



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Eje intestino-cerebro: modificaciones de la microbiota intestinal en enfermedades priónicas.

Gut-brain axis: modifications of gut microbiota in prion diseases.

Autora

Paula De Diego Abejón

Directoras

Laura Grasa López

Inmaculada Martín Burriel

Facultad de Veterinaria

2024

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	
2.1. Eje intestino-cerebro.....	5
2.2. Enfermedades prion-like.....	5
2.2.1. Enfermedad de Parkinson.....	6
2.2.2. Enfermedad de Alzheimer.....	7
2.3. La microbiota en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.....	7
2.3.1. Diagnóstico.....	7
2.3.1.1. Enfermedad de Parkinson.....	8
2.3.1.2. Enfermedad de Alzheimer.....	8
2.3.2. Tratamiento.....	9
2.3.2.1. Enfermedad de Parkinson.....	10
2.3.2.2. Enfermedad de Alzheimer.....	11
2.4. Enfermedades priónicas.....	12
2.5. Microbiota en enfermedades priónicas.....	14
2.6. Scrapie: la resistencia del prión.....	15
3. Justificación y objetivos	17
4. Metodología	18
5. Resultados y discusión	
5.5. Composición de la microbiota intestinal en las ovejas control y con Scrapie.....	19
5.6. Alfa y beta diversidad.....	20
5.7. Diferencias en la abundancia bacteriana.....	24
5.8. Discusión.....	27
6. Conclusiones	30
7. Valoración personal	31
8. Bibliografía	32

1. RESUMEN

El eje intestino-cerebro (EIC) consiste en la comunicación bidireccional entre el sistema nervioso central (SNC) y el entérico (SNE), uniendo los centros emocionales y cognitivos del cerebro con las funciones intestinales periféricas. Esta red de comunicación incluye, además del SNC y SNE, el sistema nervioso autónomo (SNA) y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, combinando líneas de comunicación hormonales y neuronales. La microbiota intestinal tiene un impacto en el EIC, interactuando no sólo localmente con las células intestinales del SNE, sino también con el SNC regulando la química cerebral e influenciando el sistema neuroendocrino asociado con la respuesta al estrés, la ansiedad y la memoria. Un número creciente de estudios han relacionado alteraciones en la microbiota intestinal con enfermedades neurodegenerativas de tipo "prion-like" como Alzheimer o Parkinson. Son menos los estudios realizados en enfermedades priónicas.

Además de revisar los pocos artículos disponibles de las enfermedades priónicas, valoramos, a partir de los resultados de un análisis de microbiota en heces de ovino infectada de forma natural con scrapie, la composición de la microbiota intestinal en las ovejas control y con scrapie y así analizar posibles diferencias. A partir de la bibliografía consultada y del análisis de resultados podemos concluir: que por primera vez se describen alteraciones en la microbiota intestinal de un modelo natural de ovino con scrapie sugiriendo la relevancia del eje intestino-cerebro también en estas patologías; que en las enfermedades priónicas se producen alteraciones similares a las descritas en otras enfermedades neurodegenerativas prion-like; que la variación en la composición de la microbiota podría influir sobre la patogenia de la enfermedad así como podría estar agravando la enfermedad por la alteración del metabolismo de los AGCC; y que el aumento de ciertas bacterias podría paliar en parte los efectos perjudiciales de otras bacterias.

The gut-brain axis (GBA) consists of bidirectional communication between the central nervous system (CNS) and the enteric nervous system (ENS), linking the emotional and cognitive centres of the brain with peripheral gut functions. This communication network includes, in addition to the CNS and ENS, the autonomic nervous system (ANS) and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, combining hormonal and neural lines of communication. The gut microbiota has an impact on the GBA, interacting not only locally with the gut cells of the ENS, but also with the CNS, regulating brain chemistry and influencing brain chemistry regulating brain chemistry and influencing the neuroendocrine system associated with stress response, anxiety and memory. A growing number of studies have linked alterations in the gut

microbiota to prion-like neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease and Parkinson disease. Fewer studies have been conducted in prion-like diseases. Fewer studies have been conducted on prion-like diseases.

We review the few available articles of prion diseases and we assess, based on the results of a microbiota analysis in sheep naturally infected with scrapie feces, the composition of the gut microbiota in control sheep and sheep with scrapie and analyze possible differences. From the bibliography consulted and the analysis of the results, we conclude: for the first time, alterations in the gut microbiota of a natural model of sheep with scrapie are described suggesting the relevance of the gut-brain axis also in these pathologies; prion diseases produce alterations similar to those described in other prion-like neurodegenerative diseases; variation in the composition of the microbiota could influence the pathogenesis of the disease as well as aggravate the disease by altering the metabolism of SCFAs; and the increase in certain bacteria could partly mitigate the detrimental effects of other bacteria.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. EJE INTESTINO-CEREBRO

El eje cerebro-intestino consiste en un vínculo nervioso bidireccional en el que se intercambian mensajes y respuestas los componentes del Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Entérico (SNE) (Malagelada J. R., 2020). Entre estos componentes se incluyen las conexiones intracerebrales que se establecen entre la corteza cerebral, el sistema límbico, el eje hipotalámico-pituitario y el sistema cerebral; las vías neuronales, como el SNE, los nervios vagos (aférente y eférente) y espinales; y el sistema nervioso autónomo (simpáticos y parasimpático). También se consideran las vías humorales, que incluyen citoquinas (factor de necrosis tumoral alfa), hormonas del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal y hormonas gastrointestinales como la grelina que influye en el comportamiento y, por tanto, en el cerebro a través del eje intestino-cerebro, y neuropéptidos (Bercik P. et al., 2012; Malagelada J. R., 2020; Hattori N. et al., 2021).

Los microorganismos del intestino desempeñan una función crucial en el eje intestino-cerebro, influyendo en el funcionamiento cerebral. Los términos microbiota y microbioma se refieren a los microorganismos de un determinado sistema, pero tienen sutiles diferencias. Mientras que la microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos, sobre todo las bacterias, que habitan en el intestino, el microbioma incluye a los microorganismos pero también a sus elementos estructurales y sus metabolitos (Berg G. et al., 2020).

En el eje microbiota-intestino-cerebro (MGBA del inglés *Microbiota Gut Brain Axis*) la interacción ocurre a través del sistema inmunológico, la señalización neuroquímica del huésped, las rutas directas del sistema nervioso entérico y el nervio vago, y la producción de metabolitos como ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos de cadena ramificada y peptidoglicanos (Malagelada J. R., 2020). La microbiota interviene en los procesos nerviosos relacionados con la señalización de la hormona del estrés, la función neuronal y la neuroprotección, así como el desarrollo, la mielinización, la neurogénesis y la activación de la microglía (Margolis K. G. et al., 2021). En el intestino, la microbiota puede comprometer el sistema inmune de manera inadecuada, lo que se ha implicado en la fisiopatología y la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Margolis K. G. et al., 2021; Mayer E. A. et al., 2022).

2.2. ENFERMEDADES PRION-LIKE

Las enfermedades neurodegenerativas (END) se definen comúnmente como patologías que alteran la función cerebral, normalmente acompañadas de atrofia del tejido cerebral y

menor capacidad cognitiva, con tendencia a empeorar con la cronicidad (Lezama Toledo A. R. et al., 2022). Existen evidencias de la conexión entre alteraciones de la microbiota y el desarrollo de las END. Dentro de estas patologías, las conocidas como similares a priónicas o *prion-like* son aquellas que presentan unos mecanismos moleculares similares a las enfermedades priónicas, como cursar con la alteración estructural y acumulación de proteínas mal plegadas en el cerebro. En esta categoría se incluyen las enfermedades de Alzheimer (EA), de Parkinson (EP) o la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), entre otras.

Para el estudio de la microbiota de las END, se pueden tener en cuenta las vías y conexiones del eje cerebro-intestino (Quigley E. M. M., 2017; Lezama Toledo A. R. et al., 2022). El paso de bacterias intestinales a través de una barrera intestinal defectuosa así como una microbiota desequilibrada o la presencia de bacterias inflamatorias (como *Helicobacter pylori*), activan el sistema inmune produciendo una respuesta inflamatoria sistémica que deteriora la barrera hematoencefálica (BHE) y promueve la neuroinflamación favorecida por la liberación de citocinas y la lesión y degeneración neuronal (Quigley E. M. M., 2017; Trichka J. et al., 2021; Lezama Toledo A. R. et al., 2022).

A continuación, se describen la relación entre la microbiota intestinal y la patogenia de distintas enfermedades *prion-like*.

2.2.1. ENFERMAD DE PARKINSON

La EP cursa con una alfa-sinucleinopatía, con evidencias de que se podría originar en el SNE y propagarse hasta el cerebro a través del nervio vago de forma similar a los priones (Trichka J. et al., 2021; Lezama-Toledo A. R. et al., 2022). Este proceso estaría favorecido por una comunicación intracelular mediante neurotransmisores y neuromoduladores de bacterias intestinales y una permeabilidad de la BHE comprometida (Lezama Toledo A. R. et al., 2022). La agregación de alfa-sinucleína es acelerada por una proteína amiloide de la superficie celular llamada fibra curli producida por *Escherichia coli* resistente en el intestino (Trichka J. et al. 2021). En conjunto, se inducen respuestas inmunes e inflamatorias sistémicas y neurodegeneración dopaminérgica (Lezama Toledo A. R. et al., 2022). En el cerebro, la alfa-sinucleína altera la homeostasis celular e induce la muerte neuronal a través de la inhibición de la señalización sináptica, la alteración de la dinámica del citoesqueleto, y la pérdida de la capacidad de degradación de proteínas y la fragmentación mitocondrial (Trichka J. et al., 2021).

Los pacientes con EP muestran un microbioma intestinal desequilibrado (disbiosis) caracterizado principalmente por una supresión de Prevotellaceae, géneros antiinflamatorios como *Coprococcus*, y la pérdida de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta.

Además, se observa una proliferación de Proteobacterias proinflamatorias, Enterococcaceae y Enterobacteriaceae. También la reducción de los géneros bacterianos Roseburia, Fusicatenibacter, Blautia, Anaerostipes y Faecalibacterium, que predispone a niveles más bajos de butirato intestinal. Se ha observado un aumento de especies de Akkermansia, que causa una mayor inflamación y permeabilidad intestinal, y de Methanobrevibacter, que causa una mayor producción de metano (Quigley E. M. M., 2017; Trichka J. et al., 2021; Lezama Toledo A. R. et al., 2022).

2.2.2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La etiología de la EA se ha relacionado estrechamente con la microbiota y una variedad de sus metabolitos (Liu L. et al., 2022). El epitelio del tracto gastrointestinal y la barrera hematoencefálica se vuelven más permeables durante el envejecimiento, permitiendo así que los polisacáridos y los amiloides accedan al cerebro, causando inflamación. Se desencadena entonces un complejo proceso neurodegenerativo que implica la formación aberrante de placas de β -amiloide ($A\beta$), así como ovillos neurofibrilares de Tau hiperfosforilada, y también intervienen las fibras curli, como en la EP. En un entorno repleto de depósitos amiloides tóxicos y proinflamatorios, la microglía se ve desbordada y no puede eliminar eficazmente los residuos. Esto conduce a la activación inmunitaria, la inflamación crónica y el estrés oxidativo, produciéndose la muerte celular y la disminución de las funciones cerebrales normales (Trichka J. et al., 2021; Lezama Toledo A. R. et al., 2022).

La composición de la microbiota intestinal cambia a medida que envejecemos y ciertas bacterias protectoras, como Bacteroidetes, Bifidobacterias y Lactobacillus, disminuyen (Lezama Toledo A. R. et al., 2022). En pacientes con EA, en algunos casos se observa un aumento de especies de Ruminococcaceae y en otros una disminución de Firmicutes y Bifidobacterium (Trichka J. et al., 2021).

2.3. LA MICROBIOTA EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Dada la estrecha interacción entre las bacterias intestinales y el cerebro, la disbiosis de la microbiota intestinal emerge como un área de interés para investigar nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos.

2.3.1. DIAGNÓSTICO

La interacción bidireccional entre la microbiota intestinal y el Sistema Nervioso

Central, el llamado MGBA, afecta profundamente la función cerebral y tiene un impacto importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Varesi A. et al., 2022a). Por lo que los biomarcadores relacionados con la microbiota intestinal pueden representar una herramienta alternativa/complementaria prometedora para evaluar las condiciones de las enfermedades (Varesi A. et al. 2022b). Dado que los síntomas gastrointestinales a menudo preceden a la aparición de trastornos cerebrales, los biomarcadores derivados del microbioma intestinal también se han considerado para enfermedades neurodegenerativas, aportando una poderosa capacidad de predicción y diagnóstico diferencial de casos de pacientes con Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de Alzheimer (Varesi A. et al., 2022a; Varesi A. et al., 2022b).

2.3.1.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

Se han buscado biomarcadores basados en la composición de la microbiota intestinal para el diagnóstico de EP, entre los que se han propuesto la reducción de Prevotellaceae. La escasez de Roseburia en pacientes con EP *de novo* fue predictivo de un deterioro más rápido de la capacidad motora, no motora e intelectual en tres años. Además, una reducción en la abundancia de Fusicatenibacter, Blautia y Faecalibacterium, junto con una mayor presencia de Akkermansia, se correlaciona con una progresión más rápida de la enfermedad, y los bajos niveles de Barnesiella al inicio y al año de seguimiento se asociaron con una peor evolución clínica de la EP. Por otra parte, se ha medido la abundancia de ciertas moléculas producidas por la microbiota intestinal en la circulación sanguínea para el diagnóstico de EP. Por ejemplo, los niveles bajos de óxido de trimetilamina en plasma, medidos en una etapa temprana de la enfermedad, predicen desarrollo de demencia, sirviendo como marcador de pronóstico. La gravedad de la enfermedad se ha asociado con niveles más bajos de urolitina en la orina, una molécula antiinflamatoria producida por la microbiota intestinal tras la ingesta de polifenoles. Cuando la urolitina es baja refleja una condición de disbiosis caracterizada por un crecimiento excesivo de los microorganismos proinflamatorios Enterobacteriaceae a expensas de los beneficiosos Lachnospiraceae y Gordonibacter (Varesi A. et al., 2022a).

2.3.1.2. ALZHEIMER

Se pueden considerar para diagnóstico de la EA los cambios en las comunidades bacterianas entre grupos y las variaciones en los metabolitos circulantes. En estudios realizados con modelos murinos, se han obtenido resultados diferentes en función del transgénico utilizado. En el modelo triple transgénico, Actinobacteria y el filo TM7 parecen ser más precisos en el diagnóstico de la EA que las diferencias significativas de especies de

Prevotella y Helicobacter observadas en los transgénicos APP/PS1. Utilizando este mismo modelo, se ha sugerido para el diagnóstico temprano o de pacientes con EA leve, la detección de grandes cambios en la abundancia de las familias Proteobacteriaceae, Verrucomicrobiaceae, Bifidobacteriaceae, Erysipelotrichaceae, Prevotellaceae, Bacteroidaceae y Rikenellaceae (Varesi A. et al., 2022b).

En estudios con *Drosophila melanogaster*, se ha identificado a Wolbachia como un posible biomarcador de EA, mientras que Stenotrophomonas parece ejercer un papel beneficioso en la prevención de la neurodegeneración. En estudios con pacientes humanos, algunos biomarcadores como enterobacterias, SCFA y abundancia de ácido indol-3-pirúvico, tienen la capacidad para diagnosticar de manera diferencial entre una enfermedad sintomática leve y una etapa más avanzada. Finalmente, el cambio progresivo de géneros *Faecalibacterium* a Bifidobacteria en EA ofrece la posibilidad de seguir la proporción de géneros productores de butirato/lactato como marcador de enfermedad de neurodegeneración (Varesi A. et al., 2022b).

2.3.2. TRATAMIENTO

Los probióticos son microorganismos vivos no patógenos conocidos por sus efectos beneficiosos para la salud (Wang Y. et al., 2022). Dentro de esta categoría se incluyen Lactobacillus, Streptococcus, Propionibacterium y Bifidobacterium. Tanto estos microorganismos como el ácido ferúlico sintetizado por la microbiota intestinal son eliminadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) con potencial terapéutico en diversas enfermedades crónicas como la neurodegeneración. Además, las moléculas secretadas por la microbiota como el butirato y el β -hidroxibutirato y la hormona gastrointestinal grelina provocan efectos neuroprotectores en enfermedades neurodegenerativas (Westfall S. et al., 2017; Wang Y. et al., 2022).

Además del uso de probióticos para el tratamiento de END, se ha propuesto también el uso de prebióticos. La definición de prebióticos se refiere más comúnmente a los carbohidratos dietéticos que son fermentados selectivamente por la microbiota intestinal para modular la composición de la microbiota y, a su vez, conferir beneficios para la salud del huésped (Peterson C. T., 2020). Por otra parte, también se usan los simbióticos que son una combinación de probióticos y prebióticos donde los prebióticos mejoran la viabilidad del probiótico, proporcionando una fuente de fibra fermentable y actuando como un prebiótico general (Long-Smith C. et al., 2020).

Por último, como terapia se usa un método cada vez más popular de modificación del microbioma que es la transplatación de microbiota fecal (TMF). Este tratamiento implica la

transferencia de microbiota intestinal de un individuo "sano" a uno que tiene un microbioma intestinal "enfermo", generalmente con el objetivo de corregir la disbiosis en el receptor (Matheson J.-A. T. et Holsinger R. M. D., 2023). El TMF es un procedimiento relativamente seguro, y es posible curar casi todas las complicaciones del TMF sólo con terapia antibiótica (Trichka J. et al., 2021).

2.3.2.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La suplementación con las cepas probióticas de bifidobacterias y lactobacilos producen vitaminas y moléculas bioactivas como antioxidantes, que desempeñan un papel importante en la patología de Parkinson (Wang Y. et al., 2022). La administración de SLAB51, una nueva formulación probiótica, fue capaz de aumentar la viabilidad celular mediante la reducción del estrés oxidativo y la muerte neuronal en un modelo humano in vitro, así como de revertir los déficits fenotípicos en el comportamiento motor cuando se administró a un modelo de EP en roedores (Liu L. et al., 2022). Por otra parte, se ha descrito como el metabolito bacteriano β -hidroxibutirato disminuye la agregación de alfa-sinucleína de una manera dependiente de los factores de transcripción reguladores del envejecimiento DAF-16/FoxO en *Caenorhabditis elegans*. Finalmente, la hormona gastrointestinal grelina parece proporcionar protección en un modelo tóxico de EP al reducir la pérdida de células dopaminérgicas y proteger la integridad mitocondrial (Westfall S. et al., 2017).

En pacientes con EP, un simbiótico que contenía probióticos multicepa más un prebiótico y leche fermentada mejoraron los síntomas gastrointestinales funcionales, como estreñimiento, aumentando significativamente el número de evacuaciones intestinales completas (Long-Smith C. et al., 2020; Peterson C. T., 2020). En otros estudios realizados en humanos, el probiótico multicepa que contiene *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus fermentum* mejoró la inflamación y parámetros metabólicos; y el probiótico multicepa que contiene *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus reuteri*, y *Lactobacillus fermentum* mejoró el movimiento y parámetros metabólicos de los pacientes con Parkinson (Peterson C. T., 2020).

En un estudio con ratones C57BL/6, con la administración de TMF por sonda oral una vez al día durante 7 días y el tratamiento durante 5 días con inyección intraperitoneal de la neurotoxina MPTP se observó mejora de la función motora, aumento de los neurotransmisores del sistema nervioso estriado, aumento de las neuronas dopaminérgicas, reducción de la neuroinflamación originada en la glía y aumento de Firmicutes en comparación con los controles. Además, con cinco semanas de inyección de la neurotoxina MPTP seguidas de la administración de 14 infusiones de FMT, a nivel neurológico, se observó mejoras en las

pruebas de comportamiento, protección contra el daño neuronal y reducción de la neuroinflamación. En este estudio, a nivel gastrointestinal, se determinó la disminución de la inflamación en el intestino, disminución de *Anaerostipes*, *Bifidobacterium*, *Turicibacter*, ASF356 y *Ruminococcus*, y aumento de *Blautia* (Matheson J-A. T. et Holsinger R. M. D., 2023).

Finalmente, también se ha evaluado la acción terapéutica del uso de ciertos antibióticos en la EP. Como ejemplo, el medicamento antibiótico Rifaximina redujo poblaciones bacterianas potencialmente deletéreas y alivió los síntomas clínicos de la enfermedad, incluyendo los marcadores séricos de inflamación (Liu L. et al., 2022).

2.3.2.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La suplementación con las mezclas probióticas que consisten en *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve* y otros probióticos en el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer temprana en ratones transgénicos mejoran la disfunción cognitiva y reducen el daño cerebral al inhibir la formación de placa β -amiloide y alterar la microbiota intestinal (Wang Y. et al., 2022). Además, el tratamiento con probióticos multicepa (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*) con selenio, así como con el probiótico multicepa que contiene *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus fermentum*, parecen mejorar la cognición y parámetros metabólicos en ratones modelo (Long-Smith C. et al., 2020; Peterson C. T., 2020). En otro estudio se ha demostrado como el tratamiento con los probióticos *Acetobacter acetii*, *Acetobacter sp.*, *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc spp.*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Candida famata* y *Candida krusei* mejora también la cognición, además de los marcadores de inflamación sistémica, estrés oxidativo y daño a las células sanguíneas (Peterson C. T., 2020).

El metabolito bacteriano ácido ferúlico, un antioxidante de origen vegetal, previene la toxicidad relacionada con β -amiloide tanto en modelos de EA *in vitro* como *in vivo* al inhibir directamente la agregación de β -amiloide y la actividad de la β -secretasa. El metabolito bacteriano β -hidroxibutirato también retrasa la toxicidad. De hecho, el tratamiento oral con ácido ferúlico administrado durante seis meses redujo varios fenotipos conductuales típicos de EA en ratones al tiempo que redujo la formación de fibrillas β -amiloide, la escisión de la proteína precursora amiloide β -carboxi-terminal (APP), la neuroinflamación y el estrés oxidativo. El metabolito bacteriano ácido butírico también tiene un efecto directo sobre las aferentes vagales, una estimulación que se ha demostrado en ensayos clínicos que es beneficiosa para el conocimiento en pacientes con EA. Además, se ha descrito en un modelo

de rata que tanto el ácido butírico como el propiónico redujeron significativamente la expresión del precursor de la proteína β A4 amiloide, lo que indica los posibles papeles neuroprotectores contra la EA (Westfall S. et al., 2017).

Por otra parte, en relación con las hormonas gastrointestinales, la grelina ha sido implicada en la promoción de la plasticidad sináptica y el rescate de los problemas de memoria en los modelos de Alzheimer. Se demostró que la grelina reduce la acumulación tóxica de β -amiloide al tiempo que inhibe la respuesta inflamatoria excesiva. Del mismo modo, el metabolito bacteriano histamina se identificó recientemente como un posible agente terapéutico contra la enfermedad del Alzheimer. Recientemente se descubrió que la histamina es un producto del metabolismo microbiano intestinal; géneros como *Lactobacillus* (como *Lactobacillus reuteri*), *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* spp. tienen el gen de la histidina descarboxilasa y pueden producir histamina (Westfall S. et al., 2017).

La suplementación con prebióticos, como los oligosacáridos de quitosano, también parecen reducir los déficits cognitivos al inhibir el estrés oxidativo y las respuestas neuroinflamatorias en el modelo de rata de EA inducido por amiloide- β 1-42 (Peterson C. T., 2020).

En esta enfermedad también se ha analizado el efecto del tratamiento con trasplante de microbiota fecal (TMF) en modelos murinos. Por ejemplo, siete infusiones diarias consecutivas administradas por sonda oral causaron la disminución del área de placa amiloide en el modelo de ratón 5xFAD. Otro ejemplo sería el tratamiento con antibióticos durante tres días antes y TMF administrado por sonda oral diariamente durante 4 semanas en el modelo de ratón APP/PS1, que mejoró los resultados conductuales y redujo las placas A β y la neuroinflamación, corrigió las anomalías del microbioma y los niveles del metabolito bacteriano butirato aumentaron (Matheson J.-A. T. et Holsinger R. M. D., 2023).

Finalmente, se ha demostrado que el tratamiento con antibióticos disminuye la amiloidosis y la activación microglial en un modelo murino de Alzheimer (Trichka J. et al., 2021).

2.4. ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Las enfermedades priónicas, o encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), son una clase de enfermedades neurodegenerativas mortales que pueden afectar tanto a los seres humanos como a algunas especies animales domésticas y en libertad (Yanga D. et al., 2020). Según la hipótesis priónica, las EET están causadas por agentes infecciosos conocidos como priones, que consisten en una forma anómala de la proteína priónica celular (PrP) asociada a la enfermedad, denominada PrP^{Sc} (de proteína prion scrapie). Las EET se caracterizan por la

conversión de las proteínas priónicas celulares codificadas por el huésped (PrP^C) en sus isoformas patógenas (PrP^{Sc}), que se acumulan en el sistema nervioso central. El cambio en la estructura de plegamiento de la proteína conduce a la resistencia característica de la PrP^{Sc} hacia la inactivación (Böhlein C. et al., 2012).

Los priones son únicos entre los agentes infecciosos porque parecen carecer de ácido nucleico y comprenden únicamente la proteína PrP^{Sc} (Donaldson D. S. et Mabbott N. A., 2016). El depósito de PrP^{Sc} resistente a la proteasa en el cerebro provoca la inducción de astrocitos reactivos que expresan altos niveles de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), seguido de una patología espongiiforme significativa (vacuolación) tanto en neuronas como en el neuropilo, y una pérdida neuronal (Bradford B. M. et al., 2017; Trichka J. et al., 2021).

La neurodegeneración sólo se produce cuando la acumulación de PrP^{Sc} se asocia a una respuesta inmune innata aumentada por parte de la microglía en las mismas regiones cerebrales. Por tanto, los factores que aumentan la destrucción de neuronas por la microglía pueden aumentar la progresión de la enfermedad priónica del SNC (Bradford B. M. et al., 2017). Así, la microglía puede cambiar a un perfil más proinflamatorio en caso de infección por patógenos sistémicos o exposición a endotoxinas como el LPS bacteriano, que también pueden potenciar el plegamiento anormal de la PrP recombinante. Estos cambios en el estado microglial exageran agudamente el deterioro cognitivo, alteran la coordinación motora y aceleran la progresión de la enfermedad priónica del SNC (Donaldson D. S. et Mabbott N. A., 2016).

La PrP^{Sc} aparece inicialmente en las neuronas intestinales y en los tejidos linfoides asociados al intestino dentro del revestimiento intestinal, incluidas las amígdalas, las placas de Peyer, el apéndice y los segmentos colónicos y cecales, junto con los ganglios linfáticos mesentéricos (Yanga D. et al., 2020). Se ha descubierto que la replicación temprana de priones en el intestino es esencial para su propagación al cerebro y que el epitelio luminal intestinal también participa en el transporte de PrP^{Sc} que se inicia en las células M (Donaldson D. S. et Mabbott N. A., 2016; Yanga D. et al., 2020). Esto sugiere que el agente patógeno puede causar trastornos en el entorno intestinal y, por lo tanto, dar lugar a una serie de alteraciones complejas del metabolismo celular, que pueden intensificar aún más la infección por priones en el cerebro (Yanga D. et al., 2020)

La microbiota intestinal puede ser otro mecanismo por el que los patógenos priónicos ejercen su efecto (Yanga D. et al. 2020). Por ejemplo, el daño a la mucosa intestinal mediado por patógenos gastrointestinales puede exacerbar la patogénesis de la enfermedad al potenciar la captación de priones desde el lumen, así como también puede intensificar la cantidad de priones vertidos al medio ambiente (Donaldson D. S. et Mabbott N. A., 2016).

Dentro del conjunto de enfermedades priónicas, algunas tienen una etiología idiopática, aparentemente surgen espontáneamente en el SNC y pueden tener formas esporádicas y genéticas, como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) esporádica y la prionopatía proteinasa sensible variable. Otras, como el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, la ECJ genética y el insomnio fatal familiar, están asociadas a mutaciones dentro del gen *PRNP* (que codifica PrP^C) que puede predisponer a PrP^C a plegarse anormalmente en la isoforma patógena (Donaldson D. S. et Mabbott N. A., 2016; Trichka J. et al., 2021). También pueden adquirirse por infección con priones exógenos como la ECJ iatrogénica por contaminación médica y quirúrgica (Trichka J. et al., 2021). Muchas otras enfermedades priónicas se adquieren tras el consumo oral de alimentos contaminados con priones. Entre ellas se incluyen la tembladera natural de las ovejas o scrapie, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), la enfermedad debilitante crónica en especies de cérvidos como los ciervos y los alces, la enfermedad de Kuru en humanos por la ingesta de cerebros contaminados en prácticas de canibalismo y la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos por el consumo de productos cárnicos contaminados procedentes de ganado con EEB (Donaldson D. S. et Mabbott N. A., 2016; Trichka J. et al., 2021).

2.5. MICROBIOTA EN ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Hay pocos estudios realizados relativos al cambio y papel de la microbiota en enfermedades priónicas.

En un estudio realizado en modelo de ratón hembra C57BL/6, se observó que, a nivel de filo, las Proteobacterias estaban incrementadas en el grupo infectado con priones, mientras que las Saccharibacterias mostraban la tendencia opuesta; ambas pueden estar implicadas en la inflamación intestinal y extraintestinal y otras reacciones metabólicas, que causan cambios mentales y físicos e intensifican la enfermedad después de la infección por priones. A nivel de familia, Lactobacillaceae y Helicobacteraceae, aumentaron en el grupo infectado, mientras que Ruminococcaceae y Prevotellaceae disminuyeron en el grupo infectado (Yang D. et al., 2020).

Un estudio realizado en humanos indica los cambios y el papel de la microbiota centrándose sólo en la enfermedad priónica ECJ y comparando los resultados con el grupo control. Por un lado, los filos Alphaproteobacteria y Proteobacteria, así como su familia Succinivibrionaceae y género *Succinivibrio*, mostraron un aumento de su abundancia y se asociaron positivamente con demencia clínica. El filo Actinobacteria, cuyo papel exacto en la enfermedad priónica todavía se desconoce, aumento significativamente; asimismo, el aumento de su familia Bifidobacteriaceae puede producir un exceso de butirato, el cual induce la apoptosis del epitelio intestinal aumentando la permeabilidad intestinal. Al igual que los

anteriores, el filo Fusobacteria también aumento significativamente, así como su clase Fusobacteria, la familia Fusobacteriaceae y el género *Fusobacterium*. El filo Fusobacteria induce inflamación sistémica, que puede acelerar la enfermedad priónica a través del cambio de las células de la microglía hacia un perfil más proinflamatorio, y mediante las células M, cuya densidad aumenta significativamente conduciendo a un aumento de la transferencia de priones. Por otra lado, dentro del filo Firmicutes, disminuyó la abundancia de su clase Negativicutes y de los géneros *Roseburia*, *Holdemanella* y *Lachnospiraceae_ND3007*. La disminución de la abundancia del filo Firmicutes puede causar una escasez de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), producidos por este filo, provocando así la desregulación tanto de las células microgliales cerebrales como de la permeabilidad intestinal (Guo Y. et al., 2022).

2.6. SCRAPIE Y LA RESISTENCIA DEL PRIÓN

En esta enfermedad priónica natural que afecta a ovino y caprino, únicamente se ha estudiado la resistencia del prion en el sistema digestivo, pero no se han desarrollado estudios de microbiota o microbioma.

En estudios *in vitro* con fluidos del tracto alimentario de ovinos, se ha observado la degradación proteolítica de PrP^{Sc} hasta niveles inmunoquímicamente indetectables (Scherbel C. et al., 2007). Esta degradación ocurre mediante la acción de proteasas extracelulares como por ejemplo proteinasa K (PK) y subtilisina de *Bacillus licheniformis*, de *Streptomyces* y de procariotas termófilos anaeróbicos como *Thermococcus*, *Thermosipho*, *Thermoanaerobacter*. Además, se ha evidenciado esta degradación por algunas bacterias transmitidas por los alimentos y bacterias grampositivas resistentes a antibióticos, así como por hongos y protozoos (Scherbel C. et al., 2006; Scherbel C. et al., 2007; Huang H. et al., 2010).

Por otro lado, a pesar de estos experimentos en los que parece que la microbiota ruminal e intestinal degrada la PrP^{Sc}, la detección de priones en las heces de ovejas infectadas naturalmente con scrapie sugiere que la PrP^{Sc} sobrevive a los procesos de digestión gastrointestinal en rumiantes (Böhnlein C. et al., 2012). Entre las posibles explicaciones de esta supervivencia se incluyen la resistencia de PrP^{Sc} a enzimas proteolíticas como la tripsina, la proteasa V8 y la pepsina (Scherbel C. et al., 2006); la presencia de inhibidores de proteasas extracelulares; y una concentración elevada de proteínas totales que impide a la PK producir el cambio característico en el peso molecular asociado con la pérdida de la región N-terminal de la PrP observada para la PrP^{Sc}. También se señala la resistencia de los péptidos que contienen prolina, especialmente las secuencias Lys-Pro y Pro-Lys, y/o de los péptidos hidrófobos a la degradación ruminal, lo que impide la hidrólisis de la PrP^{Sc} por las proteasas de la microbiota ruminal, posiblemente por la naturaleza peculiar del plegamiento de la PrP^{Sc} (Nicholson E.M.

et al., 2007). Además, se menciona como posible causa la presencia de antibióticos que alteran la fermentación ruminal (Scherbel C. et al., 2006).

La infectividad generalmente está relacionada con la presencia de la proteína priónica asociada a la enfermedad (PrP^{Sc}). Por ejemplo, tras la degradación por parte de la microflora gastrointestinal del cerebro de hámster infectado con priones, se mantuvo una infectividad priónica residual significativa (Scherbel C. et al., 2007); mientras que la infectividad de PrP^{Sc} pudo ser reducida por la enzima subtilisina termoestable (Huang H. et al., 2010). Respecto a la presencia de PrP^{Sc} resistente a la proteinasa K, se ha llegado a cuestionar su relación con la infectividad, ya que en algunos experimentos que hacían desaparecer la resistencia a la PK, no disminuyeron la infectividad de PrP^{Sc}. Como posibles explicaciones los autores argumentaron que la infectividad es causada por subfracciones de PrP infecciosa no detectables mediante inmunotransferencia (método utilizado para determinar la resistencia a PK), o bien es causada por moléculas o estructuras distintas a la PrP (Scherbel C. et al., 2007).

Como conclusión, la degradación de PrP^{Sc} por parte de la microbiota no parece proporcionar ninguna protección relevante contra una infección de scrapie ovino (Nicholson E.M. et al., 2007).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las alteraciones de la microbiota han sido ampliamente estudiadas en enfermedades prion-like como la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson. Sin embargo, estos estudios son muy escasos en las enfermedades priónicas. El grupo en el que he realizado este TFG se planteó la realización de un estudio de la microbiota en estas enfermedades utilizando el ovino infectado de forma natural con scrapie. En este estudio se analizó un estudio metagenómico de la microbiota en heces de ovino con scrapie y ovino control.

Con estos antecedentes, en este TFG nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Realizar una revisión bibliográfica de las implicaciones del eje intestino cerebro en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas prion-like.
2. Revisar los estudios de microbiota realizados hasta el momento en enfermedades priónicas.
3. Valorar, a partir de los resultados de un análisis de microbiota en heces de ovino con scrapie, la composición de la microbiota intestinal en las ovejas control y con scrapie y analizar posibles diferencias.

4. METODOLOGÍA

4.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se llevó a cabo una revisión exhaustiva de la literatura científica utilizando bases de datos PubMed y Google Scholar. Esta revisión bibliográfica se centró en recopilar información relevante sobre las enfermedades prion-like, el eje intestino-cerebro y su relación con la patogenia y diagnóstico de estas enfermedades. Además, se revisó la información relativa a scrapie y otras enfermedades priónicas.

Las palabras clave utilizadas en esta búsqueda fueron: gut-brain axis, microbiota, neurodegenerative diseases, prion-like, scrapie, diagnostic, therapeutic, dysbiosis, treatment, prion, ruminants, fatty acids.

4.2. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN

En este estudio, se llevó a cabo un análisis detallado e interpretación de los resultados obtenidos a partir del estudio de la microbiota intestinal en ovinos afectados por scrapie y ovinos control.

La toma de muestra de heces se realizó en el marco del proyecto de investigación PI17/21 aprobado por la Comisión Ética Asesora para la experimentación animal de la Universidad de Zaragoza. Se tomó muestra de heces de 10 ovejas con scrapie y 10 ovejas control.

La técnica utilizada para el estudio de la microbiota consistió en la extracción de DNA de las heces, amplificación de fragmentos del gen que codifica para el 16S RNA ribosomal y secuenciación de los amplicones mediante técnicas de secuenciación masiva. Esta secuenciación se llevó a cabo en la empresa Novogene. En esta empresa también se realizaron los estudios bioinformáticos pertinentes para la identificación bacteriana y comparación de la microbiota de animales con scrapie y control.

La interpretación de estos resultados se ha realizado comparando los mismos con la literatura científica relevante y con los estudios realizados en las enfermedades “prion-like”, con el fin de identificar posibles relaciones entre las alteraciones en la microbiota intestinal y la patogénesis de la enfermedad.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LAS OVEJAS CONTROL Y CON SCRAPIE

A nivel de filo, Firmicutes y Bacteroidetes fueron los filos predominantes; Verrucomicrobia, Euryarcheota, Proteobacteria, Fibrobacteres, Actinobacteria, Kiritimatiellaeota, Spirochaetes, Acidobacteria también se encuentran presentes, pero su abundancia es menor (FIGURA 1A). Dentro del filo Firmicutes, Ruminococcaceae es la familia más abundante, seguida de las familias Lachnospiraceae y Christensenellaceae. Otras familias también presentes aunque menos abundantes son Fibrobacteraceae, Rikenellaceae, Bacteroidaceae, Muribaculaceae y Prevotellaceae, pertenecientes todas ellas al filo Bacteroidetes. Las familias Akkermansiaceae dentro del filo Verrucomicrobia y Methanobacteriaceae dentro del Filo Euryarcheota, también están presentes (FIGURA 1C). Ruminococcaceae_UCG-010 y Ruminococcaceae_UCG-005 son los géneros más abundantes presentes en la microbiota intestinal de las ovejas control y con Scrapie; también destacan la presencia de Akkermansia, Christensenellaceae_R-7_group, Bacteroides, Rikenellaceae_RC9_gut_group, Methanobrevibacter, Fibrobacter, Eubacterium_coprostanoligenes_group y Methanocorpusculum (FIGURA 1B).

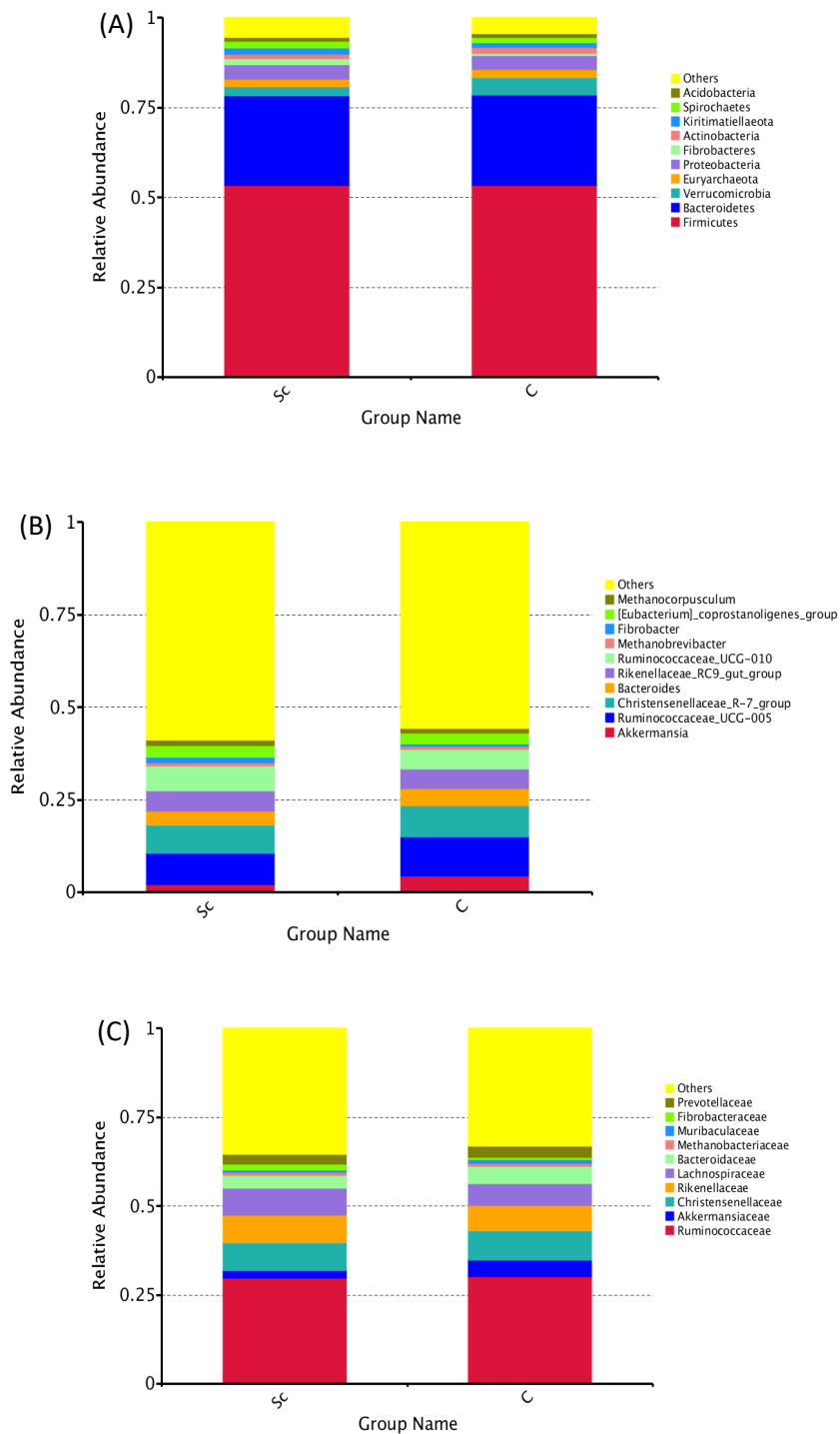


FIGURA 1. Abundancia relativa de taxones en (A) el filo, (B) el género y (C) la familia, para los grupos Scrapie (Sc) y Control (C).

5.2. ALFA Y BETA DIVERSIDAD

La diversidad alfa es un método de análisis que se utiliza para medir la diversidad dentro de una muestra o grupo y permite identificar el número de taxones diferentes dentro

de cada muestra o grupo por separado. Cuando hablamos de diversidad alfa, nos fijamos en dos parámetros: riqueza de especies, que es un recuento del número de especies diferentes presentes en una muestra o grupo y no tiene en cuenta la abundancia de las especies ni sus distribuciones relativas, y uniformidad de las especies, que mide la abundancia relativa de las diferentes especies que componen la riqueza (CosmosID-HUB Microbiome, 2023).

Para comparar la diversidad bacteriana dentro de los grupos, evaluamos cuatro índices de diversidad:

- **Especies observadas:** indica riqueza o cuenta el número de taxones diferentes que se observan en una muestra a un nivel taxonómico determinado, normalmente especies (Castro Nallar E., 2020; Lynch D., 2024).
- **Índice de Simpson:** se utiliza para calcular una medida de diversidad teniendo en cuenta el número de taxones y la abundancia, y da más peso a las especies comunes o dominantes lo que significa que unas pocas especies raras con solo unos pocos representantes no afectarán la diversidad de la muestra.
- **Índice de Shannon:** resume la diversidad de la población asumiendo que todas las especies están representadas en una muestra y que se muestrean al azar, y el índice aumenta a medida que aumenta tanto la riqueza como la uniformidad de la comunidad (CosmosID-HUB Microbiome, 2023).
- **Índice de Chao1:** es un estimador no paramétrico de la riqueza de especies, supone que las especies raras llevan información sobre el número de especies no observadas y asume implícitamente que todos los taxones tienen la misma probabilidad de ser observados (Lahti L., s.f.).

Para representar cada uno de estos índices (FIGURA 2) se utiliza un diagrama de caja (en inglés *boxplot*), que es un gráfico que proporciona un resumen conciso y comprensible de conjuntos de datos potencialmente grandes. Sirven como una forma sencilla de visualizar la distribución estadística y la dispersión de los valores en el conjunto de datos, y también muestra los valores atípicos (APEXCHARTS, s.f.; Numeracy, Maths and Statistics - Academic Skills Kit, s.f.). En el eje Y se representan los valores de los índices de diversidad alfa y en el eje X se representan las variables analizadas, que en nuestro caso se corresponden con los grupos Scrapie (Sc) y Control (C). Un boxplot está compuesto por la línea que divide el cuadro en dos y que representa el valor de la mediana. Esto muestra que el 50% de los datos se encuentran en la parte superior del valor de la mediana y el 50% en la parte inferior del valor de la mediana; el borde inferior de la caja representa cuartil inferior, que representa el 25% de los valores más inferiores; el borde superior del cuadro muestra el cuartil superior, que representa el 25% de los valores más superiores; los valores en los que se detienen las líneas verticales, que son los

valores de los valores superior e inferior de los datos; y los puntos individuales del diagrama que muestran los valores atípicos (Numeracy, Maths and Statistics - Academic Skills Kit, s.f.). Además, se realizaron las pruebas t-test y Wilcox test para analizar estadísticamente las diferencias significativas entre el grupo control (C) y el grupo Scrapie (Sc) para cada uno de los índices de diversidad alfa. El valor de p de las pruebas t-test y Wilcox test de los índices especies observadas (WILCOXON test p = 1), Simpson (WILCOXON test p = 0,05511), Shannon (WILCOXON test p = 0,1051) y chao1 (WILCOXON test p = 0,9118) indican que no se observan diferencias significativas entre los dos grupos.

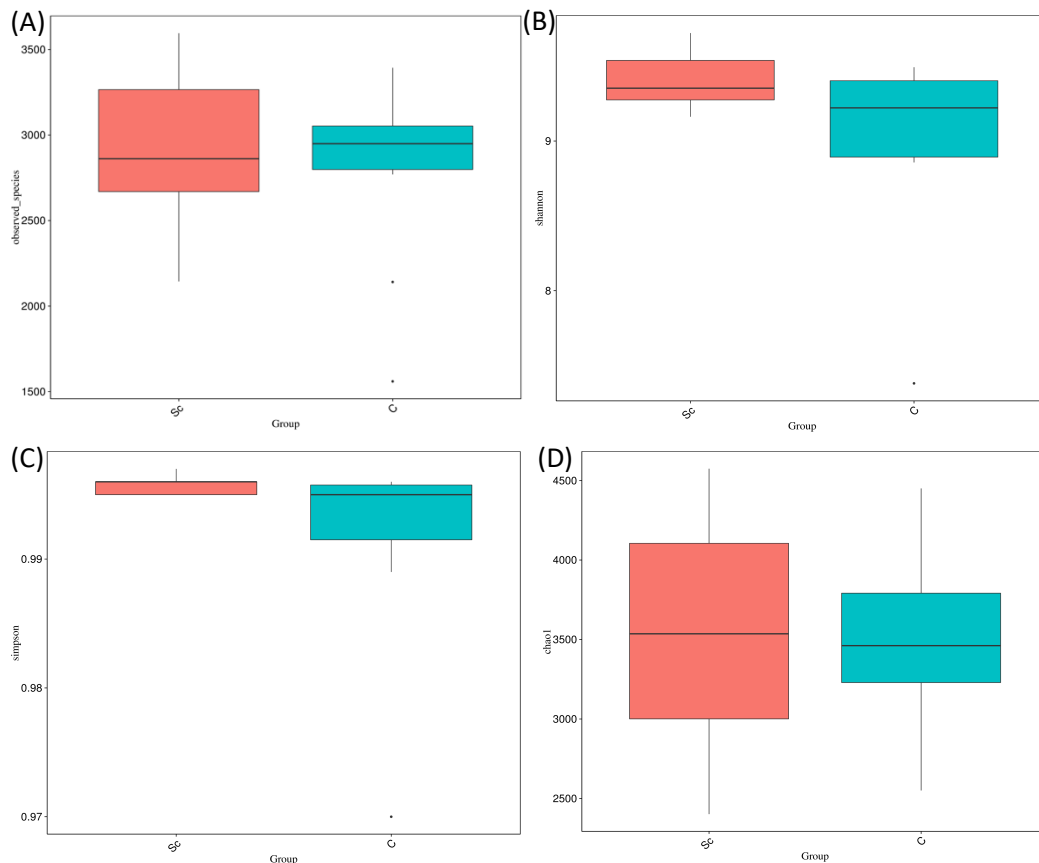


FIGURA 2. Índices de diversidad alfa, (A) especies observadas, (B) índice de Shannon y (C) índice de Simpson e (D) índice de Chao1, para los grupos Scrapie (Sc) y Control (C) utilizando datos taxonómicos.

La diversidad beta es una comparación de muestras o grupos entre sí y mide la distancia o disimilitud entre cada par de muestras, siendo la métrica de entrada la abundancia relativa de las especies bacterianas, con el fin de reflejar la composición del microbioma subyacente en la comunidad (CosmosID-HUB Microbiome, 2024). Para ello, se evalúan dos índices de diversidad:

- NMDS (de las siglas en inglés *Non-Metric Multidimensional Scaling*): se trata de un análisis que nos permite representar gráficamente una serie de puntos de muestreo en función de la similitud o disimilitud de la composición de las comunidades de esos puntos de muestreo (Alonso-Fernandez A., 2022a).
- Análisis de similitudes (ANOSIM): prueba no paramétrica para evaluar si la variación entre grupos es significativamente mayor que la variación dentro de los grupos, lo que ayuda a evaluar la razonabilidad de la división de grupos.

En la FIGURA 3A de NMDS, el eje NMDS1 se corresponde a la disimilitud observada y el eje NMDS2 es la distancia de ordenación. Estos ejes son ortogonales, es decir, son no correlacionados al no tener factores en común. La ordenación de las muestras utiliza el orden relativo de las distancias entre muestras y no los valores absolutos de los coeficientes de similitud. Esto significa que, si la muestra 1 es más parecida a la 2 que a la 3 entonces se localizará más cercana a la muestra 2 que a la 3, sin embargo, esa diferencia entre distancias no necesariamente tendrá la dimensión exacta. Por eso la representación gráfica del NMDS sufre menos distorsiones respecto a las distancias reales. Además, en NMDS, el valor de estrés (stress) nos indica la cantidad de varianza que no se ajustó y cuanto más bajo es este valor de estrés, mayor varianza se explica. Las ordenaciones con estrés $\leq 0,2$, como en nuestro caso (stress = 0,131), proporciona una representación adecuada (Alonso-Fernandez A., 2022b). Respecto a ANOSIM, al igual que en alfa diversidad, se usa un gráfico tipo *boxplot* para representar dicho índice. En el análisis ANOSIM, se obtiene el valor de un rango a partir de la distancia ordenada entre las muestras y se representa en el eje de las Y para cada una de las variables “Entre grupo” y “Dentro del grupo”, compuesto este último por los grupos Scrapie (Sc) y Control (C), situadas en el eje de las “X”. En nuestro caso, esta prueba dio un valor de p que nos indica que existen diferencias significativas en el grupo Scrapie (Sc) en comparación con el Control (C) ($p = 0,011$) (FIGURA 3B).

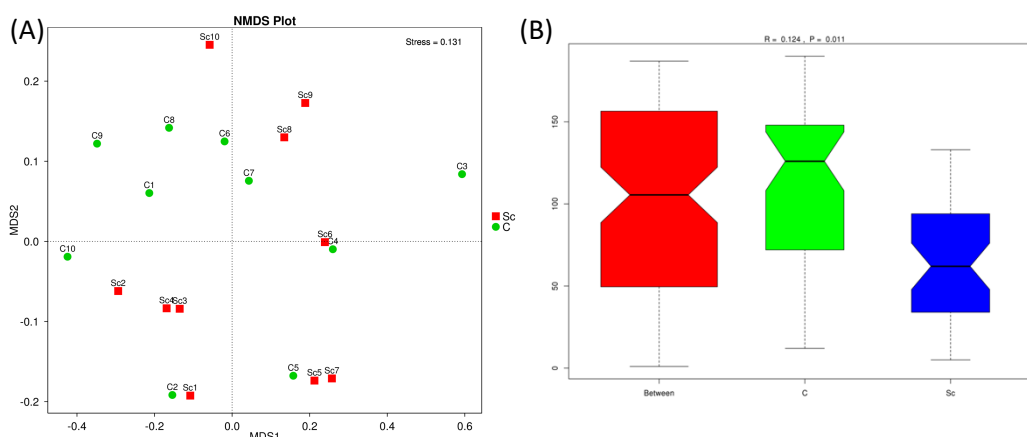


FIGURA 3. Diversidad beta de las comunidades bacterianas. (A) Gráficos de Escalamiento No-Métrico Multidimensional (NMDS). Cada punto de datos en el gráfico representa una muestra. La distancia entre los puntos de datos refleja el grado de variación. Las muestras que pertenecen al mismo grupo son del mismo color. Cuando el valor del factor de estrés es inferior a 0,2 (stress = 0,131) se considera que el NMDS es adecuado. (B) Análisis de similitudes (ANOSIM) evidencia diferencias significativas en el grupo Scrapie (Sc) en comparación con el Control (C) ($p^{**} = 0,011$).

5.3. DIFERENCIAS EN LA ABUNDANCIA BACTERIANA

Analizamos las diferencias en la abundancia de las bacterias presentes a nivel de filo, familia y género entre el grupo control (C) y el grupo con Scrapie (Sc) mediante el análisis estadístico t-test. A nivel de filo, se observó un aumento en la abundancia de Cyanobacteria ($p = 0,001$) y Lentisphaerae ($p = 0,003$) (FIGURA 4A) en los animales con Scrapie respecto al grupo Control. Las familias cuya abundancia aumentó en el grupo Scrapie respecto al Control son Lachnospiraceae ($p = 0,009$), p-251-o5 ($p = 0,023$), Spirochetaceae ($p = 0,049$), Victivallaceae ($p = 0,001$) y Barnesiellaceae ($p = 0,04$); mientras que, disminuyó la abundancia de Clostridiaceae_1 con una tendencia a la significación ($p = 0,08$) (FIGURA 4C). Respecto al género, mostraron un aumento de su abundancia Ruminococcaceae_UCG-010 ($p = 0,010$), Treponema_2 ($p = 0,045$), dgA-11_gut_group ($p = 0,004$), Paeniclostridium ($p = 0,031$) y Lachnoclostridium_10 ($p = 0,003$) en los animales con Scrapie comparando con el Control; sin embargo, se observó una disminución de la abundancia en Ruminococcaceae_UCG-005 ($p = 0,024$) y Clostridium_sensu_stricto_1 ($p = 0,007$) en el grupo Scrapie en comparación con el Control (FIGURA 4B).

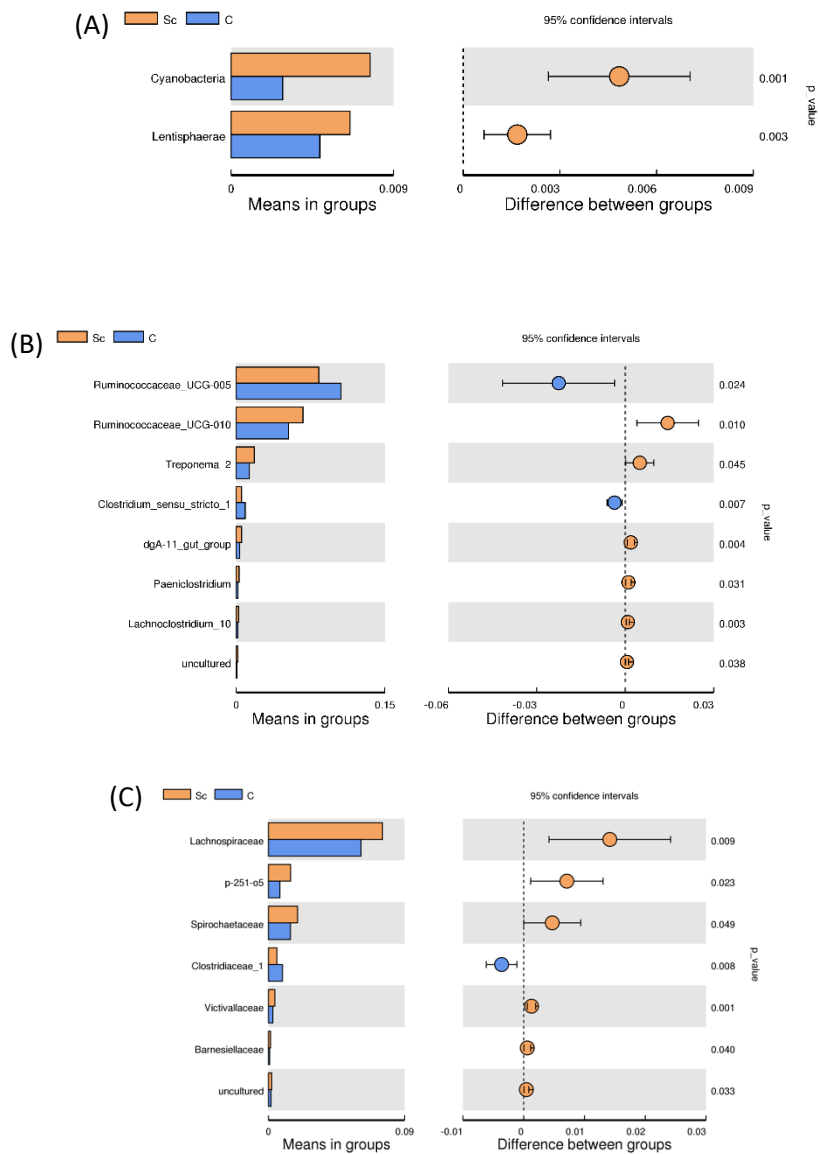


FIGURA 4. Diferencias en la abundancia bacteriana entre ovino con scrapie y control. Análisis de la prueba t-test entre los grupos Control (C) y Scrapie (Sc) a nivel de (A) filo, (B) género y (C) familia. El panel izquierdo representa la abundancia de aquellas especies que muestran una diferencia significativa entre los grupos. Cada barra representa el valor medio de la abundancia de la bacteria en cada grupo. El panel derecho es el intervalo de confianza de variación entre grupos. La parte más a la izquierda de cada círculo representa el límite inferior del intervalo de confianza del 95 %, mientras que la parte más a la derecha es el límite superior. El centro del círculo representa la diferencia del valor medio. El color del círculo está de acuerdo con el grupo cuyo valor medio es más alto. El valor más a la derecha es el valor p de la prueba de t-test.

Se realizó un análisis discriminante lineal del efecto-tamaño (LEfse) para determinar los géneros que explican una mayor probabilidad de generar diferencias entre los grupos Scrapie y Control mediante el acoplamiento de pruebas estándar de significancia estadística no paramétrica (Acosta M. I., 2021). Las puntuaciones LEfse pueden interpretarse como el grado de diferencia constante en la abundancia relativa entre características de los grupos de estudio. En este sentido, el género *Ruminococcaceae_UCG-005* es el que mejor permite diferenciar las comunidades bacterianas entre animales con Scrapie y los controles. El análisis dio como resultado el histograma de la abundancia relativa de biomarcadores estadísticamente diferentes entre los grupos, el histograma de las puntuaciones de LDA y el cladograma. El histograma de abundancia relativa muestra una menor abundancia de la bacteria del género *Ruminococcaceae_UCG_005* en el grupo Scrapie (Sc) frente al control (C) (FIGURA 5A). El histograma de las puntuaciones de LDA, que representa la medida en que un biomarcador puede explicar los fenotipos diferenciadores entre los grupos, nos muestra que *Ruminococcaceae_UCG-005* está aumentada en el grupo control respecto al grupo con scrapie con un LDA score (log 10) de 4.0 (FIGURA 5B). En el cladograma, se observa como el género *Ruminococcaceae_UCG-005* tiene más probabilidad de desarrollar diferencias dentro del grupo rojo (Control) (FIGURA 5C).

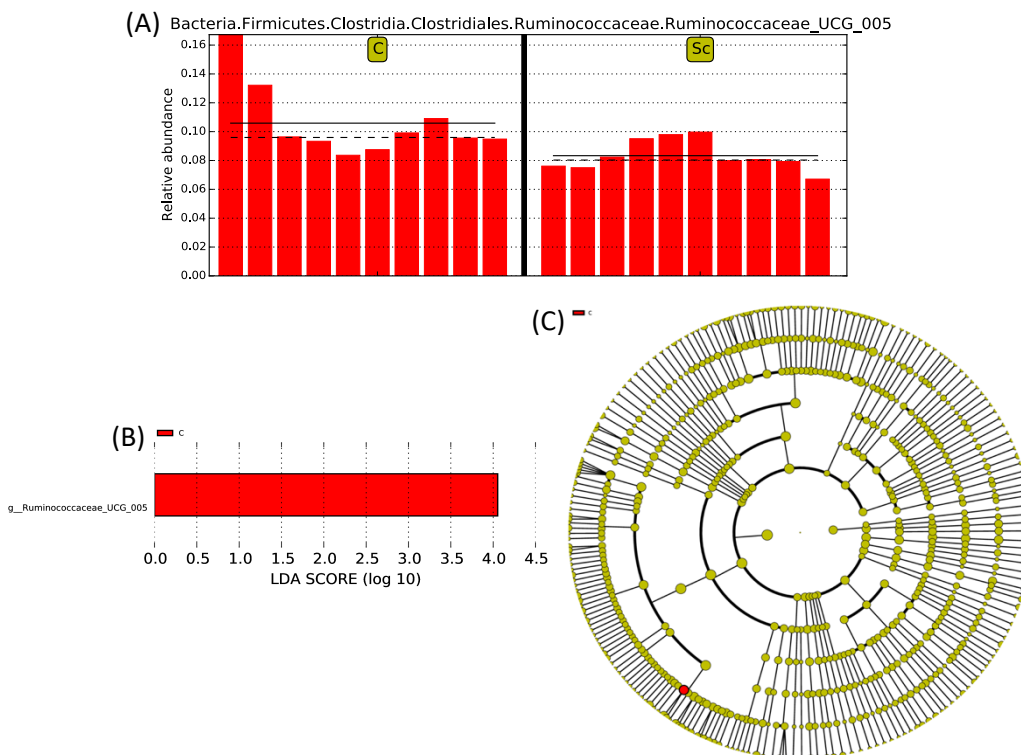


FIGURA 5. Géneros que generan diferencias en la microbiota de ovino con scrapie y control. (A) Histograma de abundancia relativa de Ruminococcaceae_UCG_005 entre los grupos, mostrando una menor abundancia en el grupo Scrapie respecto al Control. (B) Histograma de las puntuaciones de LDA que superan el criterio de selección ($> 4,0$). (C) Cladograma de taxones, los círculos que irradian del lado interior al lado exterior representan el rango taxonómico del filo al género o especies. Cada círculo representa un taxón distinto en el rango taxonómico correspondiente. El diámetro de cada círculo representa proporcionalmente la abundancia relativa de cada taxón. El amarillo significa taxones con diferencias no significativas entre los grupos. Los taxones (biomarcadores) con diferencias significativas se colorean de acuerdo con el color del grupo correspondiente. El círculo rojo significa que este taxón, en nuestro caso el Ruminococcaceae_UCG_005, tiene más probabilidad de desarrollar diferencias dentro del grupo rojo (Control).

5.4. DISCUSIÓN

Entre los filos bacterianos presentes en los rumiantes se encuentran Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Fibrobacteres, y también presentes en una pequeña cantidad, Tenericutes, y Actinobacteria. Entre las familias típicas en rumiantes se encuentran Lachnospiraceae, Lactobacillaceae, Porphyromonadaceae, Rikenellaceae, Neocallimastigomycota, Pasteurellaceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae, Succinivibrionaceae (Cholewińska P., et al., 2020). Nuestro análisis concuerda con los filos encontrados generalmente en los rumiantes, ya que hemos detectado Firmicutes y Bacteroidetes y en menor cantidad Verrucomicrobia, Euryarcheota, Proteobacteria, Fibrobacteres, Actinobacteria, Kiritimatiellaeota, Spirochaetes y Acidobacteria. A nivel de familia, nuestro análisis también concuerda con las familias bacterianas encontradas en los rumiantes, ya que en nuestros resultados hemos detectado la presencia de Ruminococcaceae, Lachnospiraceae y Christensenellaceae y otras menos predominantes como Fibrobacteraceae, Rikenellaceae, Bacteroidaceae, Muribaculaceae y Prevotellaceae, Akkermansiaceae y Methanobacteriaceae.

A continuación, vamos a comparar nuestros resultados con los descritos en la bibliografía y así explicar los posibles efectos que esta microbiota podría tener sobre la enfermedad priónica scrapie.

En nuestros resultados, hemos visto que la familia Clostridiaceae_1 y el género Ruminococcaceae_UCG-005 disminuyen. En AD, Clostridiaceae también está disminuida

(Miklossy J., 2011). Clostridiaceae_1 y Ruminococcaceae_UCG-005 están implicadas en la actividad celulolítica, por lo que si estas bacterias disminuyen, disminuye la actividad celulolítica (Liu G. et al., 2019; Rossi Leticia E., 2020; Liao R. et al., 2021). La disminución de la actividad celulolítica hace que la disponibilidad de los AGCC se vea disminuida. Esta disminución podría afectar negativamente la actividad microglial y promover la enfermedad priónica (D'Argenio V. et Sarnataro D., 2019; Liao R. et al., 2021). Además, en nuestros resultados, hemos visto que el género Clostridium_sensu_stricto disminuye. Esta bacteria es productora de AGCC, por lo que la disminución de esta bacteria disminuye los AGCC (Castro-Ramos J. J. et al., 2022). Se ha descrito que la disminución del AGCC butirato afecta a la homeostasis microglial negativamente y a la regulación de la permeabilidad de la mucosa intestinal y, por lo tanto, está involucrado en la respuesta inflamatoria (D'Argenio V. et Sarnataro D., 2019; Liao R. et al., 2021), por lo que también podría contribuir a la patogenia de scrapie.

Por otra parte, hemos visto que aumentan las familias Lachnospiraceae y Spirochaetaceae y los géneros Lachnospiraceae_10 y Ruminococcaceae_UCG-010. De forma similar a lo observado en nuestro estudio, se ha observado un aumento de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae en pacientes con PD (Heravi F. S. et al., 2023). Por otra parte, algunas espiroquetas se han asociado con la enfermedad de Alzheimer. Las espiroquetas pueden invadir el cerebro y generar infecciones latentes y persistentes. Además de por vía hematogena, las espiroquetas pueden diseminarse por vía linfática y a lo largo de las fibras nerviosas (Miklossy J., 2011). Lachnospiraceae, Spirochaetaceae, Lachnospiraceae_10 y Ruminococcaceae_UCG-010 tienen actividad celulolítica y degradan los polisacáridos complejos a AGCC, sobre todo butirato (Ozbyram E. G. et al., 2017; Edwards J. E. et al., 2020; Qian W. et al., 2017; Liao R. et al., 2021; Zhang K. et al., 2021; Zhang X. et al., 2022). La alteración en la regulación de la producción de AGCC podría tener impacto en el eje intestino-cerebro y contribuir a la neuroinflamación y la progresión de la enfermedad, al igual que sucede en PD (Heravi F. S. et al., 2023). Sin embargo, en la EA, el aumento de la abundancia de Lachnospiraceae y su producción de AGCC se asocia con una disminución de los biomarcadores de permeabilidad intestinal e inflamación (Heravi F. S. et al., 2023).

Lachnospiraceae además es productora del ácido graso saturado (AGS) 18:0 mediante el mecanismo de biohidrogenación (Belenguer A. et al., 2010). El contenido en este tipo de AGS está incrementado en cerebros de ovino con scrapie (Rosa A. et al., 2013). Por lo que, el aumento de Lachnospiraceae conduce a un aumento de los AGS cerebrales, que podría producir una alteración en las balsas lipídicas, microdominios de membrana especializados caracterizados por un alto contenido de esfingolípidos, colesterol y ácidos grasos saturados,

que sirven como centros organizadores para el tráfico de membrana y proteínas de membrana y son importantes para las vías de diferenciación y supervivencia en las neuronas. Estos microdominios comprenden un agrupamiento altamente dinámico de proteínas y lípidos que desempeñan un papel central en la transducción de señales y la comunicación intercelular (Agostini F. et al., 2013; Rosa A. et al., 2013). Dichas balsas en las ovejas afectadas por scrapie cambian hacia un estado viscoso que afecta a sus propiedades termodinámicas, la organización espacial y la transducción de señales (Rosa A. et al., 2013).

También, Ruminococcaceae_UCG-005 y Ruminococcaceae_UCG-010 se consideran potencialmente beneficiosas que pueden regular el entorno interno del intestino y están relacionadas con la regulación inmune y la homeostasis saludable (Zhang X. et al., 2022). Pero esto puede encontrarse afectado debido a la disminución de Ruminococcaceae_UCG-005. Sin embargo, al producirse esa situación negativa para el intestino, Ruminococcaceae_UCG-010 aumenta en un intento de equilibrar dicha situación.

Por último, Spirochaetaceae, debido a su forma de espiral, también tiene la capacidad de separar las células intestinales, rompiendo la integridad de la pared intestinal y permitiendo el paso de sustancias que normalmente no deberían pasar; por lo que el aumento de esta bacteria lo podría intensificar facilitando el paso de las proteínas priónicas (Campbell-McBride N., 2009).

6. CONCLUSIONES

A partir del análisis de resultados y la bibliografía consultada podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Por primera vez se describen alteraciones en la microbiota intestinal de un modelo natural de enfermedad priónica, el ovino con scrapie, sugiriendo la relevancia del eje intestino-cerebro también en estas patologías.
- En las enfermedades priónicas se producen alteraciones similares a las descritas en otras enfermedades neurodegenerativas prion-like.
- La variación en la composición de la microbiota, especialmente el aumento de Lachnospiraceae, Spirochaetaceae y Lachnospiraceae_10 y la disminución de Clostridiaceae_1 podría influir sobre la patogenia de la enfermedad.
- La variación de Clostridium_sensu_stricto podría estar agravando la enfermedad por la alteración del metabolismo de los AGCC.
- El aumento de Ruminococcaceae_UCG-010 podría paliar en parte los efectos perjudiciales de Ruminococcaceae_UCG-005

From the analysis of the results and the bibliography consulted, we can draw the following conclusions:

- *For the first time, alterations in the gut microbiota of a natural model of prion disease, sheep with scrapie, are described, suggesting the relevance of the gut-brain axis also in these pathologies.*
- *Prion diseases produce alterations similar to those described in other prion-like neurodegenerative diseases.*
- *Variation in the composition of the microbiota, especially the increase in Lachnospiraceae, Spirochaetaceae and Lachnospiraceae_10 and the decrease in Clostridiaceae_1 could influence the pathogenesis of the disease.*
- *The variation in Clostridium_sensu_stricto could be aggravating the disease by altering the metabolism of SCFAs.*
- *The increase in Ruminococcaceae_UCG-010 could partly mitigate the detrimental effects of Ruminococcaceae_UCG-005.*

7. VALORACIÓN PERSONAL

La elección de este TFG fue, por una parte, porque al estar esta facultad tan involucrada en las enfermedades priónicas hizo que este tema me resultara atractivo para indagar. Por otra parte, fue por temas personales ya que conozco a personas cercanas y queridas que tuvieron y tienen estas enfermedades neurodegenerativas y me ha servido de ayuda para hacer este TFG con aún más fuerzas y ganas.

Mis aprendizajes han sido sobre todo el darme cuenta de lo conectado que está todo el cuerpo tanto en humanos como en animales y de la importancia de diagnosticar y tratar teniendo en cuenta el conjunto de áreas y como he dicho la totalidad del organismo. También, me he dado cuenta que es necesaria más investigación en torno a estas enfermedades priónicas y *prion-like* para determinar con exactitud los efectos reales de la microbiota y dejen de ser meras hipótesis en dichas enfermedades.

Gracias por las fuerzas y ganas, abuela.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acosta M. I. (2021). *Modulación de la microbiota intestinal del lenguado senegalés (Solea Senegalensis) bajo un esquema de alimentación suplementado con vitamina K1 (filoquinona)*. Tesis. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Agostini F., Dotti C. G., Azucena Pérez-Cañamás, Ledesma M. D., Benetti F. et Legname G. (2013). "Prion Protein Accumulation in Lipid Rafts of Mouse Aging Brain". PLoS ONE, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0074244

Alonso-Fernandez A. (2022a). "Análisis de comunidades: ANOSIM y NMDS". Rpubs. Disponible en: <https://rpubs.com/aafernandez1976/ANOSIMyNMDS> [Consultado 24-12-2023]

Alonso-Fernandez A. (2022b). "Análisis De Componentes Principales (PCA) Y Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS)". Rpubs. Disponible en: <https://rpubs.com/aafernandez1976/PCA> [Consultado 17-01-2024]

APEXCHARTS (s.f.). "BoxPlot". APEXCHARTS. <https://apexcharts.com/docs/chart-types/boxplot/> [Consultado 18-01-2023]

Belenguer A., Toral P. G., Frutos P., et Hervás G. (2010). "Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep". Journal Dairy Science, 93, pp. 3275–3286). doi: 10.3168/jds.2010-3101

Bercik P., Collins S. M. et Verdu E. F. (2012) "Microbes and the gut-brain axis". *Neurogastroenterology and Motility*, 24, pp. 405-413. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01906.x

Böhnlein C., Groschup M. Maertlbauer H. E., Pichner R. et Gareis M. (2012). "Stability of Bovine Spongiform Encephalopathy Prions: Absence of Prion Protein Degradation by Bovine Gut Microbiota". *Zoonoses and Public Health*, 59, pp. 251–255. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01455.x

Bradford B. M., Tetlow L. et Neil Mabbott A. (2017). "Prion disease pathogenesis in the absence of the commensal microbiota". *Journal of General Virology*, 98, pp. 1943–1952. DOI 10.1099/jgv.0.000860

Castro Nallar E. (2020). "Diseño experimental y análisis de datos". Castro Lab. Disponible en: http://www.castrolab.org/teaching/data_analysis/curso-mcv502-bcm634-bio625.html

[Consultado 24-12-2023]

Campbell-McBride N. (2009). "Food Allergy: A Case Study". *Journal of Orthomolecular Medicine*, 24 (1), pp. 31-41. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/288537904_Food_allergy_A_case_study

[Consultado 12-01-2024]

Castro-Ramos J. J., Solís-Oba A., Solís-Oba M., Ligne Calderón-Vázquez C., Mireya Higuera-Rubio J. et Castro-Rivera R (2022). "Effect of the initial pH on the anaerobic digestion process of dairy cattle manure". *AMB Express*, 12 (162). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01486-8>

CosmosID-HUB Microbiome (2023). "Alpha Diversity". CosmosID-HUB Microbiome. <https://docs.cosmosid.com/docs/alpha-diversity#shannon> [Consultado 18-01-2023]

CosmosID-HUB Microbiome (2024). "Beta Diversity". CosmosID-HUB Microbiome. <https://docs.cosmosid.com/docs/beta-diversity> [Consultado 18-01-2023]

D'Argenio V. et Sarnataro D., (2019). "Microbiome Influence in the Pathogenesis of Prion and Alzheimer's Diseases". *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (4704). doi: 10.3390/ijms20194704

Donaldson D. S. et Mabbott N. A. (2016). "The influence of the commensal and pathogenic gut microbiota on prion disease pathogenesis". *Journal of General Virology*, 97, pp. 1725–1738. DOI 10.1099/jgv.0.000507

Guo Y., Xu Y., Lin X., Zhen Z., Yi F., Guan H., Shi Q., Sun W., Yang A., Dong X. et Wang J. (2022). "Creutzfeldt-Jakob Disease: Alterations of Gut Microbiota". *Frontiers in neurology*, 13 (832599). DOI: 10.3389/fneur.2022.832599

Hattori N. et Yamashiro Y. (2021). "The Gut-Brain Axis". *Annals of Nutrition and Metabolism*, 77 (2), pp. 1–3. DOI: 10.1159/000512226

Heravi F. S., Naseri K. et Hu H. (2023). "Gut Microbiota Composition in Patients with Neurodegenerative Disorders (Parkinson's and Alzheimer's) and Healthy Controls: A Systematic Review". *Nutrients*, 15 (4365). <https://doi.org/10.3390/nu15204365>

Malagelada J. R. (2020). "The Brain-Gut Team". *Digestive Diseases*, 38, pp. 293–298. DOI: 10.1159/000505810

Margolis K. G., Cryan J. F., et Maye E. A. (2021). "The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood". *Gastroenterology*, 160 (5), pp. 1486-1501. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.066>

Matheson J.-A. T. et Holsinger R. M. D. (2023). "The Role of Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Review". *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (1001). <https://doi.org/10.3390/ijms24021001>

Mayer E. A., Nance K. et Chen S. (2022). "The Gut–Brain Axis". *Annual Review of Medicine*, 73, pp. 439-453. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042320-014032>

Miklossy J. (2011). "Alzheimer's disease - a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria". *Journal of Neuroinflammation*, 8 (90). doi: 10.1186/1742-2094-8-90

Numeracy, Maths and Statistics – Academic Skills Kit (s.f.). "Box and Whisker Plots". Numeracy, Maths and Statistics – Academic Skills Kit. <https://www.ncl.ac.uk/webtemplate/ask-assets/external/maths-resources/statistics/data-presentation/box-and-whisker-plots.html>
[Consultado 18-01-2023]

Lahti L. (s.f.). "Estimate richness measures". miaverse: R/Bioconductor framework for microbiome data science. <https://microbiome.github.io/mia/reference/estimateRichness.html>
[Consultado 18-01-2023]

Lezama Toledo A. R., Rivera Monroy G., Esparza Salazar F., Lee J-Y., Jain S., Yadav H. et Venturina Borlongan C. (2022). "Gut–Brain Axis as a Pathological and Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders". *International Journal of Molecular Science*, 23 (1184). <https://doi.org/10.3390/ijms23031184>

Liao R., Xie X., LV Y., Dai J., Lin Y. et Zhu L. (2021). "Ages of weaning influence the gut microbiota diversity and function in Chongming white goats". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, pp. 3649–3658. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11301-2>

Liu G., Bou G., Su S., Xing J., Qu H., Zhang X., Wang X., Zhao Y. et Dugarjaviin M. (2019). "Microbial diversity within the digestive tract contents of Dezhou donkeys". *PLoS One*, 14 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226186>

Liu L., Huh J. R. et Shaha K. (2022). "Microbiota and the gut-brain-axis: Implications for new therapeutic design in the CNS". *eBioMedicine*, 77 (103908). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103908>

Long-Smith C., O’Riordan K. J., Clarke G., Stanton C., Dinan T. G. et Cryan J. F. (2020). "Microbiota-Gut-Brain Axis: New Therapeutic Opportunities". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 60 (17), pp. 1-26. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919->

Lynch D. (2024). "Alpha Diversity". *One Codex*. <https://docs.onecodex.com/en/articles/4136553-alpha-diversity> [Consultado 18-01-2023]

Ozbayram E. G., Kleinstuber S., Nikolausz M., Ince B. et Ince O (2017). "Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw". *Anaerobe*, 46, pp. 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.03.013>

Peterson C. T. (2020). "Dysfunction of the Microbiota-Gut-Brain Axis in Neurodegenerative Disease: The Promise of Therapeutic Modulation With Prebiotics, Medicinal Herbs, Probiotics, and Synbiotics". *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 25, pp. 1-19. DOI: 10.1177/2515690X20957225

Qian W., Li Z., Ao W., Zhao G., Li G. et Wu JianPing (2017). "Bacterial community composition and fermentation in the rumen of Xinjiang brown cattle (*Bos taurus*), Tarim red deer (*Cervus elaphus yarkandensis*), and Karakul sheep (*Ovis aries*)". *Canadian Journal of Microbiology*, 63(5), pp. 375-383. doi: 10.1139/cjm-2016-0596

Quigley E. M. M. (2017). “Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases”. *Topical Collection on Genetics*, 17 (94). <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0802-6>

Rosa A., Scano P., Incani A., Pilla F., Maestrale C., Manca M., Ligios C. et Pani A. (2013). “Lipid profiles in brains from sheep with natural scrapie”. *Chemistry and Physics of Lipids*, 175– 176, pp. 33– 40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.08.001>

Rossi Letícia E. (2020). “Fecal bacteriome of nellore steers with high and low feed efficiency phenotypes”. Programa de Posgrado. Universidad de federal de Viçosa.

Trichka J. et Zou W-Q. (2021). “Modulation of Neuroinflammation by the Gut Microbiota in Prion and Prion-Like Diseases”. *Pathogens*, 10 (887). <https://doi.org/10.3390/pathogens10070887>

Varesi A., Campagnoli L. I. M., Fahmideh F., Pierella E., Romeo M., Ricevuti G., Nicoletta M., Chirumbolo S. et and Pascale A. (2022). “The Interplay between Gut Microbiota and Parkinson’s Disease: Implications on Diagnosis and Treatment”. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (12289). <https://doi.org/10.3390/ijms232012289>

Varesi A., Pierella E., Romeo M., Piccini G. B., Alfano C., Bjørklund G., Oppong A., Ricevuti G., Esposito C., Chirumbolo S. et Pascale A. (2022). “The Potential Role of Gut Microbiota in Alzheimer’s Disease: From Diagnosis to Treatment”. *Nutrients*, 14 (668). <https://doi.org/10.3390/nu14030668>

Wang Y., Zhang Z., Li B., He B., Li L., Nice E. C., Zhang W., et Xu J. (2022). “New Insights into the Gut Microbiota in Neurodegenerative Diseases from the Perspective of Redox Homeostasis”. *Antioxidants*, 11 (2287). <https://doi.org/10.3390/antiox11112287>

Westfall S., Lomis N., Kahouli I., Dia S. Y., Singh S. P. et Prakash S. (2017). “Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis”. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, pp. 3769–3787. DOI 10.1007/s00018-017-2550-9

Yang D., Zhaoa D., Shahb S. Z. A., Wuw W., Laia M., Zhanga X., Lia J., Guana Z., Zhaoa H., Lia W., Gaoa H., Zhoua X. et Yang L. (2020). “Implications of gut microbiota dysbiosis and metabolic changes in prion disease”. *Neurobiology of Disease*, 135 (104704).

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104704>

Zhang K., Qian Q., Mao Y., Xu Y., Yang Y., Chen Y. et Wang X. (2021). “Characterization of growth phenotypes and gastrointestinal tract microbiota in sheep fed with caragana”. *Journal of Applied Microbiology*, 131 (6), pp. 2763–2779. <https://doi.org/10.1111/jam.15138>

Zhang X., Li C., Shahzad K., Han M., Guo Y., Huang X., Wu T., Wang L., Zhang Y., Tang H., Zhang Q., Wang M., Zhou P. et Zhong F. (2022). “Seasonal Differences in Fecal Microbial Community Structure and Metabolism of House-Feeding Chinese Merino Fine-Wool Sheep”. *Frontiers In Veterinary Science*, 9 (875729). doi: 10.3389/fvets.2022.875729