00	0,00	0,00
g__Cloacibacillus	0,00	0,00	0,02
g__Synergistes	0,00	0,00	0,00
g__Anaeroplasma	0,00	0,00	0,00
g__Firmicutes bacterium CAG:822	0,00	0,00	0,00
g__Mycoplasma	0,00	0,00	0,00

ANEXO 8. Coeficiente de incremento de frecuencias

A continuación, se muestran diferentes tablas donde se indican los microorganismos que presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al coeficiente de incremento de frecuencia (*Multiplier*) en el grupo de pacientes en comparación con el grupo de sujetos sanos, en los diferentes niveles taxonómicos. Así, los primeros microorganismos de las tablas se visualizan con fondo sombreado cada uno de un color, son aquellos cuyo coeficiente de incremento de frecuencia entre ambos grupos del estudio presenta un nivel de significación estadísticamente significativo con $p < 0.05$. En las tablas que se exponen seguidamente únicamente se han incluido los microorganismos que tienen un nivel de significación de $p < 0,1$, en orden decreciente de nivel de significación.

Tabla 38. Coeficiente de incremento de frecuencia del nivel de familia entre pacientes y controles (continuación)

Familia	Multiplier (95% IC)	Valor-P	AUC (95% IC)
f__Propionibacteriaceae	3.78 (0.75 to 19.07)	0.10812	63.3 (51.8 to 74.9)
f__Pasteurellaceae	0.28 (0.05 to 1.40)	0.12108	60.0 (43.1 to 76.9)
f__Methanobacteriaceae	3.37 (0.67 to 17.01)	0.14188	60.5 (39.6 to 81.4)
f__Campylobacteraceae	3.29 (0.65 to 16.60)	0.15012	63.3 (51.8 to 74.9)
f__uncultured organism	3.25 (0.64 to 16.43)	0.15357	60.2 (46.8 to 73.7)
f__uncultured bacterium	3.24 (0.64 to 16.35)	0.15536	55.2 (33.4 to 77.1)
f__Defluviitaleaceae	3.22 (0.64 to 16.26)	0.15740	63.8 (43.5 to 84.1)
f__Coriobacteriaceae	0.39 (0.08 to 1.97)	0.25455	55.7 (33.7 to 77.7)
f__Marinifilaceae	2.53 (0.50 to 12.80)	0.26060	58.1 (35.9 to 80.3)
f__Carnobacteriaceae	2.53 (0.50 to 12.80)	0.26066	62.6 (41.8 to 83.4)
f__metagenome	0.40 (0.08 to 2.00)	0.26235	57.1 (47.6 to 66.7)
f__Fusobacteriaceae	2.51 (0.50 to 12.67)	0.26573	57.6 (40.9 to 74.4)
f__Peptostreptococcaceae	2.41 (0.48 to 12.16)	0.28758	50.2 (28.0 to 72.5)
f__Enterobacteriaceae	0.43 (0.08 to 2.17)	0.30605	60.0 (38.3 to 81.7)
f__Tannerellaceae	2.12 (0.42 to 10.72)	0.36252	75.7 (56.5 to 94.9)
f__Eggerthellaceae	2.03 (0.40 to 10.23)	0.39295	62.4 (41.0 to 83.8)
f__Prevotellaceae	0.49 (0.10 to 2.50)	0.39453	59.5 (37.7 to 81.3)
f__Family XI	2.02 (0.40 to 10.19)	0.39549	54.3 (31.9 to 76.7)
f__Acidaminococcaceae	1.98 (0.39 to 10.02)	0.40748	50.5 (28.4 to 72.6)
f__Muribaculaceae	0.51 (0.10 to 2.55)	0.40955	50.5 (32.5 to 68.5)
f__Clostridiales vadinBB60 group	1.95 (0.39 to 9.85)	0.41908	56.2 (36.9 to 75.5)
f__Christensenellaceae	1.88 (0.37 to 9.47)	0.44685	56.2 (34.1 to 78.3)
f__Pseudomonadaceae	1.85 (0.37 to 9.32)	0.45863	53.3 (46.8 to 59.9)
f__Neisseriaceae	0.55 (0.11 to 2.77)	0.46667	57.1 (47.6 to 66.7)
f__Firmicutes bacterium CAG:822	0.57 (0.11 to 2.90)	0.50209	53.6 (46.6 to 60.6)
f__Aerococcaceae	1.72 (0.34 to 8.70)	0.51063	53.3 (39.1 to 67.5)
f__Veillonellaceae	0.58 (0.12 to 2.94)	0.51366	59.5 (38.0 to 81.1)
f__Candidatus Saccharibacteria bacterium UB2523	1.66 (0.33 to 8.37)	0.54107	54.8 (34.3 to 75.2)
f__Bifidobacteriaceae	1.56 (0.31 to 7.86)	0.59301	53.3 (31.2 to 75.5)
f__Actinomycetaceae	1.55 (0.31 to 7.83)	0.59572	61.9 (40.3 to 83.5)

f_ uncultured Erysipelotrichaceae bacterium	0.65 (0.13 to 3.30)	0.60597	53.6 (46.6 to 60.6)
f_ Leptotrichiaceae	1.50 (0.30 to 7.56)	0.62563	53.6 (42.3 to 64.9)
f_ Victivallaceae	1.45 (0.29 to 7.32)	0.65331	53.3 (46.8 to 59.9)
f_ Cardiobacteriaceae	0.73 (0.14 to 3.69)	0.70410	53.6 (46.6 to 60.6)
f_ Staphylococcaceae	0.73 (0.14 to 3.69)	0.70410	53.6 (46.6 to 60.6)
f_ uncultured Erysipelotrichia bacterium	1.36 (0.27 to 6.89)	0.70661	53.3 (46.8 to 59.9)
f_ Corynebacteriaceae	0.75 (0.15 to 3.77)	0.72237	53.6 (46.6 to 60.6)
f_ Family XIII	1.34 (0.26 to 6.75)	0.72578	53.3 (31.4 to 75.2)
f_ Bacteroidaceae	1.33 (0.26 to 6.69)	0.73346	61.0 (39.7 to 82.2)
f_ Puniceicoccaceae	1.32 (0.26 to 6.67)	0.73582	53.3 (46.8 to 59.9)
f_ Streptococcaceae	1.32 (0.26 to 6.67)	0.73688	54.3 (31.8 to 76.8)
f_ TM7 phylum sp. oral clone FR058	1.31 (0.26 to 6.64)	0.74084	51.0 (33.7 to 68.2)
f_ Lactobacillaceae	0.76 (0.15 to 3.85)	0.74245	53.8 (34.2 to 73.4)
f_ Clostridium sp. CAG:306	1.30 (0.26 to 6.58)	0.74855	53.1 (41.7 to 64.4)
f_ Micrococcaceae	1.30 (0.26 to 6.55)	0.75262	56.2 (41.0 to 71.4)
f_ Erysipelotrichaceae	1.28 (0.25 to 6.44)	0.76851	51.4 (29.3 to 73.6)
f_ Cellulomonadaceae	1.27 (0.25 to 6.44)	0.76916	53.3 (46.8 to 59.9)
f_ Rhizobiaceae	1.27 (0.25 to 6.44)	0.76916	53.3 (46.8 to 59.9)
f_ uncultured	0.79 (0.16 to 4.00)	0.77705	54.3 (33.1 to 75.5)
f_ Moraxellaceae	1.25 (0.25 to 6.33)	0.78480	53.3 (46.8 to 59.9)
f_ Anaerolineaceae	1.23 (0.24 to 6.20)	0.80332	53.3 (46.8 to 59.9)
f_ Prototheca zopfii	1.23 (0.24 to 6.20)	0.80352	53.3 (46.8 to 59.9)
f_ Flavobacteriaceae	1.23 (0.24 to 6.19)	0.80543	52.4 (32.6 to 72.1)
f_ Rikenellaceae	1.21 (0.24 to 6.13)	0.81488	53.3 (31.4 to 75.3)
f_ Leuconostocaceae	0.85 (0.17 to 4.27)	0.83997	51.9 (31.7 to 72.1)
f_ Saccharimonadaceae	1.17 (0.23 to 5.92)	0.84772	55.7 (33.7 to 77.7)
f_ Burkholderiaceae	1.17 (0.23 to 5.89)	0.85306	50.2 (28.1 to 72.4)
f_ XXX	0.87 (0.17 to 4.38)	0.86258	50.0 (27.8 to 72.2)
f_ Akkermansiaceae	1.14 (0.23 to 5.78)	0.87011	55.5 (33.3 to 77.6)
f_ Lachnospirae	0.88 (0.17 to 4.43)	0.87317	59.0 (37.0 to 81.0)
f_ Clostridiaceae 1	0.88 (0.17 to 4.44)	0.87695	51.9 (31.2 to 72.6)
f_ Ruminococcus	1.12 (0.22 to 5.64)	0.89314	62.4 (40.8 to 84.0)
f_ Synergistaceae	1.09 (0.22 to 5.52)	0.91376	50.7 (32.5 to 68.9)
f_ Mycoplasmataceae	1.08 (0.21 to 5.46)	0.92456	50.0 (36.9 to 63.1)
f_ Roseburiaceae	1.07 (0.21 to 5.42)	0.93193	51.9 (29.1 to 74.7)
f_ Atopobiaceae	1.04 (0.21 to 5.24)	0.96391	51.9 (30.0 to 73.8)
f_ Anaeroplasmataceae	1.01 (0.20 to 5.11)	0.98949	50.0 (40.4 to 59.6)
f_ Microbacteriaceae	1.00 (0.20 to 5.05)	1.00000	50.0 (50.0 to 50.0)

Coficiente de incremento en la frecuencia de las familias en el grupo de pacientes con respecto al grupo control. En esta tabla se recoge el resto de familias con un multiplier con nivel de significación $p > 0,1$. AUC= Area Under Curve/Área bajo la curva. IC= Intervalo de confianza.

Tabla 39. Coeficiente de incremento de frecuencia del nivel de género entre pacientes y controles (continuación)

Genero	Multiplier (95%IC)	Valor-P	AUC (95%IC)
g_ [Eubacterium] nodatum group	4.44 (0.73 to 26.92)	0.10458	66.2 (45.6 to 86.8)
g_ Atopobium	0.23 (0.04 to 1.38)	0.10700	62.9 (41.2 to 84.6)
g_ Agathobacter	0.23 (0.04 to 1.40)	0.11035	61.0 (39.4 to 82.5)
g_ Holdemanella	4.30 (0.71 to 26.02)	0.11273	56.7 (44.1 to 69.3)
g_ CAG-352	0.23 (0.04 to 1.42)	0.11406	58.1 (45.1 to 71.1)
g_ Coprococcus 2	0.24 (0.04 to 1.46)	0.12081	56.0 (38.1 to 73.8)
g_ uncultured	4.13 (0.68 to 25.04)	0.12250	63.8 (49.7 to 77.9)
Thermoanaerobacterales bacterium			
g_ Ruminococcus UCG-013	0.25 (0.04 to 1.48)	0.12607	74.3 (55.3 to 93.3)
g_ Angelakisella	3.89 (0.64 to 23.54)	0.13968	61.9 (45.5 to 78.4)
g_ Veillonella	0.26 (0.04 to 1.57)	0.14203	64.8 (43.5 to 86.0)
g_ CHKCI002	3.79 (0.63 to 22.97)	0.14694	63.3 (51.8 to 74.9)
g_ Papillibacter	3.78 (0.62 to 22.88)	0.14813	67.1 (47.1 to 87.2)
g_ Propionibacterium	3.78 (0.62 to 22.87)	0.14826	63.3 (51.8 to 74.9)
g_ Dialister	3.73 (0.62 to 22.57)	0.15228	56.7 (34.5 to 78.8)
g_ [Ruminococcus] torques group	3.70 (0.61 to 22.39)	0.15485	69.5 (49.7 to 89.4)
g_ Haemophilus	0.28 (0.05 to 1.68)	0.16306	60.0 (43.1 to 76.9)
g_ Ruminococcus UCG-002	0.28 (0.05 to 1.69)	0.16552	50.5 (28.0 to 73.0)
g_ DTU089	3.52 (0.58 to 21.30)	0.17121	72.4 (53.3 to 91.5)
g_ Escherichia-Shigella	0.30 (0.05 to 1.79)	0.18456	59.8 (38.1 to 81.4)
g_ Methanobrevibacter	3.37 (0.56 to 20.40)	0.18632	60.5 (39.6 to 81.4)
g_ Citrobacter	3.34 (0.55 to 20.23)	0.18945	56.7 (47.8 to 65.6)
g_ Parasutterella	3.31 (0.55 to 20.05)	0.19265	53.1 (30.5 to 75.7)
g_ Oscillospira	3.29 (0.54 to 19.92)	0.19516	59.5 (41.0 to 78.0)
g_ Campylobacter	3.29 (0.54 to 19.91)	0.19540	63.3 (51.8 to 74.9)
g_ Coriobacteriaceae UCG-002	3.23 (0.53 to 19.56)	0.20199	60.2 (46.8 to 73.7)
g_ Defluviitaleaceae UCG-011	3.22 (0.53 to 19.49)	0.20335	63.8 (43.5 to 84.1)
g_ Klebsiella	0.31 (0.05 to 1.88)	0.20382	57.9 (39.9 to 75.8)
g_ metagenome	0.31 (0.05 to 1.89)	0.20560	54.8 (38.4 to 71.1)
g_ Ruminococcus 2	3.18 (0.52 to 19.24)	0.20841	57.4 (35.5 to 79.2)
g_ Megasphaera	0.32 (0.05 to 1.93)	0.21425	53.8 (36.4 to 71.2)
g_ Ruminococcus 1	3.10 (0.51 to 18.76)	0.21859	63.1 (42.0 to 84.2)
g_ Family XIII UCG-001	0.34 (0.06 to 2.05)	0.23904	69.0 (48.6 to 89.5)
g_ Solobacterium	2.93 (0.48 to 17.75)	0.24207	64.3 (43.5 to 85.1)
g_ Synergistes	2.91 (0.48 to 17.62)	0.24529	56.7 (47.8 to 65.6)
g_ Ruminiclostridium 1	2.90 (0.48 to 17.56)	0.24683	60.0 (41.4 to 78.6)
g_ UBA1819	2.88 (0.48 to 17.44)	0.24988	66.7 (46.3 to 87.0)
g_ Paraprevotella	0.35 (0.06 to 2.11)	0.25230	59.0 (39.1 to 79.0)
g_ Coprococcus 1	2.84 (0.47 to 17.21)	0.25570	62.1 (41.8 to 82.5)
g_ Prevotella 6	2.84 (0.47 to 17.21)	0.25579	60.0 (49.5 to 70.5)
g_ Peptoniphilus	2.82 (0.47 to 17.10)	0.25859	60.7 (47.3 to 74.1)
g_ [Eubacterium] fissicatena group	2.82 (0.47 to 17.06)	0.25974	66.4 (46.9 to 86.0)
g_ S5-A14a	2.80 (0.46 to 16.98)	0.26194	60.0 (49.5 to 70.5)
g_ Prevotella 2	2.80 (0.46 to 16.93)	0.26327	56.7 (47.8 to 65.6)
g_ Sellimonas	2.74 (0.45 to 16.58)	0.27306	55.2 (35.8 to 74.7)
g_ Peptococcus	2.72 (0.45 to 16.50)	0.27554	58.8 (41.3 to 76.3)
g_ Collinsella	0.37 (0.06 to 2.25)	0.28110	56.4 (34.4 to 78.4)
g_ Kluivera	0.37 (0.06 to 2.25)	0.28189	57.1 (47.6 to 66.7)
g_ [Eubacterium] eligens group	2.68 (0.44 to 16.22)	0.28380	56.2 (33.8 to 78.6)
g_ Prevotella 9	0.37 (0.06 to 2.27)	0.28516	51.9 (36.4 to 67.5)

g_ Erysipelotrichaceae UCG-004	0.38 (0.06 to 2.30)	0.29163	60.7 (49.6 to 71.9)
g_ Holdemania	2.63 (0.43 to 15.95)	0.29201	65.0 (43.9 to 86.1)
g_ Azospirillum sp. 47_25	2.62 (0.43 to 15.86)	0.29496	60.0 (49.5 to 70.5)
g_ Oxalobacter	2.61 (0.43 to 15.82)	0.29601	61.0 (41.1 to 80.8)
g_ Subdoligranulum	0.38 (0.06 to 2.33)	0.29838	61.0 (38.8 to 83.1)
g_ Odoribacter	2.58 (0.43 to 15.60)	0.30326	56.0 (33.5 to 78.5)
g_ Ruminococcus UCG-003	0.40 (0.07 to 2.40)	0.31295	52.4 (30.6 to 74.2)
g_ Flavonifractor	2.44 (0.40 to 14.78)	0.33159	63.3 (42.4 to 84.2)
g_ Negativicoccus	2.39 (0.39 to 14.48)	0.34275	60.0 (49.5 to 70.5)
g_ Butyricimonas	2.39 (0.39 to 14.47)	0.34336	57.6 (36.0 to 79.2)
g_ Romboutsia	2.39 (0.39 to 14.45)	0.34410	50.7 (28.4 to 73.0)
g_ Candidatus Saccharimonas	2.38 (0.39 to 14.42)	0.34520	59.8 (46.2 to 73.3)
g_ Negativibacillus	0.42 (0.07 to 2.56)	0.34939	50.5 (28.3 to 72.7)
g_ Anaerofustis	2.36 (0.39 to 14.27)	0.35114	56.4 (36.5 to 76.4)
g_ Slackia	2.34 (0.39 to 14.15)	0.35574	54.8 (35.0 to 74.5)
g_ Senegalimassilia	0.43 (0.07 to 2.63)	0.36338	54.3 (37.9 to 70.7)
g_ Sutterella	2.29 (0.38 to 13.89)	0.36630	53.8 (32.7 to 74.9)
g_ Tyzzerella	2.25 (0.37 to 13.63)	0.37733	54.3 (36.5 to 72.0)
g_ Ruminococcus UCG-005	0.45 (0.07 to 2.73)	0.38516	51.9 (28.8 to 75.0)
g_ Alloprevotella	0.45 (0.07 to 2.73)	0.38556	57.1 (47.6 to 66.7)
g_ Desulfovibrio	2.22 (0.37 to 13.44)	0.38586	54.8 (33.7 to 75.9)
g_ Rikenella	0.46 (0.08 to 2.77)	0.39460	58.6 (43.3 to 73.8)
g_ Enorma	2.18 (0.36 to 13.23)	0.39512	56.2 (43.5 to 68.9)
g_ Ruminococcus UCG-008	0.46 (0.08 to 2.80)	0.40058	57.1 (47.6 to 66.7)
g_ Lactococcus	2.16 (0.36 to 13.08)	0.40187	56.4 (36.4 to 76.4)
g_ Pseudoflavonifractor	2.16 (0.36 to 13.08)	0.40192	57.1 (44.6 to 69.7)
g_ CAG-873	2.14 (0.35 to 12.98)	0.40660	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ GCA-900066755	2.13 (0.35 to 12.88)	0.41133	57.6 (39.5 to 75.7)
g_ Parabacteroides	2.12 (0.35 to 12.85)	0.41276	75.7 (56.5 to 94.9)
g_ Lachnoclostridium	2.11 (0.35 to 12.79)	0.41592	63.8 (42.6 to 85.0)
g_ Acetanaerobacterium	2.11 (0.35 to 12.77)	0.41678	57.6 (39.3 to 75.9)
g_ GCA-900066225	2.10 (0.35 to 12.74)	0.41852	57.6 (36.0 to 79.2)
g_ Anaerofilum	2.10 (0.35 to 12.69)	0.42072	54.8 (34.0 to 75.6)
g_ Ruminiclostridium 5	2.03 (0.34 to 12.32)	0.43976	68.6 (48.2 to 89.0)
g_ Fusobacterium	2.03 (0.34 to 12.30)	0.44059	55.0 (38.8 to 71.2)
g_ Anaerococcus	2.00 (0.33 to 12.12)	0.45013	57.1 (44.6 to 69.7)
g_ Blautia	1.99 (0.33 to 12.05)	0.45410	64.3 (42.9 to 85.7)
g_ Prevotella 7	1.93 (0.32 to 11.70)	0.47371	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Lachnospirae ND3007	0.52 (0.09 to 3.15)	0.47711	53.8 (36.4 to 71.2)
group			
g_ Christensenellaceae R-7	1.90 (0.31 to 11.53)	0.48327	56.7 (34.6 to 78.8)
group			
g_ [Eubacterium] brachy	0.53 (0.09 to 3.19)	0.48492	59.0 (37.8 to 80.3)
group			
g_ Granulicatella	1.89 (0.31 to 11.43)	0.48929	61.0 (40.0 to 81.9)
g_ Murdochiella	1.89 (0.31 to 11.42)	0.49017	56.7 (47.8 to 65.6)
g_ [Eubacterium]	0.53 (0.09 to 3.22)	0.49191	51.9 (29.1 to 74.7)
coprostanoligenes group			
g_ Lachnospirae UCG-010	0.53 (0.09 to 3.23)	0.49330	51.0 (29.0 to 72.9)
g_ Lachnospirae UCG-008	1.87 (0.31 to 11.30)	0.49756	60.0 (44.4 to 75.6)
g_ [Eubacterium] ventriosum	1.86 (0.31 to 11.26)	0.49948	50.2 (26.7 to 73.7)
group			
g_ Lachnospira	1.86 (0.31 to 11.24)	0.50086	54.5 (33.2 to 75.9)
g_ Prevotellaceae UCG-001	0.54 (0.09 to 3.27)	0.50303	54.0 (39.7 to 68.4)
g_ Pseudomonas	1.85 (0.30 to 11.17)	0.50504	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Arcanobacterium	1.85 (0.30 to 11.17)	0.50505	56.7 (47.8 to 65.6)
g_ Erysipelatoclostridium	1.84 (0.30 to 11.15)	0.50638	57.9 (35.9 to 79.9)
g_ Erysipelotrichaceae UCG-003	0.55 (0.09 to 3.31)	0.51030	58.6 (37.1 to 80.0)
g_ Lachnospirae UCG-001	0.55 (0.09 to 3.31)	0.51177	55.0 (37.0 to 73.0)

g_Rikenellaceae RC9 gut	1.83 (0.30 to 11.07)	0.51178	53.1 (41.7 to 64.4)
group			
g_Gordonibacter	1.83 (0.30 to 11.06)	0.51201	56.7 (38.5 to 74.9)
g_Neisseria	0.55 (0.09 to 3.32)	0.51267	57.1 (47.6 to 66.7)
g_Sanguibacteroides	1.75 (0.29 to 10.62)	0.54121	53.3 (39.1 to 67.5)
g_Ruminococcus V9D2013	1.74 (0.29 to 10.55)	0.54594	55.2 (39.9 to 70.6)
group			
g_Firmicutes bacterium	0.57 (0.09 to 3.48)	0.54605	53.6 (46.6 to 60.6)
CAG:822			
g_Abiotrophia	1.72 (0.28 to 10.43)	0.55406	53.3 (39.1 to 67.5)
g_[Eubacterium]	1.71 (0.28 to 10.33)	0.56119	58.6 (42.6 to 74.5)
ruminantium group			
g_Faecalibacterium	0.59 (0.10 to 3.56)	0.56337	63.3 (42.1 to 84.5)
g_Mobiluncus	1.68 (0.28 to 10.16)	0.57372	56.2 (43.5 to 68.9)
g_Bulleidia	1.67 (0.28 to 10.14)	0.57489	56.7 (47.8 to 65.6)
g_Candidatus	1.66 (0.27 to 10.04)	0.58252	54.8 (34.3 to 75.2)
Saccharibacteria bacterium			
UB2523			
g_Adlercreutzia	1.65 (0.27 to 10.02)	0.58374	53.8 (34.0 to 73.6)
g_Catenibacterium	0.61 (0.10 to 3.70)	0.59259	51.9 (34.7 to 69.1)
g_[Bacteroides] pectinophilus	1.63 (0.27 to 9.90)	0.59272	53.3 (46.8 to 59.9)
group			
g_Eubacterium	1.62 (0.27 to 9.79)	0.60090	53.1 (41.7 to 64.4)
g_Cryptobacterium	1.62 (0.27 to 9.79)	0.60142	56.7 (47.8 to 65.6)
g_Copro bacter	1.61 (0.27 to 9.76)	0.60389	56.4 (36.1 to 76.8)
g_Butyricicoccus	0.62 (0.10 to 3.77)	0.60515	58.6 (37.0 to 80.2)
g_Ruminiclostridium 9	1.59 (0.26 to 9.61)	0.61534	62.4 (40.4 to 84.3)
g_Gemella	0.63 (0.10 to 3.82)	0.61566	53.8 (31.8 to 75.8)
g_Parvimonas	1.59 (0.26 to 9.60)	0.61598	51.4 (35.9 to 67.0)
g_Phocaea	0.63 (0.10 to 3.83)	0.61803	54.3 (35.6 to 73.0)
g_Copro bacillus	1.58 (0.26 to 9.58)	0.61808	58.1 (40.0 to 76.2)
g_Mailhella	1.56 (0.26 to 9.42)	0.63053	53.3 (46.8 to 59.9)
g_[Eubacterium]	0.65 (0.11 to 3.92)	0.63601	57.1 (47.6 to 66.7)
oxidoreducens group			
g_Catabacter	1.54 (0.25 to 9.31)	0.63944	51.7 (31.1 to 72.3)
g_Hydrogenoanaerobacteriu	0.65 (0.11 to 3.95)	0.64113	54.0 (39.6 to 68.5)
m			
g_Acetitumaculum	0.65 (0.11 to 3.95)	0.64129	53.6 (46.6 to 60.6)
g_uncultured	0.65 (0.11 to 3.95)	0.64270	53.6 (46.6 to 60.6)
Erysipelotrichaceae bacterium			
g_Actinomyces	1.53 (0.25 to 9.27)	0.64293	62.4 (40.7 to 84.1)
g_Lachnospirae UCG-003	1.51 (0.25 to 9.15)	0.65354	53.3 (46.8 to 59.9)
g_Sneathia	1.50 (0.25 to 9.06)	0.66081	53.6 (42.3 to 64.9)
g_Catenisphaera	0.67 (0.11 to 4.08)	0.66757	53.6 (46.6 to 60.6)
g_Johnsonella	1.48 (0.24 to 8.94)	0.67165	52.9 (38.6 to 67.1)
g_Phascolarctobacterium	1.48 (0.24 to 8.93)	0.67220	50.7 (28.7 to 72.8)
g_Raoultibacter	1.47 (0.24 to 8.92)	0.67306	53.1 (41.7 to 64.4)
g_Peptostreptococcus	1.47 (0.24 to 8.92)	0.67332	53.6 (42.3 to 64.9)
g_Lachnospirae NK4A136	0.68 (0.11 to 4.12)	0.67521	52.4 (30.0 to 74.8)
group			
g_Candidatus Soleaferrea	1.46 (0.24 to 8.84)	0.68066	50.2 (27.7 to 72.8)
g_Bifidobacterium	1.45 (0.24 to 8.81)	0.68324	53.3 (31.2 to 75.5)
g_Merdibacter	0.69 (0.11 to 4.16)	0.68340	55.2 (34.7 to 75.8)
g_Pygmaibacter	1.45 (0.24 to 8.79)	0.68489	52.6 (36.3 to 69.0)
g_Scardovia	1.44 (0.24 to 8.74)	0.68990	53.1 (41.7 to 64.4)
g_Faecalicoccus	0.70 (0.12 to 4.24)	0.69801	53.3 (41.7 to 64.9)
g_Acidaminococcus	1.42 (0.24 to 8.63)	0.70003	54.3 (35.8 to 72.8)
g_Fusicatenibacter	1.41 (0.23 to 8.56)	0.70641	56.7 (34.2 to 79.1)
g_Roseburia	0.71 (0.12 to 4.33)	0.71496	52.9 (30.2 to 75.5)
g_Marvinbryantia	1.39 (0.23 to 8.40)	0.72166	51.9 (31.6 to 72.2)
g_Enterobacter	1.39 (0.23 to 8.40)	0.72213	53.1 (41.7 to 64.4)

g_ GCA-900066575	1.38 (0.23 to 8.38)	0.72401	52.4 (30.4 to 74.4)
g_ Cardiobacterium	0.73 (0.12 to 4.42)	0.73267	53.6 (46.6 to 60.6)
g_ Staphylococcus	0.73 (0.12 to 4.42)	0.73267	53.6 (46.6 to 60.6)
g_ uncultured Erysipelotrichia bacterium	1.36 (0.23 to 8.27)	0.73497	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Fournierella	1.36 (0.22 to 8.24)	0.73739	51.0 (29.2 to 72.7)
g_ TM7 bacterium human oral taxon HOT-869	1.36 (0.22 to 8.23)	0.73843	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Gardnerella	0.74 (0.12 to 4.50)	0.74729	53.3 (41.7 to 64.9)
g_ Carnobacterium	1.34 (0.22 to 8.13)	0.74862	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Intestinibacter	1.34 (0.22 to 8.12)	0.74925	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Corynebacterium 1	0.75 (0.12 to 4.51)	0.74933	53.6 (46.6 to 60.6)
g_ [Eubacterium] xylanophilum group	1.34 (0.22 to 8.09)	0.75213	52.9 (30.9 to 74.8)
g_ Streptococcus	1.33 (0.22 to 8.04)	0.75772	54.3 (31.8 to 76.8)
g_ Bacteroides	1.33 (0.22 to 8.02)	0.75942	61.0 (39.7 to 82.2)
g_ Anaerostipes	1.32 (0.22 to 8.02)	0.75952	56.2 (34.5 to 77.9)
g_ Tyzzerella 4	1.32 (0.22 to 8.00)	0.76150	50.0 (36.9 to 63.1)
g_ TM7 phylum sp. oral clone FR058	1.31 (0.22 to 7.96)	0.76612	51.0 (33.7 to 68.2)
g_ uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	1.31 (0.22 to 7.95)	0.76719	50.5 (31.9 to 69.0)
g_ Lactobacillus	0.76 (0.13 to 4.62)	0.76758	53.8 (34.2 to 73.4)
g_ Clostridioides	1.30 (0.22 to 7.90)	0.77251	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Clostridium sp. CAG:306	1.30 (0.22 to 7.89)	0.77313	53.1 (41.7 to 64.4)
g_ Rothia	1.30 (0.21 to 7.86)	0.77682	56.2 (41.0 to 71.4)
g_ Oribacterium	1.29 (0.21 to 7.83)	0.78017	55.7 (40.5 to 71.0)
g_ XXX	1.29 (0.21 to 7.81)	0.78172	60.5 (39.0 to 82.0)
g_ Succiniclasticum	1.29 (0.21 to 7.80)	0.78282	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Erysipelotrichaceae UCG-006	0.78 (0.13 to 4.71)	0.78476	50.5 (40.9 to 60.1)
g_ Ruminiclostridium 6	0.78 (0.13 to 4.72)	0.78690	54.3 (32.2 to 76.4)
g_ Weissella	0.78 (0.13 to 4.74)	0.79003	51.4 (38.2 to 64.6)
g_ Mesorhizobium	1.27 (0.21 to 7.72)	0.79183	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Tropheryma	1.27 (0.21 to 7.72)	0.79183	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Allisonella	1.26 (0.21 to 7.66)	0.79844	52.6 (41.2 to 64.1)
g_ Acinetobacter	1.25 (0.21 to 7.59)	0.80600	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Selenomonas 4	1.25 (0.21 to 7.59)	0.80600	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ TM7 phylum sp. canine oral taxon 237	1.25 (0.21 to 7.59)	0.80600	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Prevotellaceae NK3B31 group	1.25 (0.21 to 7.58)	0.80700	51.0 (32.9 to 69.0)
g_ Olsenella	1.25 (0.21 to 7.56)	0.80873	50.5 (31.9 to 69.0)
g_ Lachnospirae NC2004 group	0.80 (0.13 to 4.87)	0.81293	53.6 (46.6 to 60.6)
g_ gut metagenome	0.80 (0.13 to 4.87)	0.81326	53.8 (34.2 to 73.5)
g_ Cetobacterium	1.24 (0.20 to 7.48)	0.81809	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Flexilinea	1.23 (0.20 to 7.44)	0.82277	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ Prototheca zopfii	1.23 (0.20 to 7.44)	0.82295	53.3 (46.8 to 59.9)
g_ [Eubacterium] hallii group	0.82 (0.13 to 4.95)	0.82630	53.3 (35.9 to 70.7)
g_ uncultured	1.22 (0.20 to 7.41)	0.82662	67.6 (47.2 to 88.1)
g_ Butyrivibrio	0.82 (0.14 to 4.95)	0.82673	53.3 (41.7 to 64.9)
g_ Dorea	0.82 (0.14 to 4.95)	0.82686	51.9 (29.8 to 74.0)
g_ Alloscardovia	0.82 (0.14 to 4.97)	0.82928	50.5 (37.4 to 63.6)
g_ Alistipes	1.20 (0.20 to 7.27)	0.84241	53.3 (31.3 to 75.3)
g_ Caproiciproducens	0.85 (0.14 to 5.12)	0.85490	50.0 (30.4 to 69.6)
g_ Enterorhabdus	0.85 (0.14 to 5.13)	0.85670	51.2 (31.1 to 71.3)
g_ uncultured bacterium	1.18 (0.19 to 7.12)	0.85988	55.7 (33.8 to 77.6)
g_ Megamonas	0.86 (0.14 to 5.23)	0.87279	51.0 (37.8 to 64.1)
g_ Harryflintia	0.87 (0.14 to 5.28)	0.88144	52.9 (35.4 to 70.3)

g [Ruminococcus] gauvreauii	0.87 (0.14 to 5.29)	0.88237	51.9 (31.1 to 72.8)
group			
g Akkermansia	1.14 (0.19 to 6.93)	0.88309	55.5 (33.3 to 77.6)
g Eisenbergiella	1.14 (0.19 to 6.93)	0.88389	51.2 (31.0 to 71.4)
g Clostridium sensu stricto 1	0.88 (0.15 to 5.33)	0.88925	51.9 (31.2 to 72.6)
g Lachnospirae NK4B4	0.89 (0.15 to 5.38)	0.89726	50.5 (40.9 to 60.1)
group			
g Ruminococcus NK4A214	0.90 (0.15 to 5.42)	0.90429	51.4 (29.1 to 73.8)
group			
g uncultured organism	0.90 (0.15 to 5.43)	0.90490	51.2 (32.1 to 70.3)
g Leuconostoc	1.08 (0.18 to 6.56)	0.93015	51.2 (32.1 to 70.3)
g Cloacibacillus	0.92 (0.15 to 5.59)	0.93049	51.7 (33.6 to 69.7)
g Mycoplasma	1.08 (0.18 to 6.55)	0.93214	50.0 (36.9 to 63.1)
g Lachnospirae UCG-004	0.93 (0.15 to 5.62)	0.93501	53.3 (35.9 to 70.8)
g Lactonifactor	1.07 (0.18 to 6.48)	0.94097	50.0 (36.9 to 63.1)
g Mogibacterium	0.94 (0.16 to 5.69)	0.94621	51.4 (36.9 to 66.0)

Coefficiente de incremento en la frecuencia de los géneros bacterianos en el grupo de pacientes con respecto al grupo control que presentan un nivel de significación de $p > 0,1$.

