

Avelina Suárez Moya

Microbioma y secuenciación masiva

Hospital Clínico San Carlos. Madrid

RESUMEN

El microbioma humano es un ecosistema interno constituido por el hombre y los microorganismos que en él conviven, microorganismos esenciales para mantener su salud, pues junto con el sistema inmunológico protegen frente a patógenos invasores y mantienen la salud.

La base de la microbiología tradicional ha sido el cultivo bacteriano, sin embargo la mayoría de los microorganismos observables en la naturaleza, no se cultivan mediante técnicas habituales, por ello en la actualidad, la era molecular ha permitido identificar estos microorganismos en base a su huella genética, gracias a la metagenómica.

La subunidad 16S del ARN ribosomal es considerada como la diana universal para la identificación bacteriana a partir del ADN, con la ayuda de la secuenciación. El método de Sanger o secuenciación de primera generación terminó imponiéndose por su sencillez y precisión, posteriormente se desarrolló la segunda generación, o de alto rendimiento capaz de generar cientos de miles de reacciones de secuencias de manera más rápida y económica, sin embargo, es la secuenciación de tercera generación, la que lleva al límite los avances de la nanotecnología.

Con la utilización del gen de referencia, las técnicas de secuenciación masiva y las herramientas bioinformáticas para el tratamiento de datos, se ha podido conseguir una información sobre el microbioma humano, con un nivel de detalle sin precedente en cuanto a taxonomía y función de los microorganismos, lo que ha supuesto una autentica revolución no solo en su conocimiento sino también en su implicación en la salud o de enfermedad del ser humano.

Palabras clave: Microbioma, ARNr 16S, Secuenciación masiva

Correspondencia:
Avelina Suárez Moya
Hospital Clínico San Carlos. Plaza de Cristo Rey s/n,
28040 Madrid España
E-mail: avelina.suarez@salud.madrid.org

Microbiome and next generation sequencing

ABSTRACT

The human microbiome is an internal ecosystem that refers to the community of microorganisms that populate the human body. These microorganisms are essential to support his health, because the interaction between the host immune system and microorganisms, provide the host with protection against pathogens, and contributes to the preservation of health.

Bacteriological culture has been the basis for traditional microbiology; however, most of the bacterial forms observed in nature cannot be isolated with laboratory culture methods. At present, metagenomic applies a suite of genomic technologies, where the microorganisms are identified by their genomic fingerprint.

The 16S rRNA subunit is considered as the universal target for bacterial identification from DNA with the aid of sequencing. Sanger sequencing technology had a great impact on the first generation sequencing due to its simplicity and precision. Platforms high-throughput known as second generation sequencing technologies are capable to generate hundreds of thousands of sequence reactions in a faster and economic way. However, thanks to the third generation sequencing the greatest advances in nanotechnology have been made.

Using the reference gene, the massive sequencing techniques and bioinformatics tools used for the data processing, there has been an important development of the human microbiome, achieving an unprecedented detail level on the taxonomy and microbial function. This has meant an authentic revolution not only in their knowledge but also in their involvement in the health or illness of the human being.

Key words: microbiome, 16S rRNA, massive sequencing

MICROBIOMA

El microbioma humano es un ecosistema interno constituido por el hombre y los microorganismos que en él conviven. Más de 10^{13} microbios coexisten con las 10^{12} células en el organismo humano¹. Estos microorganismos generalmente no son perjudiciales para el hombre, sino que son esenciales para mantener su salud, ya que son necesarios para la digestión de los alimentos, la síntesis de nutrientes y la prevención de enfermedades, pues junto con el sistema inmunológico, protegen frente a patógenos invasores y mantienen su salud^{2,3}.

Se llama microbioma a los microorganismos que colonizan y viven de manera fisiológica en el cuerpo humano, es la flora microbiana comensal. Factores fisiológicos, como temperatura, humedad, o la presencia de nutrientes, entre otros, favorecen el desarrollo de una comunidad bacteriana en determinados ecosistemas del cuerpo humano, estableciéndose así diferentes microbiotas: oral, respiratoria, gastrointestinal, de la piel, vaginal o del tracto urogenital⁴.

El microbioma se construye a partir de la genética, la dieta, la edad y la interacción con el medio ambiente, por ello cada individuo tiene su propio microbioma característico^{4,5}. Se puede considerar como un genoma en constante interacción con el medio ambiente, por ello una alteración en la composición o funcionamiento del mismo, una disbiosis, puede producir alteraciones en la respuesta inmune y ocasionar enfermedades⁶. Modificaciones en la dieta, el consumo de fármacos, especialmente antibióticos, incluso cambios de temperatura, pueden provocar esta disbiosis desencadenante de enfermedades tan diversas como la diabetes, el autismo, el intestino irritable, la obesidad, la depresión o enfermedades autoinmunes⁷.

A pesar de que cada vez es más evidente la implicación de la microbiota en determinadas enfermedades, no siempre se tiene la certeza de esta asociación, por ello en el año 2008, el instituto Nacional de Salud en Estados Unidos, establece un proyecto de colaboración internacional llamado "The Human Microbiome Project (HMP) cuyo principal objetivo es la caracterización integral del microbioma humano y el análisis de su importancia en la salud y en la enfermedad. Así, éste proyecto ha determinado las comunidades microbianas encontradas en diferentes partes del organismo⁸.

En el **tracto respiratorio superior**, existe una variedad importante de flora microbiana que varía de unos lugares a otros, conocidos como nichos ecológicos. En los individuos sanos, los senos paranasales, las trompas de Eustaquio y el tracto respiratorio por debajo del nivel de la laringe suelen ser estériles⁹. Sin embargo, se ha podido establecer una conexión entre una microbiota aberrante, enfermedades alérgicas y asma bronquial⁷. Su relación con la enfermedad respiratoria crónica es poco conocida.

La **cavidad oral** representa un 25% del microbioma humano⁸ y contiene un número diferente de nichos, incluyendo dientes, surco gingival, lengua, mejillas, paladar duro y blando etc., todos ellos colonizados por bacterias, que se suelen presentar como biopelículas bacterianas más que como entes ais-

lados¹⁰. De hecho, la microbiota oral es uno de los microbiomas mejor caracterizados de los que colonizan el cuerpo humano¹¹. Según el "Human Oral Microbiome Database" hay aproximadamente 700 especies procariotas presentes en la cavidad oral humana¹². Sin embargo, en presencia de una patología, este número suele alterarse, en caso de la caries suele producirse una disminución de 600 a 160, desapareciendo sobre todo los más resistentes a los ácidos, lo que induce a pensar que las especies desaparecidas podrían tener un factor protector frente al proceso¹³ o que la adición de probióticos podría ser útil para la prevención o el tratamiento de las correspondientes patologías¹⁴.

En este sentido, Mira et al.¹⁵ han descrito una nueva especie en la cavidad oral, *Streptococcus dentisani* que se encuentra en la superficie dental de individuos sin caries, ya que es productor de bacteriocinas que eliminan las bacterias causantes de estas lesiones.

En el **surco gingival** el ambiente es similar al del colon, en el que la concentración bacteriana alcanza 10^{12} por ml y los anaerobios representan el 99% de la flora cultivable⁹.

El **esófago**, a pesar de que algunos autores consideran que en él no existe una colonización permanente, puede sin embargo estar invadido por los microorganismos que arrastran los alimentos y pudieran establecerse allí. De hecho, este microbioma se altera en diversas patologías como la esofagitis eosinofílica o el reflujo esofágico¹⁶.

Durante muchos años el **estómago** fue considerado como un órgano estéril pues su barrera gástrica y la acidez de sus secreciones impedían que los microorganismos pudieran sobrevivir⁹. Gracias a la metagenómica se ha comprobado que hay bacterias que pueden adaptarse a las condiciones adversas del estómago¹⁷.

El **microbioma intestinal**, contiene 100 billones de microorganismos con más de 1.000 especies diferentes como mínimo, y más de 3 millones de genes. Puede pesar hasta 2 kg y es el responsable de distintas funciones fisiológicas con un impacto directo en la salud, como son la digestión de alimentos que el estómago y el intestino delgado no han sido capaces de digerir, la producción de vitaminas B y K que el organismo humano no puede sintetizar y de colaboración con el sistema inmune, actuando como efecto barrera¹⁸.

Alrededor de un tercio de la microbiota intestinal es común para la mayoría de la población, aunque existe una proporción de microorganismos específicos de cada persona. Su papel mantener un balance ecológico⁷. Su composición varía a lo largo de sus diferentes porciones. En el intestino delgado, los microorganismos simplemente pasan por él, aunque la interrupción de este flujo, por obstrucciones, divertículos, asas ciegas u otras patologías, produce concentraciones bacterianas con predominio anaeróbico, y este patrón de sobrecrecimiento bacteriano puede ser responsable entre otros de síndromes de mala absorción o del intestino irritable¹.

La mayor concentración de anaerobios se produce en el íleon terminal y sobre todo en el colon, aunque la mayoría de

las bacterias del colon no se pueden cultivar⁹. El colon es el lugar de mayor contenido bacteriano, aproximadamente 10^{14} microorganismos por ml.

La microbiota intestinal en el hombre, se establece después del destete, alrededor de los 3 años de edad. El feto crece y se desarrolla en un ambiente estéril y durante el parto es colonizado por microorganismos, de la madre si el parto es vaginal, o del entorno en que tiene lugar el nacimiento. Posteriormente la alimentación define su composición. Hoy se sabe con certeza que la dieta puede alterar la microbiota intestinal, pero se desconocen los factores responsables de los cambios en su composición⁵.

Se considera que la microbiota presente en las heces, representa a todas las comunidades bacterianas que viven en el tracto gastrointestinal, y por ello suele ser la muestra elegida para la mayoría de los estudios, siendo además una muestra de fácil recolección y no invasiva. Debe realizarse un estudio genómico, ya que la mayoría de los microorganismos no crecen en los medios habituales de cultivo. La caracterización de este ecosistema es el primer paso para elucidar su papel en la salud y la enfermedad¹⁹.

En los últimos años la composición y las funciones de la microbiota humana intestinal se ha desarrollado ampliamente, debido sobre todo a las tecnologías "ómicas" que han facilitado el análisis genético y metabólico de la comunidad microbiana²⁰.

La Unión Europea ha financiado un proyecto "MyNew-Gut", en 2013 para investigar la influencia de la microbiota intestinal en la salud y en el bienestar. Sin duda, todo este esfuerzo contribuirá al desarrollo de nuevos enfoques para prevenir las enfermedades relacionadas con la dieta (síndrome metabólico y obesidad), los trastornos del comportamiento a través de cambios en el estilo de vida y la ingesta de pro-prebióticos y productos alimenticios semipersonalizados e innovadores²¹.

Existe por tanto una interacción entre el ambiente, la microbiota y el huésped, aunque falta por establecer e identificar qué factores son los determinantes de su composición y función. Su conocimiento nos permitiría modificar la microbiota intestinal y mejorar la salud⁶.

En el **tracto genital femenino** la concentración bacteriana es de 10^8 microorganismos por ml en la vagina y el cérvix durante los años de reproducción. Pueden producirse cambios por su influencia hormonal²² en función del estado del ciclo menstrual y otros factores como la menarquia, la menopausia, el embarazo, los antibióticos y la cirugía ginecológica²³.

La microbiota vaginal, está dominada por *Lactobacillus* que protegen a la mucosa del establecimiento de patógenos y mantienen un ecosistema saludable e impiden el riesgo de infección²², el tratamiento antibiótico provoca una disbiosis, que facilita el desarrollo de procesos infecciosos²⁴.

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana altera las comunidades bacterianas en determinadas mucosas²⁵, y recientemente ha sido observada una disbiosis en la

flora intestinal de estos pacientes, que se ha relacionado con el estado inflamatorio mantenido que presentan^{26,27}.

La **flora de la piel** también contiene una gran cantidad de anaerobios, aunque su papel en la salud o la enfermedad es aún desconocido⁹. Las bacterias anaerobias son muy frecuentes y parece que pueden ser responsables de importantes procesos no considerados tradicionalmente como enfermedades infecciosas, tales como la enfermedad cardiovascular, diabetes, enfermedad mental, obesidad, síndrome metabólico o intestino irritable.

Con los crecientes avances en las tecnologías de detección de ADN (ácido desoxirribonucleico), y la disminución del coste en la secuenciación, se ha ampliado enormemente el mundo microbiano revelando una diversidad microbiana sin precedentes en casi todos los ambientes²⁰, relacionando la salud con la cantidad de microorganismos y su biodiversidad.

Ahora es preciso establecer las diferencias en las comunidades microbianas y sus funciones en los diferentes estados de salud o de enfermedad. Para ello hay que conocer su composición: metataxonomía, los genes que contiene: metagenómica, la expresión de estos genes: metatranscriptoma, las proteínas expresadas: metaproteómica e incluso en los últimos años se ha incorporado el estudio de pequeñas moléculas: metabolómica²⁸.

TÉCNICAS DE ESTUDIO DE MICROBIOMA

Metagenómica. La base de la microbiología tradicional ha sido el cultivo bacteriano, que permite el aislamiento de microorganismos y su posterior identificación en base a sus características morfológicas, bioquímicas y genéticas²⁶. Pero la mayoría de los microorganismos observables en la naturaleza, el 99,8% de ellos, no pueden cultivarse por técnicas habituales, por carecer de condiciones o métodos adecuados^{29,30}.

En la actualidad la era molecular ha permitido identificar estos microorganismos en base a su huella genética, gracias a la metagenómica³¹, una nueva aplicación de la biología molecular que estudia las comunidades bacterianas, desde el punto de vista genómico, partiendo del ADN obtenido de muestras, de diferentes entornos naturales sin necesidad de cultivarlas.

Para determinar el microbioma en una muestra biológica, se parte del ADN que se extrae, se amplifica y se secuencian los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN (ácido ribonucleico) ribosomal, molécula antigua ya propuesta por Carl Woese en 1975³², pero presente en todas las bacterias actuales, y cuya estructura y función han permanecido constantes a lo largo del tiempo. La subunidad 16S del ARN ribosomal es considerada como la diana universal para la identificación bacteriana, por sus características y propiedades que permiten la caracterización taxonómica de las bacterias, pudiendo discernir hasta nivel de género y en algunos casos de especie^{33,34}.

Con la utilización del gen de referencia, las técnicas moleculares de secuenciación masiva y las herramientas para análisis de datos, se ha podido conseguir información sobre el

microbioma humano, con un nivel de detalle sin precedente en cuanto a taxonomía y función de los microorganismos³¹, recuperando la mayor diversidad posible de especies a partir de muestras clínicas, aunque son precisos más estudios para reconocer a los microorganismos en su entorno natural²⁹.

El método de Sanger pertenece a la primera generación de técnicas de secuenciación, y terminó imponiéndose por su sencillez y precisión, pero posteriormente gracias a la secuenciación masiva se obtienen millones de secuencias a una velocidad sin precedentes y cada vez a coste más reducido³⁵.

En la búsqueda de abaratar costes se desarrollaron los llamados secuenciadores de segunda generación, o de alto rendimiento, capaces de generar cientos de miles de secuencias de manera más rápida y económica. La secuenciación de segunda generación se inició basándose en la pirosecuenciación del ADN:

Existen 4 plataformas disponibles para secuenciación masiva³⁴, cuyas características son:

- Secuenciación por síntesis:
 - PCR en emulsión (Roche, SOLiD)
 - PCR en puente (illumina)
- Secuenciación por conducción: (Ion-Torrent).

1. Roche. Utiliza los secuenciadores 454. Aplica una técnica basada en la polimerización no fluorescente, que mide la liberación del pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas, que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido. La longitud de las lecturas generadas permite la secuencia *de novo* de genomas. Su inconveniente es que comete errores en regiones homopoliméricas³⁶. (http://genomics.org/index.php/454_GS_FLX).

2. SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection). Usa secuenciadores de "Applied Biosystems: Life Technologies", y obtiene la secuencia por ligación de octámeros marcados de secuencia conocida a la cadena de ADN, con la posterior detección de la señal fluorescente emitida tras cada ligación. (http://www.sciencedirect.com/topics/page/ABI_Solid_Sequencing). La tasa de error en este caso es menor³⁴.

3. Illumina. Adapta la familia de secuenciadores Solexa, incorporando progresivamente una serie de instrumentos como MiSeq, HiSeq y NextSeq³⁴. Aplica también un método basado en la polimerización del ADN, donde la incorporación de un nucleótido marcado con fluorescencia y protegido en la cadena naciente impide que ésta siga creciendo. Después de detectar la señal fluorescente se elimina el grupo protector pudiéndose incorporar otro nucleótido marcado e iniciar un nuevo ciclo. (<http://www.illumina.com/support>). Es una técnica muy potente en cuanto a información generada y coste.

Estas dos últimas técnicas tienen la ventaja sobre la pirosecuenciación de resolver las regiones homopoliméricas, pero su inconveniente radica en que no son capaces de generar lecturas superiores a 75 bases, y no se pueden utilizar en la secuenciación *de novo*.

4. Ion-Torrent. Se basa en una secuenciación con "chips" semiconductores. Detecta los iones H⁺ liberados por la polimerasa tras la incorporación de un nucleótido³⁷. Es más sencilla, rápida y rentable respecto a las anteriores. No hay imágenes, detección de fluorescencia, cámaras o escáneres. (<http://www.iontorrent.com>).

Cuando no se precisa una amplificación clonal como paso previo a la propia secuenciación, se habla de **secuenciación masiva de tercera generación** que aplica Tecnología SMRT ("single molecule real time sequencing") basada en la lectura de la hebra molde del ADN, llevando al límite los avances de la nanotecnología de pequeñas moléculas, junto con todas las ventajas relacionadas con el coste y la velocidad de secuenciación.

Las principales plataformas desarrolladas en estas nuevas tecnologías son:

- **HeliScope:** desarrollado por Helicos BioScience Corporation, está basado en la secuenciación a tiempo real de miles de millones de pequeñas moléculas únicas de ADN adheridas a una superficie sólida. Dada la pequeñez de las lecturas generadas, esta tecnología está recomendada para la resecuenciación de genomas y no para la secuenciación *de novo*³⁸.

- **PacBio** (Pacific Biosciences): se basa en la detección de una sola molécula de ADN polimerasa trabajando de manera continua para obtener mayor velocidad. Con esta estrategia el equipo es tan sensible que es capaz de detectar la fluorescencia pegada a un solo nucleótido³⁹. La plataforma PacBio se utiliza a menudo para determinar secuencias genómicas completas, sin la necesidad de un genoma de referencia³⁴.

- **Mini ON** (Oxford Nanopore): es una de las más recientes tecnologías que permite secuenciar ADN y proteínas específicas por electricidad⁴⁰. Mide el cambio en la corriente resultante de las cadenas de ADN que interactúan con un nanoporo de proteína cargada. Estas mediciones pueden ser utilizadas para deducir la secuencia de nucleótidos subyacente. (<https://nanoporetech.com/>).

Igual que PacBio, MinION permite una secuenciación *de novo* para genomas completos³⁴.

El MinION™ es un nuevo secuenciador portátil que mide cuatro pulgadas de longitud y es alimentado desde el puerto USB de un ordenador portátil. Además, prometen una bioinformática más sencilla que es uno de los mayores problemas de la secuenciación.

Metataxonomía. El gen que codifica para ARNr 16S es común a todas las bacterias, contiene similitudes y diferencias en la secuencia de sus nucleótidos que permiten la caracterización taxonómica de las bacterias de una comunidad, pudiendo discernir entre estratos de dominio y *phylum* hasta nivel de género y en algunos casos especie. La descripción de perfil taxonómico se basa en la comparación de las secuencias del gen de la muestra a estudiar con las secuencias de referencia de una base de datos⁴¹.

Las plataformas de secuenciación de alto rendimiento generan tal cantidad de datos genómicos que en un ordenador

común no se pueden manejar⁴², por ello la informática ha adquirido una relevancia crítica en las técnicas de secuenciación masiva, en el sentido de que su capacidad es esencial para utilizar y analizar datos biológicos.

A diferencia de los sistemas de secuenciación tradicionales, estas plataformas son capaces de generar de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación en un tiempo record y con coste cada vez más reducido. Estas secuencias aisladas obtenidas requieren el empleo de potentes herramientas informáticas para su alineamiento y ensamblaje⁴³.

El orden habitual de análisis bioinformático incluye el control de calidad, la eliminación de secuencias quiméricas y posterior agrupamiento de las secuencias por características de similitud y solapamiento (clustering). Posteriormente, se procede a la asignación taxonómica y el análisis estadístico para determinar las diferencias significativas comparadas con la secuencia de referencia. Todo esto requiere un software muy sofisticado que está en continua evolución⁴⁴. Algunos de los soportes informáticos existentes son:

- **Programación R:** es un lenguaje y un entorno de programación para el cálculo estadístico, manipulación de datos y creación de gráficos.

- **QIIME** (Quantitative Insight Into Microbial Ecology): es una plataforma bioinformática para realizar análisis de microbiomas a partir de datos de secuenciación de ADN sin procesar. Y permitiendo obtener gráficos y estadísticas. Asigna identidades taxonómicas, a nivel de género, incluso a veces de especie, basadas en comparaciones con secuencias, de una base de datos, de referencia⁴⁵.

- **GALAXY:** es un programa abierto para analizar los datos que proporciona el estudio metagenómico, funcional y de diagnóstico clínico. Es avanzado en configurabilidad, adaptabilidad, extensibilidad y reproducibilidad destinados tanto a investigación como al uso académico⁴⁶.

- **Proyecto de Base de Datos Ribosómicos** (Ribosomal DataBase Project **RDP**): es una base de datos que contiene herramientas para analizar secuencias del gen 16S ARNr⁴⁷.

MEDIDAS DE LA BIODIVERSIDAD

La biodiversidad es uno de los principales indicadores de la salud de la microbiota. Ahora que las plataformas de secuenciación producen cientos de miles de secuencias de cientos de muestras a partir de la subunidad 16S del ARN ribosomal, las secuencias generadas presentan una gran diversidad, por lo que se hace necesaria su caracterización, imprescindible para poder entender la estructura de las mismas. Whittaker⁴⁸ clasifica esta diversidad en alfa y beta.

Se define como diversidad alfa, a la riqueza de especies de una comunidad a la que consideramos como homogénea y esta diversidad puede ser medida según el número de especies presentes o bien según la distancia filogenética que hay entre ellas⁴⁹.

La diversidad beta, mide las diferencias en la composición bacteriana de una o más muestras. Estas diferencias podrán ocurrir en el espacio, cuando las mediciones se hacen en lugares distintos en un mismo tiempo, o en el tiempo cuando las mediciones se realizan en el mismo lugar, pero en distintos momentos. La beta diversidad se puede medir de forma cuantitativa o cualitativa, en la primera se considera la abundancia de los microorganismos observados, mientras que en la segunda solo se tiene en cuenta la presencia o ausencia.

REPRESENTACIONES GRÁFICAS

Los métodos aplicados para la interpretación de los datos moleculares y genómicos en la práctica clínica, están basados en la utilización de distintos biomarcadores:

- **Mapas de calor:** utilizados para la representación visual de los datos obtenidos por secuenciación de alto rendimiento. Son muy útiles. Son gráficos en los que mediante un código de colores se resalta la abundancia de las diferentes comunidades bacterianas en cada muestra.

- **Marcadores Fluorescentes:** a partir de la combinación de la potencia de la secuenciación con el análisis de datos obtenidos del Proyecto del Microbioma Oral Humano en la detección de microorganismos de cada nicho oral, Mark Welch y al.⁵⁰ aplican una técnica para la visualización microscopía de la muestra oral utilizando múltiples marcadores fluorescentes que etiquetan a las bacterias, no solo a las más prevalentes, resultando una imagen sorprendente de microorganismos. Diferentes colores indican las diferentes bacterias presentes en la muestra.

- **LEfSe (LDA Effect size)** (Análisis discriminante lineal, efecto-tamaño): es un algoritmo para la identificación de características genómicas, estudiando la diferencia entre dos o más condiciones biológicas. Esta herramienta identifica primero las características que son estadísticamente diferentes entre las clases biológicas y después realiza pruebas adicionales para determinar si estas diferencias son consistentes con respecto al comportamiento biológico esperado⁴¹.

- **PICRUST** (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States): es un software diseñado para predecir el contenido funcional del metagenoma a partir de genes marcadores o genomas completos. Esta plataforma realiza la predicción metagenómica basándose en la enciclopedia Kyoto de genes y genomas (KEGG)⁵¹, que se desarrolla a partir del conocimiento experimental de la bibliografía publicada.

FINANCIACIÓN

La autora declara no haber recibido ninguna financiación para la realización de esta revisión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Backhed F, Ley RE, Sonnenberg JL, Peterson DA, Gordon JL. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307:1915-20.

2. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(5):313–23.
3. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paolab M, Ramazzottic M, Poulletd JB, Massartd S et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:14691–6.
4. Turnbaugh PJ, Lay RE, Harnady M, Fraser-Liggett C, Knigth R, Gordon JI. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world *Nature*. 2007; 449(7164): 804–10.
5. Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients* 2015; 7: 17–44.
6. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G. et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2016; 65: 330–9.
7. Tojo R, Suárez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M et al. World Intestinal microbiota in health and dise of bifidobacteria in gut homeostasis. *J Gastroenterol* 2014; 20(41): 15163–76.
8. Human Microbiome Project Consortium. Structure function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486(7402): 207–14.
9. Bartlett JG. Anaerobic bacteria: History and role in normal human flora 2016 UpToDate www.uptodate.com
10. Arora N, Mishra A, Chugh S. Microbial role in periodontitis: Have we reached the top? Some unsung bacteria other than red complex. *J Indian Soc. Periodontol*. 2014; 18(1): 9–13.
11. Teles R, Teles F, Frias-López J, Paster B, Haffajee A. Lesons learned an unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol* 2000. 2013; 62(1): 95–162.
12. Palmer RJ. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol* 2000. 2014; 64(1): 1–24.
13. Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett*. 2014; 162(2): 22–38.
14. Suarez JE Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos *Nutr Hosp* 2013; 28:38–41
15. Camelo-Castillo A, Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. *Streptococcus dentisani* sp nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64: 60–5.
16. Harris JK, Fang R, Wagner BD, Choe HN, Kelly CJ, Schroeder S et al. Esophageal Microbiome in Eosinophilic Esophagitis. *PLoS One* 2015 doi:10.1371/journal.pone.0128346 .
17. Otero LL, Ruiz VE, Pérez Pérez GI. *Helicobacter pylori*: The balance between a role as colonizer and pathogen. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014; 28(6):1017–29.
18. Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Ther Adv Gastroenterol* 2013; 6(4): 295–308.
19. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635.
20. Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de León A, Sanchez-Flores A. The road to Metagenomics: from Microbiology to DNASequencing technologies and bioinformatics. *Front Genet* 2015; 6:348.
21. Korpela K, Flint HJ, Johnstone AM, Lappi J, Poutanen K, Dewulf E et al. Gut microbiota signatures predict host and microbiota responses to dietary interventions in obese individuals. *PLoS One* 2014; 9:3 e90702
22. Lorenzen E, Kudirkiene E, Gutman N, Grossi AB, Agerholm JS, Erneholm K et al. The vaginal microbiome is stable in prepubertal and sexually mature Ellegaard Göttingen Minipigs throughout an estrous cycle. *Vet Res* 2015; 46:125.
23. McMillan A, Rulisa S, Sumarah M, Macklaim JM, Renaud J, Bisanz JE et al. A multi-platform metabolomics approach identifies highly specific biomarkers of bacterial diversity in the vagina of pregnant and nonpregnant women. *Sci Rep* 2005; 5:14174 | DOI: 10.1038/srep14174
24. Martín R, Soberón N, Vázquez F, Suárez JE. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26(3): 160–7.
25. Salas JT, Chang TL. Microbiome in HIV infection. *Clin Lab Med*. 2014; 34(4): 733–45.
26. Vázquez-Castellanos JF, Serrano-Villar S, Latorre A, Artacho A, Ferrus ML, Madrid N et al. Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals. *Mucosal Immunology*. 2015; 8(4):760–72.
27. Ponte R, Mehraj V, Ghali P, Couëdel-Courteille A, Cheynier R, Routy JP. Reversing Gut Damage in HIV Infection: Using Non-Human Primate Models to Instruct Clinical Research. *EBioMedicine* 2016; 4: 40–49.
28. McLean ES. Advancements toward a systems level understanding of the human oral microbiome. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4:98.
29. Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics- the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7(5): 492–8.
30. Ferrer MD., Mira A. Oral Biofilm Architecture at the Microbial Scale. *Trends Microbiol*. 2016; 24(4): 246–8.
31. Xu P, Gunsolley J. Applications of metagenomics in understanding oral health and disease. *Virulence* 2014; 5(3): 424–32.
32. Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny *FASEB J*. 1993; 7(1):113–23.
33. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(4): 238–45.
34. Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis* 2016; 24.doi:10.1111/odi12509.
35. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp*. 2012; 2(3):1–12.
36. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature* 2005; 437(7057): 376–80.

37. Perkel J. Making Contact with Sequencing's Fourth Generation. *BioTechniques* 2011; 50(2): 93–5.
38. Thompson JF, Steinmann KE. Single Molecule Sequencing with a HeliScope Genetic Analysis. *System Curr Protoc Mol Biol.* 2010; 7:10.
39. Korlach J, Bibillo A, Wegener J, Peluso P, Pham TT, Park I et al. Long processive enzymatic dna synthesis using 100% dye-labeled terminal phosphate-linked nucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008; 27:1072–83.
40. Hargreaves AD, Mulley JF. Assessing the utility of the Oxford Nanopore MinION for snake venom gland cDNA sequencing. *Peer J* 2015; 24;3:e1441 DOI 10.7717/peerj.1441
41. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011; 12:R60
42. Stein LD. The case for cloud computing in genome informatics. *Stein Genome Biology* 2010; 11: 207.
43. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre y postnatal. *Diagn Prenat.* 2012; 23(2):56–66.
44. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 Suppl 1:4516–22.
45. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010; 7(5): 335–6.
46. Blankenberg D, Hillman-Jackson J. Analysis of next-generation sequencing data using Galaxy. *Methods Mol Biol.* 2014; 1150:21–43.
47. Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 2005; 33: D294–D296
48. Whittaker R. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 1972; 21: 213–51.
49. Lozupone CA, Knight R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32(4): 557–78.
50. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Riekenb CW, Dewhirst E, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016. 113(6): E791–800.
51. Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 2000; 28(1): 27–30.