



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

## Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia



Rosa del Campo-Moreno<sup>a,b,\*</sup>, Teresa Alarcón-Cavero<sup>c</sup>, Giuseppe D'Auria<sup>d,e</sup>, Susana Delgado-Palacio<sup>f</sup> y Manuel Ferrer-Martínez<sup>g</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, España

<sup>b</sup> Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Sevilla, España

<sup>c</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

<sup>d</sup> Servicio de Secuenciación y Bioinformática, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica, Valencia, España

<sup>e</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Valencia, España

<sup>f</sup> Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Villaviciosa, Asturias, España

<sup>g</sup> Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 6 de febrero de 2017

Aceptado el 17 de febrero de 2017

On-line el 31 de marzo de 2017

Palabras clave:

Microbiota humana

Influencia en la salud

Next generation sequencing

Trasferencia de materia fecal

Keywords:

Human microbiota

Influence on health

Next generation sequencing

Faecal microbiota transplant

### R E S U M E N

La microbiota es el conjunto de microorganismos que reside en nuestro cuerpo, que a su vez pueden diferenciarse según su comportamiento en comensales, mutualistas y patógenos. El conocimiento de este ecosistema se ha visto considerablemente incrementado tras la introducción de las técnicas de secuenciación masiva del gen 16S ARNr (gen ADNr 16S). Este avance ha supuesto una verdadera revolución en el conocimiento de la composición de la microbiota y de su implicación en los estados de salud y enfermedad del ser humano. En este documento se detallan los diferentes ecosistemas bacterianos que podemos encontrar en el cuerpo humano y las evidencias científicas que existen en relación con diferentes enfermedades. También se describe el procedimiento de transferencia de materia fecal, particularmente utilizado para el tratamiento de las recidivas de la diarrea por *Clostridium difficile*, y las bases metodológicas de las nuevas técnicas moleculares utilizadas en la caracterización de la microbiota.

© 2017 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

### Microbiota and Human Health: characterization techniques and transference

#### A B S T R A C T

The human microbiota comprises all the microorganisms of our body, which can also be categorised as commensals, mutualists and pathogens according to their behaviour. Our knowledge of the human microbiota has considerably increased since the introduction of 16S rRNA next generation sequencing (16S rDNA gene). This technological breakthrough has seen a revolution in the knowledge of the microbiota composition and its implications in human health. This article details the different human bacterial ecosystems and the scientific evidence of their involvement in different diseases. The faecal microbiota transplant procedure, particularly used to treat recurrent diarrhoea caused by *Clostridium difficile*, and the methodological bases of the new molecular techniques used to characterise microbiota are also described.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

### Introducción

La microbiota es el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) que reside en nuestro cuerpo, que a su vez pueden diferenciarse en comensales, mutualistas

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rosacampo@yahoo.com (R. del Campo-Moreno).

y patógenos. El término microbioma hace referencia a todo el hábitat, incluidos los microorganismos, sus genes y las condiciones ambientales, pero en la práctica ambos términos se usan indistintamente, confundiendo el sufijo *bioma* (comunidad) con el de *oma* (conjunto)<sup>1</sup>. En cada una de las diferentes localizaciones de nuestro organismo podemos encontrar ecosistemas microbianos complejos. El más complejo, diverso y numeroso es el asociado al aparato digestivo, particularmente en el ciego, donde la densidad de microorganismos es la mayor que hay en nuestro organismo. Estas comunidades tienen un comportamiento simbiótico y mutualista con las células eucariotas humanas, son imprescindibles para el correcto funcionamiento de nuestro organismo, mantienen un importante diálogo con el sistema inmune y tienen funciones homeostáticas que condicionan nuestra salud<sup>2</sup>. Numerosas evidencias científicas han implicado al microbioma intestinal y su potencial metabólico en diversos estados patológicos en los últimos años, originando nuevas estrategias terapéuticas para controlar y regular este ecosistema<sup>3</sup>. Entre estos nuevos enfoques se encuentra la transferencia de microbiota fecal, con una popularidad creciente dado su éxito en el tratamiento de la diarrea recurrente causada por *Clostridium difficile*<sup>4</sup>.

El conocimiento de nuestro microbioma se ha visto considerablemente ampliado tras la utilización de las técnicas moleculares de secuenciación masiva, especialmente las de segunda generación, también conocidas como *next generation sequencing*. Para determinar la composición de la microbiota siempre se han utilizado cultivos microbiológicos, pero hoy en día se sabe que la mayor parte de los microorganismos de este ecosistema no se pueden cultivar con los medios tradicionales, siendo únicamente posible su detección tras la secuenciación de ADN como huella genética. La utilización de técnicas moleculares ha permitido identificar y asignar taxonómicamente a la mayoría de los microorganismos sin necesidad de cultivarlos<sup>5</sup>. Este avance, así como otras técnicas microbiológicas que se detallarán en el presente artículo, han supuesto una verdadera revolución en el conocimiento de la microbiota y de su implicación en los estados de salud y enfermedad del ser humano.

### Consideraciones clínicas

Desde el nacimiento existe una relación simbiótica entre la microbiota y nuestras células que evoluciona en el tiempo, adaptándose a los cambios<sup>6</sup>. Por su enorme capacidad metabólica, se ha considerado a la microbiota como un «órgano» imprescindible para la vida y con influencia en la salud y la enfermedad<sup>7</sup>. Su composición presenta particularidades y características propias de cada individuo, pudiendo variar en función de la base genética, la dieta y la interacción con el medio ambiente.

El estudio de este ecosistema es un campo de rápido avance científico, aceptando universalmente que para alcanzar un estado de salud adecuado es necesario tener también una microbiota «sana». Nuestra microbiota experimenta cambios como consecuencia de la influencia de múltiples factores, de un modo similar a los que experimenta cualquier órgano de nuestro cuerpo desde la ontogenia a la muerte. Continuamente estamos expuestos a factores que pueden influir, aunque una de sus características es su gran capacidad de resiliencia<sup>8</sup> (capacidad de adaptación frente a un agente perturbador o una situación adversa, con posterior recuperación del estado inicial cuando cesa la alteración), recuperando inmediatamente su estado natural, que se denomina con el término «eubiosis». El nivel de estos cambios viene definido no solo por la naturaleza, la fuerza y la duración de la alteración, sino también por la composición y la estabilidad de cada microbiota, asumiendo que cada una es única para cada persona. En algunas ocasiones, la naturaleza de la alteración es tan fuerte que condiciona alteraciones en su composición o en su funcionamiento,

alcanzando un estado de disbiosis. La disbiosis puede producirse en cuestión de días, particularmente tras la ingesta de antibióticos, pero también puede ser consecuencia de otras acciones a más largo plazo, fundamentalmente relacionadas con la dieta.

En una persona adulta, el tracto gastrointestinal puede albergar entre 500 y 1.000 especies de microorganismos, siendo las bacterias de los filos *Bacteroidetes* ( $\approx 25\%$ ) y *Firmicutes* ( $\approx 60\%$ ) los mayoritarios. En menor proporción se detectan *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Spirochaetes*, las arqueas, los hongos, los protozoos, los virus y otros microorganismos. También es importante mantener las proporciones equilibradas, y por ello se ha establecido la ratio *Firmicutes/Bacteroides* como un parámetro para evaluar el equilibrio de la microbiota intestinal y su funcionalidad. En los obesos esta ratio está muy alterada por el aumento de los *Firmicutes*. El aumento de *Firmicutes* también se ha descrito en ancianos de forma fisiológica como consecuencia de la edad.

Las principales funciones de la microbiota intestinal son prevenir la colonización por otros microorganismos patógenos, ayudar a digerir los alimentos, producir vitaminas B y K que el organismo humano no es capaz de sintetizar y, finalmente, y no menos importante, estimular al sistema inmune. Tras el nacimiento, las células del sistema inmune carecen de estímulos, reconociendo a todos los antígenos de su alrededor como parte del organismo y bloqueando la respuesta inflamatoria contra ellos. Es por ello que los primeros contactos de la microbiota con las líneas celulares inmunológicas sin diferenciar son muy importantes, y van a ayudar a definir lo que es lo «propio» de lo «extraño». Este sistema y la microbiota intestinal mantienen un diálogo continuo con carácter mutualista, pero si esta situación se desequilibra puede iniciarse un proceso patológico. Esta parece ser la base de ciertas enfermedades autoinmunes donde los antígenos de la microbiota intestinal representan un estímulo suficientemente grande como para desencadenar una respuesta inflamatoria. En otras enfermedades, como el síndrome metabólico y la obesidad, también se atribuye a la microbiota intestinal el origen del estímulo que origina una respuesta inflamatoria basal continuada.

Recientemente se ha descrito la existencia del eje cerebro-intestino, que conecta el sistema nervioso central con la microbiota intestinal a través del nervio vago, el sistema parasimpático, los metabolitos bacterianos, que pueden tener acciones como neurotransmisores, y el sistema endocrino asociado al tracto digestivo<sup>9,10</sup>. Así pues, además de las enfermedades que clásicamente se han relacionado con alteraciones en la microbiota, como la obesidad, la diabetes tipo 2, las enfermedades inflamatorias del intestino y las alergias, últimamente también se han relacionado otras enfermedades del sistema nervioso central, como el autismo, la ansiedad, la depresión y la dependencia alcohólica.

Actualmente se acepta que para alcanzar un estado de salud integral es necesario que nuestra microbiota, particularmente la asociada al tracto gastrointestinal, también esté sana. Los principales indicadores de salud de la microbiota son su riqueza (cantidad de microorganismos) y su biodiversidad (cantidad de especies). Ambos parámetros se evalúan con los índices de biodiversidad tipo alfa, como el de Shannon (refleja la heterogeneidad de una comunidad con base en el número de especies presentes y su abundancia relativa), y el índice de Chao (abundancia y representación de cada especie en todas las muestras).

Se han publicado numerosas asociaciones entre estados patológicos y alteraciones de la microbiota, bien por presencia o aumento de determinados géneros, bien justamente por lo contrario, ausencia o disminución de su concentración. Para evaluar y comparar la microbiota de un paciente con la de un sujeto sano se emplean métodos computacionales de ordenación, como el método de agrupamiento (*clustering*), o de reducción de las dimensiones de las matrices de distancias que definen el conjunto de las muestras de

cada estudio. También se puede realizar un análisis de componentes principales, que permite añadir otras variables clínicas.

### Transferencia de materia fecal

Por el momento la única indicación para la transferencia fecal es la recidiva de la diarrea por *C. difficile*, donde lo que se busca es restaurar de una forma ecológica la diversidad bacteriana y la disbiosis causada por la diarrea y el patógeno. Las primeras guías recomendaban realizar la transferencia en la tercera recidiva; sin embargo, en una reciente revisión se recomienda su realización tras el segundo episodio de diarrea. En los casos en los que la transferencia no obtenga resultados inmediatos, se puede realizar una segunda transferencia en las mismas condiciones, y en el caso de que vuelva a fallar se puede volver a realizar, pero utilizando otro donante<sup>11</sup>.

Existen otras enfermedades donde la transferencia de materia fecal tiene un gran potencial terapéutico: la enfermedad inflamatoria intestinal, la obesidad, el síndrome metabólico, las enfermedades autoinmunes, las alergias, el síndrome de fatiga crónica y algunas enfermedades neuropsiquiátricas. Para todas estas enfermedades se han publicado estudios con transferencia de materia fecal, aunque los resultados no han tenido tanto éxito como en la diarrea por *C. difficile*. De todas ellas, la colitis ulcerosa es la que mejores resultados clínicos tiene, aunque parece que el éxito es dependiente del donante para cada paciente.

Los efectos secundarios de este procedimiento suelen ser escasos y poco relevantes. Recientemente se ha realizado una revisión de 50 publicaciones relacionadas con la transferencia fecal donde se pone de manifiesto que un gran número de pacientes presentaron efectos adversos<sup>12</sup>. Muchos de estos efectos secundarios están asociados a la vía de administración de la infusión, siendo la colonoscopia la vía más segura. Se han descrito casos de muerte por neumonía por aspiración, casi siempre ligados a la administración por tubo nasogástrico. Sin embargo, todos los estudios señalan que, por el momento, no se conocen los efectos adversos de la transferencia de heces a largo plazo. La ausencia de enfermedades transmisibles en el donante es un requerimiento imprescindible, y las guías internacionales recogen las afecciones que hay que descartar antes de aceptar a un donante. Básicamente, el estudio que se hace al donante es semejante al que se realiza en cualquier trasplante de órganos. Otra de las posibles aplicaciones de la transferencia de materia fecal es la descontaminación intestinal de pacientes colonizados por bacterias multirresistentes a los antibióticos. Por el momento se ha descrito la erradicación de enterococos resistentes a vancomicina, estafilococos resistentes a metilicina y *Klebsiella* spp. productora de carbapenemasa<sup>13,14</sup>.

### Elección de la muestra

Como se ha descrito anteriormente, cada zona de nuestro organismo alberga su particular microbiota y, por lo tanto, la muestra dependerá de la zona a estudiar. La gran mayoría de los estudios se centran en la microbiota intestinal, ya que es la más numerosa y la que más implicación tiene en nuestro estado de salud. Para el estudio de esta comunidad la muestra más utilizada son las heces por su sencilla obtención no invasiva. Las desventajas que tienen las heces son que no representan la totalidad de la microbiota adherida al epitelio intestinal y que las bacterias de los tramos intestinales más superiores pueden estar totalmente degradadas, impidiendo su correcta detección. En algunas afecciones, como la enfermedad inflamatoria intestinal, se pueden aprovechar las biopsias obtenidas durante las endoscopias rutinarias. La biopsia tiene la ventaja de ser una muestra más real, cuya obtención y conservación están más estandarizadas, aunque también tiene como inconvenientes su carácter invasivo, que únicamente recoge la

microbiota de un punto concreto, y que los enemas de preparación del paciente para la colonoscopia pueden modificar su composición. Por todo ello, la muestra que más se utiliza son las heces en lugar de la biopsia. Otra opción es utilizar exudados rectales, que reproducen perfiles de microbiota similares a los encontrados en heces. Esta muestra se obtiene de forma sencilla y se puede conservar inmediatamente al realizarse la toma en el propio centro. Además, esta muestra se utiliza actualmente en todos los hospitales para el estudio de los pacientes portadores de bacterias multirresistentes a los antibióticos con buenos resultados, aunque no está asegurada la total representación de la microbiota.

### Recogida, conservación y transporte

En el caso de que la muestra sean heces, las recomendaciones son recogerlas igual que para un coprocultivo y congelarlas inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ , aunque también son aceptables temperaturas superiores (hasta  $-20^{\circ}\text{C}$ ). La congelación previene posibles cambios en las comunidades microbianas hasta que se pueda realizar la extracción de ácidos nucleicos. La rapidez en la congelación es especialmente importante en el caso de que lo que se vaya a extraer sea ARN, porque se degrada fácilmente a temperatura ambiente. Las torundas rectales se pueden conservar hasta 2 h a temperatura ambiente en un tampón estabilizador sin impacto en la composición de la microbiota.

En el caso de que la muestra elegida sean las heces, el procedimiento más habitual es que los pacientes las recojan en su domicilio, las conserven refrigeradas ( $4^{\circ}\text{C}$ ) o congeladas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y las entreguen lo antes posible en el centro donde se van a procesar. Pueden existir factores que modifiquen los resultados finales, como la contaminación durante la recogida, el tiempo hasta que se congelan, la congelación a temperaturas no muy bajas o la descongelación durante el transporte al laboratorio. Cuando la muestra permanece a temperatura ambiente se puede alterar la composición de su microbiota, por lo que se recomienda su congelación inmediata. Otra posibilidad que se ha estudiado con buenos resultados es congelar la muestra en los 15 min siguientes a la defecación y conservarla hasta 3 días en el congelador del domicilio.

Dependiendo de cada centro, según el tipo de muestra y del tiempo que se vayan a conservar hasta su procesamiento, será necesario elegir el método más adecuado de acuerdo con diferentes criterios, que incluyen el coste, la disponibilidad, la dificultad de uso, el tiempo requerido para su manejo y si es compatible con otros métodos diagnósticos que se vayan a utilizar en esa misma muestra<sup>15</sup>.

### Procesamiento de la muestra: extracción de ácidos nucleicos

Dentro de una misma muestra pueden existir diferentes microambientes con variaciones en la composición de su microbiota, y por ello es muy importante realizar una buena homogeneización mecánica antes de comenzar el proceso de la extracción. También es muy importante disolver completamente la alícuota que se vaya a procesar de la muestra, habitualmente 0,5 g de heces en 5 ml de agua, mediante agitación en vórtex o con la utilización de bolitas de vidrio.

Sin duda, el paso más crítico de todo el proceso es la extracción y purificación de los ácidos nucleicos, habitualmente ADN, ya que se necesita conseguir una buena cantidad y calidad sin arrastrar sustancias que puedan inhibir las subsiguientes reacciones de PCR. Para la extracción existen diferentes protocolos comerciales y manuales con los que, en general, se obtienen buenos resultados.

## Método de secuenciación

Con el avance tecnológico en secuenciación masiva se han desarrollado nuevos métodos que pueden secuenciar directamente el ADN fragmentado o amplificado sin necesidad de clonar. Estos métodos de secuenciación se conocen como métodos de segunda generación y se agrupan en la definición de *next generation sequencing*. Los métodos de segunda generación tienen muchas ventajas, entre ellas un menor coste, una reducción del tiempo de preparación de las librerías y del proceso de secuenciación, una aceptable calidad de los datos y, sobre todo, la generación de una gran cantidad de secuencias.

La secuenciación masiva con métodos de segunda generación requiere un paso previo de amplificación por PCR que puede inducir a error, sobre todo por sobreestimar las poblaciones mayoritarias. Aun así, estas técnicas representan, en la actualidad, el estándar para el estudio de las comunidades microbianas, particularmente la microbiota humana. Entre los métodos de secuenciación de segunda generación se encuentran aquellos basados en la tecnología 454 de la empresa Roche, que fue pionera y que ya está fuera del mercado. Actualmente las tecnologías más habituales disponibles son Solexa, comercializada por Illumina, e Ion Torrent, comercializada por Thermo Fisher.

Para poder comparar los resultados de diferentes trabajos, es importante conocer las diferentes metodologías y sus sesgos. El proceso de PCR presenta limitaciones, ya que siempre se amplifica más lo más abundante, y se desprecian las poblaciones minoritarias. Es importante también elegir bien los cebadores que se van a utilizar. Los más utilizados amplifican la región V3-V4 del gen ADNr 16S, y fueron elegidos con base en su «universalidad» para la mayoría de las especies bacterianas, aunque recientemente se ha descrito que algunas especies de bifidobacterias y bacterias lácticas no se amplifican con estos cebadores por fallos en la hibridación.

En el estudio de la microbiota basado en la taxonomía del gen del ADNr 16S se cuantifica la abundancia relativa de cada filo, familia o género. Sin embargo, este método presenta un inconveniente importante, ya que este gen tiene diferente número de copias en cada género o especie. Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* tiene una única copia del gen, *Helicobacter pylori* tiene 2 copias, *Staphylococcus* tiene 7 copias y, finalmente, *Clostridium beijerinckii* tiene 14 copias.

A pesar de los posibles sesgos y limitaciones técnicas que existen en la secuenciación masiva, estas aproximaciones moleculares son herramientas muy poderosas, que suelen ser reproducibles y permiten determinar cambios estructurales en las comunidades microbianas. Por todo ello, la secuenciación masiva de segunda generación es considerada como la mejor opción para estudiar el microbioma humano.

La tercera generación de secuenciadores ya está también en el mercado con varios equipos en desarrollo. Los grandes avances que aportan son la secuenciación directa sin paso previo de amplificación por PCR y la longitud de las secuencias obtenidas, que puede llegar hasta varias kilobases. Sin embargo, una de sus desventajas es que tienen que mejorar la calidad de las secuencias que se obtienen. Entre estos métodos de tercera generación se encuentra el de Pacific Biosciences (PacBio), con el nuevo Sequel System, y el MinION, de Oxford Nanopore.

## Estrategias para la caracterización de la microbiota

1) Metataxonomía: es la estrategia más utilizada para caracterizar la composición y la cantidad relativa de las comunidades microbianas, y su evolución en función del tiempo o de otras variables clínicas. A partir de una muestra de heces a la que se extrae el ADN total, se amplifica el gen ADNr 16S con cebadores

universales y después se secuencian masivamente los amplificones. A cada secuencia se le asigna el grupo taxonómico mediante búsquedas en las bases de datos públicas como *Ribosomal Database Project*, y después se analizan los resultados con herramientas bioinformáticas, primero para validar la calidad (identidad  $\geq 98\%$ ) y longitud ( $\geq 200$  pb) de las secuencias. El orden habitual de análisis bioinformático incluye: a) control de calidad de las secuencias; b) eliminación de secuencias quiméricas; c) agrupamiento de las secuencias por características de similitud y solapamiento (*clustering*); d) asignación taxonómica, y e) análisis estadístico para determinar las diferencias significativas<sup>16</sup>.

En general, el proceso completo de secuenciación masiva suele quedar a cargo de los servicios de secuenciación, debido a la alta especialización técnica necesaria y a la limitación de la disponibilidad de los aparatos que se requieren para esta metodología. En estas unidades se ofertan los conocimientos y las habilidades necesarios para llevar a cabo la construcción de las librerías y la secuenciación de acuerdo con los estándares de cada tecnología elegida. A pesar de que el procesamiento final de los datos suele correr a cargo de un experto en bioinformática, siempre es necesario atribuir un sentido biológico y microbiológico a los resultados<sup>17</sup>.

- 2) Metataxonomía de la fracción activa. Los estudios de metataxonomía permiten conocer la composición de la microbiota sin diferenciar entre las bacterias vivas y las muertas, latentes o inactivas. La información funcional de las bacterias también es importante, ya que puede incidir directa o indirectamente en nuestra salud. Para poder identificar a las bacterias activas es necesario extraer el ARN de la muestra, transformarlo en ADNc mediante retrotranscripción y, finalmente, secuenciarlo. De esta forma solo se identifican las bacterias que se están dividiendo. Las técnicas y tecnologías para el estudio son las mismas que en el caso de la metataxonomía, salvo que en este caso el material de partida es la molécula de ADNr 16S.
- 3) Metagenómica. Este abordaje está basado en la secuenciación masiva de ADN o ARN (o ADNc) para estudiar cómo las alteraciones en la composición microbiana influyen en el contenido de genes y la expresión de los mismos. Este método, desarrollado en los años 1980 y 1990, es conocido como *shot-gun* y permite leer las secuencias de fragmentos de ADN o ARN sin amplificación previa. Es un método que requiere una mayor computación de los datos y eso suele encarecer el proceso. El conjunto de todos estos fragmentos se considera representativo del conjunto de los genomas bacterianos presentes en la microbiota original. La secuenciación de metagenomas permite obviar el importante sesgo introducido por el proceso de PCR, ya que los fragmentos obtenidos se seleccionan al azar sobre el total de los genomas presentes en la muestra original<sup>18</sup>.
- 4) Metabólica. Esta estrategia aborda la identificación y caracterización de los metabolitos desde un punto de vista funcional<sup>19</sup>. La determinación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos se considera como uno de los mejores marcadores de la actividad microbiana, ya que son el producto final de una reacción metabólica, independientemente de qué microorganismos o qué número de enzimas participan en ella. El análisis metabólico de una muestra como son las heces se complica mucho ya que no solo contiene los productos metabólicos de los microorganismos y de las células epiteliales, sino que también recibe un flujo constante de sustancias con la ingesta de alimentos. Desde el punto de vista de la química analítica, para el análisis de metabolomas se requieren 2 tipos de herramientas: la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas. Además, independientemente de las técnicas, hay 2 tipos de enfoque en metabólica: dirigido y no dirigido, según se conozca o no la naturaleza del metabolito que se quiere identificar y/o cuantificar.

Los metabolitos bacterianos más estudiados en las heces son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), originados en la fermentación bacteriana de los hidratos de carbono complejos de la dieta (fibra y almidón). Los principales AGCC que se detectan en las heces son el acético, el propiónico y el butírico (> 90% de todos los AGCC), pero también hay otros ramificados, el ácido isobutírico y el ácido isovalérico, que son minoritarios (representan en torno al 5% del total) y derivan principalmente del metabolismo de proteínas y aminoácidos, habiendo sido menos estudiados en general que los mayoritarios.

La mayor parte de los AGCC producidos en el colon se absorben en la mucosa colónica mediante difusión y transportadores específicos. Mientras que el epitelio del colon consume casi por completo el butírico, el cual constituye la principal fuente de energía para los colonocitos, el acético y el propiónico pasan a la circulación portal y se utilizan como precursores en el hígado o en los tejidos periféricos para la gluconeogénesis hepática y la lipogénesis. Los AGCC tienen una gran importancia en la fisiología y nutrición del tracto gastrointestinal, presentando propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas. Así, el butírico se ha relacionado con la reversión de células neoplásicas, pudiendo participar en la prevención de procesos cancerígenos.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

1. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome*. 2015;3:31.
2. Cho I, Martin J, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13:260–70.
3. Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The human gut microbiome in health and disease. *Integr Med (Encinitas)*. 2014;13:17–22.
4. Sangster W, Hegarty JP, Schieffer KM, Wright JR, Hackman J, Toole DR, et al. Bacterial and fungal microbiota changes distinguish *C. difficile* infection from other forms of diarrhea: Results of a prospective inpatient study. *Front Microbiol*. 2016;7:789.
5. Logares R, Sunagawa S, Salazar G, Cornejo-Castillo FM, Ferrera I, Sarmiento H, et al. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environ Microbiol*. 2014;9:2659–71.
6. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014;6:237ra65.
7. Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med*. 2016;375:2369–79.
8. Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM, Wilmes P. The human gut microbiome in health: Establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environ Microbiol*. 2016;18:2103–16.
9. Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci*. 2013;36:305–12.
10. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci*. 2017;20:145–55.
11. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*. 2017;66:569–80.
12. Wang S, Xu M, Wang W, Cao X, Piao M, Khan S, et al. Systematic review: Adverse events of fecal microbiota transplantation. *PLoS One*. 2016;11:e0161174.
13. García-Fernández S, Morosini MI, Cobo M, Foruny JR, López-Sanromán A, Cobo J, et al. Gut eradication of VIM-1 producing ST9 *Klebsiella oxytoca* after fecal microbiota transplantation for diarrhea caused by a *Clostridium difficile* hypervirulent R027 strain. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86:470–1.
14. Laffin M, Millan B, Madsen KL. Fecal microbial transplantation as a therapeutic option in patients colonized with antibiotic resistant organisms. *Gut Microbes*. 2017;6:1–4.
15. Hsieh YH, Peterson CM, Raggio A, Keenan MJ, Martin RJ, Ravussin E, et al. Impact of different fecal processing methods on assessments of bacterial diversity in the human intestine. *Front Microbiol*. 2016;7:1643, eCollection 2016.
16. Comeau AM, Douglas GM, Langille MG. Microbiome helper: A custom and streamlined workflow for microbiome research. *mSystems*. 2017;2(1), pii:e00127–16.
17. Vincent AT, Derome N, Boyle B, Culley AI, Charette SJ. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods*. 2016. pii: S0167-7012(16)30031-8.
18. Xie H, Guo R, Zhong H, Feng Q, Lan Z, Qin B, et al. Shotgun metagenomics of 250 adult twins reveals genetic and environmental impacts on the gut microbiome. *Cell Syst*. 2016;3:572–84.
19. Ferrer M, Martins dos Santos VA, Ott SJ, Moya A. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: A multi-omic approach. *Gut Microbes*. 2014;5:64–70.