

Caracterización de la composición bacteriana fecal en pacientes con enfermedad de Parkinson y controles sanos de Colombia

Natalia Arias Rodríguez

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

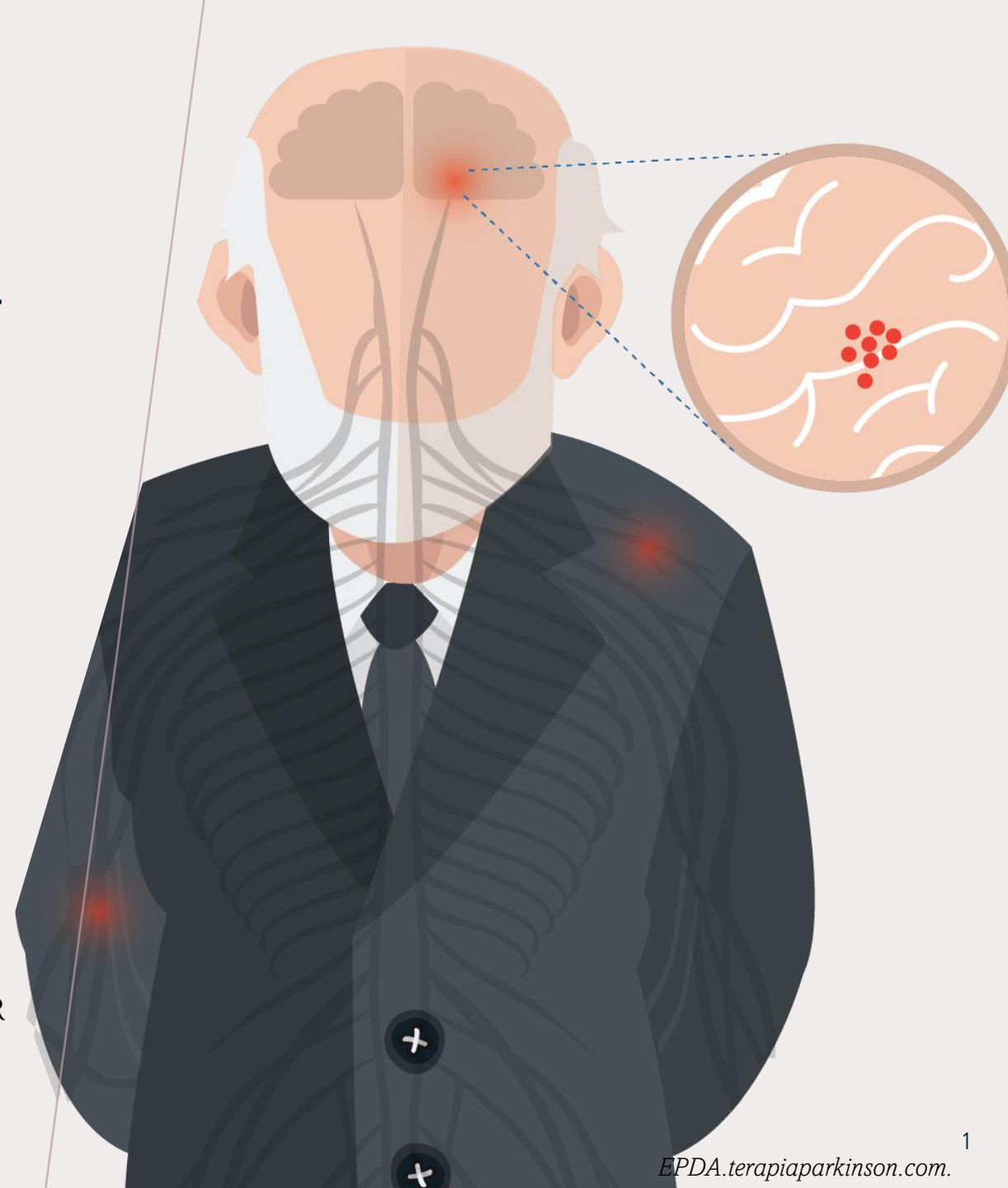
Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

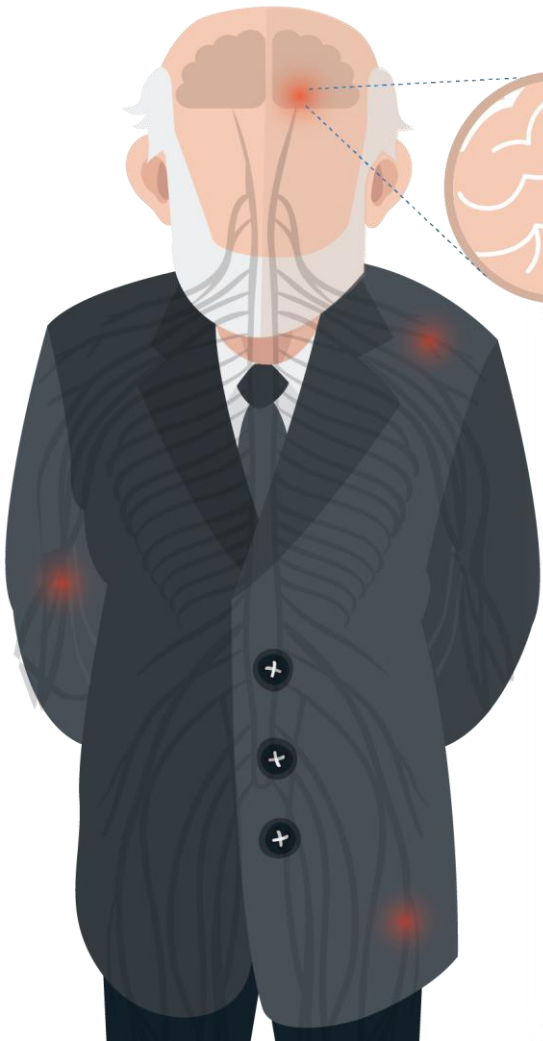
Bogotá, 21 mayo 2021



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR
DE CUNDINAMARCA
Facultad de Ciencias de la Salud



Generalidades de la enfermedad de Parkinson



01
EDAD



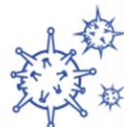
02
FACTOR
HEREDITARIO



03
SEXO



04
EXPOSICIÓN
A TOXINAS



- Trastorno neurodegenerativo.
- Trastorno multifactorial.
- Afecta al 1% de los mayores de 60 años y al 4% de los mayores de 80 años.

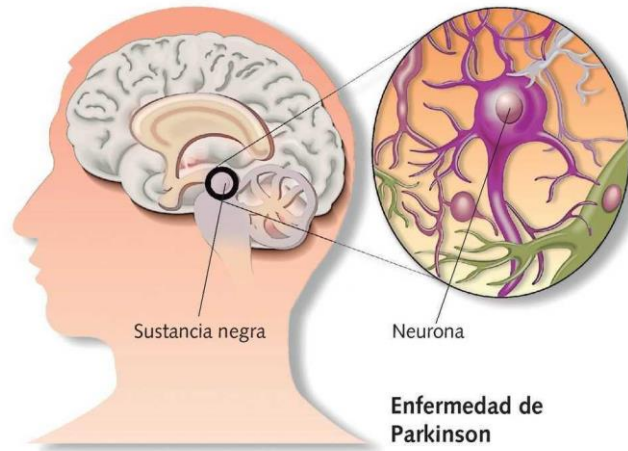
Parkinson genético

Representa del 5 al 10% de los casos.

Parkinson idiopático

Representa del 90% al 95% de los casos.

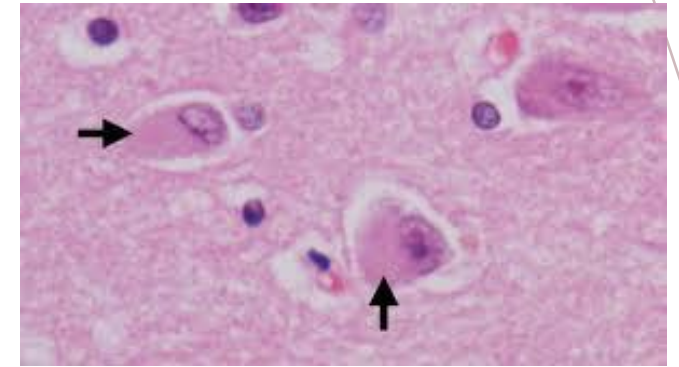
Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson



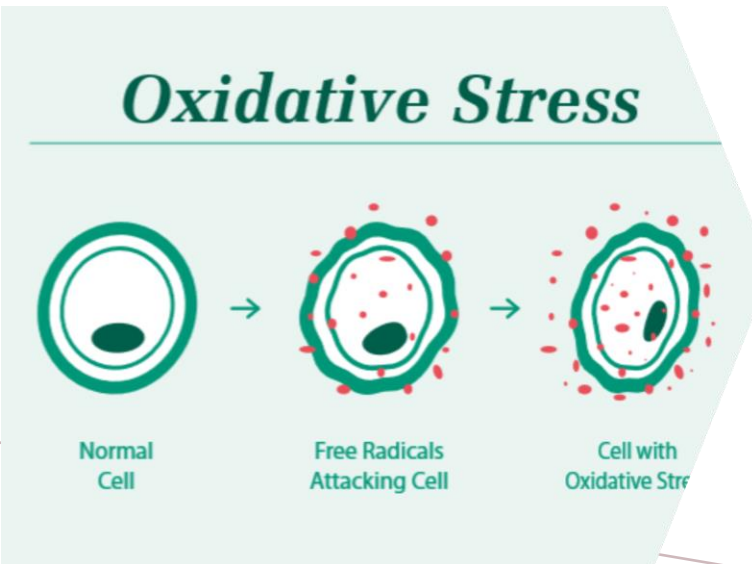
Lopez S. Elsevier.(2014).

Perdida progresiva de células dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta.

→
Formación
Cuerpos de Lewy



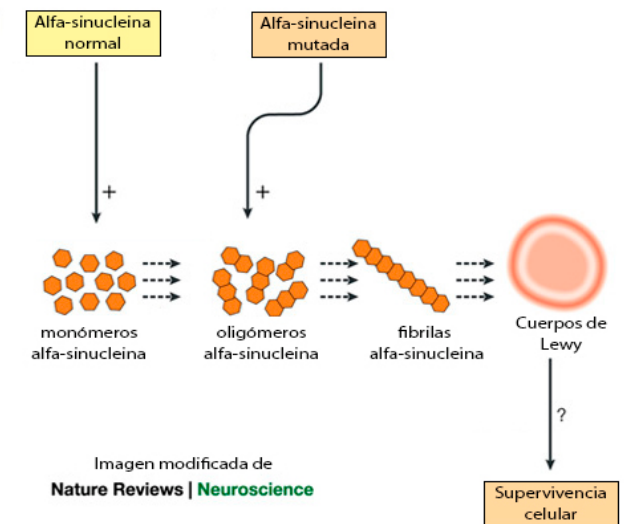
ECG. (2016).



Redenhair. (2018).

Camino de muerte celular

- Autofagia de los lisosomas.
 - Estrés en retículo endoplasmático.
- Disfunción mitocondrial.
- Desregulación homeostasis del calcio.
- Defectos en la membrana.



Cuenca J. (2016).

Clínica del Parkinson

Síntomas:

Temblor en manos, brazos, piernas, mandíbula y cara.



Rigidez en brazos, piernas y tronco.

Problemas de equilibrio y coordinación.

Bradicinesia

Lentitud de los movimientos.

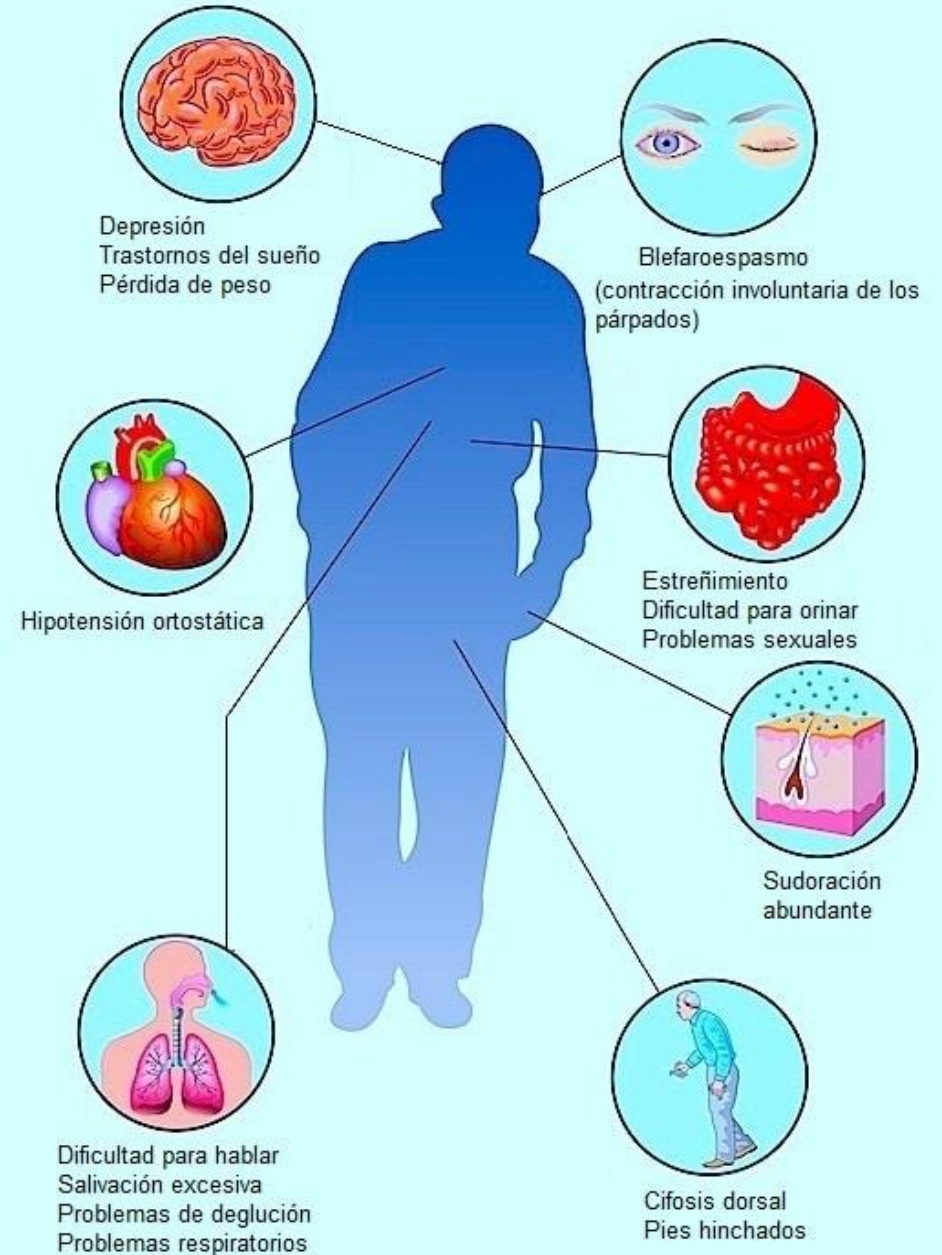
No existe cura para esta enfermedad y el tratamiento busca mejorar los síntomas.

Usted y Parkinson.

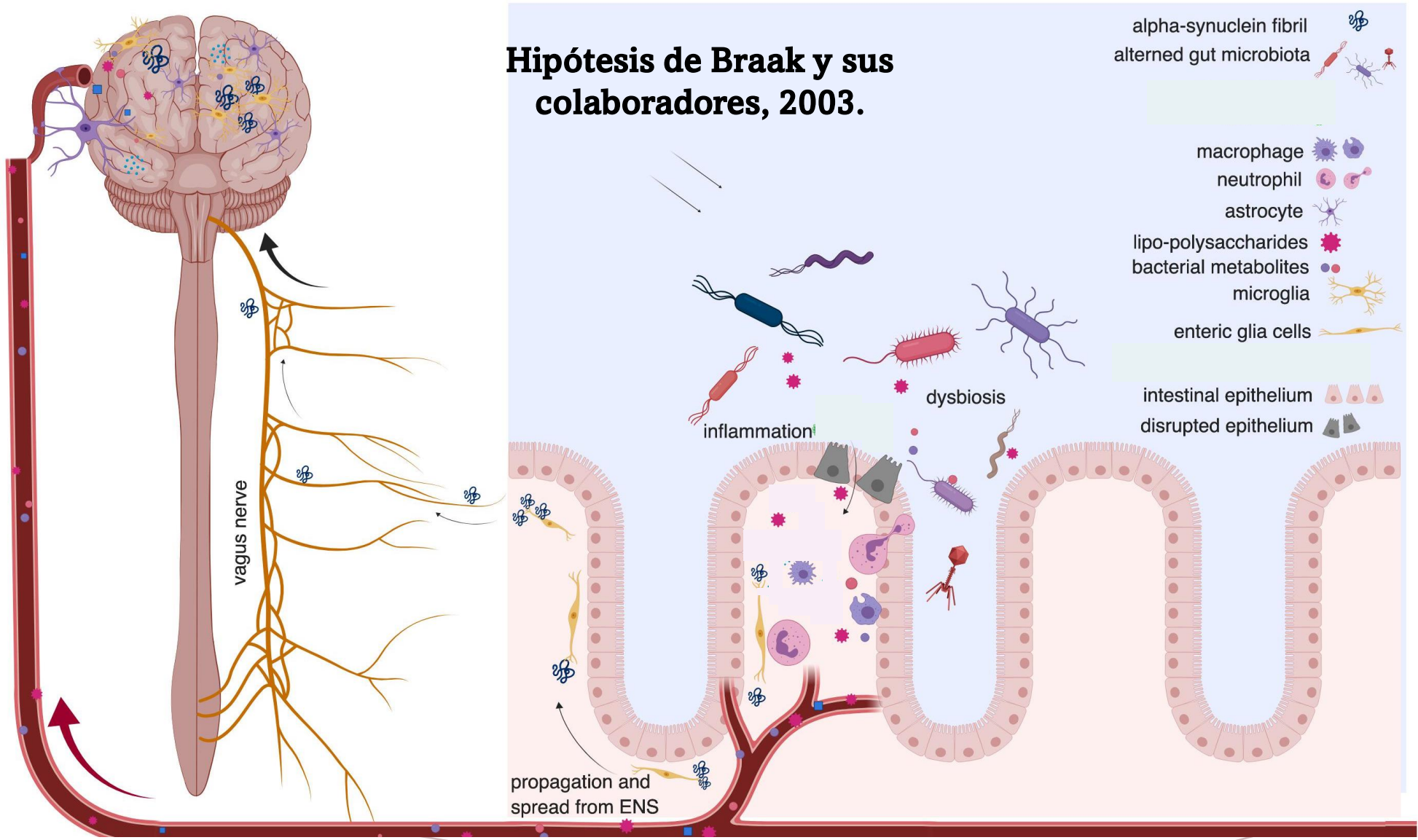
- Síntomas motores para el diagnóstico.
- Síntomas gastrointestinal en el 80% de los casos.

Enfermedad de Parkinson

Síntomas no motores de la Enfermedad de Parkinson



Axis microbiota – intestino - cerebro



Fitzgerald E, et al. Frontiers.(2019).

Biomarker	Association	Proposed contribution to pathogenesis	Source of biomarker	References
Fecal levels of acetate, propionate and butyrate (SCFAs)	Reduced in patients with PD	<ul style="list-style-type: none"> –Decreased SCFAs levels leads to decreased levels of sodium-butyrate, a histone deacetylase inhibitor that protects dopaminergic neurons – Decreased SCFAs result in decreased motility of gut, driving non-motor gastrointestinal dysregulation seen in PD 	Fecal sample	Unger et al., 2016
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Reduced in patients with PD	<ul style="list-style-type: none"> – Low levels associated with decreased levels of butyrate – Low levels associated with loss of IL-10 secreting T-regulatory cells (Tregs) 	Fecal sample	Sarrabayrouse et al., 2014; Keshavarzian et al., 2015; Honda and Littman, 2016; Unger et al., 2016
<i>Prevotellaceae</i>	Reduced in patients with PD	<ul style="list-style-type: none"> – Low levels decrease mucin synthesis, increasing gut permeability leading to environmental exposure – Low levels correspond to increased alpha-synuclein expression in colon – Low levels lead to loss of neurodegeneration restriction by impairing ghrelin secretion pathway 	Fecal sample	Scheperjans et al., 2015; Unger et al., 2016; Bedarf et al., 2017
<i>Enterococcaceae</i>	Reduced in patients with PD	Unknown	Fecal sample	Unger et al., 2016
<i>Enterobacteriaceae</i>	Elevated in patients with PD	<ul style="list-style-type: none"> – Increases permeability of intestinal epithelium exposing ENS to environmental toxins – Positive association with postural and gait instability in PD patient population 	Fecal sample	Keshavarzian et al., 2015; Scheperjans et al., 2015; Unger et al., 2016
<i>Bifidobacterium</i>	Elevated in patients with PD	unknown	Fecal sample	Keshavarzian et al., 2015; Scheperjans et al., 2015; Unger et al., 2016; Hopfner et al., 2017
Alpha-synuclein in sigmoid mucosal neurons	Present 2–5 years before onset of PD motor symptoms	– Aggregations in sigmoid colon observed in patients with PD prior to diagnosis	Sigmoid mucosal biopsies	Shannon et al., 2012; Visanji et al., 2017
<i>Lachnospiraceae</i>	Reduced in patients with PD	– Low levels associated with decreased levels of butyrate	Fecal sample	Keshavarzian et al., 2015; Bedarf et al., 2017



Bandetex. (2021).



Banderas del mundo. (2019).

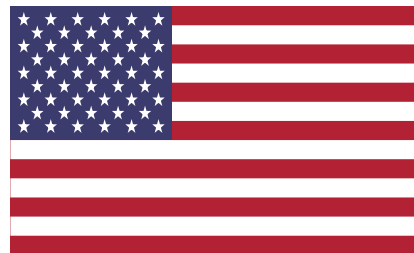


Banderas VKD. (2013).

Factores demográficos y la microbiota intestinal



Banderas del mundo. (2018).



COPE. (2020).



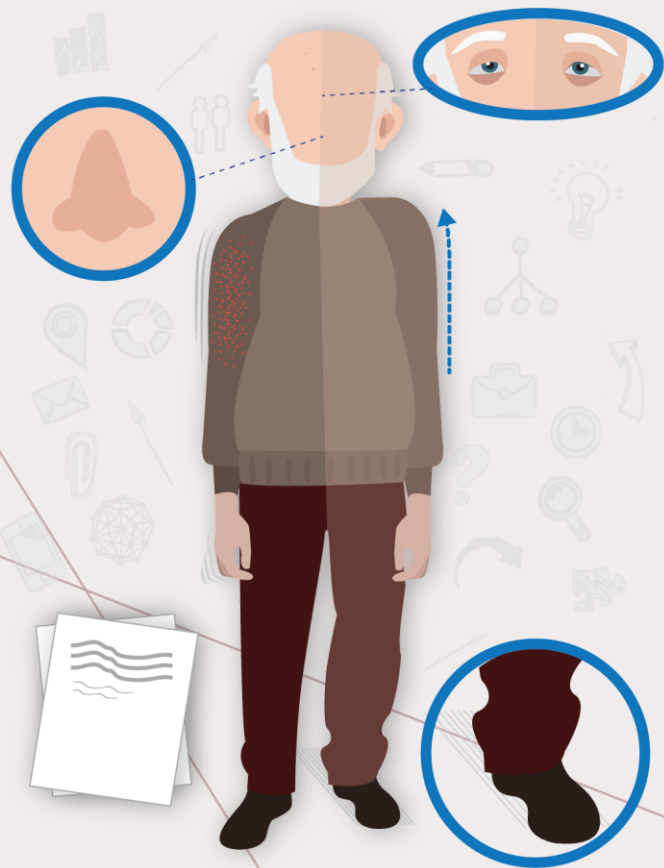
Sitographics. (2013).



Biothas. (2021).



Pregunta Problema



¿Cuáles son las diferencias en la composición bacteriana fecal de pacientes con enfermedad de Parkinson y pacientes sanos de Colombia?

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la composición bacteriana fecal de los pacientes con enfermedad de Parkinson y controles sanos en Colombia.

Objetivos específicos:

- Establecer la composición bacteriana fecal, en pacientes con enfermedad de Parkinson y controles sanos en la población colombiana.
- Identificar las diferencias en composición y abundancia bacteriana, entre pacientes con enfermedad de Parkinson vs controles en la población.
- Identificar las posibles capacidades funcionales de los microorganismos evidenciados en el contexto de la enfermedad de Parkinson.



Jemastock. Istockphoto. (2018).

Hipótesis

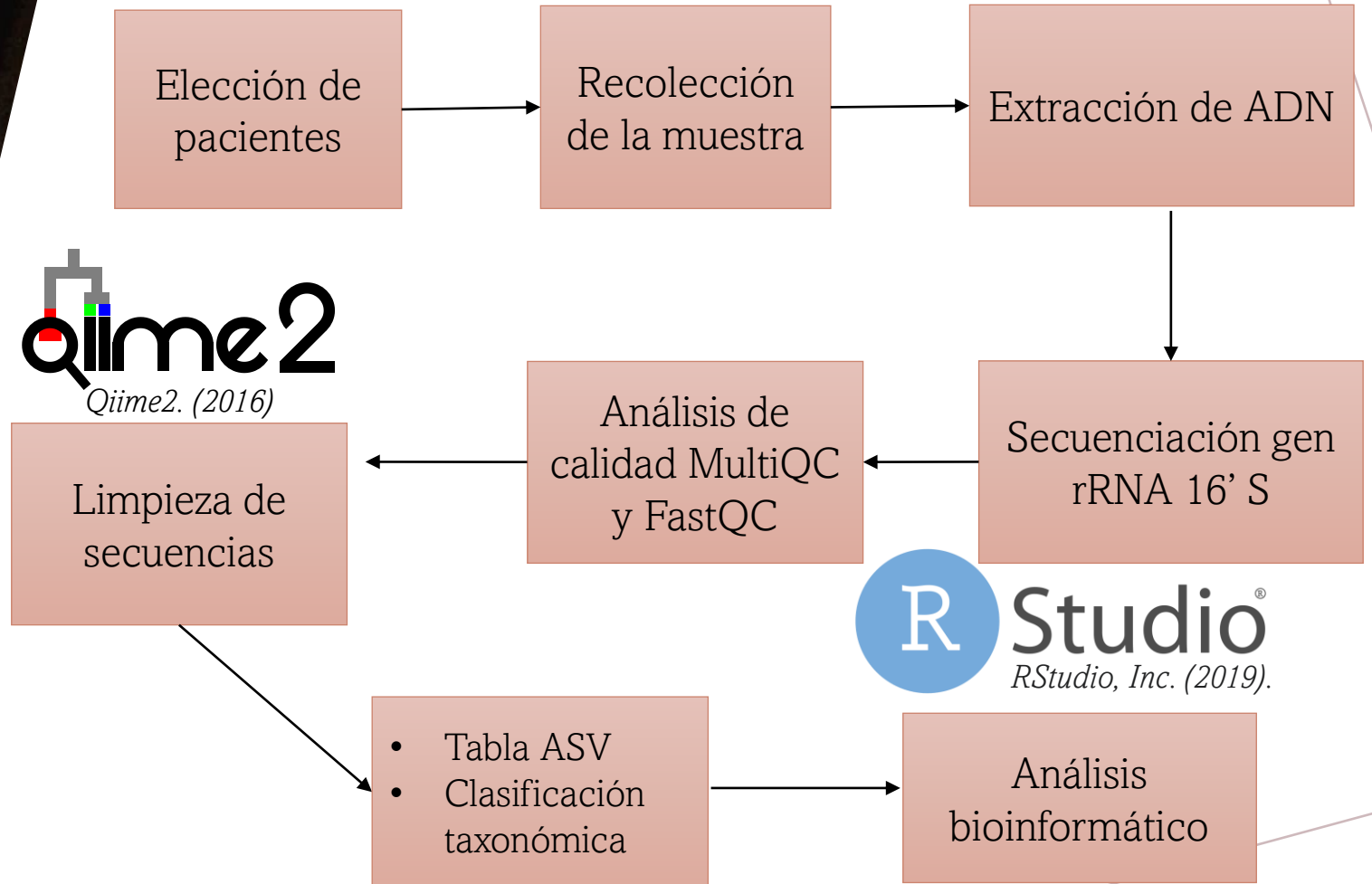


biocodexmicrobiotainstitute.com

Los pacientes con enfermedad de Parkinson, presentan variaciones en abundancia bacteriana de:

- Incremento de la familia *Lactobacillaceae*: mal plegamiento de la alfa sinucleína.
- Incremento de la familia *Bifidobacteriaceae*: síntomas depresivos.
- En los géneros *Enterococcus spp*, *Desulfovibrio spp*, *Acinetobacter spp*, *Proteobacteria spp* y *Bacteroides spp*: síntomas motores y aumentando el estrés oxidativo en SNE.
- Disminución en las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococaceae*: disminución en la producción de ácidos grasos.
- Se espera esclarecer el papel de la familia *Prevotellaceae*.

Diseño Metodológico





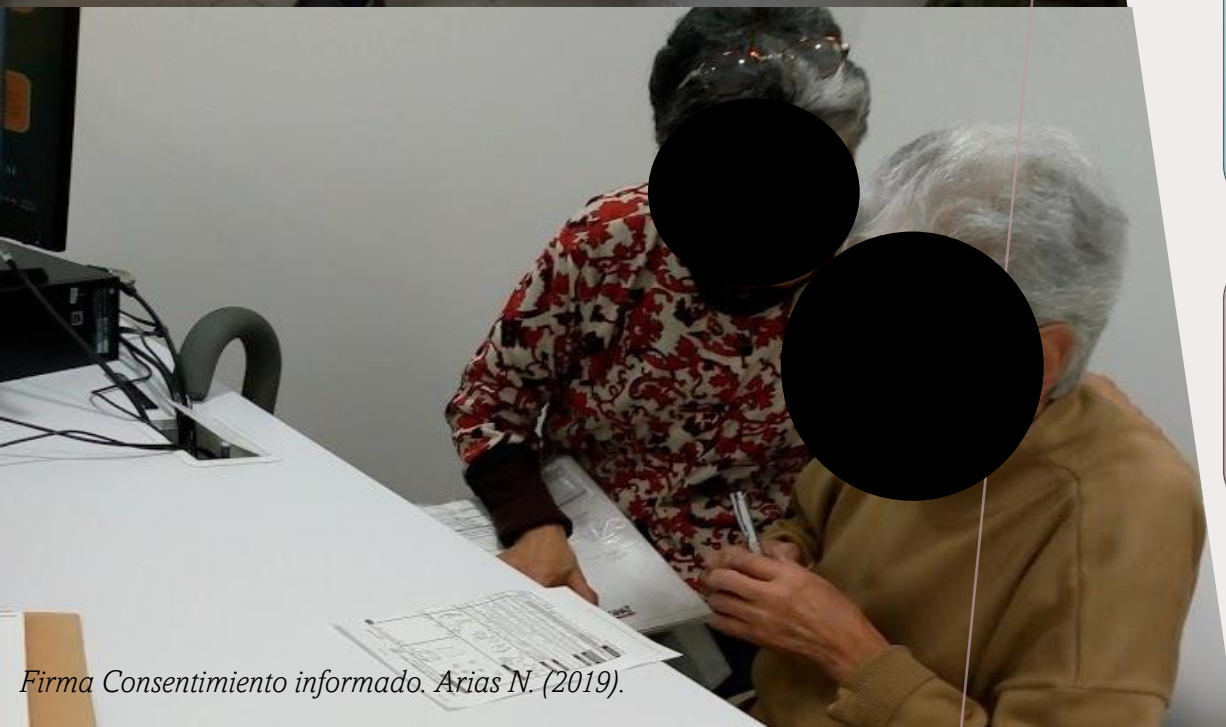
Elección de pacientes y recolección de muestra

Población: Colombianos residentes en Bogotá a partir de los 40 años.

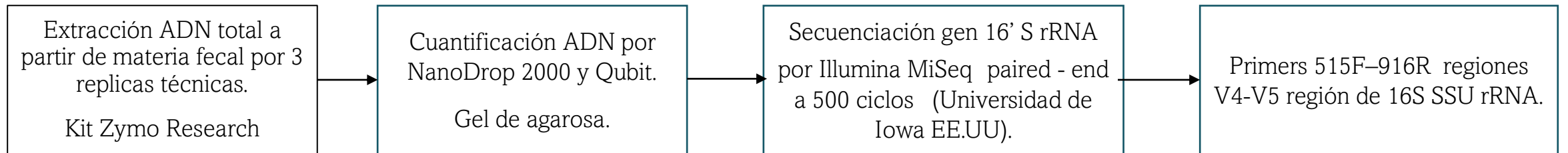
Muestra: 25 pacientes del doctor William Fernández del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia y 25 voluntarios sanos como controles.

Firma consentimiento informado (resolución número 008430 de 1993 del Ministerio de salud).

Recolección de muestra de materia fecal



Procesamiento de material genético a partir de las muestras

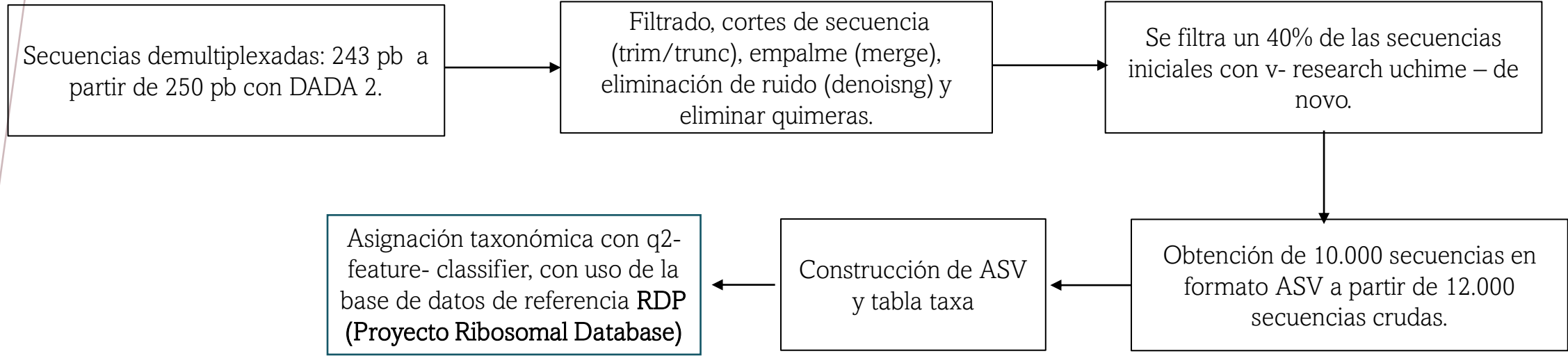


Evidencia fotográfica fase experimental, Instituto de Genética Universidad Nacional. Arias N. (2019).



Qiime2. (2016)

Asignación taxonómica de las muestras (pacientes y controles sanos)



File	Edit	Format	View	Help			
ASV	c10	c11	c12	c13	c14	c15	c16
ASV39	1424	24	19	4	684	7	11
ASV13	3093	262	535	8	2	5	1
ASV50	4030	2407	123	71	91	299	339
ASV57	1218	5	12	53	9	31	249

Construcción tablas ASV. Arias N. (2020).

ASV	Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus
ASV8	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	
ASV1	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	
ASV4	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	
ASV2	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	

Asignación taxonómica ASV. Arias N. (2020).

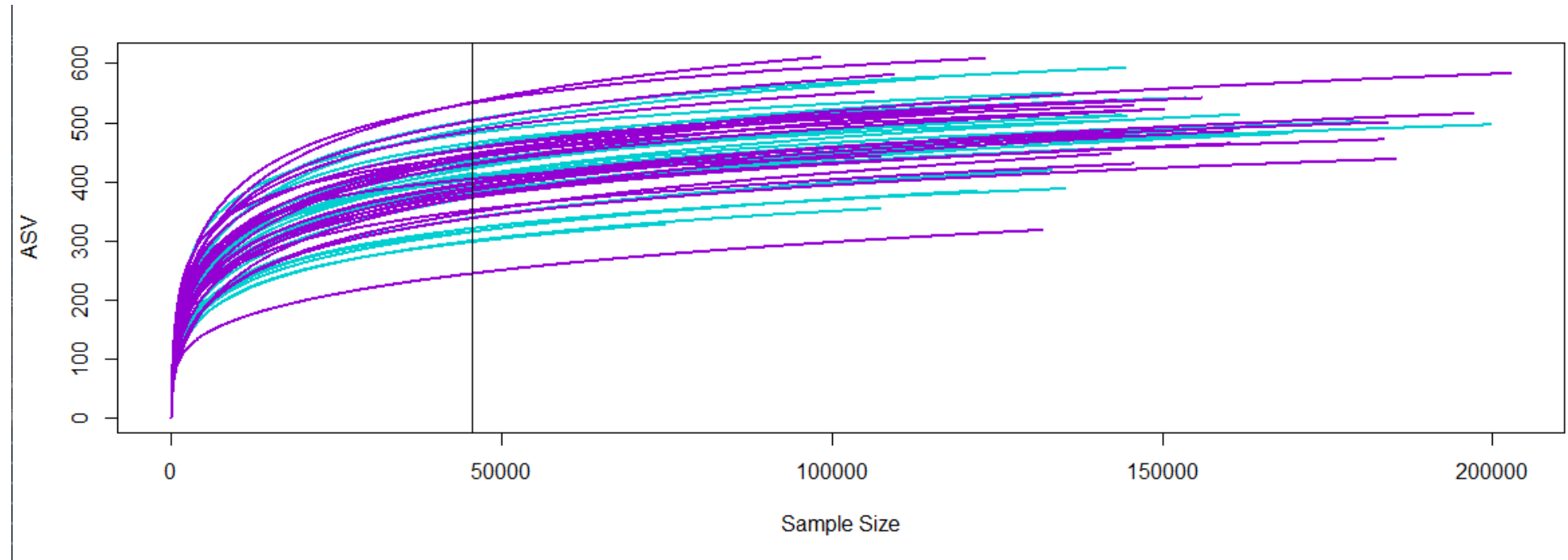
Número de ASVs encontradas en cada muestra

Uso de phyloseq, paquete Vegan en R Studio

■ Pacientes

■ Controles

Profundidad máxima de ASVs encontradas: 200.000 y un mínimo aproximado de 40.000



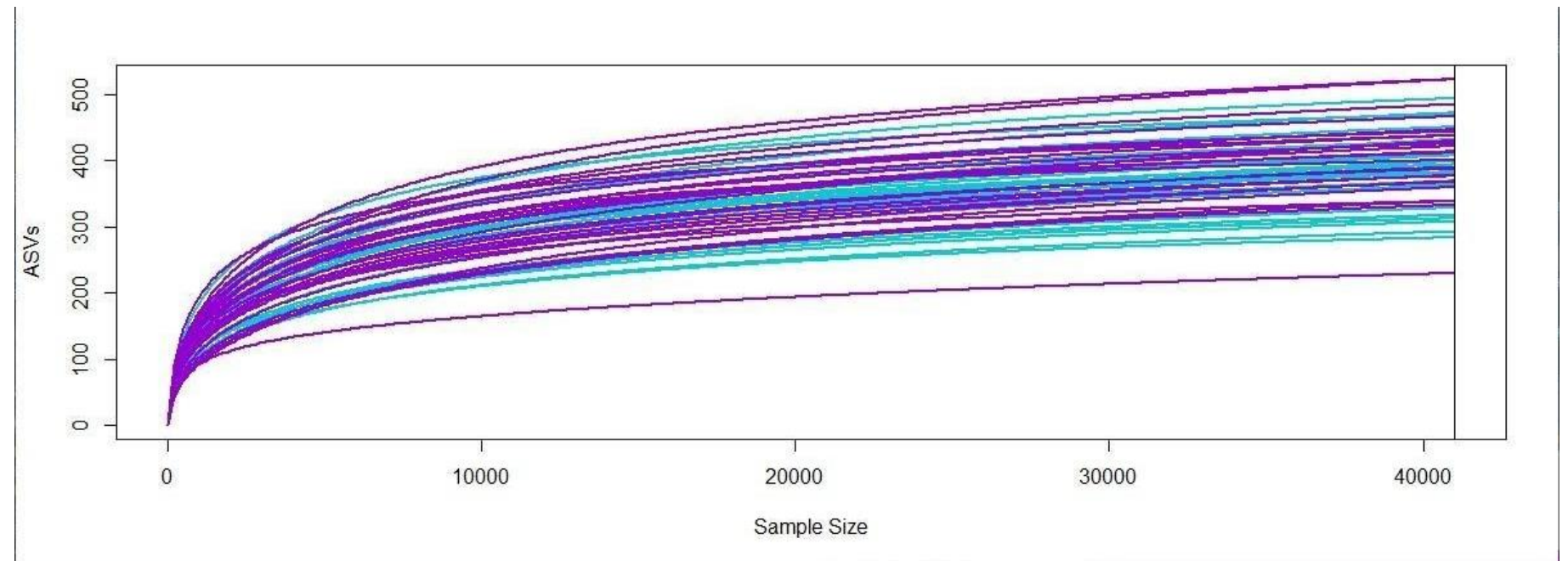
Rarefacción de las ASV obtenidas. Arias N. (2021).

Obtención de una misma profundidad para cada lectura de secuencias

Uso de phyloseq, paquete Vegan en R Studio

- Pacientes
- Controles

Profundidad llevada a 40.000 secuencias para todas las muestras.



Normalización de las ASV obtenidas. Arias N. (2021).

Diversidad de especies

Diversidad Alfa

Número de especies presentes en un hábitat.

Índice de Shannon

Número de especies presentes en un ambiente en términos de riqueza y abundancia.

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log_b p_i \quad \text{Shannon-Weaver}$$

Oksanen. Vegan: ecological diversity. (2016).

Índice Simpson

Abundancia de las especies, donde permite identificar si hay **dominancia** de unas especies sobre otras.

$$D_1 = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad \text{Simpson} \quad (2)$$

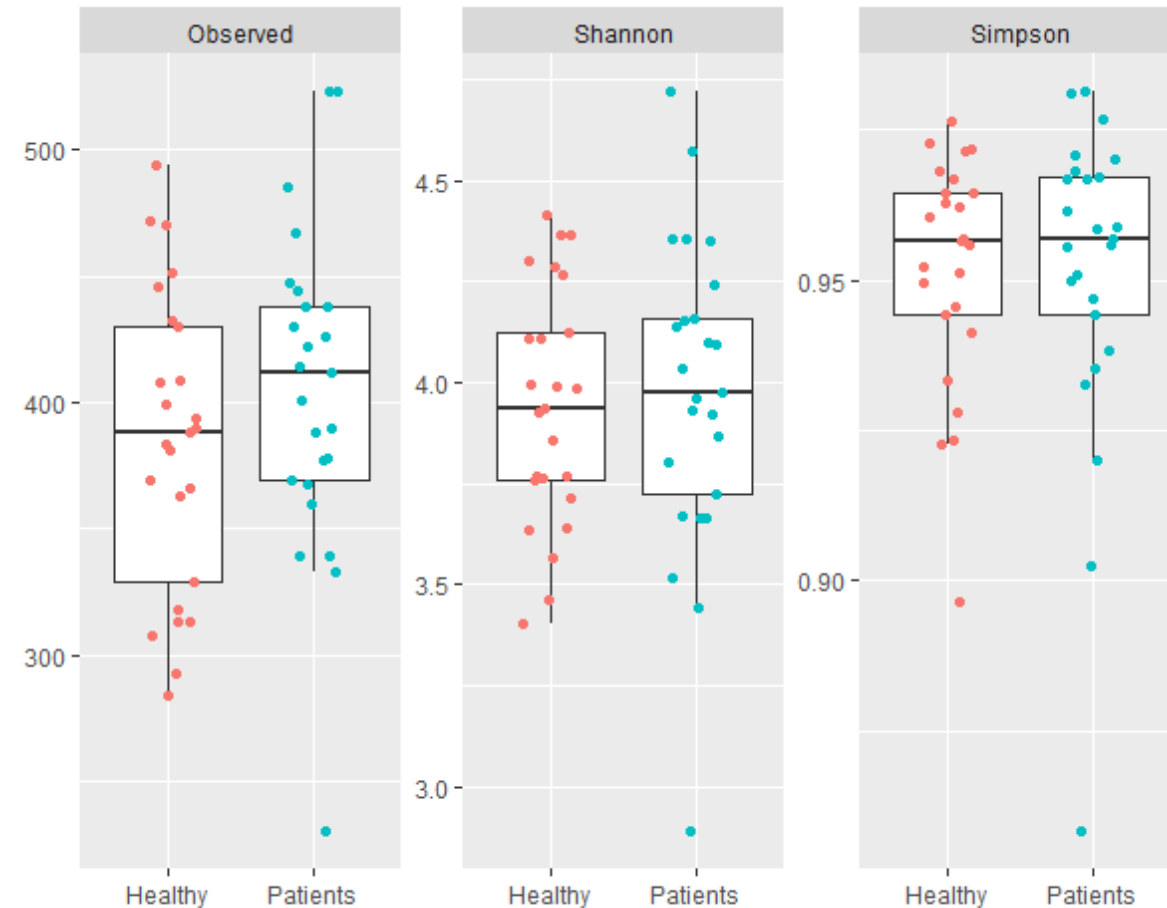
Oksanen. Vegan: ecological diversity. (2016).

Diversidad homogénea en cada pacientes y cada control negativo

Uso de phyloseq, paquete Vegan en R Studio

Prueba estadística Wilcoxon:
 $p = 0,8626$. Intervalo de
confianza del 95%.

Los pacientes con EP y los
controles sanos, caracterizan de una
diversidad con alta riqueza y
abundancia de especies.



Reportes de diversidad alfa en pacientes con EP vs controles sanos

- Keshavarzian, et al, 2015 y Hopner, et al, 2017: no hay diferencias significativas
- Petrov, et al, 2017 y Li C, et al, 2019: disminución de abundancia en pacientes con EP.

RESULTS

Evaluation of taxonomic pattern of gut microbiota in PD patients (Fig. 1) showed that the level of alpha-diversity calculated using chao1 index was higher in the control group, which reflects reduction of gut microbiota diversity during PD (627.567 ± 102.988 and 699.481 ± 112.524 , respectively; $T=4.105$; $p=0.001$). It is known that reduced gut microbiota diversity is associated with the development of inflammatory processes in the intestine [9]. Reduction in taxonomic

(Petrov, et al. *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*.2017).

HC Versus PD Subjects: Mucosa-Associated Bacteria

The α -diversity of mucosal-associated bacterial communities was, for the most part, not altered between PD and HC subjects (Table S6); only the family level demonstrated a significant difference in richness (i.e., the number of species per sample).

(Hopner, et al. Elsevier. 2018).

2.2. Intestinal microbiota

We detected no significant differences between cases and controls in the abundances of major phyla and also no significant differences in alpha diversity (species richness of a group) measures (Simpson, Shannon, Chao1, Phylogenetic distance; Mann-Whitney U test, $p > 0.05$). Alpha diversity indices were also not dependent on sex and age (ANOVA, $p > 0.05$ for each factor). We

(Keshavarzian, et al. *PubMed*. 2015).

Diversidad de especies

Beta diversidad



Recambio de especies entre dos ambientes distintos.



Ordenación de especies

Permite representar los datos en un número de ejes reducidos, de tal manera que representen las principales tendencias de los datos.

Análisis de componentes principales PCA

Análisis de coordenadas principales PCoA

Análisis de correspondencia CA:

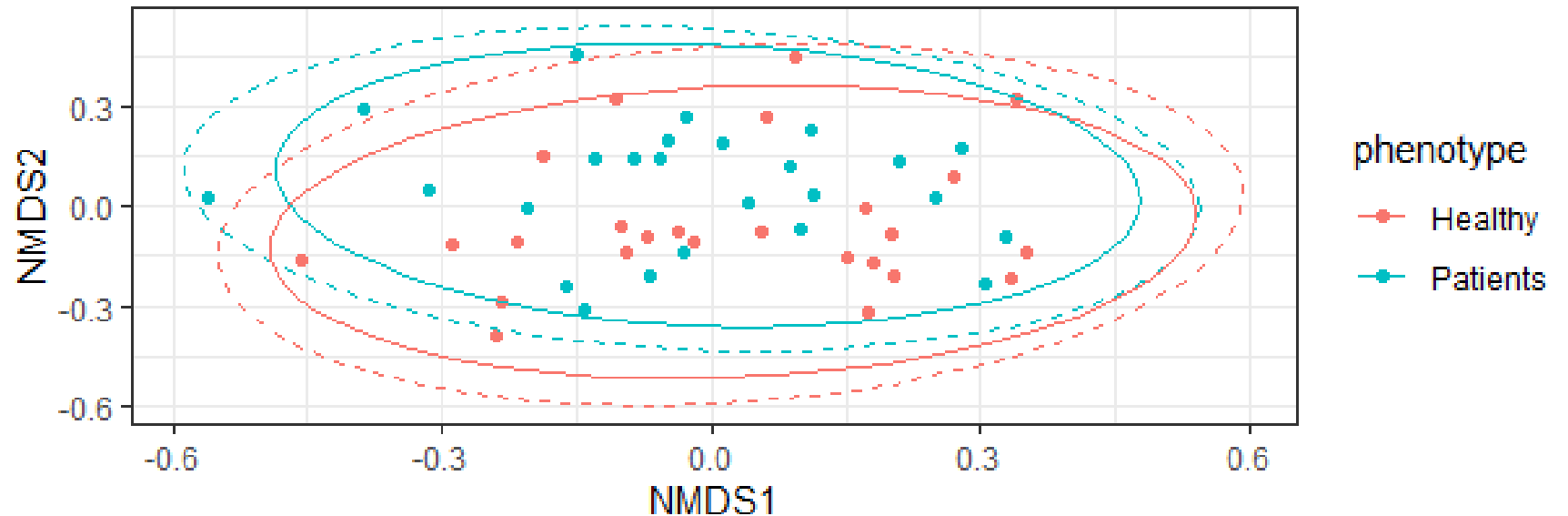
Escala multidimensional no métrica NMDS

- 0.05 excelente
- > 0.01 muy bueno
- > 0.2 bueno
- > 0.3 la ordenación es pobre

Muestras de grupos de estudio similares entre si

- Uso de phyloseq, paquete Vegan en R Studio

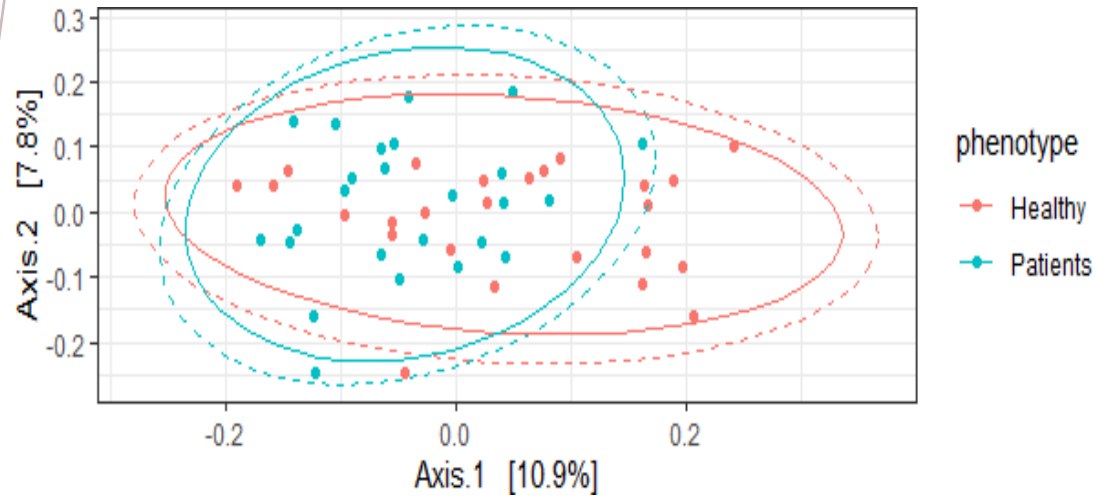
Las muestras no tienen distancias grandes entre si, porque todas tienen origen gastrointestinal.



Análisis NMDS. Arias N. (2021).

Se evidencian diferencias significativas en Weight UniFraC entre grupos de estudio

Uso de phyloseq, paquete Vegan en R Studio



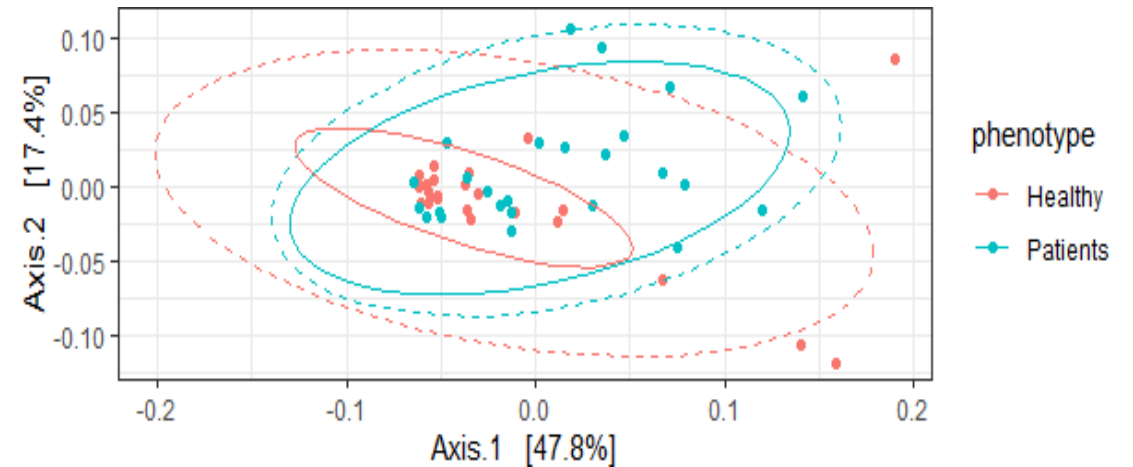
Análisis Unweight UniFraC. Arias N. (2021).

```
Call:
anosim(x = uwunifrac_dist, grouping = samples_JF$phenotype, permutations = 1000)
Dissimilarity:

ANOSIM statistic R: 0.05977
Significance: 0.01998

Permutation: free
Number of permutations: 1000
```

Test ANOSIM Unweight UniFraC. Arias N. (2021).



Análisis Weight UniFraC. Arias N. (2021).

```
Call:
anosim(x = wunifrac_dist, grouping = samples_JF$phenotype, permutations = 1000)
Dissimilarity:

ANOSIM statistic R: 0.08386
Significance: 0.003996

Permutation: free
Number of permutations: 1000
```

Distancias estadísticamente significativas entre pacientes y controles.

Test ANOSIM Weight UniFraC. Arias N. (2021).

Reportes de diversidad beta en pacientes con EP vs controles sanos

- Hopner, et al, 2017 y Barichella, et al 2018, Petrov, et al, 2017 : diferencias significativas entre grupos de estudio.

Microbial Composition in Patients With PD, MSA, and PSP

Alpha-diversity analysis showed that PD patients were characterized by a higher richness than HC ($P = .012$), whereas MSA and PSP were not. Rarefaction curves are shown in Supplementary Figure 1A,B.

Beta-diversity analyses using both unweighted and weighted UniFrac revealed that PD, MSA, and PSP communities were phylogenetically distant, although MSA and PSP showed a similar distribution, differing from both HC and PD conditions (Fig. 1A). Only the comparisons of HC versus MSA and HC versus PD were significant ($P = .045$ and $P = .002$, respectively).

(Barichella, et al. *Movement Disorders*. 2018)

plot indicates the degree of similarity of taxonomic composition of the samples. Significant differences in bacterial composition ($p=0.0001$; $R=0.214$) were revealed after comparison of microbiota samples from patients with PD and healthy controls, which agrees with previous reported data in Finnish population [13].

(Petrov, et al. *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny* .2017).

based on beta diversity metrics (Yue & Clayton theta, Morisita-Horn index, and Bray-Curtis index, calculated with family-level data) showed a significant difference between groups (unweighted UniFrac $P < 0.02$ and weighted UniFrac $P < 0.001$ for all three indices).

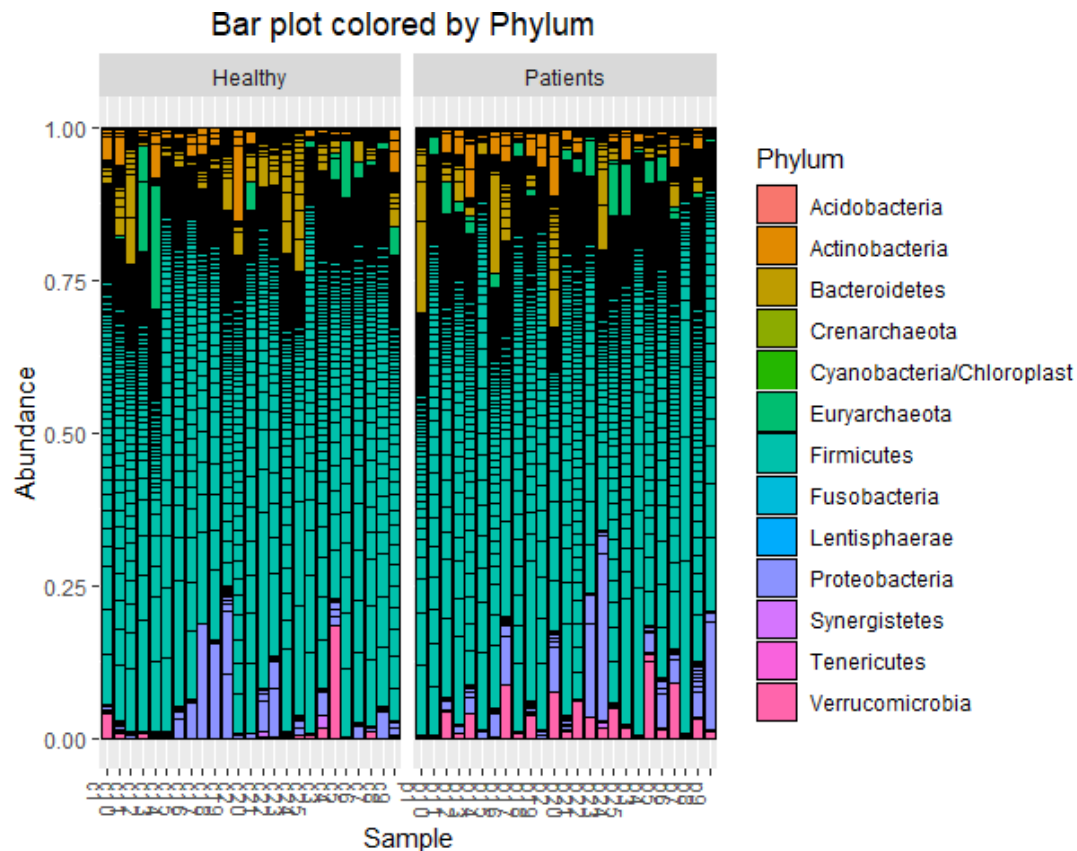
The mean abundance of Prevotellaceae in the feces of PD patients was reduced by 77.6% in comparison with control subjects (Fig. 1, Supplemental Data eTable 4). The explorative analysis suggested that five families were more abundant in PD patients than in

(Hopner, et al. *Elsevier*. 2018)

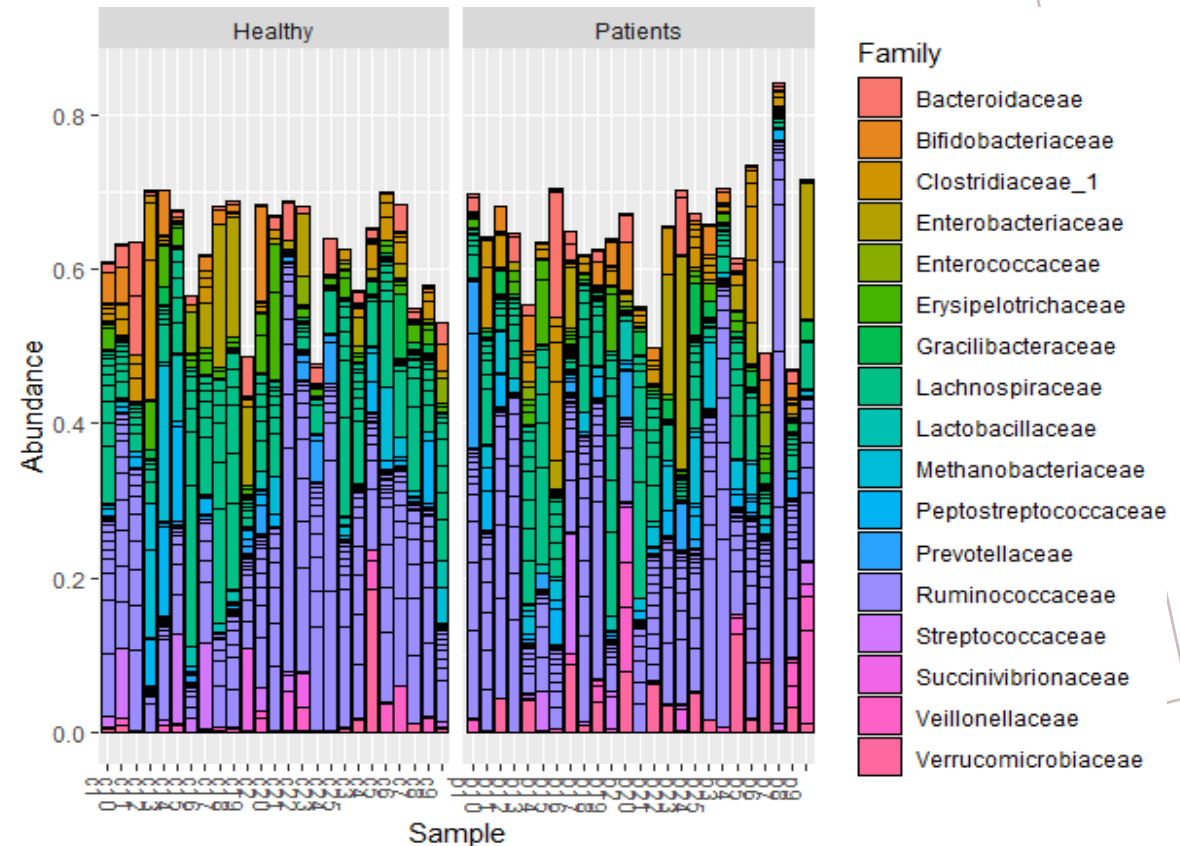
Abundancia relativa por Filum y familias bacterianas

Uso de phyloseq, paquete Vegan en R Studio

Identificación de la composición bacteriana fecal de pacientes y controles.



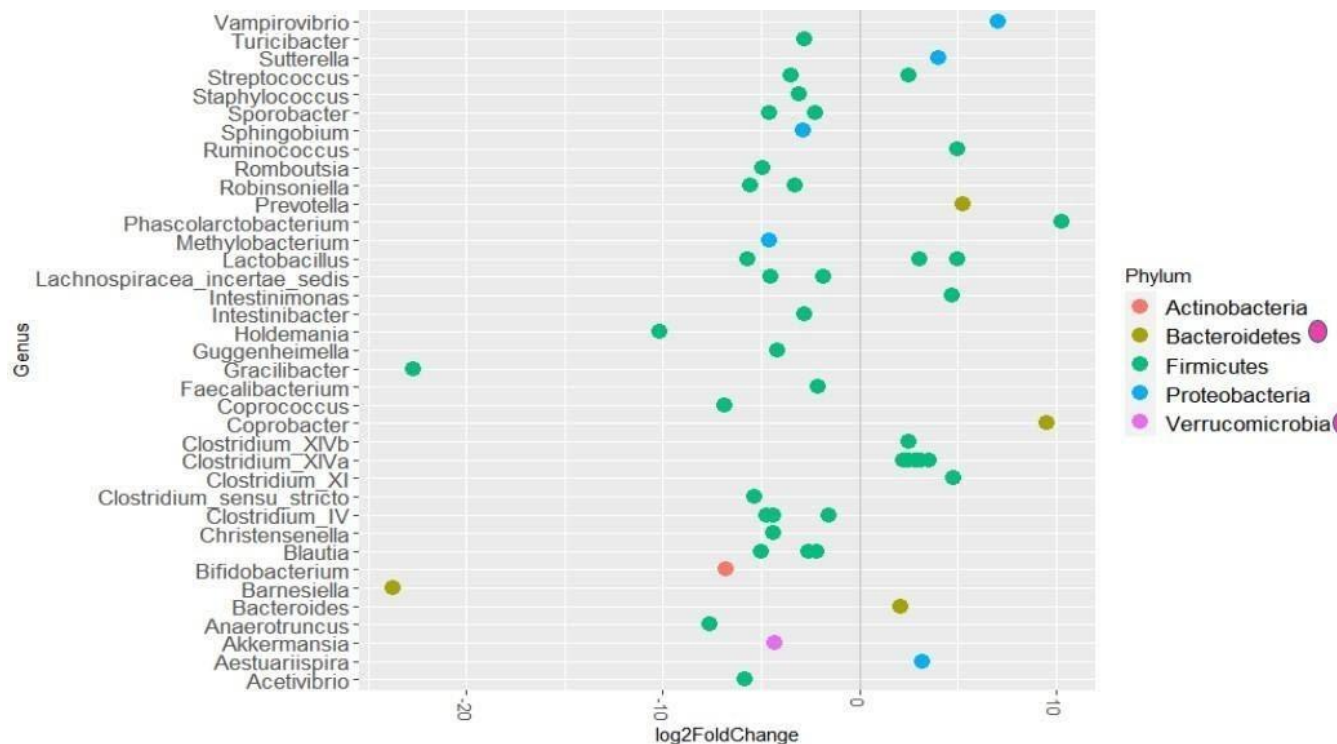
Abundancia relativa por filum. Arias N. (2021).



Abundancia relativa por familias. Arias N. (2021).

Principales filum encontrados y géneros, en los grupos de estudio

Uso de phyloseq, paquete Vegan en R Studio



Se observan resaltadas los géneros bacterianos que DESeq2 señaló como significativos siendo >5% de abundancia.

Composición diferencial significativa en género y filum bacteriano con DESeq2.
Arias N. (2021).

Familias y filum significativamente diferenciadas en los grupos de estudio

Uso de phyloseq, paquete Vegan en R Studio

Se observan resaltadas las familias bacterianas que DESeq2 señaló como significativas siendo >5% de abundancia.

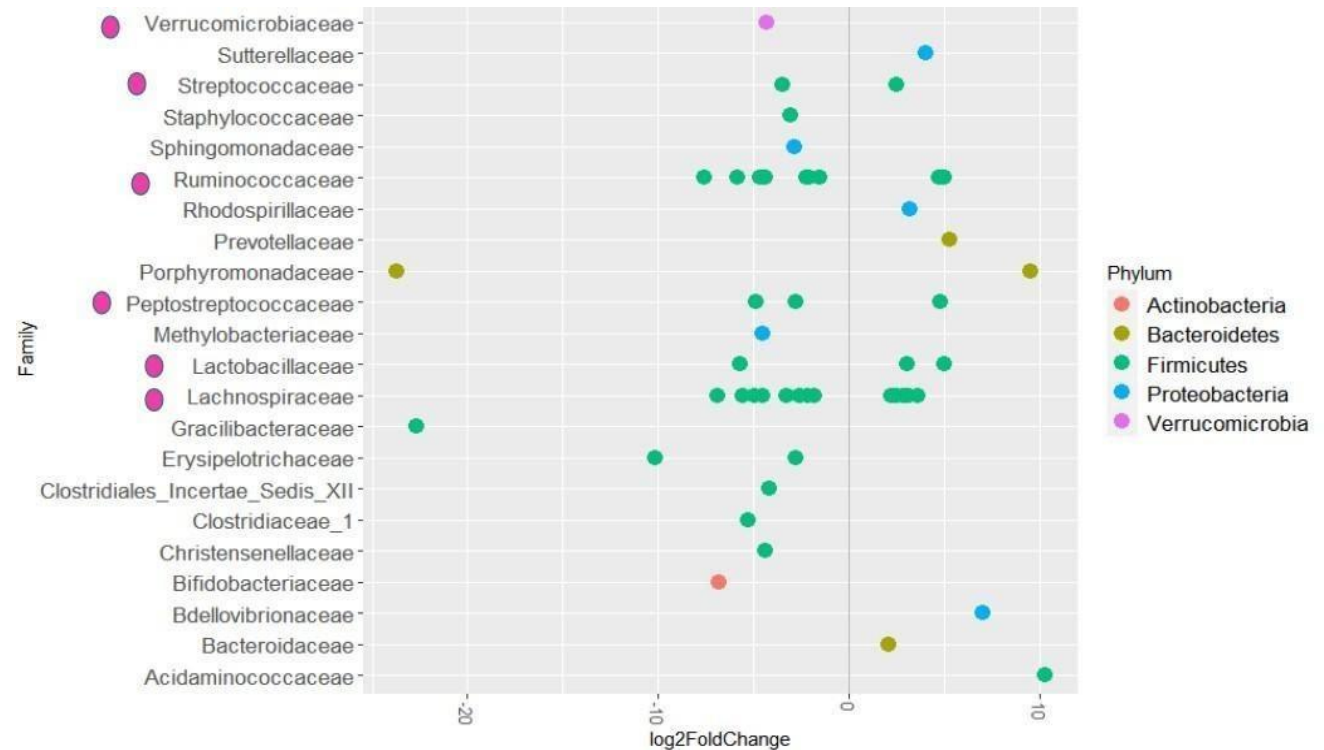
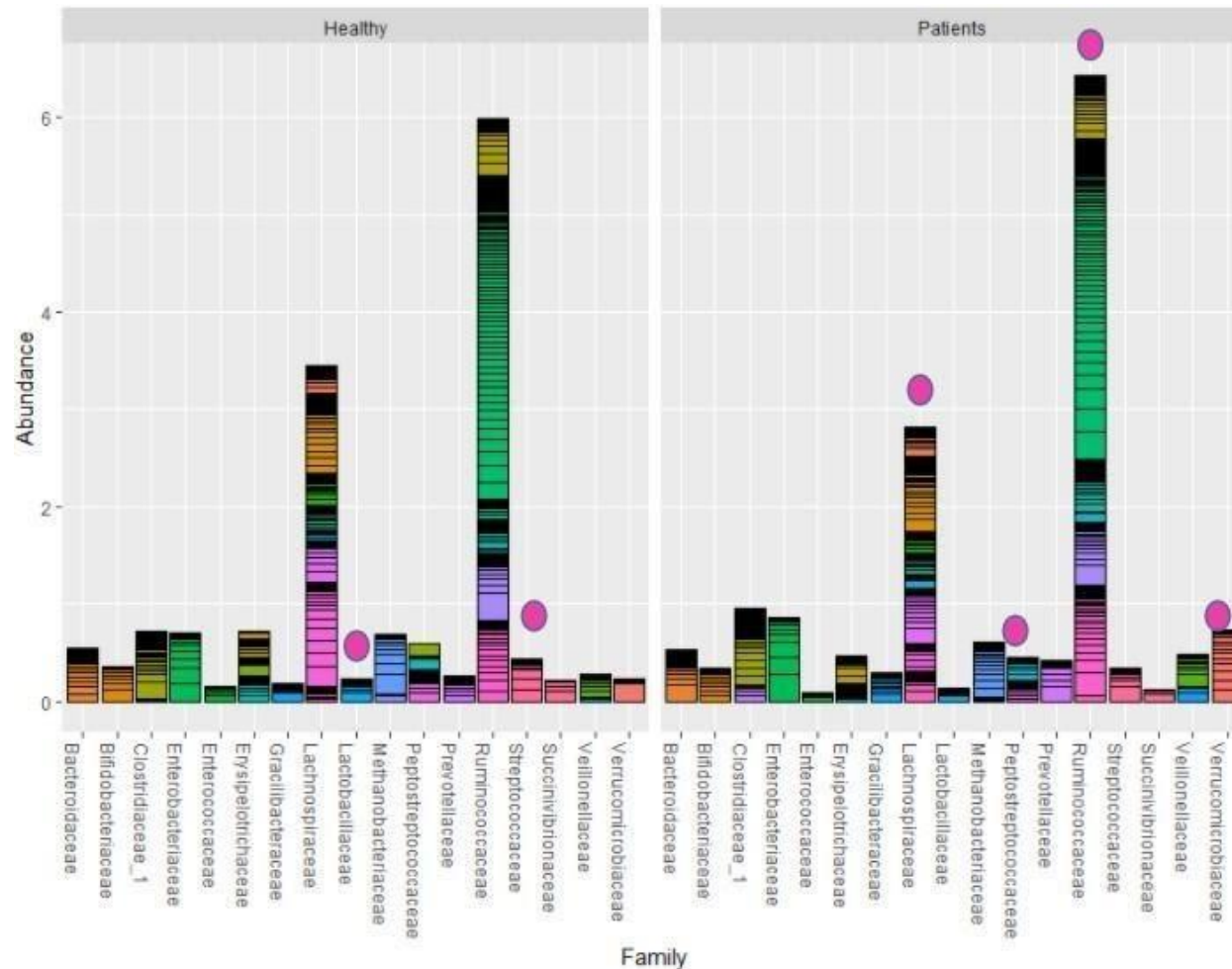


Fig.14. Composición diferencial significativa en familias bacterianas con DESeq2. Elaboración propia. (2021).

Abundancia de las familias con diferencias significativas

Uso de phyloseq, paquete Vegan en R Studio

Diferencias composicionales estadísticamente significativas, de la microbiota fecal, entre grupos de estudio.



Familias aumentadas en pacientes con EP y controles. Arias N. (2021).

Diferencias reportadas por familias bacterianas

Ruminococcaceae ↑

- (Li F, et al, 2019) ↑
- (Li W, et al, 2017) ↓
- (Lin A, et al, 2018) No significativo

Oxidación de AGCC

Lactobacillaceae ↓

- (Scheperjans et al, 2014) Y (Li C, et al, 2020) ↓
- (Hasegawa, et al, 2015), (Hopner et al, 2017), (Hilli E, et al, 2017) y (Barichela M, et al, 2018) ↑

Regula secreción de alfa sinucleína y regula la producción de AGCC

Lachnospiraceae ↑

- (Li F, et al, ⁴³, 2019) ↑
- (Hill E, et al ²⁸, 2017), (Lin A., et al, ³⁶, 2018) y (Barichela M, et al, ³⁷, del 2018) ↓

Síntesis de la mucina e interfiere con el plegamiento de alfa sinucleína.

Streptococcaceae ↓

- (Li W, et al, 2017) ↑



Regula producción de AGCC, aumento relacionado con aumento de patobiontes y neurotoxicidad.

Verrucomicrobiaceae ↑

- (Hill E, et al ²⁸, 2017) y (Li F, et al ⁴³, 2019) ↑

Mantenimiento de la permeabilidad intestinal y el género *Akkermansia spp* principal implicado en neuroprotección.

Abundancias reportadas en diferentes estudios

 Incrementadas
 Disminuidas

Primer reporte de la familia *Peptostreptococcaceae* en pacientes con EP hasta la fecha.

		Badarf, 2017	Barikheila, 2019	Hasegawa, 2015	Heinz 2018	Hill 2017	Hopfner, 2017	Keshavarzian, 2015	Li, 2017	Lin, 2018	Petrov, 2017	Qian, 2018	Scheperjans, 2015	Unger, 2016	Baldini, 2019	Li, 2019	Pietrucci, 2019	Li, 2019	Estudio llevado a cabo
Tamaño de estudio	Casos EP	31	193	52	76	197	29	38	14	75	89	45	72	34	147	10	80	51	25
	controles	28	191	36	78	130	29	34	24	45	66	45	72	34	162	10	72	48	25
Metodos	Escopeta	x																	
	16S rRNA(region)		v3-v4		v4	x	v1-v2	v4	-v4; v4-	x	v3-v4	v3-v4	v1-v3		v3-v4	V3-V4	x	x	v4-v5
Familias bacterianas	<i>Peptostreptococcaceae</i>																		
	<i>Akkermansiaceae</i>																		
	<i>Bacteroidaceae</i>																		
	<i>Bifidobacteriaceae</i>																		
	<i>Christensenellaceae</i>																		
	<i>Clostridiaceae</i>																		
	<i>Comamonadaceae</i>																		
	<i>Coriobacteriaceae</i>																		
	<i>Enterobacteriaceae</i>																		
	<i>Enterococcaceae</i>																		
	<i>Erysipelotrichaceae</i>																		
	<i>Lachnospiraceae</i>																		
	<i>Lactobacillaceae</i>																		
	<i>Pasterurellaceae</i>																		
	<i>Porphyromonadaceae</i>																		
	<i>Prevotellaceae</i>																		
	<i>Ruminococcaceae</i>																		
<i>Sphingomonadaceae</i>																			
<i>Streptococcaceae</i>																			
<i>Verrucomicrobiaceae</i>																			

Cuadro comparativo estudios previos y el presentado. Arias N. (2021).

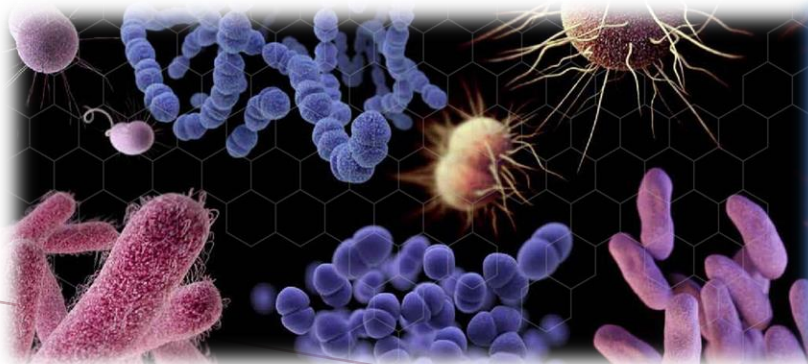
Primer reporte significativo de la familia *Peptostreptococcaceae* en pacientes con EP

- Microbiota gastrointestinal y bucal.
- Fermentación de los aminoácidos.
- Producción de AGCC y síntesis de la mucina.

Otras patologías asociadas

Correlación negativa

Correlación positiva



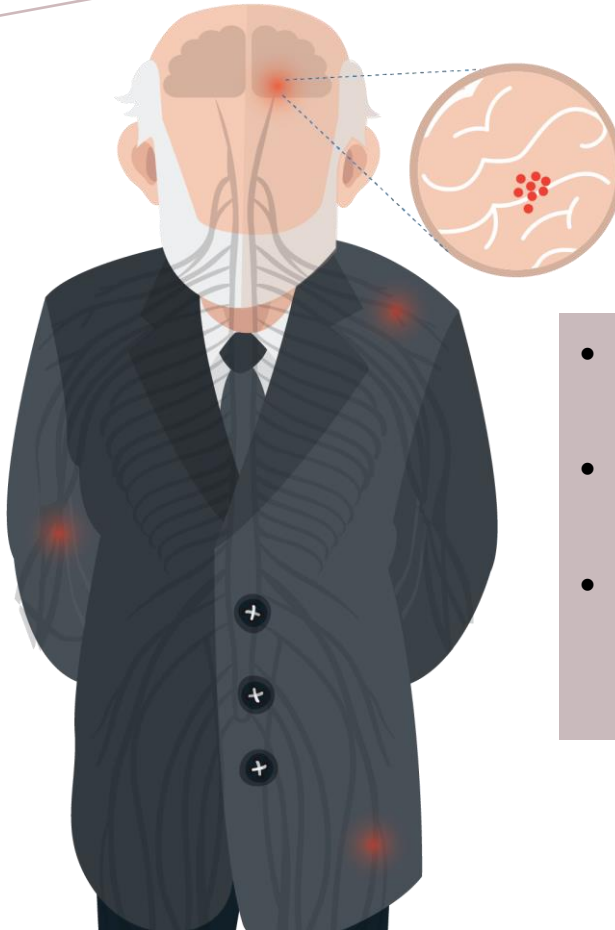
Infecciones polimicrobianas



Cáncer colorrectal



Enfermedades autoinmunes



- Principales Filum: *Actinobacterias*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*.
- Principales géneros: *Bacteroides spp* y *Verrucomicrobia spp*.

- Familias *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* y *Verrucomicrobiaceae* ↑
- Familias *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae* ↓
- *Peptostreptococcaceae*: primera vez descrita en pacientes con EP.

Conclusiones

- **Alfa diversidad** puede ser dependiente de variables intrínsecas de la microbiota de la persona.
- **Beta diversidad** demostró agrupaciones diferenciadas entre los grupos de estudio.



- Altamente implicados en la producción y metabolismo de AGCC.
- Mediadores en el mal plegamiento y propagación de proteínas como alfa sinucleína.
- Reguladores de la hemostasia intestinal.
- Implicados en la neuroprotección y cambios de comportamiento.

Conclusiones

Perspectivas

Aumentar el muestreo y poder tener mayor evidencia estadística.

- Estudios personalizados, los cuales incluyen métodos cualitativos y cuantitativos.
- Considerar las condiciones demográficas.

Aplicación de metagenómica entender las relaciones ecológicas entre bacterias a nivel intestinal y capacidades metabólicas.



Agradecimientos

A Johanna Forero Rodríguez y al profesor Andrés Mauricio Pinzón Velasco por permitirme ser parte de su proyecto.

A Edith del Carmen Hernández por su apoyo a nivel interno en todo este proceso y a la profesora Johanna Marcela Moscoso Gamma, por todo el apoyo a nivel de semillero y presentación del proyecto en eventos.

También al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, la cual me permitió ingresar a sus instalaciones y desarrollar este trabajo de grado.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por su formación en el programa de bacteriología y laboratorio clínico, el cual me dio las herramientas para llevar a cabo estos.

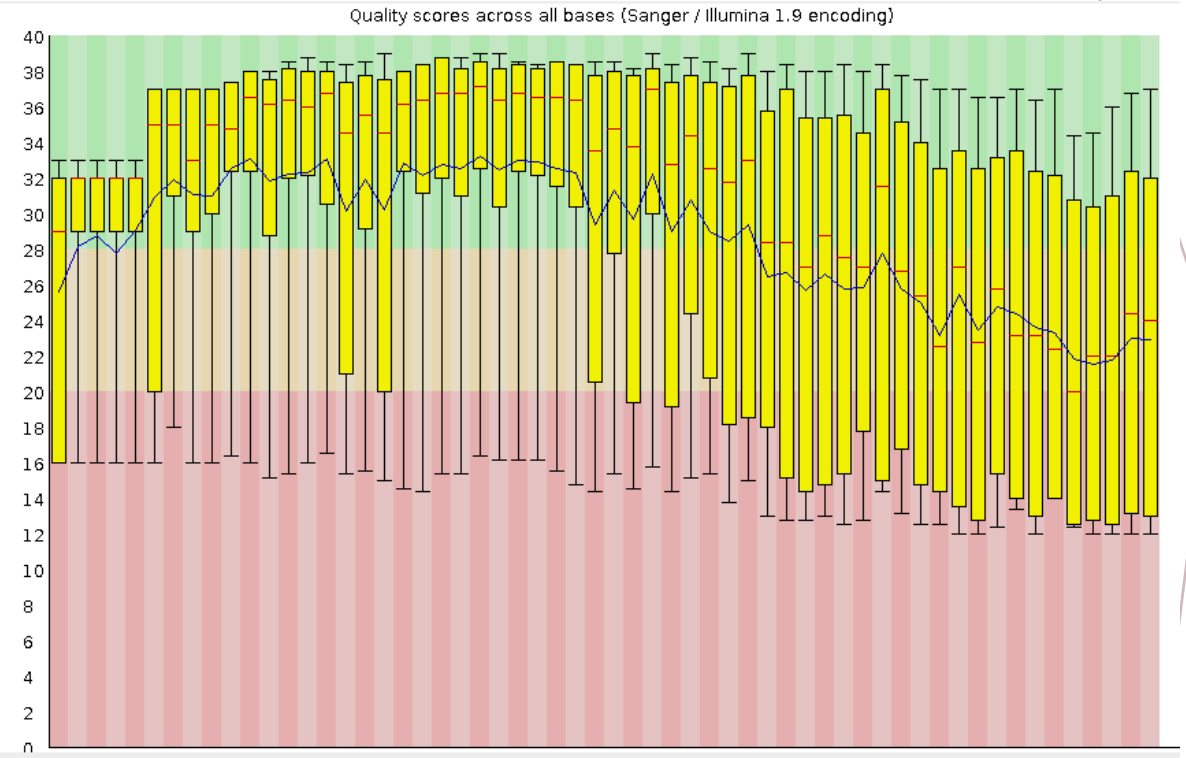
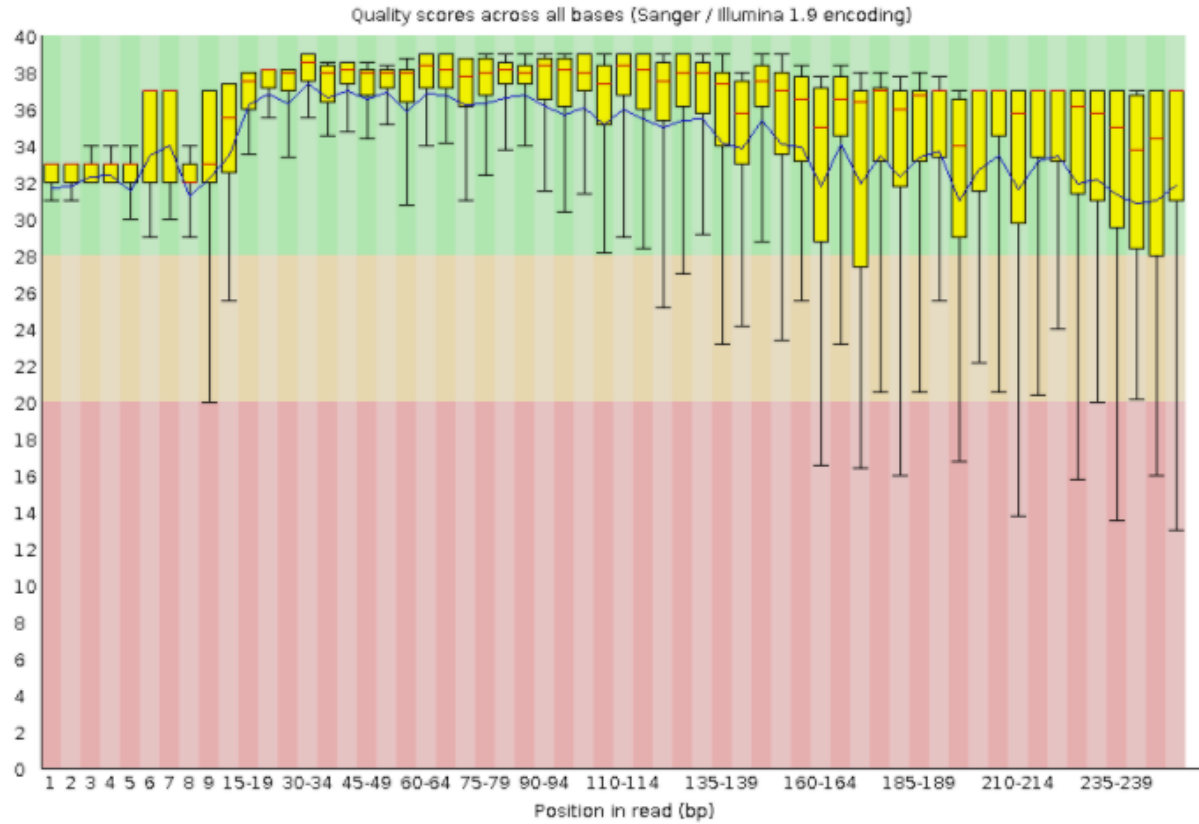
Agradecer a mi madre, Norma Rodríguez Pérez quien me brindó todo su amor, apoyo y colaboración para el desarrollo de mi carrera universitaria y con ella este trabajo y a mi mejor amiga Mariangela Vidal Salcedo, quien me impulsó a perseguir mis metas a pesar de dificultades emocionales presentadas que me impedían continuar.

Además, quiero agradecer a David Corredor Ramírez por su orientación en el manejo de Qiime 2 para el análisis bioinformático y por ultimo también agradecer a Leonardo Niño quien me enseñó el manejo de R y a Diego Benítez por su orientación conceptual respecto a diversidad microbiana e interpretación gráfica.

Gracias por su atención, espacio para preguntas:



Anexos



Análisis de calidad de secuencias Fasta con FastQC. Arias N. (2020).

Diversidad Alfa

Índice Simpson

$$D = \frac{\sum n (n - 1)}{N(N - 1)}$$

- D = índice de Simpson.
- n = número total de organismos de una especie.
- N = número total de organismos de todas las especies.

 lifeder.com

Briceño K. Liferder. (2021).

Índice Shannon

$$H' = -\sum P_i * \ln P_i$$

Donde:

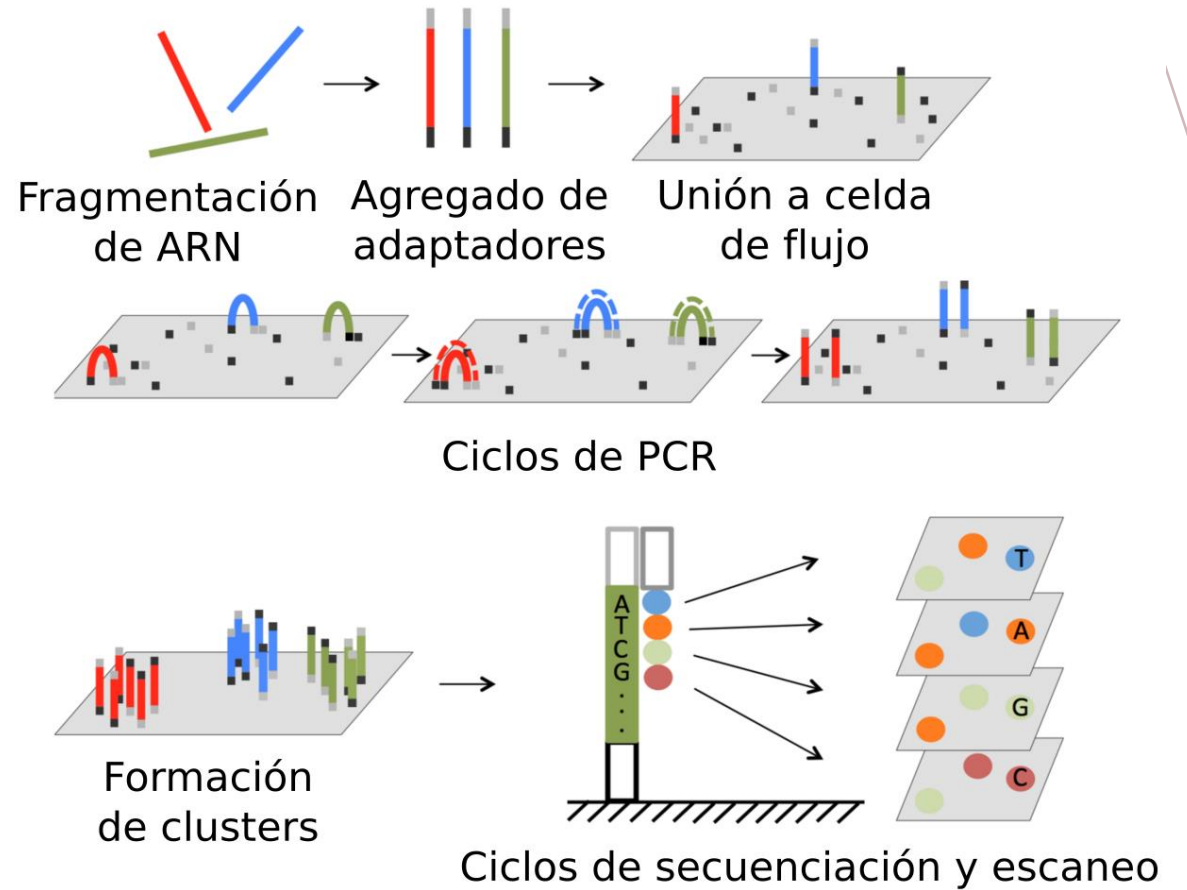
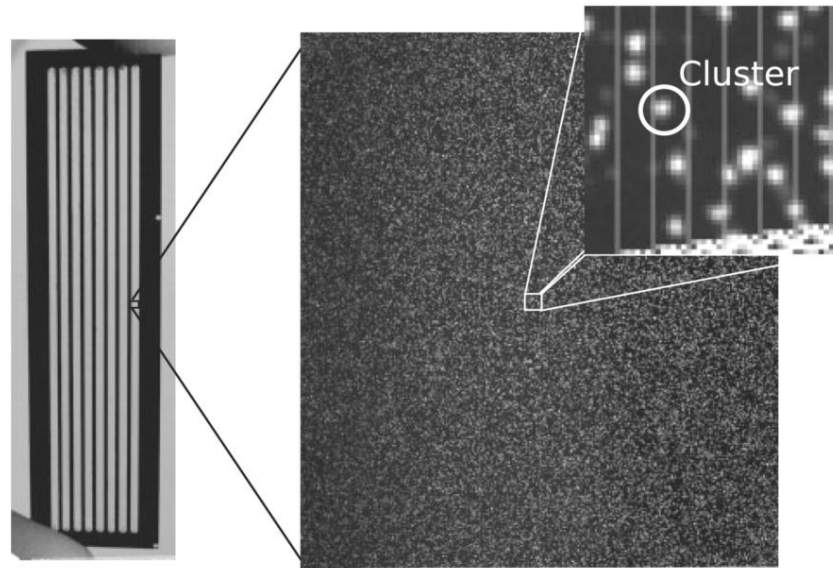
H = Índice de Shannon-Wiener

P_i = Abundancia relativa

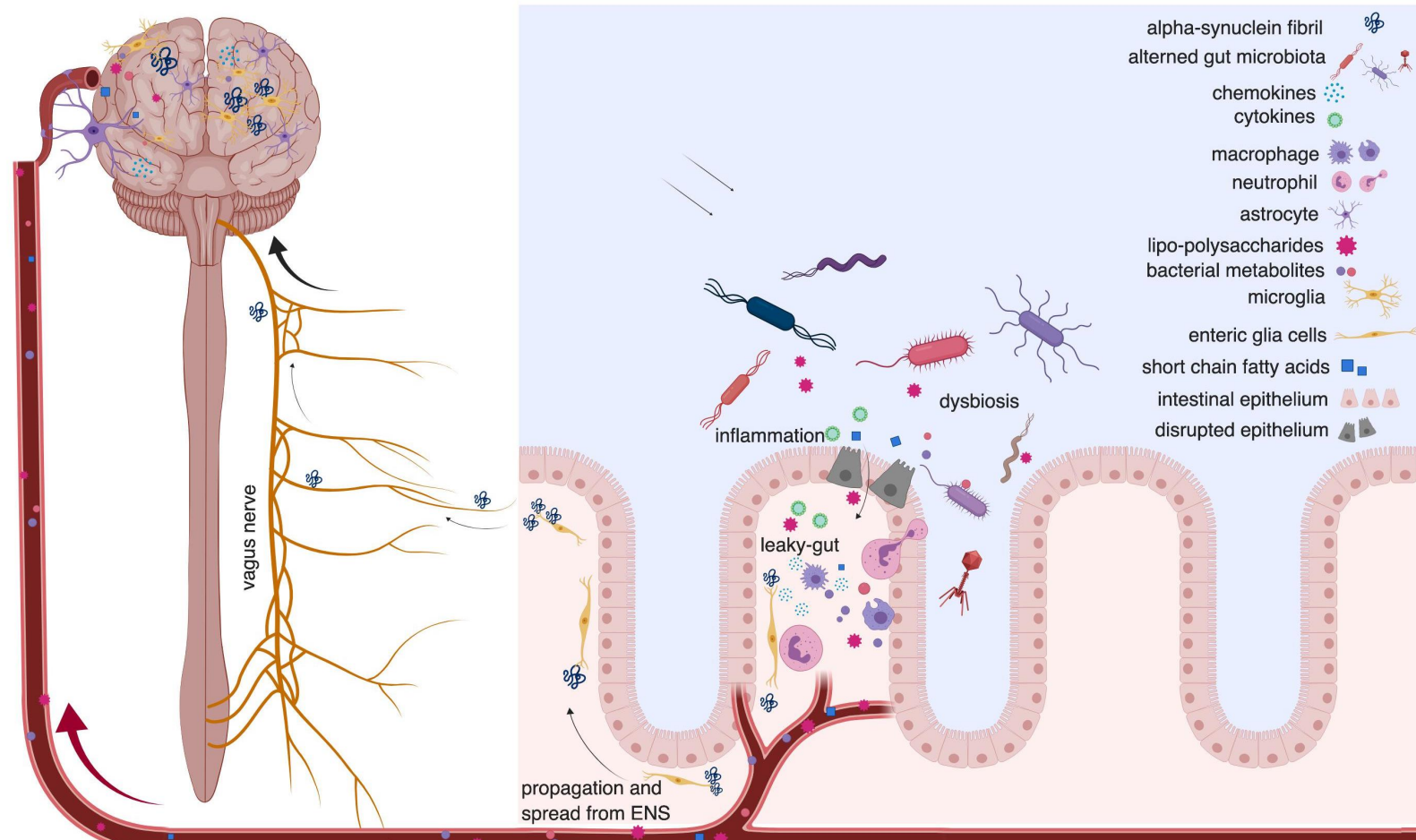
Ln = Logaritmo natural

Biología ambiental. (2013).

Secuenciación Illumina



Axis microbiota intestino cerebro



Referencias bibliográficas

1. Resolución número 8430. [internet] República de Colombia. Bogotá: Ministerio de salud; 1993 [10 de septiembre de 2020]. Recuperado de https://urosario.edu.co/Escuela-Medicina/Investigacion/Documentos-de-interes/Files/resolucion_008430_1993.pdf.
2. Scheperjans F, Aho V, Pereira P, Koskinen k & Paulin L. Gut Microbiota Are Related to Parkinson's Disease and Clinical Phenotype. PubMed. [internet] 2014 [cited 23 de may 2019]. Vol: 30(3):350-8, available from: 10.1002/mds.26069.
3. Keshavarzian A, Green S.J, Engen P.A, Voigt R.M, & Ankur Naqib. Colonic Bacterial Composition in Parkinson's Disease. PubMed. [internet] 2015 [cited 23 may 2019]. Vol: 30(10):1351-60, available from: 10.1002/mds.26307.
4. Unger M, Spiegel J, Dillman K, Grundmann D, Phillippeit H & Burmann J. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. Germany. Elsevier. [internet] 2016 [cited 23 may 2020]. 1-7. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.08.019>.
5. Oksanen J. Vegan: ecological diversity, r project. [internet] 2016 [cited 10 of march of 2021]. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vignettes/diversity-vegan.pdf>.

Referencias bibliográficas

6. Hopfner F, Künstner A and Müller S. Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort. Kiel University, Germany. Elsevier. [internet] 2017 [cited 20 may 2020]. Vol: 41-45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2017.04.019> 0006-8993/2017.
7. Rietdijk C, Perez P, Garssen j, van Weezel R & Kraneveld A. Exploring Braak hypothesis of Parkinson's disease. Netherlands, review, Frontiers in Neurology. [internet] 2017 [cited 20 sep 2020]. Vol: 8: art 37. Available from doi: 10.3389/fneur.2017.00038.
8. Petrov V, Saltykova I and Zhukova V. Analysis of Gut Microbiota in Patients with Parkinson's Disease. University, Moscow, Russia. Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny. [internet]. 2017 [cited 20 may 2020]. Vol: 162, No. 12, pp. 700-703. Available from: doi: 10.1007/s10517-017-3700-7
9. Marín D, Carmona H, Ibarra M, Gámez M. Enfermedad de Parkinson: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Rev Univ Ind Santander Salud. [internet] 2018 [cited 11/08/20]. Vol: 50(1): 79-92, recuperado de: doi: 10.18273/revsal.v50n1-2018008.
10. Barichella M, Severgnini M, Cilia R, et al. Unraveling gut microbiota in Parkinson's disease and atypical Parkinsonism, Parkinson Institute, Azienda Socio Sanitaria Territoriale. Milan, Italy. Movement Disorders. [internet] 2018 [cited 20 may 2020]. Available from: doi:10.1002/mds.27581.

Referencias bibliográficas

11. Liang S, Wu X & Jin F, Gut-Brain Psychology: Rethinking Psychology From the Microbiota–Gut–Brain Axis, University of China. Beijing. Review Frontiers. [internet] 2018 [cited 20 may 2020]. 12: 33. Available from doi: doi: 10.3389/fnint.2018.00033.
12. Fitzgerald E, Murphy S and Martinson H. Alpha-Synuclein Pathology and the Role of the Microbiota in Parkinson's Disease. USA. Review, Frontiers. [internet] 2019 [cited 9/5/2020]. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00369>.
13. Li C, Cui L and Yang Y. Gut microbiota differs between Parkinson's disease patients and healthy controls in Northeast China, Department of Neurology and Neuroscience Center, Changchun. China. Front. Mol. Neurosci. [internet] 2019 [cited 20 may 2020]. Available from <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00171>.