1. ¿qué clase de texto es: argumentativo, expositivo, literario, etc.?
2. ¿Cuál es el tema? : Rol de los microbios en la adaptación de los animales
3. ¿Quién lo escribe?
4. ¿Quién lo edita?
5. ¿De qué año es?
6. ¿A qué tipo de audiencia está dirigido?
7. ¿Cómo está construido y organizado?:
8. ¿Tiene partes y subpartes?
9. ¿Incluye gráficos, cuadros, ilustraciones?
10. ¿Tiene bibliografía? SI ¿Qué clase de fuentes reporta la bibliografía?
11. ¿es la tesis clara y razonada?
12. ¿Se puede estar de acuerdo con ella?
13. ¿Qué objeciones se le podrían plantear?
14. ¿Son los argumentos sólidos, pertinentes y coherentes?
15. ¿Podrían ser reforzados o refutados de algún modo?
16. ¿Se puede afirmar que las conclusiones son válidas según la evidencia aportada?
17. Es el uso de fuentes adecuado y riguroso?
18. ¿Es un texto relevante temáticamente para el campo de estudios en que se inscribe
19. ¿Está escrito de forma clara y organizada?
20. Tiene algún sesgo ideológico o político?

* Que ha aportado 16S rRNA based para análisis bacterial por varios años?
* Mayores longitudes con el 16S, permite una más resolución taxonómica en especies y niveles de análisis
* Criterios de asociación junto a 16S rRNA, se han agrupado basado en similitud para generar unidades taxonómicas operativas (OTU) y secuencias OTU representativas comparadas con bases de datos de referencia para inferir una taxonomía probable, si está bien, la suposición ahora histórica de que las secuencias de> 95% de identidad representan el mismo género, mientras que las secuencias de> 97% de identidad representan la misma especie1.
* Las secuencias 16S precisas y completas son de gran utilidad en muchas aplicaciones. Sin embargo, hasta hace poco tiempo, 16S precisos y completos las secuencias han estado más allá del alcance de alto rendimiento plataformas de secuenciación.
* La disponibilidad de tecnologías de tercera generación significa que la secuenciación de alto rendimiento del gen 16S completo se está convirtiendo en algo común. Secuencia de consenso circular (CCS) 3,4, combinada con sofisticados algoritmos de eliminación de ruido 5-8 para eliminar PCR y error de secuenciación, significa que ahora es posible discriminar entre millones de lecturas de secuencia que difieren en tan solo un nucleótido en todo el gen.
* Juntos, estos avances tecnológicos y metodológicos hacen que por primera vez se esté convirtiendo en posible explotar todo el potencial discriminatorio de 16S en una manera de alto rendimiento
* Pueden los alcance y los análisis de los polimorfismos 16S pueden resolverse in vivo. Microbioma las comunidades son a menudo complejas, existiendo en diversos procesos bioquímicos ambientes (por ejemplo, heces, saliva, esputo, etc.) y que contienen muchos cientos de taxones únicos cuya abundancia relativa abarca un amplio rango dinámico Clustering de secuencias 16S en OTU ha tenido históricamente dos propósitos:
  + Uno, ha eliminado variantes de secuencia de artefactos menores debido a Errores de secuenciación y amplificación por PCR al colapsar secuencias en grupos.
  + Dos-En segundo lugar, ha establecido estrechamente variantes de secuencia que existen entre taxones bacterianos relacionados.
* Las secuencias 16S varían a una velocidad menor que la del error encontrado en una plataforma de secuenciación particular.
* Cuantificar las variantes de secuencia exacta (ESV) es preferencial a los enfoques más tradicionales basados en OTU16. Esta asume que las ESV representan una forma más significativa unidad taxonómica que las OTU. Dado que la mayoría de las bacterias aislamientos que secuenciamos contenían múltiples copias variantes del 16S dentro de su genoma.

Subrayado David:

La secuencia para el análisis bacteriano utilizando el gen 16s ribosomalRNA recientemente se ha facilitado, en el artículo se pretende explorar este potencial mostrando las ventajas de “full length sequence reads” sobre secuenciación por subregiones. En principio, se revisa el potencial del gen 16s de proveer resolución taxonómica de especies y subespecies

VENTAJAS DE LA SECUENCIACIPON COMPLETA DEL GEN 16 S SOBRE LA UTILIZACIPON DE LAS REGIONES HIPERVARIENTES PARA LA DETERMIANCIÓN TAXÓNOMICA DE BACTERIAS A NIVEL DE ESPECIE Y SUBESPECIE

, puesto que, gracias a avances tecnológicos y metodológicos se ha podido realizar secuenciación de alta (producción/rendimiento(¿)) DESARROLLO TECNOLOGÍCO DE SECUENCIADORES DE ÚLTIMA GENERACIÓN CON READS MÁS LARGOS PARA IDENTIFICACIÓN DE SNP Y EL USO COMPLETO DE LAS REGIONES HIPERVARIANTES PARA DISMINUIR EL PORCENTAJE DE SEUCNEICAS SIN CLIADIFICA A NIVEL DE ESPECIE

DISCUTRI ACERCA DE COMO LA ASUNCIÓN DE QUE LAS LECTURAS DE SECUENCIAS QUE DIFIERAN EN UNO O VARIOS NUCLEOTIDOS REPRESENTAN RTAXONES DIFERENTES

que pueden llegar a detectar variaciones de un solo nucleótido SNPS a través del gen 16s completoPosteriormente, mediante diferentes experimento además, se discute la posibilidad de “resolve” datos relacionados de manera cercana “in vivo” teniendo en cuenta 16s SNPs (las variaciones de la base) intragenómicas LOS INVESTIGADORES REALIZAN 4 EXPERIMENTOS (DE QUÉ SON ¿)

se muestran ciertas ventajas, como la reducción en el porcentaje de secuencias sin clasificar, al comparar una secuenciación completa con una segmentada o el hecho que, acercamientos basados en OTUs tienen el potencial de diferenciar a nivel de especie diversidad en el intestino humano;

AQUÍ SE PLANTEA LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS QUE TIENE EL USO DE LOS OTUS FRENTE A ESV (OTU SON SUBESTIMADO Y ESV LOS SOBRESTIMA

DISCUTIR EL HECHO DE QUE LAS REGIONES V1 -V3 SON LOS REGIONES QUE MAS CERCA LOGRAR CARACTRIZAR EL NUMERO DE ESPECIES QUE SE ENCUENTRAN EN CONTRASTE CON LA REGIÓN V4 QUE, SEGÚN EN CLASE SE UTILIZA PARA CARACTERIZAR()

DISCUTIR ACERCA DE LA SLIMITACIONES QUE TIENE PACBIO Y DE COMO LOS AUTORES UNICAMENTE SE ENFOCAN EN LOS POLIMORFISMOS A NIVEL INTEGRNÓMICO CAUSADO POR LAS SUSTITUCIONES IGNORADNO LAS INSERCIONS E DELECCIONES (INDELS) JUSTIFICANDOSE EN EL HECHO QUE SU CONTIBUCIÓN ES MENOR.

DISCUTIR ACERCA DE LAS POSIBLES IMPLICACIONES QUE TENDRÍA AMPLIAR EL LÍMITE DE DETECCION A NIVEL DE ESPECIES DE UN 97% A UN 99% UTILIZANDO EL ENFOQUE OTU

We aligned PacBio full-length 16S sequences to a reference database containing a single representative 16S sequence for each member of our mock community and used the alignment statistics to evaluate the accuracy of this sequencing approach. Comparing the number of passes used to generate a CCS with the occurrence of single-nucleotide substitutions, insertions and deletions indicated that ten passes could minimize these combined errors to a minimum frequency of < 1.0%

is not valid to assume that high-throughput sequence reads differing by one or few nucleotides represent a distinct taxa

Preguntas random:

in vivo se refiere a todo el organismo? O dentro del organismo?

Pregunta para la crítica: ¿qué problemas se están presentando al decidir ignorar las inserciones y eliminaciones de la copia del gen 16s con tal de enfocarse en las sustituciones y cómo se podrían resolver en un futuro?

**Reseña crítica del artículo de investigación *“Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis”***

**Presentado por**

Carlos Andrés Díaz **- código: 202010343**

David León **- código: 201615216**

Cesar Patiño **- código: 201924259**

### En este artículo Jethro Johnson y sus colaboradores presentan en la prestigiosa revista Nature communications en el año 2019 una investigación acerca de la pertinencia del uso del gen completo ARN ribosomal 16S para la clasificación exitosa a nivel de especie y subespecie. Para esto se realizan cuatro experimentos tanto *in sillico* como *in vivo* empleando la tecnología de última generación PacBio, esto con el fin de obtener lecturas más largas y contrastarlas con los resultados obtenidos al emplear la tecnología de secuenciación ampliamente usada llamada Ilumina que hace uso de regiones hipervariantes del mismo gen para estudios taxonómicos. De esta manera critican algunas de las suposiciones comúnmente realizadas como el uso de las mutaciones de un solo nucleótido (SNP en inglés) para la diferenciación entre especies o el uso del límite de identidad para la agrupación de las secuencias en unidades operacionales taxonómicas (OTU en inglés) en un 97%, entre otros. El artículo resalta el uso de las regiones hipervariantes v1-v3 como regiones con las que se logra buena resolución a nivel de especie, también resalta la incapacidad de la región V4 en dicha labor. Concluye, entre otras cosas, que existen SNPs a nivel intragenómico en la misma especie mostrando el error de la suposición descrita anteriormente, plantea que el uso de OTU está ligado a tecnologías antiguas y de su posible reemplazo por las variantes de secuencias exactas (ESV en inglés) aunque también resalta el error causado por subestimar del primero y de sobreestimar del último.

Si bien el artículo resalta la utilidad de emplear completamente el gen ARN ribosomal 16S sin enfocarse en el uso particular de ninguna plataforma de secuenciación, la justificación que brinda acerca de la contribución a polimorfismos de origen intragenómico que tienen las inserciones y deleciones frente a las sustituciones presentes en las dos subespecies de *E coli* analizadas es poco clara pues no realiza una comparación directa, aprobando el uso de una y descartando el uso de las otras, además ignoran el hecho de que PacBio tiene sensibilidad suficiente para detectar errores a nivel de nucleótidos simples1. Por otro lado, no discute acerca de las posibles implicaciones que tiene la ampliación del límite de identidad para la agrupación de las secuencias de un 97% al 99% y remarcan superficialmente la relación existente entre el género *bacteroides* y las especies y subespecies descritas por el experimento que hacen significativos los hallazgos reportados.

Preguntas / curiosidades para la crítica David:

* ¿Cuándo se usa Oxofrd Nanopore se presentan las mismas “limitaciones de plataforma” que en PacBio o son limitaciones distintas? Pg2. Columna Izquierda
* Teniendo en cuenta que se deciden ignorar errores específicos de la plataforma PacBio, ¿Sería bueno usar ambas plataformas de secuenciación para comparar los datos obtenidos no solo entre full length y short read, sino entre PacBio y Nanopore?
* Ya que se necesitan 10 pases para reducir el error a una frecuencia menor del 1%, ¿Cuál es el costo asociado a realizar estos pases y cómo se compara con los costos de short reads? Pd4. Columna izquierda
* Ya que se considera ESVs como una unidad taxonómica más representativa que OTUs, ¿se prevé abandonar el uso de OTUs en favor de ESVs o hay ocasiones donde el uso de OTUs es más beneficioso?