



TRABAJO FIN DE GRADO

Alteraciones de la microbiota intestinal en las
enfermedades prion-like: Una revisión sistemática

Gut microbiota changes in prion-like diseases:
A systematic review

Autora
Celia León Huertas

Directora
Inmaculada Marín Burriel

Dpto de Anatomía, Embriología y Genética Animal. Facultad de Veterinaria

ABREVIATURAS

ACE: Estimador de cobertura basado en la abundancia (*Abundance-based Coverage*).

AMS: Atrofia múltiple sistémica.

DA: Demencia de Alzheimer.

DE: Desviación estándar.

DFT: Demencia frontotemporal.

EH: Enfermedad de Huntington.

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica.

EP: Enfermedad de Parkinson.

EPL: Enfermedades prion-like (EP+DA+ELA+EH+AMS+DFT).

EPr: Enfermedades priónicas.

EPyPL: Enfermedades priónicas y prion-like (EP+DA+ELA+EH+AMS+DFT+EPr).

IMC: Índice de masa corporal.

LPSN: Lista de nombres de procariotas con posición en la nomenclatura (*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*).

NGS: Secuenciación de nueva generación.

NOS: Escala Newcastle Ottawa (*Newcastle-Ottawa Scale*).

PRISMA 2020: Elementos de notificación preferidos para la revisión sistemática y metanálisis 2020. (*Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis 2020*).

RoBANS: Herramienta de evaluación del riesgo de sesgos para estudios no aleatorios (*Risk of Bias Assessment Tool for Non-randomised Studies*).

SCFA: Ácidos grasos de cadena corta (*Short Chain Fatty Acids*).

SNC: Sistema nervioso central.

SNE: Sistema nervioso entérico.

SNP: Sistema nervioso parasimpático.

SNS: Sistema nervioso simpático.

PMn: Prueba multinomial.

ÍNDICE

1.RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Microbiota intestinal.....	2
2.2 Eje intestino-cerebro.....	3
2.3 Enfermedades priónicas y prion-like.....	3
2.4 Secuenciación de nueva generación	4
2. 5 Análisis de la microbiota intestinalL	5
3.JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4.1 Tipo de investigación	6
4.2 Fuentes de información	6
4.3 Criterios de selección	6
4.4 Estrategia de búsqueda, selección y evaluación	7
4.5 Recogida de datos del texto de los artículos.....	8
4.6 Método de evaluación del riesgo de sesgos.....	8
4.7 Métodos estadísticos e informáticos.....	9
5. RESULTADOS.....	10
5.1 Artículos seleccionados	10
5.2 Evaluación del riesgo de sesgos de los artículos seleccionados	11
5.3 Características de los sujetos de las muestras.....	12
5.4 Alteración de la alfa diversidad.....	13
5.5 Alteración de la beta diversidad	14
5.6 Alteración de la abundancia relativa de taxones	16
6. DISCUSIÓN.....	17
7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	21
8. BIBLIOGRAFÍA	22

1 RESUMEN/ABSTRACT

Introducción: Diversos estudios han relacionado la alteración de la microbiota intestinal con el inicio y progresión de enfermedades priónicas y prion-like. La producción y agregación de las proteínas malplegadas que aparecen en estas enfermedades podría iniciarse en el intestino y progresar a través del eje intestino-cerebro hacia el SNC. **Objetivos:** Conocer si la microbiota intestinal de los pacientes con enfermedades prion-like está alterada respecto a los sujetos sanos y si las modificaciones son similares entre las microbiotas intestinales de estas enfermedades. **Material y métodos:** Se realiza una revisión sistemática de estudios casos control que comparan la microbiota intestinal en heces entre sujetos sanos y pacientes de enfermedades prion-like. Se compara los resultados de la alfa y beta diversidad y la abundancia relativa de taxones de los artículos seleccionados para responder a las preguntas objetivo. **Resultados y discusión:** No se ha podido demostrar que la microbiota intestinal de los enfermos de patologías prion-like sea distinta a la de los sanos ni que sea diferente de unas de estas patologías a otras ya que la muestra de artículos es pequeña y el número de artículos, datos de la alfa diversidad, beta diversidad y abundancia relativa de la mayoría de las patologías estudiadas son escasos. Sólo en la enfermedad de Parkinson se ha podido demostrar que su microbiota intestinal está alterada, respecto a los sujetos sanos, al detectarse que su alfa diversidad final y su índice Chao1 están aumentados, su beta diversidad final y distancia UniFrac no ponderada están alteradas y los taxones *g_Bifidobacterium*, *g_Lactobacillus*, *g_Akkermansia* y *f_Verrucomicrobiaceae* están aumentados y *g_Roseburia* disminuido. **Conclusiones:** Es necesario realizar más estudios sobre el tema, sobre todo de cohortes longitudinales prospectivos, y llegar a un consenso entre investigadores para estandarizar estas investigaciones de forma que permitan la comparación entre estudios para obtener conclusiones válidas.

Introduction: Various studies have related the alteration of intestinal microbiota with the onset and progression of prion and prion-like diseases. The production and aggregation of misfolded proteins that appear in these diseases could start in the intestine and progress through the gut-brain axis to the CNS. **Objectives:** To determine whether the intestinal microbiota of patients with prion-like diseases is altered with respect to healthy subjects and whether there are differences in the intestinal microbiota between these diseases. **Material and Methods:** A systematic review of case-control studies comparing the intestinal microbiota in stool between healthy subjects and patients with prion and prion-like diseases was carried out. We compared the results of alpha and beta diversity and relative abundance of taxa in the articles selected to comply with the objectives.. **Results and discussion:** It has not been possible to demonstrate that the intestinal microbiota of patients with prion-like diseases is different from that of healthy people, nor that it is different from one of these diseases to the other, since the sample of articles is small and the number of articles, data on alpha diversity, beta diversity and relative abundance of most of the diseases studied are scarce. Only in Parkinson's disease it has been possible to demonstrate that its intestinal microbiota is altered, with respect to healthy subjects, by detecting that its final alpha diversity and Chao1 index are increased, its final beta diversity and unweighted UniFrac distance are altered and the taxa *g_Bifidobacterium*, *g_Lactobacillus*, *g_Akkermansia* and *f_Verrucomicrobiaceae* are increased and *g_Roseburia* decreased. **Conclusions:** There is a need for further studies on the subject, especially prospective longitudinal cohorts, and to reach a consensus among investigators to standardize these investigations in a way that allows comparison between studies to obtain valid conclusions.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 MICROBIOTA INTESTINAL

Se define como microbiota al conjunto de microorganismos que habitan de forma estable en un lugar, por ejemplo, el cuerpo humano. Entre el sujeto sano y su microbiota se establece un equilibrio que busca el beneficio de ambos. De esta relación ha surgido el concepto de holobionte, entendiendo como tal al ente formado por un individuo, su microbiota, la relación simbiótica que establecen y el conjunto de sus genes u hologenoma (1).

No se debe confundir microbiota con microbioma. Éste último estaría constituido por el conjunto de genes de la microbiota, sus metabolitos y el ambiente en el que se encuentran (2). Los genes del microbioma superan en 100-150 veces los del genoma humano, lo que nos da idea de su potencial importancia en la fisiología humana (3).

En el presente trabajo nos centraremos exclusivamente en la microbiota intestinal bacteriana humana. El 90 % de la microbiota intestinal bacteriana humana está formada principalmente por cinco filos: Firmicutes o Bacillota (60 %), Bacteroidetes o Bacteriodota (30 %), Actinobacterias o Actinomycetota, Proteobacteria o Pseudomonadota y Verrucomicrobia o Verrucomicrobiota, siendo los más abundantes los dos primeros (4, 5).

En un intento de caracterizar las diferentes microbiotas intestinales humanas en unos pocos tipos se propuso clasificarlos en tres enterotipos: enterotipo 1, enterotipo 2 y enterotipo 3, según tengan alta proporción de Bacteroides, Prevotella o Ruminococcus, respectivamente (6). Este intento sigue generando controversia ya que estos enterotipos no recogen la amplísima diversidad existente en la microbiota humana intestinal (7).

El intestino en el momento del nacimiento en teoría es estéril, aunque en diferentes estudios se han hallado metabolitos y DNA bacteriano en el meconio (8). El recién nacido adquirirá microbiota en su paso por vagina y periné materno, del contacto con alimentos, el ambiente y los seres vivos. Las personas que conviven comparten más microbiota intestinal entre sí en comparación con las personas que viven separadas; esto parece indicar la influencia del contacto físico, ambiente y dieta compartidos sobre la microbiota (9). A los 2-3 años de edad se ha estabilizado la microbiota intestinal, que permanecerá con pequeños cambios durante la vida adulta (10) y que puede considerarse como un órgano más del cuerpo humano con funciones específicas.

La microbiota intestinal depende de múltiples factores, pudiendo variar con la dieta alimenticia, la edad y etapa de la vida, raza, sexo, genética del hospedador, zona geográfica, hábitos de consumo como el alcohol, probióticos, prebióticos y ciertos fármacos, velocidad del tránsito intestinal, estrés y múltiples patologías (11, 10). Todos estos factores hay que tenerlos en cuenta a la hora de la investigación ya que actuarán como factores de confusión.

Las funciones de la microbiota intestinal son múltiples y variadas, entre ellas: proteger la barrera intestinal, sobre todo la capa de moco y epitelio; competir con microorganismos patógenos; favorecer el equilibrio inmunológico ayudando a evitar respuestas hiperinmunológicas; producir vitaminas como K, B1, B2, biotina, ácido pantoténico y fólico, aminoácidos, ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como ácido propiónico, butírico y acético que tienen efectos antiinflamatorios y son usados como fuente de energía por las células intestinales ayudando a mantener la permeabilidad intestinal normal; modificar los ácidos biliares primarios de la bilis a secundarios y colaborar en la recirculación del colesterol; degradar sustancias no digeribles como la fibra; sintetizar sustancias neuroactivas; sintetizar, a partir de triptófano, serotonina, quinurenina e indoles que tienen efectos beneficiosos inmunológicos y vasculares; o estimular a las células enterocromafines para que produzcan serotonina (12, 13).

Actualmente se habla de eubiosis y disbiosis para referirnos a una microbiota normal o alterada, respectivamente, pero de momento en la literatura científica no existen criterios claros que definan cuando una microbiota es o no normal, debido a su gran variabilidad.

2.2 EJE INTESTINO-CEREBRO

Se conoce como eje intestino-cerebro a la interacción bidireccional que ocurre entre el sistema nervioso central (SNC) y el intestino por medio de elementos neuronales, endocrinos, metabólicos e inmunológicos (12). En este eje intervendría la microbiota, el intestino, el sistema nervioso periférico, sistema nervioso autónomo y el SNC.

El SNC actúa sobre las glándulas digestivas así como en el músculo y mucosa intestinal principalmente a través de vías eferentes del sistema nervioso simpático (SNS) y parasimpático (SNP), especialmente el nervio vago, y recibe información de ellos por las vías aferentes del sistema nervioso. Estos sistemas controlan el peristaltismo intestinal, riego sanguíneo, secreciones salivar, gástrica, pancreática y biliar, la secreción de mucina y modula en parte la permeabilidad de la barrera intestinal. Con estos mecanismos el SNC regula la digestión, la absorción y la excreción y a la vez favorece o dificulta la nutrición de la microbiota intestinal.

El intestino actúa sobre el SNC a través de las ya mencionadas vías aferentes del SNS y SNP y también mediante la absorción o no de sustancias. Parte de estas sustancias son productos del metabolismo de la microbiota que pueden actuar sobre el cerebro, como por ejemplo ácidos grasos de cadena corta que tienen efecto antiinflamatorio, influyen en la maduración de la microglía y modula la fagocitosis de la microglía (12) o los neurotransmisores como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) producido por lactobacilos y bifidobacterias o dopamina por *Bacillus* y *Serratia* (14).

Otra forma de comunicación bidireccional entre intestino y cerebro es el eje endocrino hipotálamo-hipofisario-adrenal. En experimentos con ratones se comprobó que con *E. coli* producían más hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y corticoesterona ante situaciones de estrés (15). De igual forma, el estrés, al activar el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, aumenta la permeabilidad intestinal (16).

Por último, otro mecanismo de comunicación entre intestino y cerebro es el sistema endocannabinoide. Se conoce que en la regulación de los endocannabinoides y del receptor CB1 bacterias como la *Akkermansia muciniphila* desempeñan un papel importante (12).

2.3 ENFERMEDADES PRIÓNICAS Y PRION-LIKE

El gen *PRNP* de mamíferos codifica una proteína fisiológica normal llamada proteína priónica o PrP^c cuya función no está del todo clara, aunque se cree que tiene un papel en el desarrollo neuronal y en la plasticidad neuronal. La enfermedad priónica (EPr) aparece cuando PrP^c cambia su configuración a una isoforma malplegada PrP^{sc} o PrP^{res} (scrapie prion protein) o prión la cual presenta nuevas propiedades como ser muy resistente a los procesos de esterilización químicos y físicos además de a proteasas, no ser soluble en detergentes no iónicos, mostrar en su estructura abundantes láminas β , presentar tendencia a formar agregados, transmitirse entre células e individuos de la misma o distinta especie, producir neurodegeneración específica en ciertas zonas del sistema nervioso, ser capaz de tener diferentes conformaciones o cepas, culpables de las diferentes formas clínicas, y sobre todo de inducir en proteínas similares la adquisición de su misma conformación malplegada mediante un mecanismo denominado plegamiento incorrecto dirigido por plantilla, lo que permite al prión autoampliarse y autopropagarse (17). Esta proteína PrP^{sc} o PrP^{res} es la que origina las EPr humanas conocidas: kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker y el insomnio familiar fatal. La alteración de la proteína PrP^c puede aparecer de forma espontánea tras la síntesis, por mutación del gen *PRNP*, por entrada exógena de la proteína al comer alimento contaminado con priones o por contaminación en la manipulación de tejido nervioso con priones (18). Las enfermedades prion-like (EPL) son patologías neurodegenerativas en las que aparecen proteínas malplegadas, que parecen presentar algunas propiedades típicas de los priones como la autoampliación y autopropagación. Las EPL y las proteínas malplegadas prion-like serían la α -sinucleína en

enfermedad de Parkinson (EP) y atrofia múltiple sistémica (AMS), la TDP-43 o huntingtina en enfermedad de Huntington (EH), A β y tau en demencia de Alzheimer (DA), TDP-43 o tau o FUS en demencia frontotemporal (DFT) y TDP-43 en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (17).

Fisiológicamente tras la traducción del RNA mensajero (mRNA) a proteína lineal comienza el plegamiento de ésta debido a las interacciones entre sus aminoácidos o a la acción de chaperonas y enzimas. Este plegamiento puede ser incorrecto debido a múltiples factores. Las proteínas malplegadas pueden unirse formando oligómeros y polímeros dando lugar a agregados proteicos que alterarán el normal funcionamiento celular ocasionando neurodegeneración. El sistema de control de calidad de las proteínas (PQC de *Protein Quality Control*), formado por chaperonas, proteasas y otros factores, es el encargado de dirigir el plegamiento y transporte de proteínas, eliminar las erróneas y evitar su agregación. La alta concentración de proteínas, alteraciones genéticas, pH, temperatura, iones metálicos, estrés oxidativo y presencia de otras proteínas malplegadas pueden hacer que las proteínas se plieguen defectuosamente o que el sistema PQC no realice su función de forma adecuada y acaben formándose los agregados proteínicos (19, 20).

Diversos hechos han relacionado las enfermedades priónicas y prion-like (EPyPL) con el eje intestino-cerebro y la microbiota: El estreñimiento y la detección de α -sinucleína en el SNP entérico aparecen años antes que el resto de clínica de la EP y la AMS (21); en pacientes de EP con sobrecrecimiento bacteriano intestinal el uso de antibióticos mejora la clínica motora, asociando microbiota y síntomas de EP (22); en experimentos con ratones se comprobó que la α -sinucleína podía ascender por el nervio vago hacia el cerebro (23) y en humanos la vagotomía troncular reduce la incidencia de EP (24); en otro experimento con ratones transgénicos para la DA se observó que los libres de microbiota intestinal tenían con menos frecuencia patología amiloide (25); en un modelo murino de EP se comprobó que la inflamación de la mucosa intestinal y el estrés oxidativo iniciaban agregados de α -sinucleína en el intestino (26); y por último, el trasplante de heces de sujetos con EP a modelos de ratones de EP origina un aumento de los síntomas motores (27). Todos estos hallazgos parecen apoyar la idea de que la microbiota estaría relacionada con el inicio y progresión de las EPyPL. En las EPr la relación sería la transmisión por ingestión de priones procedentes de alimentos, mecanismo ya conocido. En el caso de las EPL la disbiosis de la microbiota junto con el aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal favorecería la entrada de metabolitos y endotoxinas que por un lado producirían un estado hiperinflamatorio sistémico y por otro facilitarían la aparición de proteínas malplegadas prion-like en el sistema nervioso entérico (SNE) que más tarde se propagarían vía vagal o atravesando la barrera hematoencefálica afectando a áreas del SNC susceptibles a estos agregados proteicos (28). Este mismo mecanismo también podría darse en EPr.

2.4 SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

El estudio de la microbiota ha dado un gran paso gracias a los nuevos métodos de secuenciación masiva de DNA. La secuenciación por el método enzimático Sanger y el método químico de Maxam-Gilbert constituyeron la primera generación. Estos métodos eran lentos, caros y limitaban mucho la cantidad de DNA que se podía secuenciar. La segunda generación, que permite el procesamiento paralelo masivo, ha posibilitado a los investigadores procesar millones de secuencias de DNA en un corto tiempo, con un margen de error y un coste aceptables. Dentro de esta segunda generación existen varios métodos como por ejemplo el de Roche basado en polimerasa, con amplificación del DNA por PCR de emulsión y lectura de las secuencias por pirosecuenciación o el método de Illumina, basado en polimerasa con terminadores reversibles, amplificación por PCR en puente y lectura mediante etiquetas fluoróforas en los terminadores reversibles. La tercera generación es la de metagenómica o secuenciación shotgun de genoma completo basada en la secuenciación de una única molécula de DNA en tiempo real, no precisa amplificación del DNA y la lectura puede realizarse al pasar la cadena por un nanoporo de membrana que mediante un detector óptico o un detector de variaciones de

corriente eléctrica reconoce el nucleótido que ha pasado o bien mediante la lectura directa de la cadena de DNA con microscopía electrónica (29).

En los estudios de microbiota intestinal se suele utilizar, para conocer los diferentes taxones bacterianos que la forman, la amplificación y secuenciación del gen que codifica la unidad 16s rRNA (30). El amplicón 16s rRNA posee unas regiones hipervariables estables que permiten diferenciar unas especies/taxones de otros. El número de copias de ese gen puede variar de unas especies a otras, lo cual hay que tenerlo en cuenta a la hora de la interpretación de la abundancia y diversidad de la microbiota (31).

Según el método de secuenciación que se emplee para el análisis de la microbiota intestinal variará la profundidad taxonómica a la que se puede llegar. Así los métodos de segunda generación pueden informar de forma confiable hasta el nivel de familia o género, mientras que los de tercera generación llegan hasta el nivel de especie (32).

2.5 ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Para estudiar la microbiota intestinal y detectar si las microbiotas de dos muestras difieren entre sí se utilizan métodos importados de la Biología y Ecología como la alfa diversidad, beta diversidad y la abundancia relativa de taxones (33).

La alfa diversidad informa de la diversidad de especies o taxones a nivel local, por ejemplo, en un individuo o una muestra, centrándose en su riqueza, abundancia y heterogeneidad, mientras que la beta diversidad informa de las diferencias entre comunidades o muestras, poniendo el foco sobre la estructura filogenética y las diferencias de ésta entre ellas.

Para medir la alfa diversidad se pueden utilizar diferentes estimadores como el índice de Chao1, Shannon, Simpson, Simpson inverso, Sob, ACE, distancia filogenética de Faith, árbol completo o especies/OTUs observadas, etc. Aunque todos miden la alfa diversidad tienen matices diferenciadores, por ejemplo, Chao1 y Shannon funcionan mejor en muestras pequeñas mientras que ACE lo hace en muestras grandes, o Chao1 informa de la riqueza de especies/taxones y es más útil cuando éstos muestran baja abundancia, mientras que Shannon también informa de la homogeneidad o equidad de taxones de la muestra o el de Simpson sobre la existencia de taxones dominantes.

La beta diversidad se puede calcular también mediante el uso de diferentes distancias como UniFrac ponderado, UniFrac no ponderado, Camberra, Aithichon, Sorensen, Hellinger y la disimilitud de Bray-Curtis, entre otros (34, 33).

La abundancia relativa de un taxón es la proporción de bacterias de ese taxón respecto al total de bacterias de la muestra. Permite conocer, comparando dos muestras, que taxones están aumentados o disminuidos de una muestra a otra (33).

3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde la aparición de métodos de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) se ha producido un aumento de estudios e investigaciones sobre posibles cambios en la microbiota intestinal en ciertas enfermedades. Entre estas enfermedades estudiadas se encuentran patologías del grupo de EPL.

El objetivo general de este trabajo ha sido realizar una revisión bibliográfica sistemática de estudios casos control analizando la alfa diversidad, beta diversidad y la abundancia relativa de taxones para comprobar si existen alteraciones en la microbiota intestinal humana en los enfermos con EPL que pudieran ser de utilidad para identificar la etiología, patogenia, métodos de diagnóstico o terapias.

Partiendo de este interés se ha planteado como objetivo específico de esta investigación contestar a las preguntas:

¿Existen diferencias entre la microbiota intestinal de las EPL y la de los individuos sin estas enfermedades?, ¿Son estos cambios consistentes y similares entre las distintas EPL?

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Los artículos analizados no permiten un análisis cuantitativo global ya que en ellos se utilizan diferentes criterios de inclusión y exclusión, métodos de secuenciación, métodos estadísticos y manejo de las variables de confusión variados y diferentes que impiden su adecuada comparación. A ello se suma que en gran parte de los artículos no se muestran las tablas de valores de las variables sino su representación gráfica o simplemente las tablas de significación estadística de los resultados. Ante el impedimento de realizar una investigación basada en una revisión sistemática cuantitativa (metanálisis) se ha optado por llevar a cabo una revisión sistemática cualitativa de revisor único.

La revisión sistemática se ha realizado siguiendo las normas de la herramienta metodológica “*Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis 2020*” (PRISMA 2020) (35) para mejorar la claridad, transparencia y calidad del trabajo.

Al tratarse esta investigación de un trabajo de fin de grado individual, cada una de las fases del proceso de la revisión sistemática, ha sido realizado por un solo investigador, aunque la recomendación PRISMA 2020 sea que se lleve a cabo al menos por dos investigadores de forma independiente en paralelo para aumentar la calidad y grado de evidencia de la revisión sistemática.

4.2 FUENTES DE INFORMACIÓN

Para la búsqueda bibliográfica automatizada se han utilizado las bases de datos online PubMed (36) y Scopus (37).

PubMed, del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utiliza las bases de datos de bibliografía científica biomédica MEDLINE, preMEDLINE, Genbank y Complete Genoma. Scopus, perteneciente a la empresa Elsevier B.V., consta de una base de datos científica multidisciplinar que indexa más de 7000 publicaciones.

La elección de los dos sistemas de búsqueda mencionados se ha basado, además de su amplio uso en la comunidad científica y la gran cantidad y calidad de publicaciones que indexan, en que desde la biblioteca online de la Universidad de Zaragoza se puede obtener acceso ilimitado a ellos, así como al texto completo y archivos suplementarios online de gran parte de los artículos seleccionados.

La última búsqueda automatizada se realizó con fecha de 29 de septiembre de 2022.

4.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Para la selección de artículos útiles se han empleado los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- Idioma: Sólo se han seleccionado artículos escritos en inglés o español al ser los idiomas que conoce el autor.
- Fecha de publicación: Se han aceptado artículos publicados en cualquier fecha previa a la última búsqueda automática, aunque se ha comprobado previamente en PubMed y Scopus que antes del año 2000 no hay artículos pertinentes sobre la pregunta a estudiar.
- Tipo de investigación: Se selecciona artículos basados en estudios observacionales analíticos de tipo caso-control. Se rechazan otros tipos de artículos como revisiones sistemáticas, metanálisis y ensayos clínicos.
- Tipo de publicación: Artículos de investigación publicados en revistas en papel u online indexadas en PubMed o Scopus. No se admiten libros, documentos, conferencias, material de congresos, cartas, notas, etc.
- Estado de publicación: Sólo se admitirán artículos publicados. Se excluyen los artículos retractados o pendientes de publicación oficial.
- Especie y origen de los elementos a analizar: Sólo se recogerán datos procedentes de heces humanas.

- Sujetos del estudio: El grupo control de cada artículo ha de estar formado por sujetos sanos o sin la patología en estudio y el grupo casos por individuos con alguna patología prion-like.
- Contenido y datos de los artículos: El artículo ha de tener un contenido y datos, o enlace a ellos, que sean de utilidad para responder la pregunta de investigación. No se admiten artículos que usen muestras ya empleadas en otros artículos seleccionados; en este caso se rechazará el artículo que se considere que aporta datos menos útiles.
- Resultados: Se admitirán tanto artículos con resultado favorable como no favorable a la hipótesis de investigación de cada artículo.

4.4 ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA, SELECCIÓN Y EVALUACIÓN

La estrategia para la selección de los artículos para contestar a la pregunta planteada en esta revisión sistemática se ha basado en una primera fase de búsqueda automática online con PubMed y Scopus, una segunda fase de selección manual sobre los títulos, resúmenes e información básica de cada artículo mostrada por el gestor bibliográfico Zotero (38) y finalmente una tercera fase de evaluación con lectura completa de los artículos preseleccionados en la fase segunda (Figura 1).

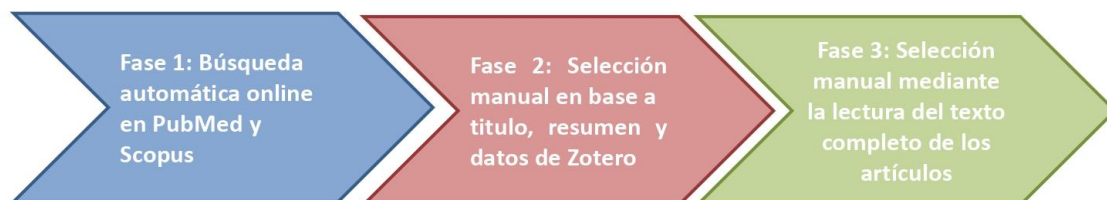


Figura 1: Proceso de selección de los artículos para la revisión sistemática

Como se preveía que el número final de artículos útiles iba a ser pequeño se ha optado por llevar a cabo en la primera fase una búsqueda automática más sensible, con el fin de reducir el riesgo de excluir artículos útiles, empleando sólo los criterios o filtros estrictamente necesarios en los buscadores online, e incluyendo la búsqueda de EPr, dejando para la segunda fase manual un cribado más específico de artículos.

En la búsqueda bibliográfica automática online se han utilizado las siguientes palabras en inglés: *microbiota, microbiome, microflora, flora, gut-brain axis, neurodegenerative disease, Parkinson, Huntington, Alzheimer, multiple system atrophy, amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia, prion, prion-like, case control*.

La búsqueda automática en PubMed y Scopus, empleando las palabras anteriores, se ha adaptado a las características propias de cada uno de los buscadores y de los resultados que aportaban para optimizarla. Las proposiciones lógicas de rastreo automático para ambos sistemas de búsqueda y sus números de resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Proposiciones lógicas empleadas en los sistemas de búsqueda online PubMed y Scopus y cantidad de artículos obtenidos en cada búsqueda

Sistema de búsqueda online	Proposición de búsqueda	Nº resultados
PubMed	((microbiota) OR (microbiome) OR (microflora) OR (flora) OR (gut-brain axis)) AND ((neurodegenerative disease) OR (prion) OR (prion-like) OR (Alzheimer) OR (Parkinson) OR (Huntington) OR (multiple system atrophy) OR (amyotrophic lateral sclerosis) OR (frontotemporal dementia)) AND (case control)	101
Scopus	(TITLE-ABS-KEY(microbiota OR microbiome OR microflora OR flora OR (gut AND brain AND axis))) AND (TITLE-ABS-KEY((neurodegenerative AND disease) OR prion OR prion-like OR Parkinson OR Huntington OR Alzheimer OR (multiple AND system AND atrophy) OR (frontotemporal AND dementia) OR (amyotrophic AND lateral AND sclerosis))) AND (TITLE-ABS-KEY(case AND control))	129

En la fase 2, se han aplicado manualmente los criterios de selección oportunos del apartado 4.3 mediante lectura del título, resumen e información básica mostrada por Zotero de cada artículo, recogiendo los criterios, su evaluación y otros datos en un formulario en la hoja “Fase 2” del archivo Excel online “Tablas accesorias”, admitiendo aquellos artículos que cumplan todos los criterios de inclusión y desechando los que cumplan al menos un criterio de exclusión. Debido al tamaño de algunos formularios y tablas, que no permite mostrarlos en el apartado de anexos, se han colocado en el mencionado archivo online de acceso abierto para su consulta, disponible en el siguiente enlace: https://drive.google.com/drive/folders/15rIWaxGuewRt_2zMytfa3pfrF2gTDne?usp=drive_link .

Con los artículos seleccionados se procedió a una fase 3 de lectura íntegra del texto, aplicando de nuevo los criterios de inclusión y exclusión, así como comprobando la utilidad del contenido para nuestra investigación, para obtener los artículos con los que finalmente se ha de llevar a cabo la recogida de datos. Si durante la lectura del texto completo de los artículos se detectó la referencia a algún posible artículo útil, se procedió a la valoración de éste y en caso de ser adecuado se reclutó también para el trabajo de investigación. El formulario de recogida de información sobre los criterios y su evaluación en esta fase 3 se puede consultar en la hoja “Fase 3” del archivo Excel online “Tablas accesorias”.

4.5 RECOGIDA DE DATOS DEL TEXTO DE LOS ARTÍCULOS

Tras la fase 3 se realizó la recogida de datos del texto y de los archivos suplementarios accesibles online de cada artículo finalmente seleccionado, utilizando el formulario de la hoja “Recogida datos” del archivo Excel online “Tablas accesorias”. Estos datos se emplearon para contestar a la pregunta de investigación y para la evaluación de riesgo de sesgos.

Los datos de las columnas “Taxones con abundancia relativa aumentada en grupo casos respecto a grupo controles” y “Taxones con abundancia relativa disminuida en grupo casos respecto a grupo controles” del archivo Excel online “Tablas accesorias” se procesaron para construir las hojas “Abundancia aumentada” y “Abundancia disminuida”, respectivamente, en el mismo archivo online. Estas dos hojas contienen los taxones con abundancias relativas aumentadas o disminuidas de cada artículo al comparar la microbiota del grupo casos y del grupo controles. El nivel taxonómico de cada taxón se ha indicado colocándole un prefijo identificativo: k para reino, p para filo, c para clase, o para orden, f para familia, g para género, s para especie y otu para las unidades taxonómicas operativas. Tras esta etiquetación, se realizó en ambas hojas de abundancia una búsqueda de taxones con denominaciones sinónimas, con el fin de evitar duplicaciones. En el caso de encontrarse duplicaciones se fusionó con una única denominación.

Para la adjudicación del nivel taxonómico, en los casos en que los artículos no lo hayan hecho, y la búsqueda de posibles sinónimos de los taxones se ha empleado LPSN-*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (39). En algunos taxones se han añadido en las celdas correspondientes de las hojas online comentarios referentes al nombre correcto del taxón y sinónimos según LPSN e incidencias en la adjudicación del nivel taxonómico.

Se ha procurado respetar, dentro de lo posible, la nomenclatura taxonómica empleada en cada artículo. Aunque en algunos de los taxones LPSN recomienda otro nombre como el correcto a utilizar, en general, se ha mantenido la denominación empleada en los artículos para facilitar su búsqueda en ellos por el lector.

4.6 MÉTODO DE EVALUACIÓN DEL RIESGO DE SESGOS

Como recomienda la herramienta metodológica PRISMA 2020 se ha realizado un análisis del riesgo de sesgos de cada uno de los artículos finalmente seleccionados. Para ello se ha empleado la herramienta *Newcastle Ottawa Scale* (NOS) (40), que se adapta adecuadamente a los estudios

observacionales no aleatorios tipo casos-control y a los analíticos transversales. La escala NOS evalúa los artículos que alcanzan 7 o más estrellas como de “bajo riesgo de sesgos” y los que tienen menos de 7 como de “alto riesgo de sesgos”. Tal como recomienda PRISMA 2020, para evitar sesgos de selección, tanto los artículos con alto como bajo riesgo de sesgos se han de emplear en la revisión sistemática, no siendo motivo de descarte de un artículo que sea valorado como de alto riesgo. De esta forma la escala NOS es una herramienta que informa al lector de la revisión sistemática para que tenga en cuenta la evidencia científica que puede aportar ésta. La herramienta NOS, aunque sus ítems pretenden ser objetivos, está sujeta a cierta subjetividad del evaluador ya que en ocasiones éste ha de interpretar si la información del texto del artículo es aplicable o no a un ítem. Para disminuir este sesgo, como ya hemos comentado en un apartado anterior, en la revisión sistemática PRISMA 2020 recomienda que dos investigadores de forma independiente apliquen la escala NOS y que las discrepancias entre ambas valoraciones se resuelvan por consenso entre ambos. Debido a la naturaleza individual de este trabajo esta evaluación dual no se ha podido realizar. En la hoja “Riesgos sesgos NOS” del archivo Excel online “Tablas accesorias” se pueden consultar la escala NOS, comentarios sobre los apartados e ítems, la valoración de los artículos y los motivos para cada valoración.

Los factores de confusión que afectan a las investigaciones de la microbiota intestinal son múltiples: edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), lugar donde se vive, dieta, estreñimiento, enfermedades y cirugía gastrointestinales, otras enfermedades, toma de antibióticos, probióticos, prebióticos, fármacos, alcohol, tabaco, consumo de drogas, etc. Como en la literatura científica no se destaca ninguno de ellos como más importante que los demás, se ha modificado la valoración del apartado “Comparabilidad” de NOS para poder puntuarlo, adjudicando en lugar de los ítems originales de 1 estrella si controla el principal factor de confusión, otra estrella si controla otros factores de confusión y ninguna si no controla ninguno, los nuevos ítems de ninguna estrella a los artículos que controlen como máximo 2 factores de confusión, una estrella a los artículos que controlen al menos 3 o 4, y otra estrella a los que controlen 5 o más, estos dos últimos ítems no son excluyentes entre sí. Esta modificación, además de permitir puntuar el apartado, endurece el criterio de comparabilidad, aumentando las exigencias de la escala para obtener el nivel de riesgo de sesgo bajo.

4.7 MÉTODOS ESTADÍSTICOS E INFORMÁTICOS

En este trabajo se ha empleado el paquete estadístico R (41) para hallar los valores y resultados de las pruebas estadísticas pertinentes.

Las variables cuantitativas se muestran como valores absolutos y/o medias y desviaciones estándar (media \pm DE) y las variables cualitativas como números absolutos y/o porcentajes.

Para el estudio de la normalidad de las distribuciones de las muestras se ha empleado la prueba de Shapiro Wilks ya que el tamaño de la muestra es menor de 50 ($n < 50$). La homocedasticidad de las varianzas entre grupos se ha comprobado mediante la prueba de Levene.

Para comparar las variables sexo, edad, IMC de casos con las de controles se ha utilizado la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney ya que las variables son independientes y no siguen una distribución normal. Para analizar variables cualitativas se ha empleado: la prueba de χ^2 de Pearson cuando se analiza una muestra con una sola variable de 2 categorías que cumple los requisitos de este test o la prueba multinomial (PMn) cuando se estudia una variable con 3 o más categorías o cuando tiene 2 categorías pero no cumple los criterios de la prueba de χ^2 de Pearson.

El nivel de significancia elegido para las pruebas de inferencia ha sido $\alpha = 0.05$.

La parte ofimática se ha realizado mediante el paquete informático Office Professional Plus 2019 de Microsoft (42) y la gestión de bibliografía con el programa Zotero (38).

5 RESULTADOS

5.1 ARTÍCULOS SELECCIONADOS

Siguiendo las tres fases de selección de artículos, mencionadas en el apartado de material y métodos (Figura 1), se ha llegado a seleccionar 29 artículos finales (Figura 2) (22, 28, 30, 31, 32, 43-66).

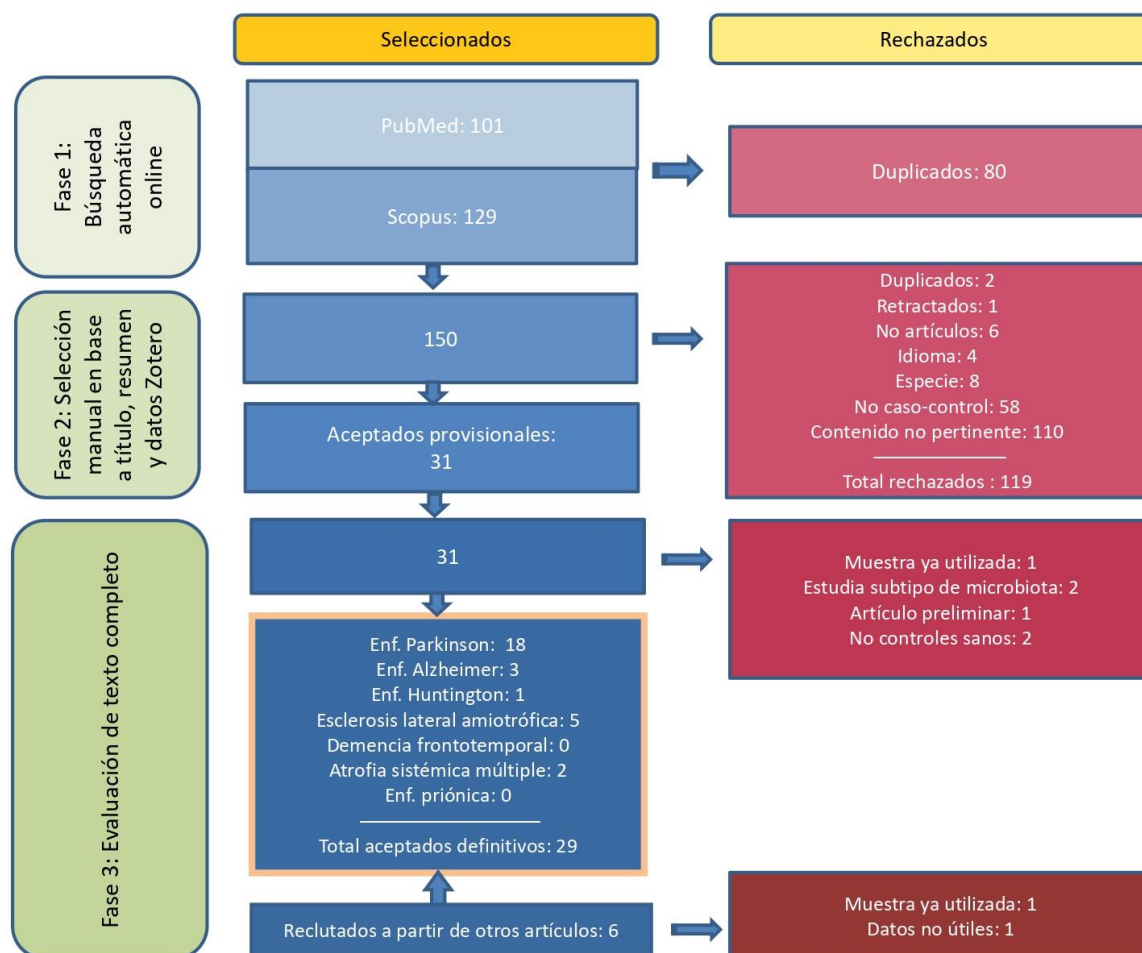


Figura 2: Resultados del proceso de selección de artículos para la revisión sistemática

Utilizando las proposiciones lógicas compuestas, mostradas en la Tabla 1, en los buscadores bibliográficos PubMed y Scopus se obtuvieron en total 230 artículos, de los cuales 101 en PubMed y 129 en Scopus. Posteriormente con la ayuda del gestor bibliográfico Zotero se detectaron y eliminaron 80 artículos duplicados de los 230 totales, preseleccionándose en esta primera fase automática 150 artículos.

Sobre estos 150 artículos se ejecutó la segunda fase, revisando y aplicando los criterios de inclusión y exclusión manualmente mediante la lectura del título, resumen e información básica que ofrece Zotero sobre cada artículo. En esta fase en base a los criterios de inclusión y exclusión se han encontrado: 2 artículos repetidos no detectados automáticamente en la fase 1; 1 artículo retractado; 3 clasificados como capítulos de libro, 2 como notas y 1 como documento de conferencia; 2 escritos en francés, 1 en alemán y otro en ruso; 3 fueron investigaciones en especies distintas a la humana, 1 no mencionaba la especie aunque revisando el texto completo se comprobó que era un experimento en ratones con vesículas de membrana externa procedentes de heces de humanos con DA, y en 4 no procedía aplicar el criterio de especie; 58 no eran estudios caso-control sino revisiones bibliográficas, revisiones sistemáticas, metanálisis, estudios de cohortes, ensayos clínicos, etc; 110 con contenido no pertinente ya que trataban, por ejemplo, de microbiota oral, metaboloma, virus, material genético bacteriano en sangre, enfermedades no prion-like, pro y prebióticos, tejidos, etc. En total se han rechazado 119

artículos, quedando, como se ha mencionado anteriormente, sólo 31 seleccionados para la siguiente fase.

En la fase 3, evaluación del texto completo mediante su lectura, se rechazaron 6 artículos de la segunda fase: 1 era un artículo preliminar de una investigación en curso; 2 estudiaban un subtipo de microbiota intestinal concreto, no general; 1 utilizaba una muestra ya empleada en otro artículo con el mismo fin; y por último, 2 no comparaban con controles sanos sino con otras patologías. En esta fase se reclutaron 6 nuevos artículos procedentes de referencias en los textos leídos. De estos 6 se rechazaron 2: 1 por utilizar una muestra empleada en otro artículo y el otro por no poder acceder a los datos más útiles para nuestro estudio al no tener acceso al archivo de datos suplementarios online. Finalmente, en esta fase se han seleccionado 29 artículos, de los cuales se han obtenido los datos para responder a la pregunta de la investigación.

De los 29 artículos finales: 18 (62,06 %) trataban de EP, 3 de DA (10,34 %), 1 de EH (3,44 %), 5 ELA (17,24 %), 2 de AMS (6,89 %), ninguno de DFT (0 %) y ninguno de EPr humanas (0 %) (Figura 3).

En las hojas “Fase 2” y “Fase 3” del archivo Excel online “Tablas accesorias” se puede consultar la información recogida en estas dos fases.

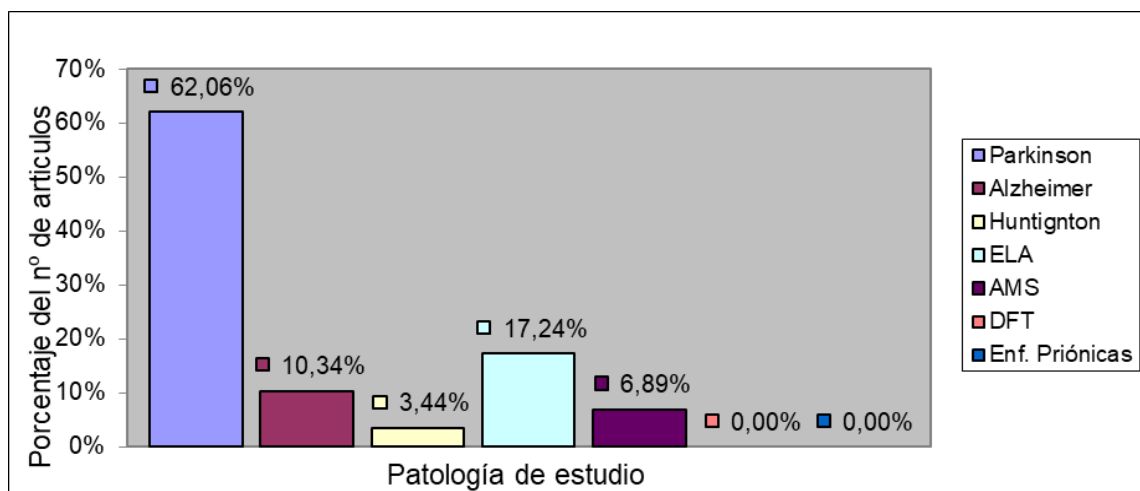


Figura 3: Porcentaje de artículos seleccionados para la realización de la revisión sistemática según la patología en la que estudia la microbiota intestinal humana en heces. ELA: Esclerosis lateral amiotrófica. AMS: Atrofia múltiple sistémica. DFT: Demencia frontotemporal.

5.2 EVALUACIÓN DEL RIESGO DE SEGOS DE LOS ARTÍCULOS SELECCIONADOS

Empleando la herramienta NOS modificada (Tabla 2) se ha obtenido que, de los 29 artículos seleccionados, 13 (44,83 %) tienen riesgo alto de sesgo y 16 (55,17 %) riesgo bajo.

Analizando la puntuación de cada uno de los tres apartados de NOS modificada, en “selección de la muestra” se alcanzó el 66,37 % de la máxima puntuación posible en ese apartado, en “comparabilidad casos/control” el 70,68 % y en “exposición” el 85,05 %.

En los ítems del primer apartado “selección de la muestra”: la “definición adecuada del caso” obtuvo un 89,65 % de la máxima puntuación posible en ese ítem, con lo que fue el ítem con mejor puntuación al aplicar NOS; la “representatividad de los casos” con 31,03 % fue el ítem con valoración más baja en NOS; la “selección de los controles” tuvo un 62,06 % y “definición adecuada de los controles” un 82,75 %. En los del segundo apartado, “comparabilidad entre casos y controles”: el ítem “los grupos tienen como máximo 2 factores de confusión controlados” alcanzó un 13,79 %; “tienen al menos 3 o 4 factores de confusión controlados” el 86,20 % y “tienen 5 o más factores de confusión controlados” mostró un 55,17 %. En el último apartado “exposición”: los ítem “determinación de la exposición” y “utilización del mismo modo de determinación para casos y controles” alcanzaron el 100 % de la puntuación máxima y el ítem “tasa de no respuesta” el 55,17 %.

En la hoja “Riesgos sesgos NOS modificada” del archivo Excel online “Tablas accesorias” se puede consultar con más detalle la valoración de los artículos realizada con la escala NOS modificada, así como comentarios sobre los apartados e ítems y los motivos para cada valoración.

Tabla 2: Evaluación del riesgo de sesgos con la herramienta NOS modificada de los 29 artículos seleccionados

Artículo	Selección muestra				Comparabilidad casos/control			Exposición			Evaluación global
	DCa	RCa	SCo	DCo	FC≥5	FC=3-4	FC≤2	DE	MMDE	TNR	
Scheperjans/2015	*			*		*		*	*		RS alto
Hasegawa S/2015		*	*	*		*		*	*		RS alto
Keshavarzian/2015	*		*	*		*		*	*		RS alto
Unger M/2016	*		*	*	*	*		*	*	*	RS bajo
Petrov VA/2017	*			*			*	*	*	*	RS alto
Hopfner F/2017	*			*	*	*		*	*	*	RS bajo
Hill-Burns EM/2017	*	*	*	*	*	*		*	*		RS bajo
Qian Y/2018	*		*	*	*	*		*	*	*	RS bajo
Heintz-Buschart/2018	*	*	*	*		*		*	*		RS bajo
Li F/2019				*			*	*	*	*	RS alto
Jin M/2019	*		*	*	*	*		*	*	*	RS bajo
Barichella M/2019	*				*	*		*	*	*	RS alto
Wallen ZD/2020	*	*	*	*	*	*		*	*		RS bajo
Hegelmaier T/2020				*			*	*	*		RS alto
Baldini F/2020	*	*	*	*	*	*		*	*		RS bajo
Khedr EM/2021r	*	*	*	*		*		*	*	*	RS bajo
Rosario D/2021	*			*	*	*		*	*		RS alto
Jo S/2022	*	*	*			*		*	*		RS alto
Vogt NM/2017	*		*	*	*	*		*	*	*	RS bajo
Hou M/2021	*			*	*	*		*	*		RS alto
Zhuang ZQ/2018	*			*		*		*	*	*	RS alto
Fang X/2016	*	*					*	*	*	*	RS alto
Brenner D/2018	*			*	*	*		*	*	*	RS bajo
Zeng Q/2020	*		*	*	*	*		*	*	*	RS bajo
Nicholson K/2021	*		*	*	*	*		*	*		RS bajo
Ngo ST/2020	*		*		*	*		*	*		RS alto
Du G/2021	*	*	*	*	*	*		*	*	*	RS bajo
Engen PA/2017	*		*	*		*		*	*	*	RS bajo
Tan AH/2018	*		*		*	*		*	*	*	RS bajo

Alto riesgo de sesgo si se puntúa con 6 o menos estrellas. **Bajo riesgo de sesgo** si se puntúa con 7 o más estrellas DCa: Definición de caso. RCa: Representatividad de los casos. SCo: Selección de controles. DCo: Definición de controles. FC ≥ 5: 5 o más factores de confusión controlados. FC 3-4: Al menos 3 o 4 factores de confusión controlados. FC ≤ 2: Máximo 2 factores de confusión controlados. DE: Determinación de la exposición. MMDE: Mismo método de determinación de la exposición para casos y controles. TNR: Tasa de no respuesta. RS: Riesgo de sesgo.

5.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS DE LAS MUESTRAS

Entre los 29 artículos seleccionados reúnen una muestra de 3547 sujetos cuyas heces se han analizado, de los cuales 1903 forman parte de los grupos casos y 1644 de los grupos controles. No se han contabilizado aquellos que por algún motivo no se analizó las heces o aunque se hiciera no se utilizaron finalmente para el estudio de la microbiota; generalmente esto se ha debido a que no se recolectó las heces con éxito, secuenciación baja, métrica inadecuada de las secuencias o por requisitos del procesamiento de datos para mantener la profundidad de secuenciación.

Entre todos los casos, la media de porcentaje de hombres fue 56,74 % ± 16,07 y entre los controles 50,35 % ± 15,01, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles (U de Mann Whitney = 440,5, p = 0,06). Respecto a la edad, la media en los casos fue 64,86 ± 6,85 y en los controles 63,16 ± 7,59, sin que exista diferencia estadísticamente significativa entre ambos (U de Mann Whitney = 402,5, p = 0,51). En el análisis del IMC, en los casos la media fue 24,87 ± 2,19 y en los controles 25,35 ± 1,85, siendo no estadísticamente significativa la diferencia entre ellos (U de

Mann Whitney = 198,5, $p = 0,58$). La media de tiempo que llevaban los enfermos, desde los primeros síntomas hasta la recolección de las heces para su análisis, fue de $70,04 \pm 39,31$ meses.

Otras variables como estreñimiento, estadio o gravedad de la enfermedad, clínica que presentan, medicación, etc no se han analizado por la heterogeneidad de los métodos de medición, escalas y criterios utilizados de unos artículos a otros.

Los datos recogidos de la muestra se pueden consultar en la hoja “Recogida de datos” del archivo Excel online “Tablas accesorias”.

5.4 ALTERACIÓN DE LA ALFA DIVERSIDAD

En 10 de los artículos no estudiaban o no daban resultados de alfa diversidad y en 1 sólo mencionaba que estaba alterada, pero sin indicar si estaba aumentada o disminuida ni los resultados de los índices de alfa diversidad que estudiaba (Fang X et al/2018). En los artículos no se ofrecían valores de los índices, sólo se indicaba si estaban aumentados, disminuidos o eran iguales y el valor de p en la comparación entre grupos y controles, lo cual ha impedido un mejor análisis cuantitativo. Los artículos que daban información de la alfa diversidad analizaban diversos índices o estimadores pero utilizaban unos u otros de forma muy heterogénea entre ellos. Los índices más empleados en la mayoría de artículos fueron Chao1 ($n = 13$), Shannon ($n = 15$), Simpson ($n = 8$) y especies/OTUs observadas ($n = 5$), mientras que utilizaron en pocos artículos los índices Simpson inverso ($n = 3$), ACE ($n = 2$), distancia filogenética de Faith ($n = 3$), árbol completo ($n = 2$) y Sob ($n = 1$). Según el número de índices empleados en cada artículo se observó que 4 analizaban 5 índices, 4 comprobaron 4 índices, 2 artículos 3 índices, 5 estudiaron 2 y 3 compararon un único índice o estimador.

Cada artículo comparaba el valor de cada índice analizado entre el grupo casos y el grupo control y si existía diferencia estadísticamente significativa al menos en uno de los índices consideraban que había alteración de la alfa diversidad en la patología estudiada. Al realizar las comparaciones de la alfa diversidad entre los estudios se ha utilizado el mismo criterio que en ellos, dando por alterada la alfa diversidad en un estudio, que llamaremos alfa diversidad final, si existía al menos un índice que mostrara diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles.

En el análisis de los artículos se ha encontrado diferencia estadísticamente significativa (PMn, $p = 0,001391$) entre el número de artículos que mostraban una alfa diversidad final aumentada ($n = 10$), disminuida ($n = 2$) e igual ($n = 6$), es decir que se ha encontrado aumentada la alfa diversidad en los enfermos del conjunto de patologías EPL respecto a los sanos.

Comparando el mismo índice entre todos los artículos que lo analizaban sólo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los índices Chao1 (PMn, $p = 0,0088$) y Árbol completo (PMn, $p = 0,045$), mostrando que estos índices estaban aumentados en los enfermos del conjunto de EPL comparándolos con los sanos. El resultado del índice Árbol completo no se aceptó debido a la baja potencia estadística de la prueba al incluir sólo 2 artículos.

El resultado de la alfa diversidad final y el índice Chao1 aumentados en el conjunto de EPL hay que considerarlo con mucha precaución ya que el número de artículos de EP es superior al de las otras patologías, distorsionando el resultado. Por este motivo se ha valorado que **este resultado del conjunto de EPL es no concluyente**.

La comparación de la alfa diversidad final de los artículos que analizaban una misma patología ha dado como resultado que sólo había diferencias estadísticamente significativas en los pacientes respecto a los controles sanos en EP (PMn, $p = 0,008886$), y en AMS (PMn, $p = 0,045$), estando aumentada la alfa diversidad final en ambas, aunque el resultado de AMS se descartó debido a la baja potencia estadística que presentaba al analizar sólo 2 artículos. Por lo tanto, se considera que la **alfa diversidad final sólo está aumentada en los enfermos respecto a los controles en EP** y no en las demás patologías.

Al analizar la comparación de cada índice entre todos los artículos de la misma patología se obtuvo que sólo se encontraba diferencia estadísticamente significativa en **el índice Chao1 para EP** (PMn, $p = 0,0088$), que **presentaba un aumento respecto a los sanos**.

El resto de comparaciones (Tabla 3) arrojaron como resultado que no se podía rechazar la hipótesis nula de igualdad entre casos y controles bien porque tenían una $p > 0.05$ y/o la potencia estadística de la prueba era muy baja debido al escaso número de datos.

En cuanto a la **comparación de la alfa diversidad de unas patologías con las otras no se ha realizado** debido al escaso número de artículos en cada patología (Figura 3, Tabla 3).

En la Tabla 3 se muestra un resumen de los datos de alfa diversidad y los resultados de las comparaciones estadísticas. En la hoja “Recogida de datos” del archivo Excel online “Tablas accesorias”, se pueden consultar los datos recopilados sobre alfa diversidad de los artículos estudiados.

5.5 ALTERACIÓN DE LA BETA DIVERSIDAD

De los artículos seleccionados, en 6 artículos no han dado resultados o no han estudiado la beta diversidad; en 1 sólo se informaba que estaba alterada (Keshavarzian et al/2015) y en otro que no lo estaba (Engen PA et al/2017), sin indicar la distancias de beta diversidad empleadas en ninguno de los dos. En los artículos revisados no se mostraban valores de las distancias utilizadas para cuantificar la beta diversidad, únicamente se indicaba su alteración o no, así como el valor de p en la comparación entre grupos y controles, lo cual ha impedido un análisis cuantitativo adecuado. El empleo de unas distancias u otras para la beta diversidad fue heterogéneo de unos artículos a otros. Las distancias más analizadas fueron UniFrac ponderado ($n = 14$ artículos), UniFrac no ponderado ($n = 14$) y Bray-Curtis ($n = 5$). Otras medidas utilizadas son Cambera ($n = 2$), Aitchison ($n = 1$), Sorensen ($n = 1$) y Hellinger ($n = 1$). Por el número de índices que empleaban había 3 artículos con 3, 11 artículos con 2 y 7 con 1 distancia estudiada.

Al realizar las comparaciones se ha utilizado el mismo criterio que en los artículos, dando por alterada la beta diversidad en un artículo, que llamaremos beta diversidad final, si existía al menos un índice que mostrara diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles.

Al analizar los artículos se ha encontrado diferencia estadísticamente significativa entre el número de artículos que informaban de una beta diversidad final distinta ($n = 19$) entre controles y casos y los que mostraban que era la misma ($n = 4$) (prueba de χ^2 de Pearson, $\chi^2 = 30.3126$, $p = 3.677E-8$), detectando la beta diversidad alterada en los enfermos del conjunto de patologías EPL en comparación con los sanos.

Al comparar el resultado, distinta o igual, de una misma distancia entre todos los artículos que la analizaban se ha hallado que existen diferencias estadísticamente significativas en UniFrac ponderado (PMn, $p = 0,008$), UniFrac no ponderado (PMn, $p = 0,001$) y Bray-Curtis (PMn, $p = 0,03$). El resultado de Bray-Curtis no se ha admitido debido a la baja potencia estadística de la prueba al incluir sólo 5 artículos.

El resultado obtenido de que la beta diversidad final y las distancias UniFrac ponderado y no ponderado están alteradas en el conjunto de EPL se ha de valorar con mucha precaución, por lo que se ha considerado como no concluyente, ya que el número de artículos de EP es mayor al de las otras patologías, pudiendo estar distorsionando el resultado.

La comparación de la beta diversidad final, distinta o igual, entre los artículos que estudiaban una misma enfermedad nos ha dado como resultado que sólo había diferencias estadísticamente significativas en EP (PMn, $p = 1,541E-5$) y DA (PMn, $p = 0,027$). La potencia estadística muy baja en el caso de DA, por estudiar sólo 3 artículos, descartó su resultado. Por lo tanto se puede decir que **la beta diversidad en los pacientes de EP está alterada** respecto a la de los sujetos sanos.

Comparando los resultados de cada distancia, distinta o igual, entre los artículos de la misma patología que la estudiaban se obtuvo que sólo había diferencia estadísticamente significativa en la distancia

UniFrac no ponderado en EP (PMn, $p = 0,003$), señalando que **UniFrac no ponderado está alterada en pacientes con EP** respecto a los sanos

El resto de comparaciones (Tabla 4) han dado como resultado que no se puede rechazar la hipótesis nula de igualdad entre los elementos comparados bien porque tenían una $p > 0,05$ y/o la potencia estadística de la prueba era muy baja debido al escaso número de datos.

La **comparación de la beta diversidad de unas patologías con las otras no se ha llevado a cabo** debido al escaso número de artículos en cada patología (Figura 3, Tabla 4).

En la Tabla 4 se muestra el resumen de los datos de beta diversidad de los artículos y de los análisis comparativos realizados. En la hoja “Recogida de datos” del archivo Excel online “Tablas accesorias”, se pueden consultar con más detalle los datos recogidos de los artículos sobre beta diversidad.

Tabla 3 y 4: Resultados de la comparación entre casos y controles de los índices de alfa diversidad (Tabla 3) y de las distancias de beta diversidad (Tabla 4) de la microbiota intestinal de los artículos seleccionados, ordenados por patología y artículo

TABLA 3: ALFA DIVERSIDAD																										
Índice	Enfermedades prion-like													EPL												
	EP										DA				ELA				EH		AMS					
	30	43	45	46	47	50	51	53	32	C	56	57	C	59	60	61	62	63	C	64	C	65	66	C	30-66	
Chao1	=	↑	↓	=	↑	=	↑	=	↑/≠*	p=0.0088	↓	=	p=0.3	=	=	=	=	=	p=0.216	↑	p=0.3	=	=	=	p=0.0088	
Shannon	=	=	=	=	↑	=	=	=	↑/≠*	p=0.3416	↓	=	p=0.51	=	↑	=	=	=	p=0.7599	=	p=1	=	=	p=1	p=0.6617	
Simpson	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	p=0.7599	=	=	p=1	=	=	=	=	=	p=1	=	p=1	↑	=	p=0.3	p=0.4635	
S. inver.	=	=	=	=	=	=	=	=	=	p=1	=	=	p=1	=	=	=	=	=	p=1	=	=	↑	p=0.3	p=0.657		
ACE	=	=	=	=	=	=	=	=	=	p=1	=	=	p=1	=	=	=	=	=	p=1	=	=	=	=	p=1		
DFF	=	=	=	=	=	=	=	=	=	p=1	↓	=	p=1	=	=	=	=	=	p=1	=	=	=	=	p=0.657		
Esp. obs	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	p=0.51	=	=	p=1	=	↑	=	=	=	p=0.51	↑	p=0.3	=	=	p=0.216		
A.comp.	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	p=0.3	=	=	p=1	=	=	=	=	=	p=1	↑	p=0.3	=	=	p=0.045		
Sob	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	p=1	=	=	=	=	=	p=1	=	=	=	=	p=1		
NI	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	x	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=		
AD final	=	↑	↓	=	↑	=	↑	↑	↑	=	↓	=	=	=	↑	↑	=	=	=	↑	=	↑	↑	=	=	
	p=0.008886 ^D										p=0.51 ^D			p=0.216 ^D				p=0.3 ^D		p=0.045 ^D						
	p=0.001391 ^E																									

TABLA 4: BETA DIVERSIDAD																													
Distancia	Enfermedades prion-like													EPL															
	EP										DA				ELA				EH		AMS								
	30	43	45	46	31	47	50	51	52	28	53	32	C	56	57	58	C	59	60	61	62	63	C	64	C	65	66	C	30-66
UP	↑	↑	↑	↑	↑	=	=	↑	=	=	=	=	p=0.07	↑	=	↑	p=0.216	↑	=	↑/≠*	=	↑	p=0.0837	=	p=1	=	=	p=0.008	
UNP	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	=	=	=	p=0.003	↑	=	↑	p=0.216	↑	=	↑/≠*	=	=	p=1	↑	p=0.3	=	=	p=0.001	
Camberra	=	=	=	=	↑	=	=	=	↑	=	=	=	p=0.9	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	p=0.09	
Aitchison	=	=	=	=	↑	=	=	=	↑	=	=	=	p=0.3	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	p=0.3	
B-C	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↑	↑/≠ ^A	p=0.9	↑	↑	=	p=0.9	=	=	=	=	=	p=1	=	=	=	=	p=0.03	
Sorensen	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↑/≠ ^B	p=0.3	p=0.3	
Hellinger	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↑/≠ ^B	p=0.3	p=0.3	
NI	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	
BD final	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	↑	↑	↑	=	↑	=	↑	=	↑	=	↑	=	=	↑	=	
	p=1.541E-5 ^D										p=0.027 ^D			p=0.1631 ^D				p=0.3 ^D		p=0.51 ^D									
	p=3.677E-8 ^E																												

Sólo se muestran las enfermedades y artículos con datos útiles. EP: Enfermedad de Parkinson. DA: Demencia de Alzheimer. ELA: Esclerosis lateral amiotrófica. EH: Enfermedad de Huntington. AMS: Atrofia múltiple sistémica. EPL: Enfermedades prion-like con datos. S. inver.: Simpson inverso. ACE: Estimador de cobertura basado en la abundancia. DFF: Distancia filogenética de Faith. Esp.obs.: Especies/OTUs observadas. A. comp.: Árbol completo. UP: UniFrac ponderado. UNP: UniFrac no ponderado. B-C: Bray-Curtis. NI: No indica que índice o distancia ha analizado. AD final y BD final: Alfa diversidad y beta diversidad global asignada a cada artículo (se entiende que en un artículo la alfa diversidad final o la beta diversidad final es distinta entre casos y controles si al menos uno de los índices o distancias, respectivamente, que menciona el artículo es distinto entre casos y controles). =: Índice o distancia igual en casos y controles sanos. ↑: Índice mayor en casos que en controles sanos. ↓: Índice menor en casos que en controles sanos. ↑↓: Distancia distinta entre casos y controles sanos. x: Alfa diversidad alterada, sin indicar si aumenta o disminuye. *: Índice mediante secuenciación metagenómica shotgun/Índice mediante secuenciación 16s rRNA. **: Analizado con PCA/analizado con ANOSIM. A: Secuenciación metagenómica shotgun/secuenciación 16s rRNA. B: A Nivel OTU/a nivel género. 30 al 66: Referencia bibliográfica del artículo. C: Comparación del resultado de todos los artículos de una patología para cada índice/distancia de alfa o beta diversidad. D: Comparación del resultado de la alfa diversidad final o de la beta diversidad final de todos los artículos de una patología. E: Comparación del resultado de la alfa diversidad final o de la beta diversidad final de todos los artículos del conjunto de EPL. **p con fondo amarillo**: Se acepta que los resultados de los elementos comparados son distintos y estadísticamente significativos. **p con fondo gris**: Resultado de la comparación estadísticamente significativo pero no concluyente debido al mayor peso de los artículos de EP y/o a la baja potencia estadística por la escasez de datos.

5.6 ABUNDANCIA RELATIVA DE TAXONES

Tras comprobar la existencia de nomenclaturas sinónimas entre alguno de los taxones nombrados en los artículos, para evitar duplicidades, se fusionaron, según la información de la base LPSN (39), los taxones *Clostridium* XVIII con *Erysipelatoclostridium*, *Lachnoclostridium* con *Clostridium*, *Catabacteriaceae* con *Christensenellaceae* y *Catabacter* con *Christensenella*, antes de proceder al análisis de los taxones.

En los artículos analizados se han encontrado en total 245 taxones de microbiota intestinal distintos que estaban aumentados de forma estadísticamente significativa en el grupo de los casos respecto a los controles y 220 disminuidos.

Por patologías, los taxones aumentados estadísticamente significativos en EP fueron 194 (media por artículo (mpa): $14,5 \pm 12,14$), en DA 50 (mpa: $16,66 \pm 8,32$), en ELA 22 (mpa: $5 \pm 5,95$), en EH 13 (mpa: 13 ± 0) y en AMS 2 (mpa: $1 \pm 1,41$), y los taxones disminuidos en EP fueron 157 (mpa: $11,33 \pm 9,58$), DA 57 (mpa: $19,33 \pm 17,89$), ELA 24 (mpa: $5 \pm 4,69$), EH 1 (mpa: 1 ± 0) y AMS 4 (mpa: $2 \pm 1,41$).

En 3 artículos no se ha encontrado ningún taxón estadísticamente significativo aumentado para la patología estudiada, en concreto, uno de EP (Hegelmaier T et al/2020), otro de ELA (Ngo ST et al/2020) y el último de AMS (Engen PA et al/2017), mientras que no se observaron taxones disminuidos en 4 artículos, 2 de ellos de EP (Hopfner F et al/2017, Helgelmaier T et al/2020) y 2 de ELA (Brenner D et al/2018, Ngo ST et al/2020).

Tabla 5: Taxones de la microbiota intestinal de los artículos seleccionados con abundancia relativa aumentada o disminuida ordenados por patologías y nº de artículos en los que aparecen alterados

Nº artículos	ENFERMEDADES PRION-LIKE					EPL
	EP	DA	ELA	EH	AMS	
8	g_Bifidobacterium					g_Bifidobacterium
7	g_Akkermansia					g_Akkermansia, g_Lactobacillus
6	f_Verrucomicrobiaceae, g_Lactobacillus, g_Roseburia					f_Verrucomicrobiaceae, f_Lactobacillaceae, g_Roseburia
5	p_Verrucomicrobia, f_Lactobacillaceae, f_Prevotellaceae, g_Faecalibacterium					f_Christensenellaceae, g_Alistipes, g_Anaerotruncus, p_Verrucomicrobia, f_Lachnospiraceae, f_Prevotellaceae, g_Faecalibacterium, p_Firmicutes
4	f_Christensenellaceae, g_Alistipes					f_Rikenellaceae, g_Parabacteroides, p_Bacteroides, p_Proteobacteria, p_Bacteroidetes
3	f_Bifidobacteriaceae, g_Oscillospira, f_Rikenellaceae, g_Parabacteroides, p_Proteobacteria, g_Anaerotruncus, f_Lachnospiraceae, g_Blautia, g_Lactobacillus, g_Prevotella, p_Bacteroidetes, s_Faecalibacterium prausnitzii					c_Actinobacteria, f_Bifidobacteriaceae, f_Desulfovibrionaceae, f_Enterobacteriaceae, f_Porphyromonadaceae, g_Bacteroides, g_Bilophila, g_Escherichia-Shigella, g_Intestinimonas, g_Oscillospira, g_Anaerostipes, g_Bacteroides, g_Blautia, g_Clostridium, g_Enterococcus, g_Lachnospira, g_Lactobacillus, g_Paraprevotella, g_Prevotella, s_Faecalibacterium prausnitzii
2	18 taxones, 22 taxones	g_Clostridium	c_Bacteroidia, o_Bacteroidales, p_Bacteroidetes, p_Firmicutes			29 taxones, 28 taxones
1	162 taxones, 189 taxones	50 taxones, 56 taxones	19 taxones, 23 taxones	13 taxones	g_Bacteroides, s_Bacteroides fragilis, f_Coprobaillaceae, g_Paraprevotella, otu_g_Paraprevotella (OTU 000073), s_Paraprevotella clara	193 taxones, 176 taxones

Sólo se muestran las patologías y taxones con datos útiles. En las celdas con alto número de taxones no se muestran éstos, sólo su cuantía. Taxón con nombre en negro: Taxón con abundancia relativa aumentada en la enfermedad respecto a sanos. **Taxón con nombre en rojo:** Taxón con abundancia relativa disminuida en la enfermedad respecto a sanos. **Taxón en fondo amarillo:** Taxón con abundancia relativa aumentada o disminuida estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la patología respecto a sanos. **Celdas con fondo gris:** No existe ese número de artículos en esa patología. EP: Enfermedad de Parkinson. DA: Demencia de Alzheimer, ELA: Esclerosis lateral amiotrófica. EH: Enfermedad de Huntington. AMS: Atrofia múltiple sistémica. EPL: Enfermedades prion-like (EP+AD+ELA+EH+AMS).

Existen 18 taxones que en la misma patología aparecían en unos artículos con la abundancia aumentada y en otros disminuida. En otros 18 taxones se observaba la misma alteración (aumentada o disminuida) dentro de cada patología en los que estaban alterados.

En la Tabla 5 se muestra el resumen de los taxones aumentados y disminuidos según el número de artículos en los que se ha detectado, clasificados por patologías y en global como EPL (EP+DA+ELA+EH+AMS).

En las hojas “Taxones aumentados” y “Taxones disminuidos” del archivo Excel online “Tablas accesorias” se pueden consultar todos los taxones alterados por artículos y patologías.

Si se considera el conjunto de EPL ningún taxón aumentado o disminuido alcanza la significación estadística (PMn, todos los taxones alterados: $p > 0.05$) por lo que no se puede rechazar que sus abundancias relativas sean iguales en el conjunto de EPL que en los sanos.

Por patologías, los taxones *g_Bifidobacterium* ($n = 8$ artículos), *g_Akkermansia* ($n = 7$), *f_Verrucomicrobiaceae* ($n = 6$) y *g_Lactobacillus* ($n = 6$) aparecieron en EP con abundancias relativas aumentadas con diferencias estadísticamente significativas respecto a los artículos en los que no estaban aumentadas (PMn, $p = 0,002719$, $p = 0,01182$, $p = 0,0419$, $p = 0,0419$ respectivamente). El taxón *g_Roseburia* ($n = 6$, PMn, $p = 0,0419$) fue el único de los taxones con abundancia disminuida en EP que presenta un resultado estadísticamente significativo. Por lo tanto, se puede confirmar que ***g_Bifidobacterium*, *g_Akkermansia*, *g_Lactobacillus* y *f_Verrucomicrobiaceae* tienen su abundancia aumentada y *g_Roseburia* disminuida en EP respecto a los sanos.** Del resto de taxones aumentados o disminuidos por patologías, no se puede rechazar la hipótesis nula de que sus abundancias relativas son las mismas en enfermos que en sanos, por mostrar un $p > 0,05$ y/o tener las comparaciones muy baja potencia estadística debido al escaso número de artículos en los que aparecen alterados esos taxones.

6 DISCUSIÓN

La intención de esta revisión sistemática era conocer, primero, si hay diferencias entre la microbiota intestinal de las EPL y la de los sujetos sanos y, segundo, si hay similitudes en ella entre unas y otras de esas patologías, mediante el análisis de la alfa y beta diversidad y la abundancia relativa de taxones, a partir de estudios casos-control publicados. Como los artículos seleccionados no aportan los valores cuantitativos de los índices, distancias y abundancias de taxones para procesarlos en conjunto se ha tenido que utilizar los resultados no cuantitativos de ellos. El número de estudios casos-control publicados para responder a estas preguntas es pequeño ($n = 29$), y excepto en el caso de la EP ($n = 18$, 62,06 %), en las demás patologías el número de artículos escaso o nulo impide realizar un estudio estadístico más concluyente y va a limitar nuestro análisis. La limitada producción de estudios casos-control se debe sobre todo a que, hasta la llegada, relativamente reciente, de los métodos de secuenciación masiva de nueva generación y el desarrollo de métodos bioinformáticos y bioestadísticos no era posible realizar un estudio amplio de la microbiota intestinal.

El porcentaje de los artículos seleccionados respecto a la patología que tratan (Figura 3) no concuerda con la incidencia de cada una de estas enfermedades en la población, donde la DA es la más frecuente seguida de la EP (67). El predominio de artículos de EP puede ser debido en parte a que las primeras pruebas que relacionan microbiota intestinal y EPL fueron experimentos sobre modelos animales de EP (23), que por lógica dieron lugar a una investigación más temprana de búsqueda de esta relación en humanos en esta enfermedad.

Nuzum ND et al/2020 (68) publicaron una revisión sistemática de estudios casos-control sobre la alteración de la microbiota intestinal en EP. En su revisión, encontró los mismos problemas que en la nuestra: su tamaño muestral pequeño y la heterogeneidad de diversos elementos importantes de unos artículos a otros que dificultaban la comparación entre ellos. Ante estos problemas Nuzum et al/2020 llevaron a cabo sólo una revisión sistemática descriptiva de esos estudios. En nuestra revisión

sistemática hemos mantenido el objetivo de intentar responder a las dos preguntas planteadas. En nuestro análisis, igual que Nuzum ND et al/2020, se ha encontrado que los artículos emplean para la selección de la muestra criterios de inclusión y exclusión variados y distintos, igual que ocurre con los métodos de recogida, conservación y transporte de las heces, con los métodos de extracción del DNA de las deposiciones, con los métodos y plataformas de secuenciación, con los programas informáticos para procesar las secuencias en bruto, con las bases de datos y programas utilizados para adjudicar taxones a las secuencias, con los datos médicos y clínicos recogidos de los sujetos casos y controles, con las escalas escogidas para clasificar la gravedad, pronóstico, estreñimiento, estudio dietético o con el uso heterogéneo de diferentes factores de confusión durante el análisis estadístico. Todos estos datos recopilados de los artículos se pueden consultar en la hoja “Recogida de datos” del archivo Excel online “Tablas accesorias”. Si a esta escasez de artículos y a la heterogeneidad de elementos de unos estudios a otros se añade la variabilidad de la microbiota intestinal existente entre sujetos (10) queda evidente la dificultad de comparación entre estudios y de obtener conclusiones fundamentadas. Según la evaluación efectuada con la NOS modificada el 44,83 % de los 29 artículos tienen un riesgo alto de sesgo y el 55,17 % lo tienen bajo. El hecho de que tengan un riesgo de sesgo global alto obliga a tenerlo en cuenta a la hora de analizar los resultados y extraer conclusiones. Nuzum ND et al/2020 (68) aplicaron “*Risk of Bias Assessment tool for Non-randomised Studies*” (RoBANS) (69) como herramienta de valoración de riesgo de sesgos, encontrando que el 30,76 % tenían riesgo bajo y el 69,23 % riesgo alto. Esta discrepancia con nuestro trabajo radica en la puntuación en el apartado “comparabilidad”. Si se analizan los ítems comparables entre RoBANS y NOS modificada, se observa que las valoraciones de los apartados de “selección de muestra” y el de “exposición” en la revisión de Nuzum ND et al/2020 fueron muy parecidas a las nuestras, con un 69,23 % y un 85,45 % del máximo posible, respectivamente, en el artículo de Nuzum ND et al/2020, y un 66,37 % y 85,05 % en nuestro estudio. En cambio, en el apartado de “comparabilidad” nuestros resultados discrepan con los de Nuzum ND et al/2020 ya que su puntuación sólo llega al 7,69 % frente a un 70,68 % del máximo posible de nuestra muestra. Esta importante diferencia se debe a que, a pesar de haberse endurecido con la modificación realizada, los criterios del apartado “comparabilidad” en NOS, los de RoBANS son más estrictos ante la falta de algún factor de confusión.

En la evaluación realizada con NOS modificada el apartado con peor valoración es “selección de la muestra” (66,37 %) debido a la baja puntuación en el ítem “representatividad de los casos” (31,03 %) ya que en la mayoría de artículos no se menciona el método de muestreo realizado. Sólo los ítems “registro seguro”, que valora el método utilizado para medir los resultados, y “mismo método de determinación de casos y controles”, que analiza que se emplee el mismo método de medición para los resultados del grupo casos y del grupo control, alcanzan el 100 % de la máxima valoración, al ser unas cuestiones técnicas cuyo cumplimiento se suele realizar con facilidad. Se ha de destacar que en los 29 artículos revisados se suele definir mejor los casos que los controles, ya que en los primeros los autores suelen mencionar los criterios empleados para validar el diagnóstico e incluir a un sujeto como caso, mientras que en los controles en algunos artículos simplemente se menciona que son sanos sin concretar cómo se ha comprobado dicho estado.

Por último, se ha de recordar, como limitaciones, por un lado que la aplicación de las herramientas de valoración de riesgo de sesgos están sujetas a cierta subjetividad, pudiendo dos personas obtener resultados distintos al utilizarlas, sesgo que no se ha podido minimizar al no ser posible la aplicación de NOS modificado por varios investigadores independientes debido al carácter individual del trabajo, y por otro lado que la valoración negativa de un ítem no significa que no se ha realizado esa actividad sino que no se ha mencionado en el texto del artículo y por lo tanto se supone no realizada.

En la comparación de las variables sexo, edad e IMC hemos comprobado que no hay diferencias estadísticamente significativas entre todos los casos y todos los controles. Este resultado concuerda con los de los artículos individuales, en los que las pruebas estadísticas no han podido rechazar que

esas variables sean iguales en sus grupos casos y controles, lo cual facilitaba el ajuste de estos factores de confusión en sus estudios. En las patologías neurodegenerativas estudiadas, excepto en EH y AMS que pueden ser más tempranas, la edad media de comienzo suele ser a partir de los 60 años, lo cual se refleja en la edad media de casos (64,86 años) y controles (63,16 años); en cuanto al sexo en la población general la EP, AMS y ELA son más frecuentes en hombres, la DA en mujeres y en EH y DFT se presenta igualdad de ambos sexos (17, 67). Los pacientes con estas enfermedades es frecuente que no presenten sobrepeso (67), por su tendencia a adelgazar, motivado por dificultades en la alimentación, cambios en la dieta, tránsito y absorción intestinal como se observa en el IMC medio un poco más bajo, aunque normal, (24,87 kg/m²) de los enfermos respecto al de los controles (25,35 kg/m²).

En el momento de analizar la alfa y beta diversidad se han detectado varios problemas importantes: Primero, que el número de artículos que ofrecen resultados de la alfa diversidad (n = 18) y beta diversidad (n = 21) es pequeño, igual que ocurre en la mayoría de las EPL, excepto EP (Tabla 3 y 4). Segundo, la cantidad de resultados de índices y distancias, excepto para Chao1, Shannon, Simpson, UniFrac ponderado y no ponderado, obtenidos de los artículos también es pequeña. Por último, estos artículos emplean múltiples y diferentes índices o estimadores y distancias de unos artículos a otros y con diferentes métodos estadísticos para su análisis (ANOSIM, PERMANOVA, PCA, etc). Todos estos hechos mencionados ocasionan que nuestros análisis comparativos tengan menos consistencia científica de la deseada y deban considerarse con precaución.

El empleo de múltiples medidas de alfa y beta diversidad en un mismo artículo, como se ha encontrado, no es una práctica recomendada en investigación, sobre todo cuando se emplean en el mismo artículo índices con características distintas como cuando se utilizan índices recomendados para diferentes tamaños de muestra. La utilización de diferentes índices y distancias para el mismo análisis aumenta la probabilidad de obtener por azar el resultado deseado en alguno de ellos.

Nuestros análisis de la alfa diversidad en los artículos que aportan datos sobre ella concluyen que en conjunto las EPL presentan una alfa diversidad aumentada respecto a los sujetos sanos, como también ocurre al considerar aisladamente a la EP. Respecto a los índices sólo Chao1 aparece significativamente aumentado, en concreto en el conjunto de EPL y en la EP.

En la comparación de la beta diversidad, en los artículos que la analizan, los resultados muestran que en el conjunto de las EPL y en la EP está alterada respecto a los sanos. En cuanto a las distancias empleadas para medir la beta diversidad, UniFrac no ponderada está alterada, respecto a los sanos, en el conjunto de EPL y en EP, mientras que en UniFrac ponderada y en disimilitud de Bray-Curtis sólo están alteradas en el conjunto de EPL.

Estos resultados de alfa y beta diversidad parecen indicar que, tanto en los pacientes con EPL como en los de EP, la riqueza o número de especies diferentes, es mayor, y que la estructura de la microbiota, es decir el árbol filogenético de taxones, es distinta a la de los sujetos sanos. Sin embargo, en las comparaciones, vistas en párrafos anteriores, de la alfa y beta diversidad final, índice Chao1, distancias UniFrac ponderado y no ponderado, de los artículos del conjunto de EPL (EP+DA+ELA+EH+AMS) la **influencia o peso de los artículos de EP sobre el resultado es alto comparado con el peso de las otras patologías, DA, ELA, EH, AMS , alterando o deformando el posible resultado.** Para poder asegurar que la alfa y beta diversidad, Chao1, UniFrac ponderado y no ponderado, en el conjunto de EPL están aumentadas, como muestran los análisis estadísticos, sería necesario un mayor número de artículos de las otras patologías que equilibrasen la proporción de datos. Por lo tanto, **nuestros resultados de alfa y beta diversidad final e índices y distancias sobre el conjunto de EPL no se pueden considerar concluyentes.**

El aumento de la riqueza de la microbiota intestinal, objetivado por una mayor alfa diversidad, clásicamente se ha valorado como un activo positivo de salud (12). Sin embargo, nuestros resultados y los de otros de los artículos analizados, en EPL y sobre todo en EP apoyan lo contrario. La explicación

podría hallarse en que más importante que el aumento de riqueza de taxones sería qué taxones nuevos han aparecido, qué efectos tienen sobre el holobionte y cómo afectan al resto del microbioma, ya que si la influencia fuera negativa favorecería la aparición de patologías. Lo mismo ocurriría con la alteración de la estructura microbiótica, manifestada por cambios en la beta diversidad. Estos cambios suponen desaparición de taxones cuyos nidos ecológicos serían ocupados por otros de nueva aparición o por la expansión de alguno de los ya existentes, generando cambios metabólicos, inmunológicos y fisiológicos que podrían propiciar la aparición y progresión de ciertas enfermedades.

Los resultados de la comparación de la abundancia relativa entre los artículos y patologías muestran una gran disparidad, desde 2 artículos, Hegelmaier T et al/2020 y Ngo ST et al/2020, en los que no se detecta ningún cambio, al de Engen PA et al/2017 que no tiene aumentado ningún taxón pero sí disminuidos o los de Hopfner F et al/2017 y Brenner D et al/2018 en los que ocurre al contrario, o la existencia de 18 taxones que en la misma patología hay artículos en los que informan de un incremento o en otros de un decremento, mientras que únicamente 18 taxones que aparecen en más de 1 artículo como alterados presentan una alteración homogénea, aumento o descenso, dentro de la misma patología. Esta disparidad, que dificulta obtener conclusiones sobre su influencia en las EPL en conjunto o en las comparaciones entre patologías, podría deberse a la variabilidad natural de la microbiota entre sujetos, a la heterogeneidad de los métodos de laboratorio y análisis empleados en los artículos, de las diferencias de las muestras utilizadas y datos mencionados en ellos y de los distintos factores de confusión ajustados, así como al escaso número de artículos encontrados para la revisión sistemática.

Los taxones, aumentados y disminuidos en su abundancia, que aparecen en dos o más artículos en el conjunto de EPL (Tabla 5) no muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al número de artículos en los que no aparecen alterados. Lo mismo sucede para las patologías DA, ELA, EH y AMS. **Sólo en EP algunos taxones alcanzan diferencias estadísticamente significativas, en concreto *g_Bifidobacterium*, *g_Lactobacillus*, *g_Akkermansia* y *f_Verrucomicrobiaceae* en los taxones con abundancia relativa aumentada y *g_Roseburia* en los taxones disminuidos.**

Para la hipótesis de que la alteración de la microbiota intestinal tiene relación con el inicio y progresión de las EPL, el aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal, permitiría el paso de metabolitos que por un lado inducirían en las células del SNE el plegamiento anormal de las proteínas involucradas en esas enfermedades, que posteriormente, por sus propiedades priónicas, ascenderían vía vagal al SNC, y por otro lado generaría el estado proinflamatorio en el sistema nervioso que se observa en estas patologías, dando lugar ambos hechos a la neurodegeneración. Las bacterias que hemos detectado aumentadas o disminuidas de forma estadísticamente significativa participarían en esta patogenia. La bacteria *g_Akkermansia* consume moco intestinal para la producción de energía debilitando así la barrera intestinal y aumentando su permeabilidad a antígenos y metabolitos, que favorecerían un estado inflamatorio intestinal y nervioso (54). El *g_Lactobacillus* degrada SCFA, cuyo efecto antiinflamatorio sistémico, incluido el SNC, su protección de la barrera intestinal, regulación de la motilidad enteral y modulación de los procesos inmunológicos son conocidos (28). Esta degradación de SCFA facilitaría la aparición de inflamación en intestino y en el sistema nervioso y aumentaría también la permeabilidad enteral. A su vez, la disminución de la abundancia de *g_Roseburia*, productor de butirato (43), un SCFA, potenciaría los efectos negativos de la disminución de SCFA. Así la hiperpermeabilidad intestinal y la inflamación se retroalimentarían entre sí y afectarían a las neuronas enterales generando proteínas mal plegadas. El *g_Bifidobacterium* participa junto al *g_Lactobacillus* en la generación de ácido gamma-aminobutírico (GABA), un neurotransmisor inhibitorio, que podría participar en la patogenia de estas enfermedades (57). El taxón *f_Verrucomicrobiaceae*, al que pertenece *g_Akkermansia*, está aumentado en estreñimiento (30), uno de los primeros síntomas que aparecen en estas EPL.

Alteraciones de la abundancia relativa de la microbiota y de la alfa y beta diversidad se observan también en otras patologías como diabetes mellitus tipo II, síndrome de intestino irritable (22), osteomielitis, endotoxemia metabólica (50), trastornos del espectro autista, obesidad, artritis reumatoide (64), entre otras, por lo que **estas alteraciones de la microbiota no servirían como marcadores de las EPL ni para diferenciar entre ellas las patologías que forman este grupo.**

Las limitaciones y posibles sesgos de este trabajo se han ido comentando a lo largo de su exposición pero a modo de resumen destacaremos las siguientes: Primero, la heterogeneidad entre los artículos analizados tanto en las muestras como en criterios de inclusión y exclusión, factores de confusión considerados, métodos de recogida de heces, métodos de extracción del DNA y de secuenciación, plataformas empleadas para la secuenciación, programas de procesamiento de secuencias y su adjudicación a taxones, índices de alfa diversidad y distancias de beta diversidad y métodos estadísticos multivariantes. Segundo, en lo referente a la muestra, las limitaciones son su pequeño tamaño, el nulo o escaso número de artículos estudiados de AD, ELA, EH, AMS y DFT, el mayor peso en las comparaciones del conjunto de EPL producido por un mayor número de artículos de EP que distorsiona el resultado, y el escaso número de datos de la mayoría de índices de alfa diversidad y distancias de beta diversidad que sólo ha permitido analizar los índices y distancias Chao1, Simpson, Shannon, especies/OTUs observadas, UniFrac ponderado, UniFrac no ponderado y Bray-Curtis. Todas estas limitaciones en la muestra de artículos han ocasionado una baja potencia en el análisis estadístico y han impedido parte de las comparaciones que se querían realizar para responder a las preguntas objetivo. Por último, otra limitación encontrada ha sido que la búsqueda, evaluación, selección de artículos, recogida de datos y aplicación de la herramienta de valoración de riesgo de sesgo NOS modificada, por el carácter individual del trabajo, no se han llevado a cabo por dos investigadores independientes en paralelo, como aconseja PRISMA 2020, por lo que no se ha podido minimizar el sesgo de subjetividad que se puede generar en todos estos procesos.

7 CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

La revisión sistemática de artículos de estudios caso-control sobre alteraciones de la microbiota intestinal en enfermedades prion-like no ha podido confirmar que existan o no diferencias en la microbiota intestinal entre el conjunto de estas patologías y los sujetos sanos. Tampoco se ha podido demostrar que existan o no diferencias en la microbiota intestinal entre las patologías que forman este grupo de enfermedades. Estas confirmaciones no han sido posibles debido al pequeño número de artículos existentes, al escaso o nulo número de artículos de algunas de las patologías de las enfermedades prion-like, a la pequeña cantidad de datos que aportan la mayoría de artículos y al superior peso de los artículos de la enfermedad de Parkinson sobre los artículos de las otras patologías del grupo. Los análisis estadísticos apoyan que la microbiota intestinal está alterada en la enfermedad de Parkinson como demuestran su alfa diversidad final y su índice Chao1 aumentados, su beta diversidad final y su distancia UniFrac no ponderada alteradas, y la abundancia relativa aumentada de *g_Bifidobacterium*, *g_Lactobacillus*, *g_Akkermansia* y *f_Verrucomicrobiaceae* y disminuida de *g_Roseburia*, respecto a los sujetos sanos. En el futuro, para obtener resultados concluyentes, será necesario realizar más estudios sobre todas las patologías del grupo de enfermedades prion-like, principalmente estudios de cohortes longitudinales prospectivos, y que los investigadores lleguen a acuerdos para estandarizar estas investigaciones con el objetivo de minimizar los sesgos y limitaciones encontrados, y posibilitar la comparación de resultados entre artículos.

The systematic review of articles of case-control studies on alterations of the intestinal microbiota in prion-like diseases has not been able to confirm whether or not there are differences in the intestinal microbiota between the group of these pathologies and healthy subjects. Nor has it been able to demonstrate whether or not there are differences in the intestinal microbiota between the pathologies

that make up this group of diseases. These confirmations have not been possible due to the small number of existing articles, the small or non-existent number of articles of some of the pathologies of the prion-like diseases, the small amount of data provided by most articles and the high weight of the articles of Parkinson's disease over the articles of the other pathologies of the group. Statistical analyses support that the gut microbiota is altered in Parkinson's disease as demonstrated by its increased final alpha diversity and Chao1 index, altered final beta diversity and unweighted UniFrac distance, and increased relative abundance of *g_Bifidobacterium*, *g_Lactobacillus*, *g_Akkermansia* and *f_Verrucomicrobiaceae* and decreased *g_Roseburia*, with respect to healthy subjects. In the future, to obtain conclusive results, it would be necessary to carry out more studies on all the pathologies of the prion-like diseases group, mainly prospective longitudinal cohort studies, and for researchers to reach agreements to standardize these investigations with the aim of minimizing the biases and limitations encountered, and to make it possible to compare results between articles.

8 BIBIOGRAFÍA

1. Castillo-Álvarez F, Marzo-Sola ME. Disease of the holobiont, the example of multiple sclerosis. *Med Clín (English Edition)*. 2019; 152(4):147-153.
2. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012 Aug;70 (Suppl 1):S38-44.
3. Zhu B, Wang X, Li L. Human gut microbiome: The second genome of human body. *Protein Cell*. 2010; 1:718–25.
4. Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martinez JA. Diet, gut microbiota, and obesity: links with host genetics and epigenetics and potential applications. *Adv Nutr*. 2019; 10(suppl_1): S17-S30.
5. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(29):8787-803.
6. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier DL, Batto j, Bertalan M, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473(7346):174-80.
7. Cheng M, Ning K. Stereotypes about enterotype: the old and new ideas. *Genomics, Proteomics Bioinforma*. 2019; 17: 4–12.
8. Stinson LF, Boyce MC, Payne MS, Keelan JA. The not-so-sterile womb: Evidence that the human fetus is exposed to bacteria prior to birth. *Front Microbiol [Internet]*. 2019;10:1124. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01124>.
9. Song SJ, Lauber C, Costello EK, Lozupone CA, Humphrey G, Berg-Lyons D, et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife [Internet]*. 2013;2:e00458. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00458>.
10. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016; 352:560–4.
11. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbioma viewed across age and geography. *Nature*. 2012; 486:222-7.
12. Ortega MÁ, García-Montero C, Fraile-Martínez O, Monserrat J, Álvarez-Mon MA. La microbiota intestinal en la salud y en la enfermedad. *Medicine*. 2022; 13(69): 4054-63.
13. Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med*. 2016; 375:2369–79.
14. Alarcon TD, Auria G, Delgado S, Moreno R, Ferrer M. Microbiota. *Procedimientos de microbiología Clínica. SEIMC*. 59. MICROBIOTA [Internet]. 2016 [Acceso 28 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia59.pdf>.

15. Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19(4): 241–255.
16. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu X-N, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice: Commensal microbiota and stress response. *J Physiol [Internet]*. 2004;558(Pt 1):263–75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>.
17. Jaunmuktane Z, Brandner S. Invited Review: The role of prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2020; 46(6), 522-45.
18. Piñar-Morales R, Barrero-Hernández F, Aliaga-Martínez L. Human prion diseases: An overview. *Med Clin (Barc) [Internet]*. 2023; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2023.03.001>.
19. Mehboudi L, Zahedirad M, Vadie P. Protein misfolding and medicinal strategies in neurodegenerative disorders. *Academic Journal of Health Sciencis: Medicina balear*. 2022; 47(4), 166-170.
20. Gregersen N, Bross P, Vang S, Christensen JH. Protein misfolding and Human disease. *Annu Rev Genom Human Genet*. 2006; 7:103- 24.
21. Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, et al. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012; 27(6): 709–15.
22. Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, Okuno T, Asahara T, Nomoto K, et al. Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. *PLoS One [Internet]*. 2015;10(11):e0142164. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142164>.
23. Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Björklund T, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol*. 2014; 128: 805-20.
24. Svensson E, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2015; 78(4): 522-9.
25. Harach T, Marungruang N, Duthilleul N, Cheatham V, et al. Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 1-15.
26. Kim S, Kwon SH, Kam TI, Panicker N, Karuppagounder SS, Lee S, et al. Transneuronal propagation of pathologic α -synuclein from the gut to the brain models Parkinson's disease. *Neuron*. 2019; 103(4): 627-41.
27. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell*. 2016; 167(6): 1469-80.
28. Hegelmaier T, Lebbing M, Duscha A, Tomaske L, Tönges L, Holm JB, et al. Interventional influence of the intestinal microbiome through dietary intervention and bowel cleansing might improve motor symptoms in Parkinson's disease. *Cells [Internet]*. 2020;9(2):376. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/cells9020376>.
29. González-Santamaría M, Lezana-Rosales JM. Técnicas de secuenciación masiva (NGS). *Ed Cont Lab Clin*. 2017. 37: 33-40.
30. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord*. 2015; 30(3): 350-8.
31. Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, Wissemann WT, Lewis MR, Wallen ZD, et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov Disord*. 2017; 32(5): 739-49.
32. Jo S, Kang W, Hwang YS, Lee SH, Park KW, Kim MS, et al. Oral and gut dysbiosis leads to functional alterations in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis [Internet]*. 2022;8(1):87. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41531-022-00351-6>.
33. Moreno CE. Métodos para medir la biodiversidad. Vol 1. 1ª ed. Zaragoza: M&T Manuales. Manuales y Tesis SEA; 2001.

34. Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J.* 2011; 5(2): 169-72.
35. Page MJ, Moher D, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *BMJ* [Internet]. 2021;372:n160. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.n160>.
36. PubMed [Internet]. National Library of Medicine - National Center for Biotechnology Information. [acceso 24 de Julio de 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>.
37. Scopus [Internet]. Elsevier B.V. [acceso 24 de Julio de 2022]. Disponible en: <https://www.scopus.com/>.
38. Zotero [Internet]. Corporation for Digital Scholarship. [acceso 24 de Julio de 2022]. Disponible en: <https://www.zotero.org/>.
39. Parte AC, Sardà-Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020; 70, 5607-12.
40. The Ottawa Hospital Research Institute [Internet]. Ottawa: University of Ottawa; [acceso 11 de diciembre de 2022]. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in metaanalyses [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en: https://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp.
41. R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing (versión x64 3.5.1) [Windows]. Viena: R Foundation for Statistical Computing. Disponible en: <https://www.R-project.org/>
42. Office Programmers Team (2018). Office Professional Plus 2019 [Windows]. Redmon: Microsoft Corporation.
43. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015; 30(10): 1351-60.
44. Unger MM, Spiegel J, Dillmann KU, Grundmann D, Philippeit H, Bürmann J, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016; 32: 66-72.
45. Petrov VA, Saltykova IV, Zhukova IA, Alifirova VM, Zhukova NG, et al. Analysis of gut microbiota in patients with Parkinson's disease. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 162(6): 734-7.
46. Hopfner F, Künstner A, Müller SH, Künzel S, Zeuner KE, Margraf NG, et al. Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort. *Brain Res.* 2017; 1667: 41-5.
47. Qian Y, Yang X, Xu S, Wu C, Song Y, Qin N, et al. Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease. *Brain Behav Immun.* 2018; 70: 194-202.
48. Heintz-Buschart A, Pandey U, Wicke T, Sixel-Döring F, Janzen A, Sittig-Wiegand E, et al. The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Mov Disord.* 2018; 33(1): 88-98.
49. Li F, Wang P, Chen Z, Sui X, Xie X, Zhang J. Alteration of the fecal microbiota in North-Eastern Han Chinese population with sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* [Internet]. 2019;707(134297):134297. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134297>.
50. Jin M, Li J, Liu F, Lyu N, Wang K, Wang L, et al. Analysis of the gut microflora in patients with Parkinson's disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2019;13:1184. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2019.01184>.
51. Barichella M, Severgnini M, Cilia R, Cassani E, Bolliri C, Caronni S, et al. Unraveling gut microbiota in Parkinson's disease and atypical parkinsonism. *Mov Disord.* 2019; 34(3): 396-405.
52. Wallen ZD, Appah M, Dean MN, Sesler CL, Factor SA, Molho E, et al. Characterizing dysbiosis of gut microbiome in PD: evidence for overabundance of opportunistic pathogens. *NPJ Parkinsons Dis* [Internet]. 2020;6(1):11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41531-020-0112-6>.

53. Baldini F, Hertel J, Sandt E, Thinnies CC, Neuberger-Castillo L et al. Parkinson's disease-associated alterations of the gut microbiome predict disease-relevant changes in metabolic functions. *BMC Biol* [Internet]. 2020;18(1):62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-020-00775-7>.
54. Khedr EM, Ali AM, Deaf E, Hassan HM, Alaa A, Gamea A. Gut microbiota in Parkinson's disease patients: Hospital-based study. *Egypt J Neurol Psychiatr Neurosurg*. 2021; 57(1): 1-9.
55. Rosario D, Bidkhorji G, Lee S, Bedarf J, Hildebrand F, Le Chatelier E, et al. Systematic analysis of gut microbiome reveals the role of bacterial folate and homocysteine metabolism in Parkinson's disease. *Cell Rep* [Internet]. 2021;34(9):108807. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108807>.
56. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):13537. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13601-y>.
57. Hou M, Xu G, Ran M, Luo W, Wang H. APOE-ε4 carrier status and gut Microbiota dysbiosis in patients with Alzheimer disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2021;15:619051. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2021.619051>.
58. Zhuang ZQ, Shen LL, Li WW, Fu X, Zeng F, Gui L, et al. Gut microbiota is altered in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2018; 63(4): 1337-46.
59. Fang X, Wang X, Yang S, Meng F, Wang X, Wei H, et al. Evaluation of the microbial diversity in amyotrophic lateral sclerosis using high-throughput sequencing. *Front Microbiol* [Internet]. 2016;7:1479. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01479>.
60. Brenner D, Hiergeist A, Adis C, Mayer B, Gessner A, Ludolph AC, et al. The fecal microbiome of ALS patients. *Neurobiol Aging*. 2018; 61: 132-7.
61. Zeng Q, Shen J, Chen K, Zhou J, Liao Q, Lu K, et al. The alteration of gut microbiome and metabolism in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):12998. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-69845-8>.
62. Nicholson K, Bjornevik K, Abu-Ali G, Chan J, Cortese M, Dedi B, et al. The human gut microbiota in people with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2021; 22(3-4): 186-94.
63. Ngo ST, Restuadi R, McCrae AF, Van Eijk RP, Garton F, Henderson RD, et al. Progression and survival of patients with motor neuron disease relative to their fecal microbiota. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2020; 21(7-8): 549-62.
64. Du G, Dong W, Yang Q, Yu X, Ma J, Gu W, et al. Altered gut Microbiota related to inflammatory responses in patients with Huntington's disease. *Front Immunol* [Internet]. 2020;11:603594. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.603594>.
65. Engen PA, Dodiya HB, Naqib A, Forsyth CB, Green SJ, Voigt RM, et al. The potential role of gut-derived inflammation in multiple system atrophy. *J Parkinsons Dis*. 2017; 7(2): 331-46.
66. Tan AH, Chong CW, Song SL, Teh CSJ, Yap IKS, Loke MF, et al. Altered gut microbiome and metabolome in patients with multiple system atrophy. *Mov Disord*. 2018; 33(1): 174-6.
67. García FC. Enfermedad de Parkinson y parkinsonismos. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2019; 12(73): 4273-84.
68. Nuzum ND, Loughman A, Szymlek-Gay EA, Hendy A, Teo WP, Macpherson H. Gut microbiota differences between healthy older adults and individuals with Parkinson's disease: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020; 112: 227-41.
69. Kim SY, Park JE, Lee YJ, Seo HJ, Sheen SS, Hahn S et al. Testing a tool for assessing the risk of bias for nonrandomized studies showed moderate reliability and promising validity. *J clin epidemiol*. 2013; 66(4): 408-14.