



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estandarizar el procesamiento de muestras de lavado bronquiolo  
alveolar para definir el microbioma en pacientes con tuberculosis  
pulmonar.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**Arely Lechuga Jiménez**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. María Teresa Herrera Barrios**

**2016**

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Jurado asignado**

**Propietario: Dr. Joel Armando Vázquez Pérez**

**Propietaria Dra. Silvia Guzmán Beltrán**

**Propietaria Tutora: Dra. María Teresa Herrera Barrios**

**Suplente: Dra. Esmeralda Juárez Carvajal**

**Suplente: Dra. Yolanda González Hernández.**

*Cuando un hombre de ciencia busca conocimientos, aun no hallándolos en su totalidad,  
descubre fragmentos muy importantes, que son precisamente los que constituyen la  
ciencia.*

*-Claude Bernard-*

*El aprendizaje es un simple apéndice de nosotros mismos; dondequiera que estemos, está  
también nuestro aprendizaje.*

*-William Shakespeare-*

## *Agradecimientos*

*A mis padres Rosalba y Angel por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios en el ámbito que más me apeteció y por brindarme todo su apoyo.*

*A mi hermano Iván por todo su apoyo.*

*A la Dra. María Teresa Herrera Barrios por haberme permitido realizar mi trabajo bajo su tutela y apoyo.*

*A mis familiares, tíos, primos, y amigos por haberme ayudado a crecer como persona y brindarme su apoyo en todo momento.*

*Al personal del laboratorio de Microbiología del INER por haberme brindado su apoyo y conocimiento en la realización de mi trabajo.*

*Al Dr. Joel Vázquez y a su alumno Iván Romero del departamento de Virología del INER por habernos brindado su apoyo y conocimiento en la realización del trabajo.*

*A mis profesores quienes me han guiado en este largo camino del conocimiento y desarrollo personal.*

*Al INER y a la Facultad de Ciencias de la UNAM por concederme las facilidades para realizar mis estudios de licenciatura y mi posterior trabajo para obtener mi grado.*

## *Dedicatorias*

*Primero que nada a mis padres quienes siempre me han apoyado y me han ayudado a superar los obstáculos que se han presentado a lo largo de mi vida, a estas dos personas que siempre ha procurado el bienestar de mi hermano y mío. A mi madre quien ejerció una gran fuerza que me ayudo a concluir rápidamente mi trabajo. A mi padre que siempre me ha ayudado y proporcionado los medios necesarios para seguir adelante. A estas dos personas que han servido de ejemplo y motivación para no rendirme y fijarme cada día metas más altas.*

*A mi hermano quien ha compartido su vida conmigo.*

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Abreviaturas	7
Resumen	8
Introducción	9
El microbioma humano	9
La microbiota del paciente con TB	10
Ácidos nucleicos	11
Extracción de ADN	13
El ARN ribosomal en el estudio del microbioma	13
La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
Análisis de productos de amplificación por electroforesis en geles de Agarosa.	17
Secuenciación de ácidos nucleicos.	18
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Metodología	23
Concentración de la muestra de Lavado Bronquiolo Alveolar (LBA)	24
Extracción y cuantificación de de ADN bacteriano	24
Amplificación de fragmentos de ARN ribosomal 16S	25
a) V3V4	
b) 16s	
Análisis de los fragmentos amplificados	28
Secuenciación	29
Resultados	30
Discusión	47
Conclusiones	50
Anexos	51
Preparación del chip de ADN	51
Preparación de un gel de Agarosa al 2%	51
Solución amortiguadora TBE 10x	51
Glosario	52
Referencias	53

## Abreviaturas

HMP	Por sus siglas en inglés. Human Microbiome Project. Proyecto del Microbioma Humano
TB	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis pulmonar
ARN	Ácido Ribonucleico
ADN	Acido Desoxirribonucleico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
LB	Lavado bronquial
LBA	Lavado bronquiolo alveolar
rARN	ARN ribosomal
rADN	ADN ribosomal
OMS	Organización Mundial de la Salud
BALF	Por sus siglas en inglés. Bronchoalveolar Lavage Fluid. Fluido del Lavado Bronquiolo Alveolar
pb	Pares de bases
V3V4	Región Variable V3-V4
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato



## Resumen

El estudio del microbioma humano inicia con la caracterización de las poblaciones bacterianas denominada “flora normal” presentes en algunos sitios del cuerpo humano como son: boca, piel y vagina. Actualmente se está considerando al pulmón como parte de estos sitios con biota y no una zona estéril como se pensaba. Esto ha sido posible con el desarrollo de la Biología Molecular que ha proporcionado nuevos métodos para la identificación bacteriana como son: la extracción de material genético, la técnica de la PCR, la electroforesis, la secuenciación y la bioinformática. La secuenciación masiva aplicada al conocimiento del microbioma humano en estado de salud y enfermedad han demostrado la amplia diversidad y complejidad de la microbiota en diferentes partes del cuerpo humano.

Una de las enfermedades infecciosas de interés en el estudio del microbioma es la tuberculosis pulmonar (TBP), causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Ésta representa la segunda causa de muertes por enfermedades infecciosas a nivel mundial y resulta interesante conocer las interacciones de la microbiota con su hospedero. En pacientes con TBP, la muestra más accesible en su obtención es la expectoración, pero tiene la desventaja de estar contaminada por la microbiota de la boca. Considerando que el tipo y calidad de la muestra son fundamentales para este tipo de estudios, el objetivo del presente trabajo es estandarizar las condiciones para procesar las muestras de lavado bronquiolo alveolar (LBA) y lavado bronquial (LB) de pacientes con TBP para poder definir el perfil del microbioma pulmonar.

Métodos: Por broncoscopia se obtuvieron las muestras de LBA y LB de pacientes con TBP. Se utilizaron 0.2ml y 10ml de las muestras, esta última se concentró por centrifugación. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN con el kit QIAamp® cador® Pathogen de Qiagen y se hizo la cuantificación del ADN, que fue utilizado para amplificar por PCR dos fragmentos del rARN bacteriano 16S, la región hipervariable V3V4 y el 16S completo. En este proceso se estandarizaron las condiciones de amplificación como: concentración de ADN, primers y número de ciclos de amplificación.

Resultados: Los resultados mostraron que se requieren 10ml de LBA o LB y concentrar la muestra por centrifugación, para posteriormente llevar a cabo la extracción de ADN incluyendo en este proceso una incubación a 55°C para favorecer la liberación del ADN.

Conclusiones: Las condiciones estandarizadas para amplificar ambos fragmentos incluyen utilizar 100ng de ADN, 10µM de cada primer y 35 ciclos de amplificación. Esto permite la amplificación de ambos fragmentos para llevar a cabo la secuenciación masiva y conocer el perfil del microbioma pulmonar en pacientes con TBP.

## INTRODUCCIÓN

### El Microbioma humano.

El estudio del microbioma humano se inició en el 2008 por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos con el Proyecto del Microbioma Humano (HMP, Human Microbiome Project), con el objetivo de caracterizar las poblaciones bacterianas presentes en diversos sitios del cuerpo y hacer la correlación con el estado de salud y enfermedad. Inicialmente en el estudio se incluyeron las partes del cuerpo como: el intestino, la cavidad oral, la piel y la vagina, posteriormente se agregó el pulmón [1]. El microbioma se define como las poblaciones de microorganismos presentes en un nicho, sus genomas y sus metabolitos, mientras que la microbiota son únicamente las poblaciones bacterianas [2, 3].

Cabe mencionar que a lo largo de la historia, para estudiar las comunidades microbianas se utilizan técnicas microbiológicas básicas, que consisten en aislar y cultivar a los microorganismos en medios enriquecidos y selectivos; sin embargo, esto representa una limitante ya que muchos de los microorganismos que habitan el cuerpo humano no son cultivables hasta el momento [2, 4, 5]. Aproximadamente más del 70% de las especies bacterianas que habitan el cuerpo humano no son cultivables por técnicas microbiológicas tradicionales [6, 7]. Actualmente, con el desarrollo de la biología molecular han surgido nuevas técnicas para el estudio del material genético de estos microorganismos [2] siendo una de ellas la secuenciación de los genes del ARN ribosomal (rARN) bacteriano 16S [5, 8].

Los estudios realizados por el HMP han producido 2.3 terabytes de datos del metagenoma del rARN 16S de distintas partes del cuerpo humano como: encías, mejillas, paladar, amígdalas, saliva, placa subgingival, placa supragingival, garganta, lengua, narinas, fosas antecubitales izquierda y derecha, pliegue retroauricular derecho e izquierdo, tracto gastrointestinal, heces, tracto urogenital y vagina. [1, 2].

El pulmón fue el último en considerarse dentro del HMP porque se consideraba una zona estéril en el estado de salud [9, 10], sin embargo, los estudios de secuenciación de ADN en modelo de ratón y en estudios de trasplante en pulmón estéril, han demostrado que existe un microbioma pulmonar en el estado de salud. Además han surgido diversos trabajos que abordan la caracterización del microbioma pulmonar en enfermedades como: fibrosis quística, enfermedad crónica obstructiva, fumadores y en la tuberculosis (TB) [11-20].

La existencia del microbioma en el pulmón es apoyada por los trabajos de Charlson y colaboradores en muestras de cavidad oral y LBA en personas sanas y también en trasplantes de pulmón se ha demostrado la presencia de bacterias en el tracto respiratorio alto y bajo, concluyendo que existe continuidad topográfica en la

diversidad bacteriana es decir, el tracto respiratorio posee una microbiota homogénea que únicamente disminuye en biomasa del tracto respiratorio alto al tracto respiratorio bajo [13, 21, 22].

### **La microbiota del paciente con TB.**

De acuerdo a los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) un tercio de la población mundial tiene TB latente, y con ello el riesgo de desarrollar la enfermedad en forma activa. De la población infectada se ha estimado que del 5-10% de las personas con TB latente desarrollaran la TB en forma activa y esto se ha incrementado en personas con un sistema inmune deficiente como son las personas infectadas con VIH, diabetes mellitus, cáncer y tratamiento con inmunosupresores [23]. De acuerdo a los reportes de la OMS en el 2015 se registraron 9,6 millones de nuevos casos de TB en el mundo, de los cuales, 1.5 millones murieron a causa de esta enfermedad la TBP ocupa el segundo lugar en causar muertes asociadas a un patógeno [24].

Hasta el 2016, se han publicado cinco trabajos con el objetivo de definir el microbioma presente en pacientes con TBP, utilizando la muestra de expectoración. Cui y colaboradores, analizaron el microbioma pulmonar en pacientes con TBP amplificando la región hipervariable V3 del rARN 16S, a diferencia de los trabajos de Botero, Wu y Cheung quienes amplificaron la región V1-V2 para la secuenciación [15, 18-20], mientras que Krishna y colaboradores analizaron la región hipervariable V6- V7 [25]

La microbiota en enfermedades parece modificarse, uno de los factores que altera la microbiota pulmonar es la tuberculosis pulmonar (TBP). En 2012 Cui y colaboradores encontraron que la microbiota de la expectoración de los pacientes con TBP es más diversa que las personas sanas, también encontraron que algunas bacterias como *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Thermus*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Diapobacter*, *Comamonas* y *Mobilicoccus* son únicas de pacientes con TBP; el estudio fue realizado en Shanghai, China [15].

Otro estudio realizado en 2013 Wu y colaboradores [19] estudiaron muestras de expectoración de pacientes chinos con TBP recién diagnosticados, TB recurrentes y pacientes con fracaso al tratamiento y concluyeron que el microbioma de personas sanas es más diverso que en los grupos de pacientes con TB contrario a los hallazgos de Cui. Por lo tanto, los géneros bacterianos identificados están asociados a una categoría de la TB y pueden influir en la progresión de la enfermedad y su tratamiento. En este estudio se encontró que los géneros bacterianos *Streptococcus*, *Gramulicatella* y *Pseudomonas* son más abundantes en pacientes con TBP mientras que los géneros *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Treponema*; *Catonella* y *Coprococcus* eran menos abundantes en los pacientes con TB en comparación con las personas sanas.

En ese mismo año Cheung y colaboradores evaluaron y concluyeron que la diversidad microbiana en expectoración es similar entre pacientes con TBP y en personas sanas,

ellos encontraron que los géneros *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacterioidetes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria* componían el 98% de las comunidades microbianas, de estos cinco géneros, las *Proteobacterias* y los *Bacterioidetes* se encontraban mejor representados en pacientes con TB mientras que los *Firmicutes* eran más predominantes en las personas sanas de Hong Kong, China [20].

En 2014, Botero y colaboradores mostraron que las comunidades microbianas encontradas en muestras de expectoración y muestra de orofaringe de pacientes con TBP y personas sanas son similares en cuanto a las Phylas identificados, pero la diversidad bacteriana es mayor en muestras de expectoración, encontrando que los *Firmicutes*, *Bacterioidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria* son los más abundantes. Además, encontraron y clasificaron secuencias pertenecientes al reino Fungi y la mayoría de dichas secuencias pertenecen a los *Ascomycota* y *Basidiomycota* [18].

Recientemente, en el 2016 Krishna y colaboradores estudiaron pacientes con TBP y personas sanas y concluyeron de que la muestra de expectoración de los pacientes de la India es diferente a los sanos, la presencia de patógenos oportunistas en la microbiota de los pacientes con TBP incrementa la complejidad y diversidad de la microbiota de la expectoración, también concluyeron que la expectoración de los pacientes en India es más diverso y significativamente diferente a los reportados en estudios recientes realizados en la población china, debido a la geografía, ecología y factores socio-económicos. Las secuencias fueron clasificadas en cinco phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacterioidetes*. En las muestras de pacientes con TBP la abundancia de *Actinobacterias* y *Firmicutes* fue mayor que las personas sanas mientras que las *Proteobacterias* y *Fusobacterias* están mejor representadas en las personas sanas y los *Bacterioidetes* se encontraban en abundancia similar en ambos grupos. Por último la presencia de patógenos oportunistas en la microbiota de los pacientes con TBP incrementa la complejidad y diversidad de la microbiota de la expectoración [25].

Los estudios mencionados se han realizado en las muestras de expectoración, y han encontrado bacterias propias de la cavidad oral. Por otra parte, algunos autores han realizado comentarios sobre la calidad de la muestra de los voluntarios sanos que prácticamente corresponde a la saliva, mencionando ellos mismos que la muestra idónea es el LBA, pero para su obtención se requiere de un método invasivo con cierto grado de riesgo.

### **Los Ácidos nucleicos**

La comparación de las secuencias de rARN es una herramienta para deducir relaciones filogenéticas y evolutivas entre las bacterias, arqueobacterias y organismos eucariotas [26]. En el área de la metagenómica la identificación y descubrimiento de microorganismos patógenos y se basa en el análisis de los ácidos nucleicos [27].

Autor	Mayor diversidad microbiana			Año
	Personas sanas	Pacientes TB	Ambos	
Cui y col.		X		2012
Wu y col.	X			2013
Cheung y col.			X	2013
Botero y col.		X		2014
Krishna y col.	X			2016

**Tabla 1: Resumen de los trabajos de microbiota en TBP.** Comparación de la diversidad microbiana en esputo de pacientes con TBP encontrada por diferentes autores en los años de 2012-2016. Las X indican la población con mayor diversidad bacteriana.

Existen dos tipos de ácido nucleico, el ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN), el primero consta de una cadena polimérica mientras que el segundo es una doble cadena, formadas por unidades monoméricas que están conectadas por enlaces covalentes y por puentes fosfodiéster. En ambos casos, las unidades monoméricas contienen un azúcar de cinco carbonos, la ribosa en el ARN y la 2'-desoxirribosa en el ADN, una base nitrogenada el ADN contiene Adenina, Timina, Guanina, Citocina y en el ARN se cambia la Timina por un Uracilo, y un grupo fosfato [28-30].

En 1920, se identificó el ADN y las proteínas como principales componentes químicos de los cromosomas, los cuales contienen los genes [31]. Entre 1944 y 1952, una serie de experimentos identificaron al ADN como material genético [28]; en 1944 Avery, MacLeod y McCarty aportaron pruebas experimentales demostrando que el ADN era el portador de la información genética en las bacterias [31] y en 1953 James Watson y Francis Crick propusieron una estructura para el ADN la cual consistía en una doble hélice constituida por dos cadenas anti-paralelas, conformado de 10 pares de bases por vuelta y el apareamiento entre dichas bases es: Adenina – Timina y Guanina – Citosina, dicho descubrimiento abrió todo un mundo nuevo para la biología molecular [28, 30].

La importancia vital de los ácidos nucleicos, es que en ellos se almacena y transmite la información genética de cada célula, tejido u organismo [28]. Una vez que se comprobó que el ADN transporta la información genética, el siguiente paso fue descifrar su estructura y el mecanismo mediante el cual la información almacenada se expresa para dar lugar al fenotipo observable. En años posteriores se descubrió como aislar y hacer copias de regiones específicas de la molécula de ADN, abriendo el camino para la era de la tecnología del ADN recombinante [31].

En la década de 1970 se descubrieron las enzimas de restricción, las cuales, fueron utilizadas en el laboratorio para cortar el ADN de cualquier organismo en secuencias nucleotídicas específicas, dando lugar a una serie de fragmentos reproducibles; y la clonación se basa en este proceso de producción de un gran número de copias de los fragmentos de ADN. Una vez obtenidos grandes cantidades de fragmentos de ADN

específicos se pueden utilizar: para aislar genes, para estudiar su organización y expresión y para estudiar su secuencia de nucleótidos [31].

### **Extracción de ADN**

La extracción y purificación de ADN es el primer paso para realizar trabajos de biología molecular. Esta macromolécula fue aislada por primera vez en 1869 por el médico alemán Friedrich Miescher [29], la extracción puede realizarse a partir de varios tipos de materiales biológicos. El ADN a trabajar debe estar evaluado en cantidad, calidad y pureza para ello es necesario separarlo del resto de los componentes celulares y del material no biológico que esté presente [32, 33].

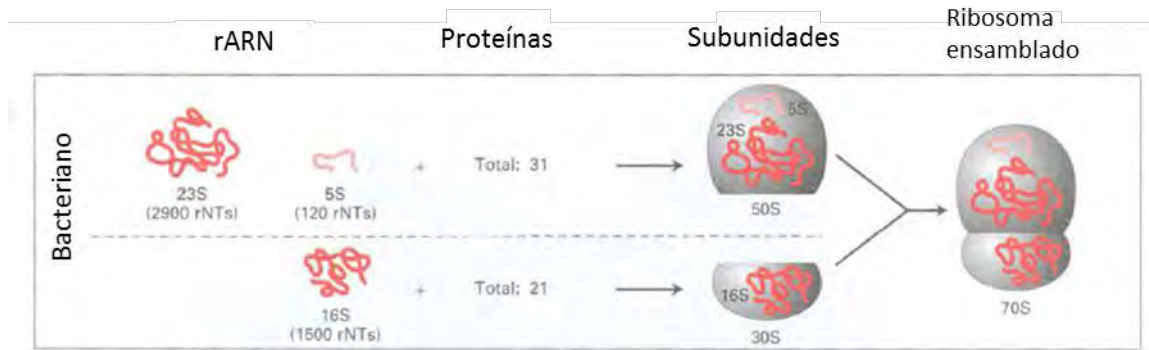
Los protocolos de extracción en general buscan eliminar o diluir potentes inhibidores de PCR (grupos hemo, ADNasas, ARNasas, alcoholes etc.). El proceso general de aislamiento involucra tres pasos: 1) la lisis de las membranas celulares, mediante el uso de amortiguadores específicos y altas temperaturas (algunos métodos usan soluciones acuosas en presencia de agentes quelantes que inhiben la acción de las nucleasas) habitualmente se utilizan métodos de homogenización; 2) la degradación de las proteínas mediante las proteasas (como la pronasa o proteinasa K, que ayudan a liberar el ADN de la cromatina y son activas contra un amplio espectro de proteínas nativas y/o sales saturadas y detergentes; 3) la extracción del ADN y su precipitación mediante el uso de alcoholes (una vez que el ADN es liberado en el contenido citoplasmático se solubiliza con un detergente y las proteínas se desnaturalizan y precipitan usualmente con fenol, alcohol isoamílico o una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico) para poder ser separadas por centrifugación [32, 33].

Existen metodologías para la extracción adecuada de ADN entre las que encontramos: el método de gradientes de centrifugación con cloruro de cesio/Bromuro de etidio, método de CTAB (**C**etyl **T**rimethyl **A**mmonium **B**romide), método de la proteinasa y de las mini-preparaciones. En la década de los 90 se empezó a utilizar kits para la extracción de ADN, que disminuyen el tiempo de extracción ya que incluyen soluciones de lisis, unión y lavado, facilitando el procedimiento garantizando un alto grado de pureza. Dichos kits utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente, con las cuales, se retiene varios microgramos de ADN, separándolos así de las demás biomoléculas [33, 34].

### **El ARN ribosomal en el estudio del microbioma**

Los ribosomas son los lugares de síntesis de proteínas y son los organelos más abundantes en las células. Se ha estimado que una célula bacteriana puede contener unos 20,000 ribosomas representando aproximadamente el 80% del total del ARN celular [35]. En los procariontes cada ribosoma está formado por dos subunidades 30S y 50S, que al unirse dan lugar a los ribosomas 70S. La subunidad 30S es alargada y asimétrica y la 50S es más gruesa [36].

Como se muestra en la Figura 1 cada subunidad ribosómica es un complejo ribonucleoproteico formado por ARN ribosómicos específicos y proteínas. La subunidad 30S contiene rARN 16S y 21 proteínas mientras que la subunidad 50S contiene rARN 5S y 23S y 31 proteínas [37].



**Figura 1: Estructura del Ribosoma.** Ribosoma bacteriano 70S formado por las subunidades 50S y 30S (Tomado de Lodish et al, 2013)

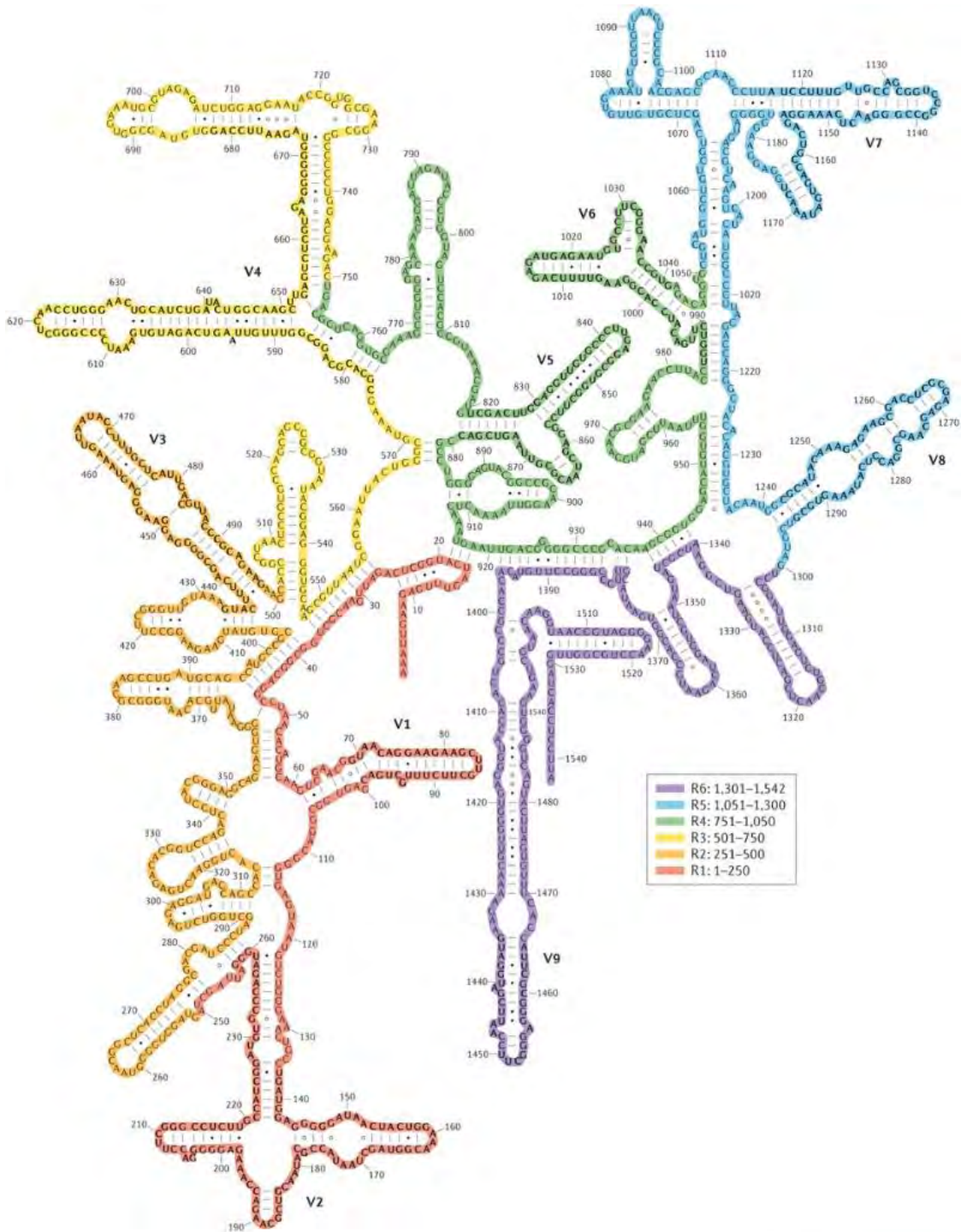
La molécula de ARN ribosomal 16S está compuesta de una cadena de aproximadamente 1550 nucleótidos en los que se encuentran 9 regiones hipervariables (V1-V9) rodeadas de 9 regiones altamente conservadas (C1-C9) como se muestra en la Figura 2 [36, 38]. El ADN ribosomal 16S es utilizado en la identificación molecular debido tanto a sus regiones variables específicas de cada especie y a su distribución universal entre las bacterias [39], además de que sus genes se encuentran altamente conservados tanto en bacterias como en otros reinos [40].

Para estudiar la filogenia y taxonomía molecular de los microorganismos se utilizan los genes que codifican el 16S rARN. Estos genes se han utilizado para el análisis evolutivo basado en secuencias porque: 1) están distribuidos universalmente, 2) son estables en su función, 3) están conservados y 4) tiene la longitud adecuada que minimiza las fluctuaciones estadísticas [37, 41].

En taxonomía, el gen del 16S rARN también es bastante útil y se ha utilizado para la identificación y descripción de nuevas especies. En bacterias, se considera que son especies diferentes cuando el grado de diferencia de la secuencia del gen del rARN 16S difiere en un 3% y para nivel de género es del 5% [37].

Desde el surgimiento de la técnica de PCR se han amplificado el 16S [26, 42-47] y sus regiones hipervariables V1-V9 [45, 47, 48] para la identificación y detección de especies bacterianas. Tanto para el rADN y el rARN 16S, los primers están localizados en las regiones altamente conservadas. [38, 48]





**Figura 2: Estructura secundaria del ARN ribosomal 16S de *Escherichia coli*.** El gen 16S está formado por 9 regiones conservadas y 9 regiones variables que se muestran en distintos colores (Tomado de Nature Reviews Microbiology 12,Pages:635–645(2014)).

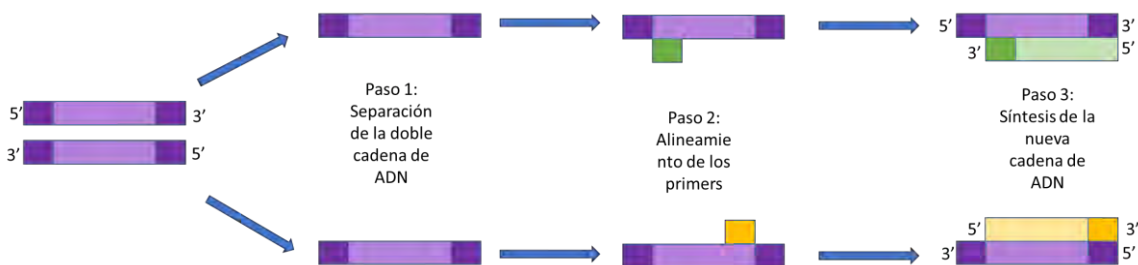
La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).



Con la llegada de la era del ADN recombinante en los 70's se revolucionó la investigación en las áreas de la genética, biotecnología y biología molecular. Sin embargo, la clonación del ADN mediante vectores y células huésped requiere mucho trabajo y tiempo. En 1986 se desarrolló la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) acelerando el ritmo en la investigación en biología. Concediendo el premio nobel de Química a su desarrollador Kary Mullis en 1993 [31, 49].

La técnica de PCR permite sintetizar *in vitro* secuencias específicas de ADN, millones de copias a partir de una región seleccionada de un genoma, En primer lugar se utilizan porciones de la secuencia que delimitan la región que va a ser amplificada, para diseñar dos oligonucleótidos sintéticos denominados también “primers o iniciadores” de ADN, cada uno de los cuales es complementario al templete de ADN, y que corresponden a sitios opuestos de la región a amplificar. Estos oligonucleótidos se utilizan como iniciadores para la síntesis *in vitro* del ADN, las reacciones de síntesis son llevadas a cabo por la ADN polimerasa, y determinan los extremos del fragmento final de ADN [31, 49, 50].

El proceso se lleva a cabo en tres etapas como se muestra en la Figura 3, La primera etapa consiste en la separación de las dos cadenas de ADN genómico, para ello cada ciclo de reacción requiere una temperatura de desnaturalización, por lo tanto, es necesaria una ADN polimerasa que sea termo-estable a temperaturas elevadas, esta enzima ha sido aislada de una bacteria termófila (*Thermus aquaticus*) [51]. En la segunda etapa, es necesario un enfriamiento en presencia de un exceso de los dos primers permitiendo su hibridación específica con las secuencias complementarias de ADN templete. Por último, en la tercera etapa la mezcla se incuba con la ADN polimerasa y los cuatro desoxi-ribonucleosidos trifosfatados (dNTPs), de forma que las regiones del ADN que se hallen en dirección 3' se sintetizan selectivamente [49, 50]. Al final se tiene la acumulación de millones de fragmentos de ADN de un peso molecular específico que puede ser evidenciado una vez que es sometido a electroforesis.



**Figura 3: Amplificación de un fragmento de ADN por PCR.** La reacción de PCR consta de tres pasos, el primero es la separación de la doble cadena de ADN, seguido de la alineación de los primers y finaliza con la síntesis de la nueva cadena de ADN. (Modificado de Alberts et al, 2002)

#### **Análisis de productos de amplificación por electroforesis en geles de Agarosa.**

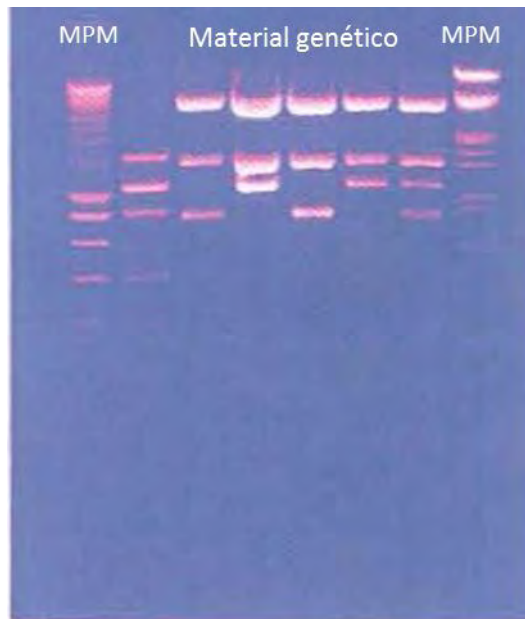
Ya que se ha realizado la amplificación de los fragmentos de ADN mediante PCR es necesario evidenciar la amplificación, una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis [31].

Durante los primeros años de la década de los 70's se descubrió que se podía determinar con exactitud la longitud y la pureza de los fragmentos de ADN utilizando una técnica llamada electroforesis. En este análisis se utilizan geles porosos formados por agarosa o por poliacrilamida. Las bandas de ADN serán invisibles a menos que el ADN este marcado o teñido con colorantes fluorescente como el bromuro de etidio que tiene la propiedad de intercalarse en la parte central del ADN y al ser iluminado con luz UV se observa la fluorescencia permitiendo la visualización de los fragmentos [50, 52]. Actualmente se ha sustituido el bromuro de etidio que es mutagénico, por colorantes como el GelRed, el cual es un colorante fluorescente que es amigable con el medio ambiente y no tiene propiedades cancerígenas [53].

La electroforesis permite hacer la separación de los fragmentos de ADN o ARN de acuerdo a su tamaño y su carga neta bajo un campo eléctrico.

Si dos moléculas tienen la misma forma y masa similares, la que tenga una mayor carga neta migrará más rápidamente hacia el electrodo de polaridad opuesta. Las moléculas más pequeñas migran a través del gel a una velocidad mayor que las más grandes; la clave está en la matriz (los poros) del gel, la cual restringe en mayor proporción la migración de las moléculas grandes que la migración de las moléculas pequeñas. Al finalizar la electroforesis las bandas de las moléculas de distintos tamaños pueden ser visualizadas mediante un colorante fluorescente que se une a los ácidos nucleicos [31, 35]. Las moléculas pequeñas de ADN de aproximadamente 10 a 2000 nucleótidos o pares de bases pueden ser separadas en geles de poliacrilamida y las moléculas largas de alrededor de 200 nucleótidos hasta más de 20kb son separadas en geles de agarosa [52]. En la electroforesis se incluye un marcador de peso molecular para poder estimar el peso del fragmento analizado, en la Figura 4 se observa la separación de ADN por electroforesis teñida con Bromuro de Etidio.

Para el estudio del microbioma humano es necesario amplificar el fragmento de ADN o ARN a secuenciar, y el producto debe ser analizado por electroforesis o en el bioanalizador. Si el producto del PCR corresponde al peso molecular esperado entonces se utilizará para la siguiente etapa que es la secuenciación.



**Figura 4:** Electroforesis en gel de Agarosa de ADN (Tomado de Lodish, 2013)

### **Secuenciación de ácidos nucleicos.**

La Secuenciación es la evaluación del orden preciso de los nucleótidos en una molécula de ADN o ARN, en la cual, se sintetizan utilizando primers que definen la secuencia a amplificar. La identificación y la recuperación de fragmentos de ADN mediante clonación o por PCR es una herramienta utilizada para analizar la estructura y función de los genes. Sin embargo, la capacidad de secuenciar el ADN ha permitido grandes avances en el conocimiento de la organización del genoma y de los genes, incluyendo su estructura, función y mecanismos de regulación [31].

A finales de los 70's se desarrollaron métodos que permitieron evaluar de manera simple y rápida la secuencia de nucleótidos de fragmentos de ADN purificado. Se han descrito dos métodos de secuenciación del ADN: 1) el Método químico y 2) el método enzimático [50].

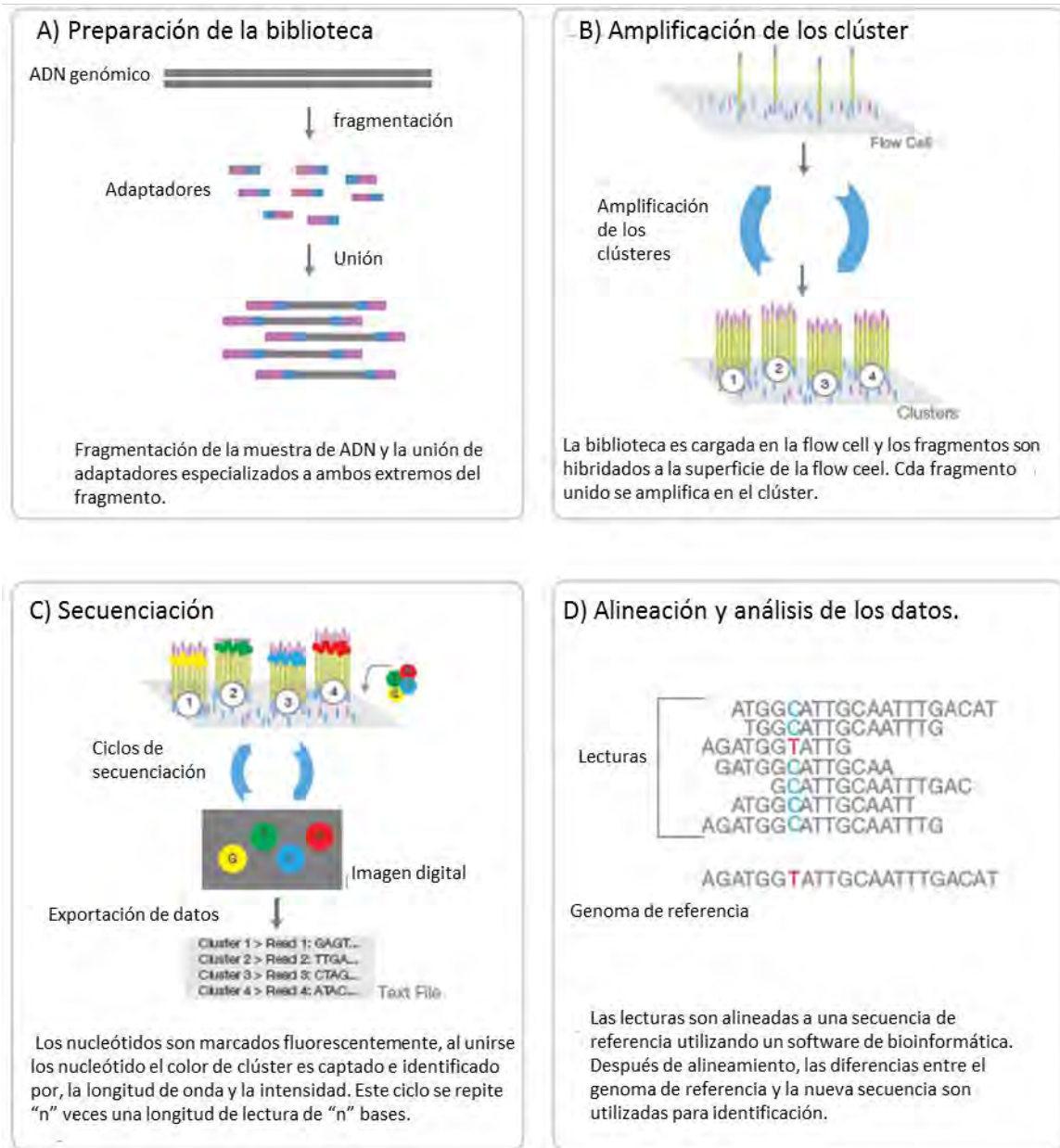
Anteriormente, la mayor parte de los métodos de secuenciación de ADN se realizaba por la técnica de dideoxi o de Sanger desarrollado por Fred Sanger en 1970 y sirvió de base por 30 años para la mayoría de las secuenciaciones. Se basa en el proceso de replicación del ADN donde se generan fragmentos de ADN de diferentes longitudes que terminan en cada una de las cuatro bases, y que están marcadas con radioactividad o con un compuesto fluorescente. Estos fragmentos son separados por electroforesis en gel de poliacrilamida de tal manera que las moléculas que difieren en un solo nucleótido de longitud se distinguen claramente. Son necesarias cuatro reacciones separadas y cuatro carriles independientes en el gel para la determinación de cada secuencias, una para cada fragmento terminado en cada una de las cuatro bases de

ADN. Las posiciones de los fragmentos se localizan por autoradiografía o fluorescencia, y las secuencias se pueden leer en el mismo gel [35, 37, 49, 52].

En la actualidad muchos de los procesos de secuenciación de ADN se llevan a cabo de manera automatizada, estos sistemas utilizan la técnica de Sanger con nucleótidos marcados con diferentes compuestos fluorescentes. Cada una de las cuatro reacciones utiliza una marca fluorescente de color diferente, y los carriles se escanean mediante un láser de detección de fluorescencia. De este modo, las cuatro reacciones se pueden correr en el mismo carril. Los resultados son analizados por un ordenador y se genera una secuencia, en la que cada una de las cuatro bases se distingue por un color [37].

Un cambio en el método de secuenciación permitió que un único instrumento de secuenciación llevará a cabo miles de millones de reacciones de secuenciación de forma simultáneamente mediante la localización de pequeños clúster en la superficie de un sustrato sólido. Este método fue llamado Secuenciación de Nueva Generación volviéndose la técnica más usada desde el 2007. En la secuenciación de nueva generación, en la amplificación de ADN uno de los primers se une covalentemente a un sustrato sólido de tal manera que al final de la amplificación los productos amplificados están unidos a la superficie formando un clúster, el cual, es secuenciado al ir detectando los desoxirribonucleotidos marcados con fluorescencia mientras la ADN polimerasa los va incorporando uno por uno a la cadena de ADN. Para que esto ocurra una hebra de ADN debe ser cortada y eliminada dejando un templete de ADN de cadena sencilla. La secuenciación es realizada nucleótido por nucleótido en cada uno de los templetos de los clústers; los dNTP's son marcados con fluorescencia. El sustrato es iluminado y el color de cada clúster es captado. Para finalizar se remueve químicamente el marcador fluorescente se une un nuevo dNTP, el ciclo se repite 100 veces aproximadamente, dependiendo del kit y el tamaño del fragmento de ADN a secuenciar [52].

La plataforma de illumina, Inc es uno de los instrumentos capaces de realizar la secuenciación de nueva generación. La plataforma de illumina® maneja cuatro pasos básicos para la secuenciación: 1) Preparación de la biblioteca, 2) Generación de los clústers, 3) secuenciación y 4) Análisis de datos; los cuales son descritos en la figura 5.



**Figura 5: Fundamentos de la Secuenciación de nueva generación.** Descripción general de la química de las cuatro reacciones de la secuenciación de nueva generación.

## JUSTIFICACIÓN

El cuerpo humano consta de una gran cantidad de bacterias que constituyen la flora normal, se ha descrito que existen aproximadamente 10 bacterias por cada célula. Estas bacterias definidas como microbiota establecen interacciones con el hospedero constituyendo el microbioma. La microbiota puede alterarse por situaciones de enfermedad como se ha demostrado en fibrosis quística y TB.

La técnica de secuenciación aplicada a los microorganismos no cultivables del pulmón, ha sido posible mediante el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten amplificar fragmentos de ADN por PCR, el análisis de los productos amplificados por electroforesis, la secuenciación y la bioinformática facilitado su identificación con base a su cadena nucleotídica. La secuenciación del microbioma en el pulmón de pacientes con TBP, ha permitido la identificación de microbioma en muestras de expectoración aunque tiene la desventaja de arrastrar microbioma de la cavidad bucal. En este trabajo se propone definir el microbioma del pulmón en los pacientes con TBP, utilizando muestras de lavado bronquiolo alveolar (LBA) y lavado Bronquial (LB) que contengan únicamente microorganismos que habiten la parte alta y baja de los pulmones.

El procesamiento de la muestra difiere en el volumen de la muestra utilizada y en el método utilizado de extracción de ADN, debido a que no hay un consenso en los métodos utilizados para muestras de LBA en otras enfermedades, en el presente trabajo realizaremos una evaluación integral de las condiciones en las que se requiere procesar muestras de LBA y LB que permitan tener resultados confiables.

## **HIPÓTESIS**

Se establecen las condiciones óptimas para la extracción de ADN de bacterias en muestras de LBA y LB de pacientes con TBP, para la secuenciación de la región variable V3V4 y el 16S ribosomal completo y la posterior caracterización del microbioma alveolar en pacientes con TB.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Establecer las condiciones adecuadas para el procesamiento de muestras de LBA y LB de pacientes con tuberculosis pulmonar, caracterizar el microbioma en las vías respiratorias bajas por la técnica de secuenciación masiva de rARN 16S.

### **Objetivos particulares.**

1. Determinar las condiciones óptimas de las muestras respiratorias LBA y LB necesarias para la obtención de ADN bacteriano, de pacientes TBP.
2. Estandarizar el método de extracción del ADN bacteriano de las muestras respiratorias de LBA y LB.
3. Realizar la amplificación la región variable V3V4 del ARN 16S ribosomal por medio de PCR.
4. Realizar la amplificación el gen completo del ARN 16S ribosomal por medio de PCR.
5. Analizar la secuencia nucleotídica del gene completo y de la región V3V4 del ARNA 16S ribosomal mediante secuenciación masiva.
6. Realizar un análisis preliminar del perfil del microbioma en las muestras de respiratorias de LBA y LB de pacientes con tuberculosis pulmonar

## **METODOLOGÍA.**

Este protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" con clave asignada B17-15.

### **a) Lugar del estudio.**

Este estudio se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" a través de la colaboración entre el Departamento de Investigación en Microbiología, Departamento de Investigación en Virología, Clínica de Tuberculosis y el Servicio de Broncoscopía.

## **PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR.**

### **Criterios de inclusión.**

Hombres y mujeres entre 18 - 50 años con diagnóstico de **probable tuberculosis pulmonar** basado por el cuadro clínico y evidencias en placa de tórax, donde su médico tratante le solicitó la realización de una broncoscopía con lavado bronquiolo alveolar (LBA) con fines de diagnóstico.

### **Criterios de exclusión para los grupos de estudio.**

Presentar infección bucal, estar embarazada, tener anemia, que estén en situación que comprometa su salud, ser fumador, con serología positiva para virus de inmunodeficiencia humana y no tener el consentimiento por escrito.

### **Obtención del material biológico.**

A los voluntarios se les realizó un lavado bucal con 15 ml de Clorhexidina durante un minuto previamente a realizar la broncoscopía. La broncoscopía con lavado bronquiolo alveolar (LBA) se realizó, en el Servicio de Broncoscopía del INER por el médico especialista. Se realizó el LBA utilizando 120 ml de solución salina estéril en el lóbulo medio y lavado bronquial (LB).

La muestra de LBA fue recuperada en jeringas de 50 ml, mientras que la muestra de LB fue transportada en el frasco de la trampa para broncoscopía y fueron transportando en un contenedor hasta el Departamento de Microbiología.



## ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA DE LBA.

### 1. Determinación del volumen y concentración de la muestra para obtener 100 ng de ADN.

Se trabajaron las muestras con tres condiciones diferentes y refiriéndose como:

#### 1) Muestra directa.

Del LBA se tomaron 200µl y se agregaron en un tubo de 1.7ml para proceder a la extracción de ADN.

#### 2) Muestra concentrada.

De la muestra de LBA o LB se tomaron 10 ml que fueron centrifugados a 1200rpm durante 15 min a 4°, posteriormente se removió el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 200 µl de PBS para la posterior extracción de ADN.

#### 3) Muestra del líquido del LBA-acelular (BALF).

El sobrenadante (lavado libre de células) fue separado de las células del LBA y centrifugado a 3000rpm durante 15 minutos a 4° y posteriormente se removió el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 200µl de PBS para la posterior extracción de ADN.

### 2-. Extracción y cuantificación de ADN bacteriano.

#### **Método 1:**

Una vez obtenidas las muestras del LBA se procedió a la extracción del ADN bacteriano y se utilizó el kit QIAamp® cador® Pathogen de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este procedimiento se inició con la preparación de una mezcla del 110% de amortiguador VXL (100µl/muestra) –ARN acarreador (1µl/muestra). A 200µl de cada muestra se le agregaron 100µl de la mezcla VXL/ARN y 20µl de proteinasa K. Posteriormente se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente o a 55° con agitación. Se agregaron 350 µl del amortiguador ACB mezclándose en el vortex y un spin para bajar el líquido. Se transfirió la mezcla a una columna QIAamp Mini que se colocó sobre un tubo de colección de 2 ml y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto; la columna se transfirió a otro tubo de colección y se descartó el filtrado del tubo anterior. Se agregaron 600µl de del amortiguador AW1 y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones; nuevamente se agregaron 600µl del amortiguador AW2 y se centrifugó en las mismas condiciones. Una vez transferida la columna a un tubo nuevo de colección se centrifugo a 14000 rpm por 2 minutos para secar la membrana y asegurarse que todos los residuos no necesarios sean desechados. Por último se transfirió la columna a un tubo de 1.5 ml y se agregaron 60µl del amortiguador AVE para eludir el ADN y se almacenaron a -20°C.

## Método 2:

Se modificaron las condiciones de incubación establecidas inicialmente en el protocolo de 15 minutos a temperatura ambiente por 15 minutos a 55°C con agitación de 1000 rpm para asegurar la lisis de la pared celular de las micobacterias presentes.

Para cuantificar el ADN bacteriano obtenido se utilizó un espectrofotómetro (DeNovix®) con 1µl de la muestra y se obtuvieron las lecturas a 230,260 y 280 nm.

### 3. Amplificación de los fragmentos del ARN ribosomal 16S.

#### 1). Fragmento de 550pb de la región V3V4.

Una vez obtenido el ADN bacteriano cuantificado se llevó a cabo la amplificación del fragmento de 550pb de la región V3V4 del ADN ribosomal 16S. Se siguió el protocolo indicado por el fabricante (illumina®): 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation: Preparing 16S Ribosomal RNA gene amplicons for the illumina MiSeq System.

Las secuencias de los primers utilizados para amplificar el fragmento de 550pb de la región variable V3V4 fueron las siguientes:

V3V4 Primer sentido 5'-3' 5'- CCTACGGGNGGCWGCAG -3'
V3V4 Primer antisentido 5'-3' 5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC -3'

Para la amplificación del fragmento se preparó la mezcla de reacción de acuerdo siguiente protocolo (2X Kapa HiFiHotStarReady Mix, Kapa Biosystems)

Reactivo	Cantidad (µl)
ADN bacteriano (5ng)	2.5
V3V4 Primer sentido 5'-3' (1µM)	5
V3V4 Primer antisentido 5'-3' (1µM)	5
2X KAPA HiFi HotStartReady Mix	12.5

Con las siguientes condiciones de amplificación.

95°C	3 min	Desnaturalización
25 Ciclos		
95°C	30 seg	Desnaturalización
55°C	30 seg	Unión de Primers
72°C	30 seg	Síntesis de la cadena de ADN
72°C	5 min	Síntesis de fragmentos incompletos
4°C	∞	

Para preparar las reacciones de PCR primero se ajustaron las concentraciones de ADN de cada una de las muestras haciendo las diluciones con agua. Después, se hizo una mezcla de reacción (enzima, primers y agua) del 110% para el total de muestras a amplificar y se agregó a cada tubo de reacción. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystem®). Los productos de amplificación fueron analizados en el Bioanalizador 2100 (Agilent)

### **Modificación del protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation: Preparing 16S Ribosomal RNA gene amplicons for the illumina MiSeq System.**

Debido a que no observamos la amplificación del fragmento de 550 pb, se hicieron modificaciones al protocolo en.

- 1) La concentración de ADN bacteriano aumentándola de 5 ng a 100 ng.
- 2) La concentración de primers de 1µM a 10µM.
- 3) El número de ciclos de 25 a 35.

### **2). Fragmento de 1465 pb del ARN ribosomal (16S completo)**

Para clasificar las bacterias, se llevó a cabo la amplificación del ARN ribosomal 16S completo en aquellas muestras que fueron positivas para la amplificación del fragmento de 550pb.

Las secuencias de los primers utilizados para amplificar el fragmento fueron:

27 Primer sentido 5'-3' 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3'
1492 Primer antisentido 5'-3' 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT- 3'

La amplificación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo (2X Kapa HiFiHotStarReady Mix, Kapa Biosystems):

Reactivo	Cantidad (µl)
ADN bacteriano (100ng)	5
27 F Primer (10µM)	1
1492 R Primer (10µM)	1
2X KAPA HiFiHotStartReady Mix	12.5
Agua	5.5

Las condiciones de amplificación fueron:

95°C - 3 min
35 ciclos
95°C - 30 seg
55°C - 30 seg
72°C - 30 seg
72°C - 5 min
4°C - ∞

Se consideraron las siguientes modificaciones.

- 1) La temperatura de unión de los primers se aumentó de 55°C a 58, 60, 62 y 64°C.
- 2) La amplificación del ARN 16S utilizando el kit FastStar High Fidelity PCR System (Roche) para fragmentos más largos y siguiendo el protocolo

Reactivo	Cantidad (µl)
Expand High Fidelity PCR System (Roche)	5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	5
dNTP's (10µM c/u)	1
27 F Primer (10µM)	1
1492 R Primer (10µM)	1
Enzyme Mix	0.75
Agua	3.25
ADN bacteriano (100ng)	5

## Condiciones de amplificación

95°C	-	3 min
35 ciclos		
95°C	-	30 seg
55°C	-	30 seg
72°C	-	1.5 min
72°C	-	5 min
4°C	-	∞

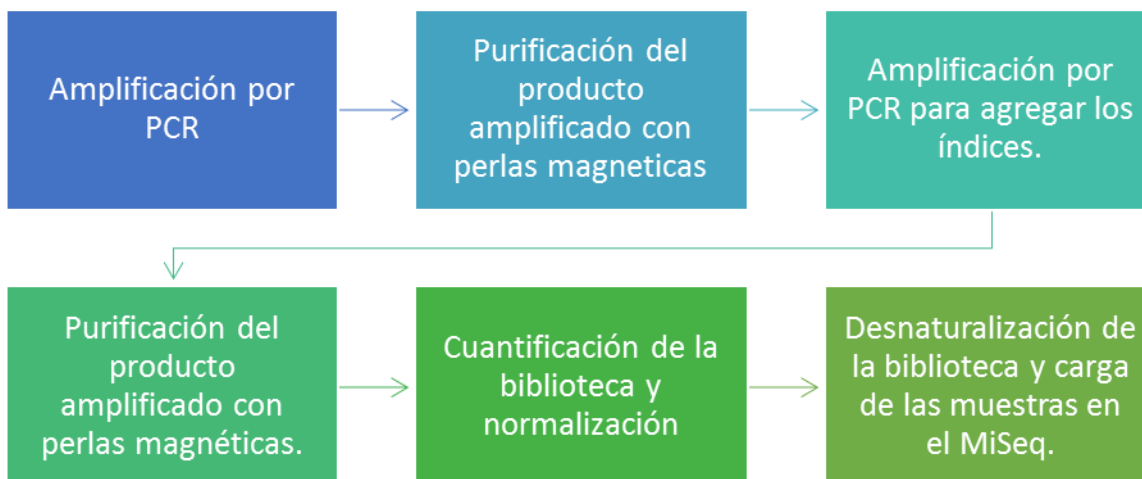
### **Análisis de los fragmentos amplificados.**

Inicialmente los productos amplificados fueron analizados en el Bioanalyzer 2100 (AGILENT) con el DNA chip 7500 y se utilizó 1µl de la muestra. EL DNA chip se cargó con 9µl de la matriz de gel aplicados por presión de aire, se colocaron 5µl marcador de ADN a todas la muestras y 1µl del marcador de peso molecular. El análisis se hizo en el equipo durante aproximadamente 30 minutos.

Alternativamente, los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Se utilizaron 5µl de la muestra y 3µl amortiguador de carga. Se incluyó el marcador de peso molecular (PM) ladder 500pby se adiciono el colorante fluorescente GelRed (Biotum) a todas las muestras. Una vez finalizada la electroforesis el gel se observó bajo la luz ultravioleta y se digitalizó la imagen en el ChemiDoc™ MP imaging System.

## Secuenciación del 16S ribosomal.

Para la secuenciación de los fragmentos V3V4 y el rADN 16S completo se siguieron los protocolos propuestos por illumina® que se esquematizan en el siguiente diagrama:



**Figura 6: Método de secuenciación.** Se describen los pasos que se siguieron para la secuenciación masiva.

## Secuenciación en MiSeq Sequencer

Se transfirieron 5µl de cada muestra a un tubo nuevo y se colocaron 576µl de HT1 en otro tubo al cual se le colocaron 24µl del tubo con las muestras; se mezcló por pipeteo 5 veces y se incubo a 96°C por dos minutos por último, se mantuvo en un baño de hielo con agua por 5 minutos y se colocaron en el cartucho de reactivos del MiSeq.

Una vez colocadas las muestras en la Flowcell (Illumina) se colocaron en secuenciador MiSeq, se realizaron lecturas y se utilizó el software del equipo para realizar el análisis bioinformático de las secuencias. Debido a que se utilizó el software del equipo para realizar el análisis bioinformático.

## Resultados

Debido a que este trabajo consistió en la evaluación del procesamiento de muestras de LBA y LB se describen tanto los métodos como los resultados.

### Grupo de estudio.

Se evaluaron las condiciones a estandarizar en cuatro pacientes y en BALFs del banco de muestras del laboratorio de investigación en microbiología del INER.

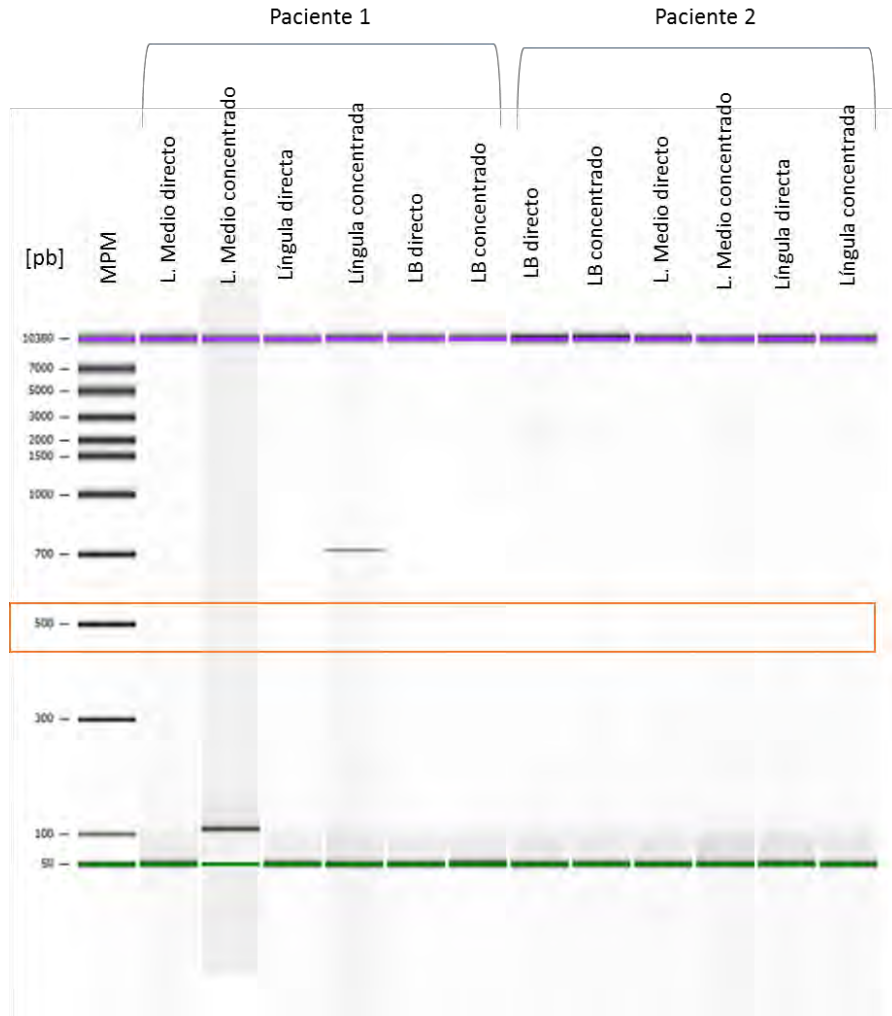
### Pruebas de extracción.

La extracción de ADN bacteriano se realizó con incubación por 15 minutos a 55°C con agitación de 1000 rpm para asegurar la lisis de la pared celular bacteriana.

### Pruebas de amplificación del fragmento de 550 pb correspondiente a la región variable V3V4 del gen 16s ribosomal.

Con el objetivo de determinar las condiciones de procesamiento de las muestras de LBA, se escogieron las muestras de los pacientes 1 y 2 para amplificar la región V3V4 del 16S ribosomal y sus productos de amplificación fueron analizados en el bioanalizador. Estas muestras corresponden a dos pacientes con TBP, y fueron obtenidas durante la broncoscopía haciendo el LBA en dos sitios diferentes: lóbulo medio, llingula y además, se hizo el LB.

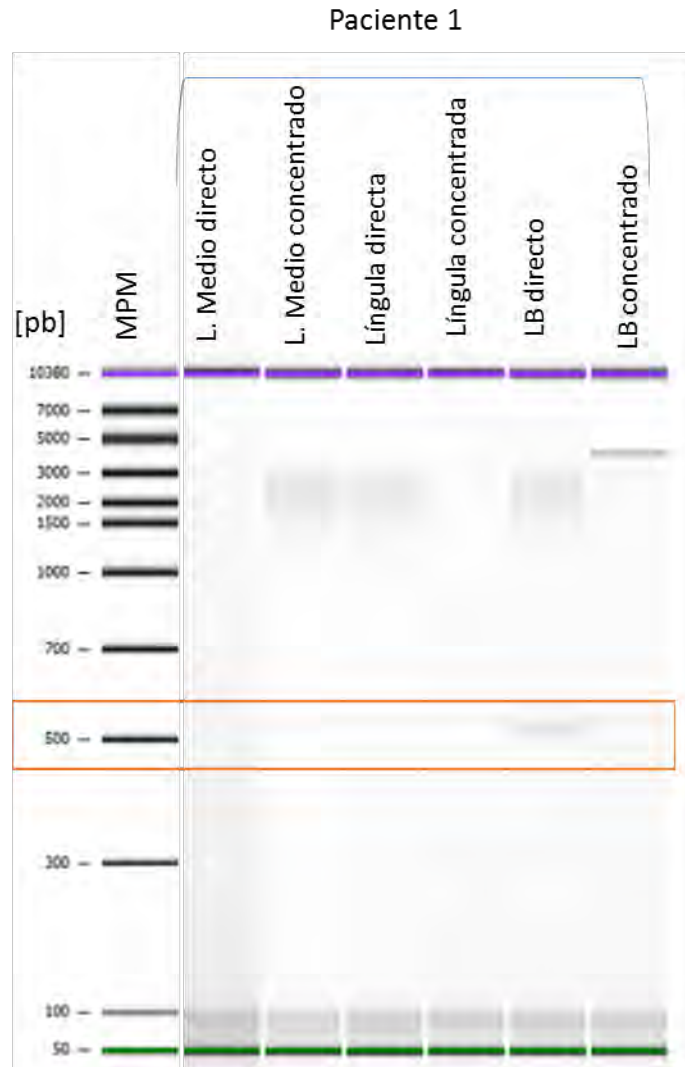
Al utilizar 5ng de ADN bacteriano y 1µM de cada primer, no se obtuvo amplificación, no todas las muestras amplificaron un fragmento de 550pb. Únicamente en las muestras del LB tanto directo como concentrado del paciente 1, se observó la amplificación mostrando una banda muy tenue para dicho fragmento. En la muestra de llingula concentrada del mismo paciente, se observó un fragmento de 700 pb que no corresponde al fragmento esperado. Por lo que no son las condiciones adecuadas de amplificación, figura 7.



**Figura 7: Amplificación del fragmento de 550pb de la región V3V4 del ARN ribosomal.** Imagen de Bioanalizador donde se muestra la amplificación del producto de 550 pb correspondiente a la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal. De izquierda a derecha carril 1 MPM, carriles 2-7 muestras correspondientes al paciente 1 y carriles 8-13 muestras correspondientes al paciente 2. En el recuadro naranja se indica la región donde se espera observar la banda de amplificación. Las condiciones de amplificación fueron 1  $\mu$ M de primers y 5ng de ADN bacteriano con 25 ciclos de PCR.

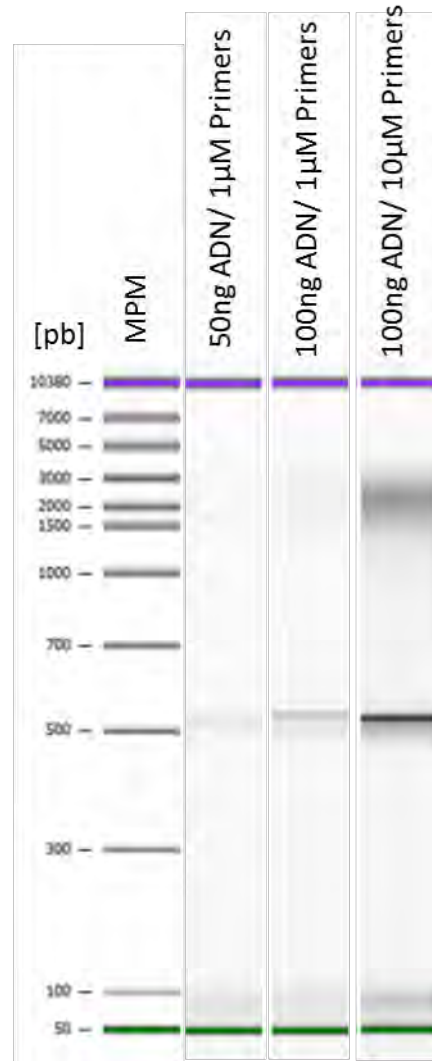
Debido a que las condiciones de amplificación no fueron las adecuadas se realizaron modificaciones al protocolo. La primera condición modificada fue la concentración de primers de 1 $\mu$ M a 10 $\mu$ M y se repitió el ensayo solamente con las muestras del paciente 1. La amplificación del fragmento de 550pb se encontró en la muestra de LB directo, sin embargo el rendimiento es bajo ya que se observó una banda muy tenue, figura 8. Comparando los resultados de la figura 1 con los obtenidos con el aumento en la concentración de primers, la intensidad de la banda aumentó.





**Figura 8: Aumento en la concentración de primers V3V4 a 10 $\mu$ M.** Imagen de Bioanalizador donde se muestra la amplificación del producto de 550 pb correspondiente a la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal. De izquierda a derecha carril 1 MPM, carriles 2-7 muestras correspondientes al paciente 1. El recuadro naranja indica la región de 500 pb donde se encuentra la banda de amplificación.

Para amplificar el fragmento de 550 pb en las muestras negativas se incrementó la concentración de ADN bacteriano de 5ng a 50 y 100ng, con la concentración de 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M de primers. Con las condiciones modificadas se amplificó la muestra de LB directo del paciente 1. Se observó que con los primers a concentración de 1  $\mu$ M la banda de amplificación es más intensa al aumentar la concentración de ADN a 100 ng (carril 2 y 3) siendo la amplificación más eficiente cuando además se incrementó la concentración de los primers a 10  $\mu$ M (carril 4), Figura 9.



**Figura 9: Efecto del incremento de la concentración de ADN bacteriano y primers en la amplificación del fragmento de 550pb.** Imagen de Bioanalizador donde se muestra la amplificación del producto de 550 pb correspondiente a la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal. De izquierda a derecha carril 1 MPM, carril 2-4 LB- directo del paciente 1 con diferentes concntraciones de ADN y primers. El recuadro naranja indica la región de 500 pb donde se encuentra la banda de amplificación.

Para verificar que efectivamente se obtiene una mayor cantidad de producto amplificado al aumentar la concentración de ADN y primer se corroboraron las concentraciones por microlito de las muestras del LB- directo del paciente 1 amplificadas con las diferentes concentraciones de ADN y primers. Los electroferogramas mostraron picos para las tres muestras pero únicamente se pudo cuantificar la muestra amplificada con 100ng y 10µM de primers debido a la sensibilidad del equipo, por lo que efectivamente existe una mayor cantidad de producto amplificado, figura 10.

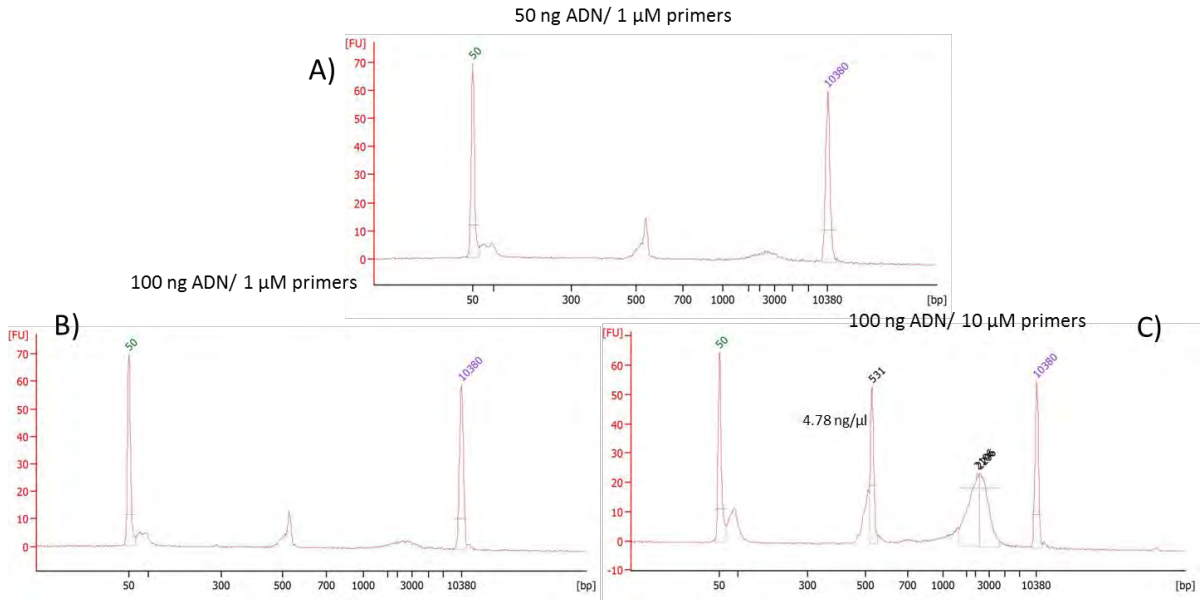
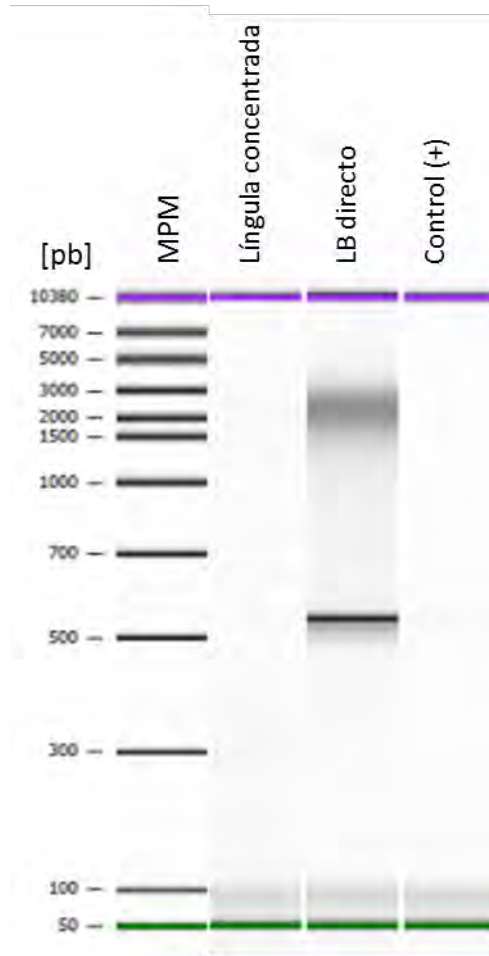


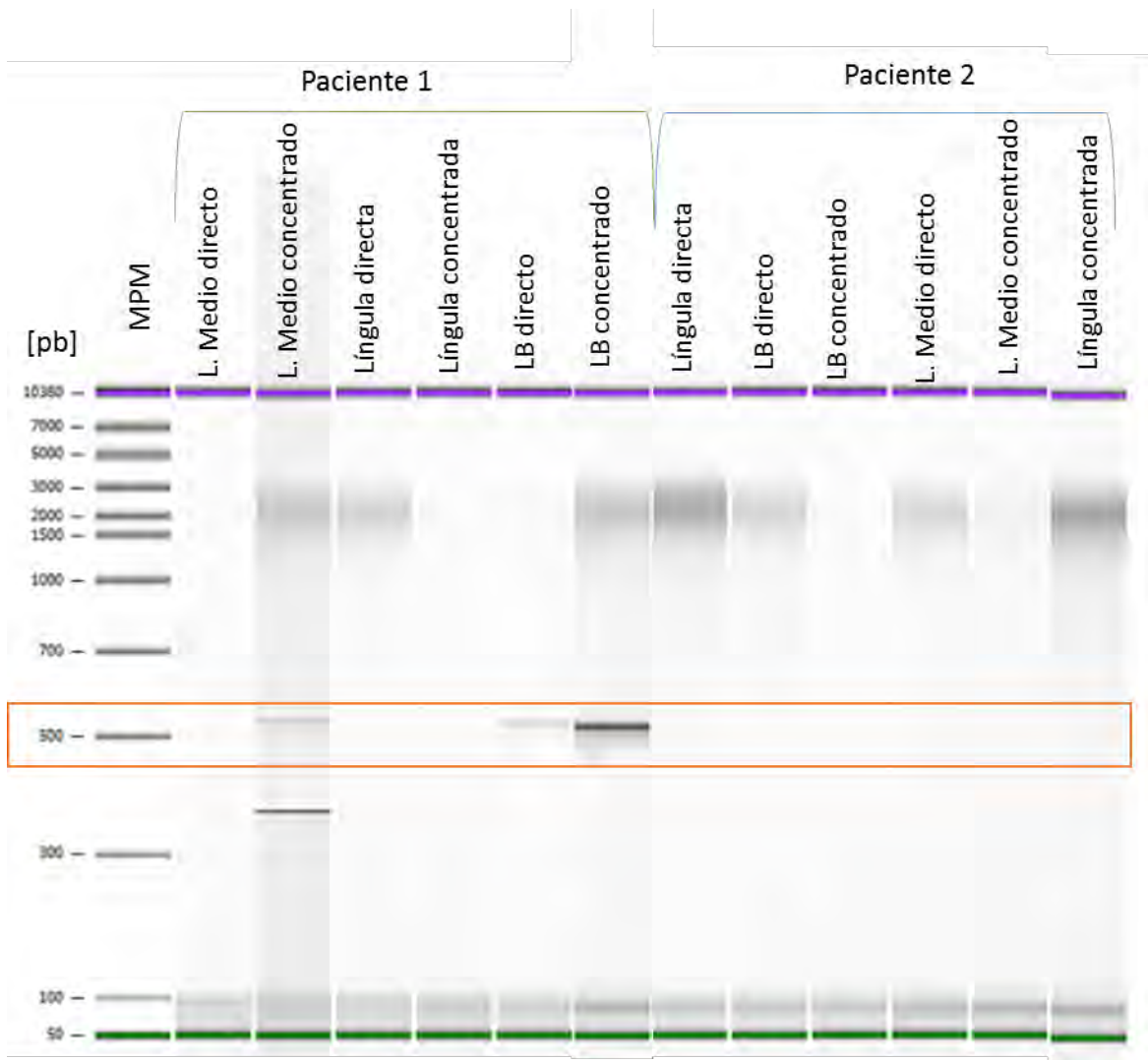
Figura 10: **Electroferogramas de la concentración de ADN bacteriano y primers en la amplificación del fragmento de 550pb.** El pico fue aumentando conforme se aumento la concentración de ADN y primers, en A) y B) la sensibilidad del equipo no logró calcular la concentración mientras que en C) se obtuvo una concentración de 4.78 ng/µl.

Con base a los resultados se estableció realizar las amplificaciones de las muestras de l ngula y LB directo del paciente 1 con 100ng de ADN bacteriano y 10 µM de los primers. Se observó que la muestra de l ngula siguió sin amplificar el fragmento de 550 pb, y se observó una banda bien definida en la muestra de LB directo, la cual al ser comparada con las amplificaciones anteriores es más intensa, figura 11.



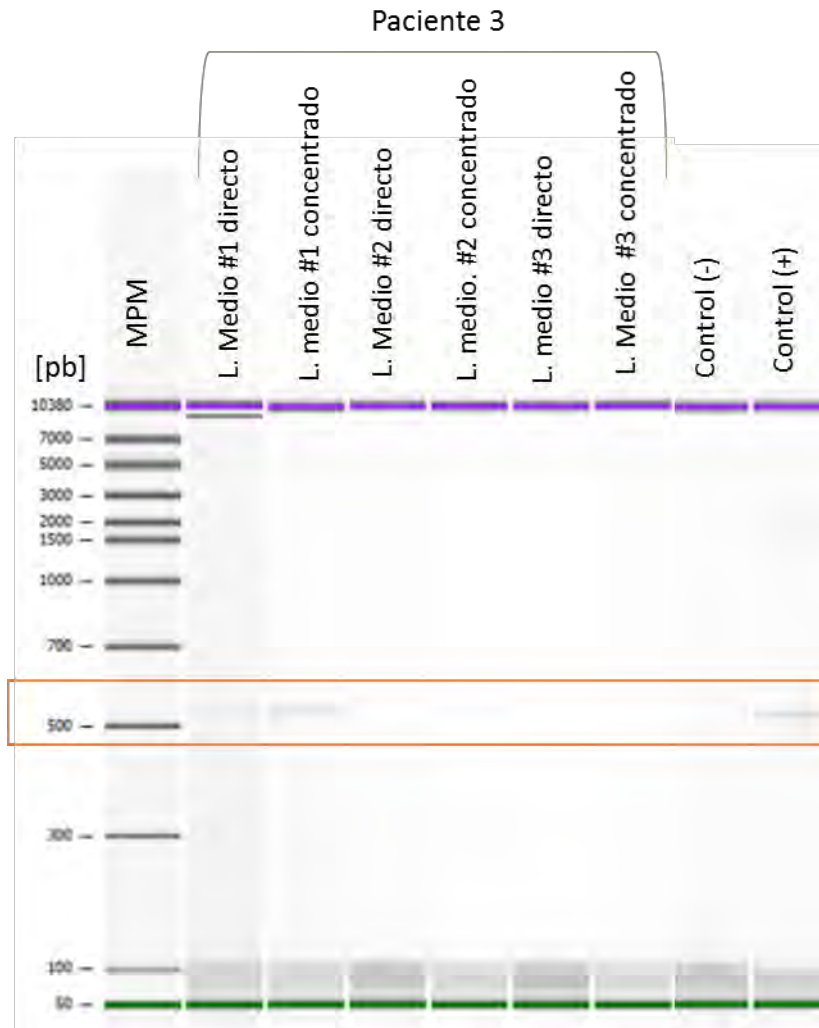
**Figura 11: Aumento en la concentración de ADN bacteriano a 100ng.** Imagen de Bioanalizador donde se muestra la amplificación del producto de 550 pb correspondiente a la región variable V<sub>3</sub>V<sub>4</sub> del gen 16S ribosomal. De izquierda a derecha carril 1 MPM, carriles 2-4 muestras correspondientes al paciente 1. El recuadro naranja indica la región de 500 pb donde se encuentra la banda de amplificación. Con 100ng de ADN bacteriano y 10  $\mu$ M

Se consideró que las mejores condiciones para la amplificación son 100ng de ADN bacteriano, 10 $\mu$ M de los primers, con dichas condiciones se procedió nuevamente a la amplificación de las muestras de los pacientes 1 y 2. Amplificaron las muestras de lóbulo medio concentrado, LB directo y LB concentrado del paciente 1. Respecto a las muestras del paciente 2, ninguna de ellas amplificó el fragmento de 550pb, figura 12.



**Figura 12: Amplificación del fragmento de 550pb con las condiciones estandarizadas.** Imagen de Bioanalizador donde se muestra la amplificación del producto de 550 pb correspondiente a la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal. De izquierda a derecha carril 1 MPM, carriles 2-7 muestras correspondientes al paciente 1, carriles 8-13 muestras correspondientes al paciente 2. El recuadro naranja indica la región de 500 pb donde se encuentra la banda de amplificación. Con 100ng de ADN bacteriano, 10 $\mu$ M de los primers

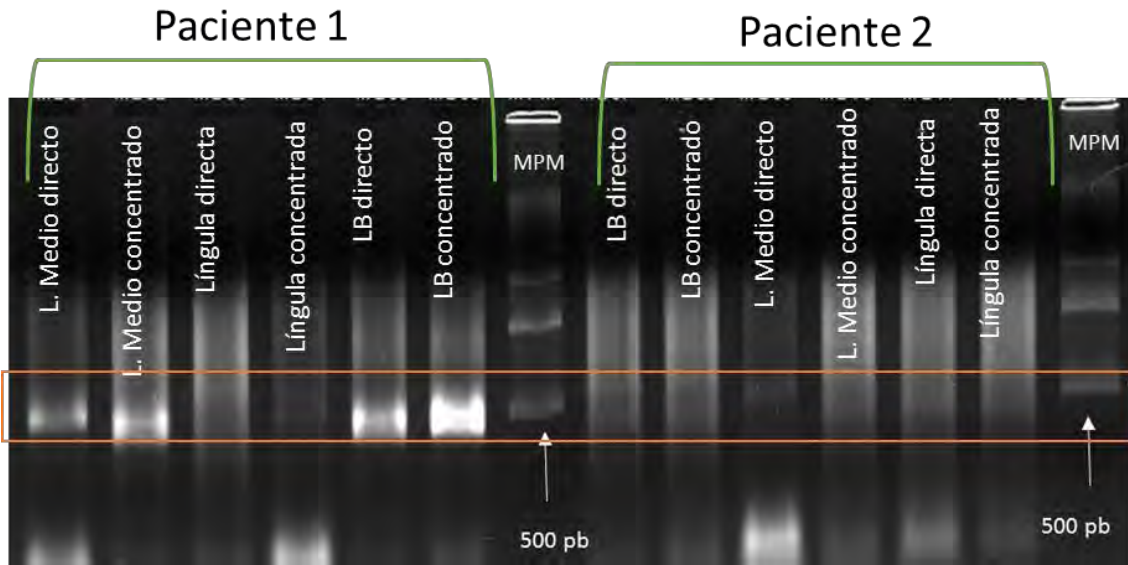
Posteriormente se analizó la muestra de LBA del paciente 3, la cual, es un LBA que se obtuvo en secuencia #1, #2 y #3 (se realizó un primer lavado y se almaceno, se realizó un segundo lavo y uno tercero) del lóbulo medio. La amplificación mostró que en la amplificación de la muestra #1 la banda del producto amplificado es más intensa en la muestra concentrada. Mientras que en las muestras 2 y 3 la amplificación se observó en la muestra concentrada, aunque las bandas son muy tenues, por lo tanto el tipo de muestra a utilizar es la muestra concentrada. En este experimento se incluyó como control positivo de amplificación una muestra que previamente ya había sido positiva (LB concentrado del paciente 1), figura 13.



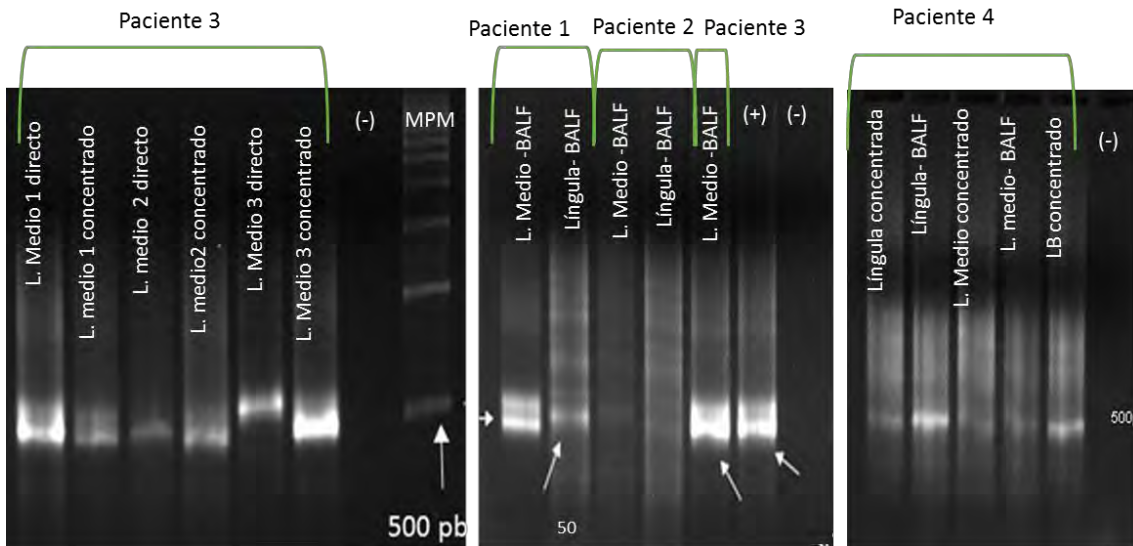
**Figura 13: Amplificación del fragmento de 550pb en muestra de LBA secuencial.** Imagen de Bioanalizador donde se muestra la amplificación del producto de 550 pb correspondiente a la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal. De izquierda a derecha carril 1 MPM, carriles 2-7 muestras correspondientes al paciente 3, carril 8 control (-) y carril 9 control (+). El recuadro naranja indica la región de 500 pb donde se encuentra la banda de amplificación. Con 100ng de ADN bacteriano, 10 $\mu$ M de los primers

Debido a que en varias muestras no amplificaron el fragmento de 500 pb, se incrementó el número de ciclos en la amplificación de 25 a 35 para aumentar el rendimiento. Además, se decidió hacer el análisis de los fragmentos amplificados mediante geles de agarosa al 2%. Se analizaron las muestras con las condiciones ya estandarizadas, primers 10  $\mu$ M con 100 ng de ADN y 35 ciclos de PCR, y los resultados se muestran en las figuras 14, 15 y 16.

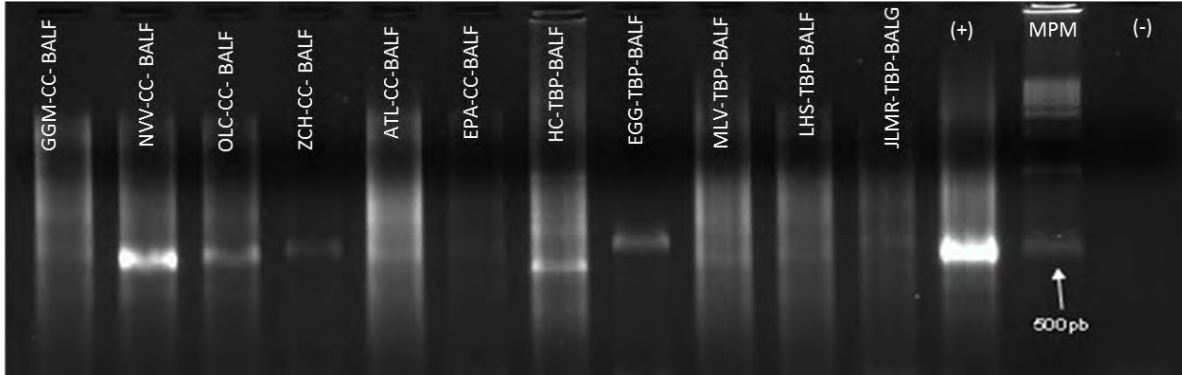




**Figura 14: Amplificación del fragmento de 550 pb en muestras de LBA y LB con el aumento en la concentración de primers, ADN bacteriano y numero de ciclos.** Gel de agarosa donde se muestra la amplificación del producto de 550 pb correspondiente a la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal. De izquierda a derecha carril 1-6 muestras del paciente 1, carriles 7 y 14 MPM, carriles 8-10 muestras correspondientes al paciente 2. El recuadro naranja indica la región de 500 pb donde se encuentra la banda de amplificación. Con 100 ng de ADN, y primers a 10  $\mu$ M con 35 ciclos de PCR

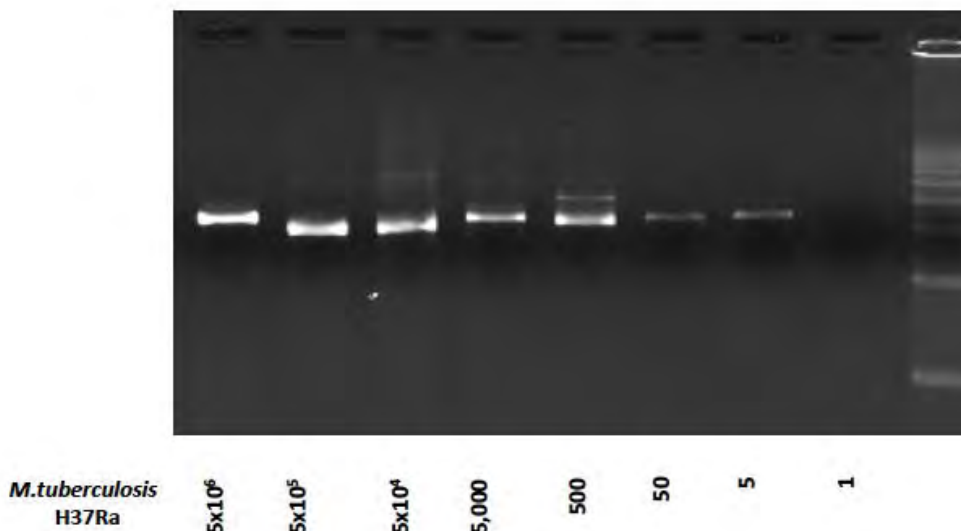


**Figura 15: Amplificación del fragmento de 550pb en muestras de LBA, LB y liquido de LBA.** Geles de agarosa donde se muestra la amplificación del producto de 550 pb correspondiente a la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal. De izquierda a derecha carril 1-6 muestras del paciente 3, carril 7 control (-), carril 8 MPM, carriles 9 y 10 BALFs del paciente 1, carriles 11 y 12 BALFs del paciente 2, carril 13 BALF del paciente 3, carril 14 control (+), carril 14 control (-), carriles 15- 19 muestras del paciente 4 y carril 20 control (-). El recuadro naranja indica la región de 500 pb donde se encuentra la banda de amplificación. Con 100 ng de ADN, y primers a 10  $\mu$ M con 35 ciclos de PCR



**Figura 16: Amplificaciones del fragmento de 550pb en muestras de líquido de LBA (BALF).** Gel de agarosa donde se muestra la amplificación del producto de 550 pb correspondiente a la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal. De izquierda a derecha carriles 1- 11 BALFs del INER, carril 12 Control (+), carril 13 MPM y carril 14 control (-). El recuadro naranja indica la región de 500 pb donde se encuentra la banda de amplificación. Con 100 ng de ADN, y primers a 10  $\mu$ M con 35 ciclos de PCR

Como no todas las muestras amplificaron el fragmento de 550pb y para probar que nuestro método de extracción permite la lisis y la extracción de ADN de micobacterias que son microorganismos resistentes. Se realizó la extracción de ADN de cantidades conocidas ( $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ , 5000, 50, 5 y 1 bacterias) de *M.tuberculosis* H37Ra, utilizando las condiciones ya estandarizadas. Posteriormente se llevó a cabo la amplificación del fragmento de 1465pb. Los resultados se muestran en la Figura 17 donde la intensidad de las bandas de los primero carriles (izquierda) es más intensa y la intensidad de estas va disminuyendo conforme disminuye el número de micobacterias, hasta llegar a una bacteria donde la banda no se aprecia.



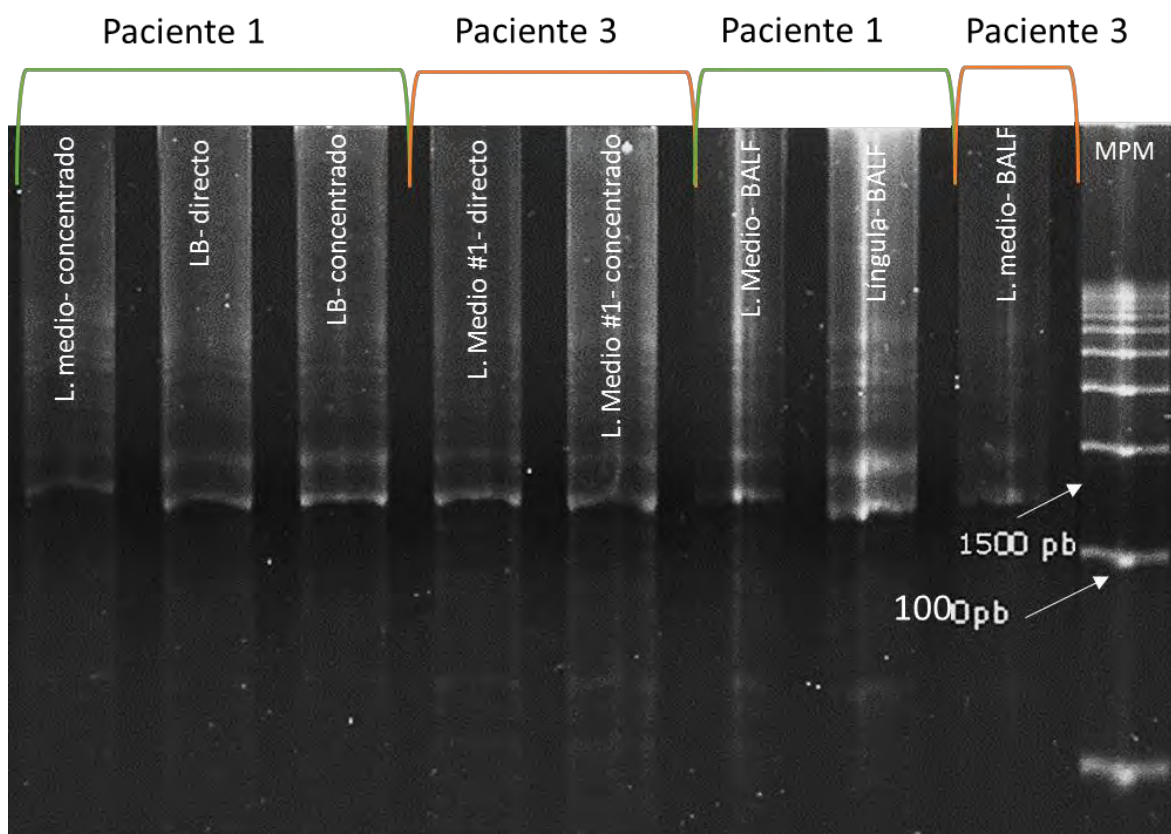
**Figura 17. Amplificación del fragmento de 1466pb con el ADN de *M.tuberculosis* H37RA.** Gel de Agarosa donde se muestra la amplificación del producto de 1465 pb correspondiente al gen 16S ribosomal completo. De izquierda a derecha la concentración bacteriana ha ido disminuyendo de  $5 \times 10^6$  a 1 bacteria. El recuadro naranja indica la región de 1500 pb donde se encuentra la banda de amplificación. Con 100 ng de ADN, y primers a 10  $\mu$ M con 35 ciclos de PCR



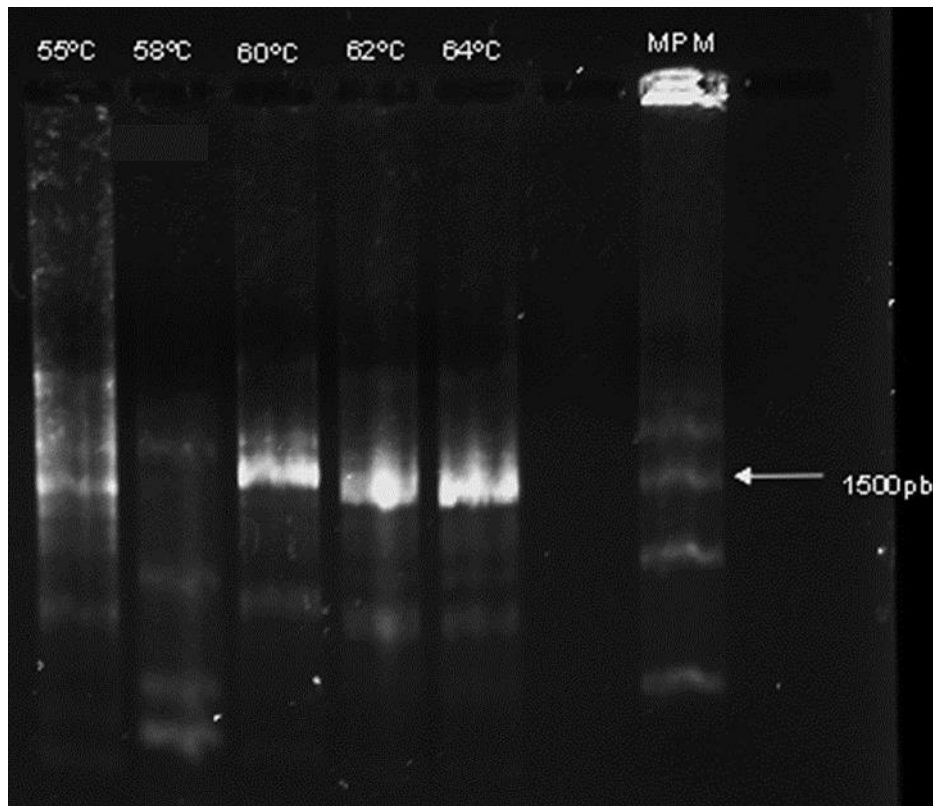
### Pruebas de amplificación del fragmento de 1465 pb correspondiente al gen 16S ribosomal completo.

Para obtener información complementaria en la secuenciación y por lo tanto en la clasificación de la microbiota del pulmón se hizo la amplificación del fragmento de 1465 pb del 16S ribosomal, para esto, se seleccionaron aquellas muestras donde se observó la amplificación del fragmento de 550 pb (Lóbulo medio- concentrado, LB- directo, Lóbulo medio- BALF, línula- BALF del paciente 1; Lóbulo medio #1 directo, Lóbulo medio#1 concentrado, lóbulo medio. BALF del paciente 3).

Para la amplificación del gen completo (1465pb) se utilizó inicialmente el mismo protocolo y se observó una gran cantidad de bandas inespecíficas, figura 18. Con el objetivo de disminuir la amplificación inespecífica se modificó la temperatura de unión de primers (58, 60, 62 y 64 °C); sin embargo, se siguió observando la amplificación de los fragmentos inespecíficos, figura 19.

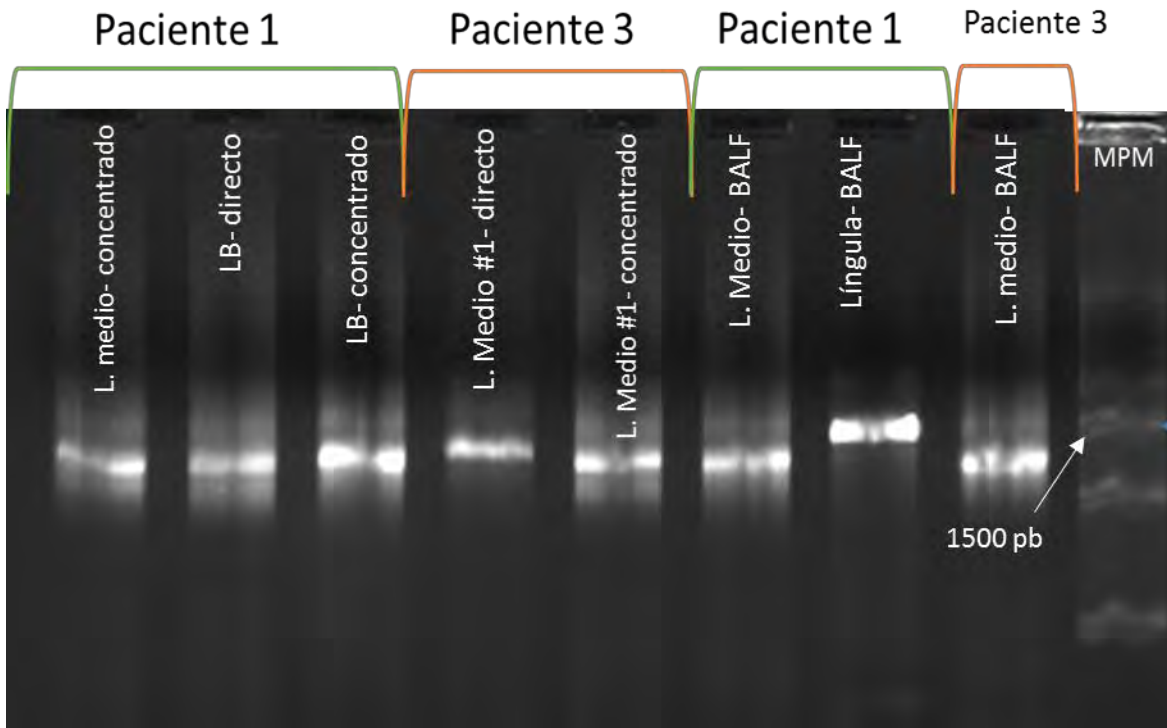


**Figura 18: Amplificación del fragmento de 1465pb con las condiciones estandarizadas.** Gel de Agarosa donde se muestra la amplificación del producto de 1465 pb correspondiente gen 16S ribosomal completo. De izquierda a derecha carril 1-3 muestras del paciente 1, carriles 4 y 5 muestras correspondientes al paciente 3, carriles 6 y 7 BALFs del paciente 1, carril 8 BALF del paciente 3 y carril 9 MPM. El recuadro naranja indica la región de 1500 pb donde se encuentra la banda de amplificación.

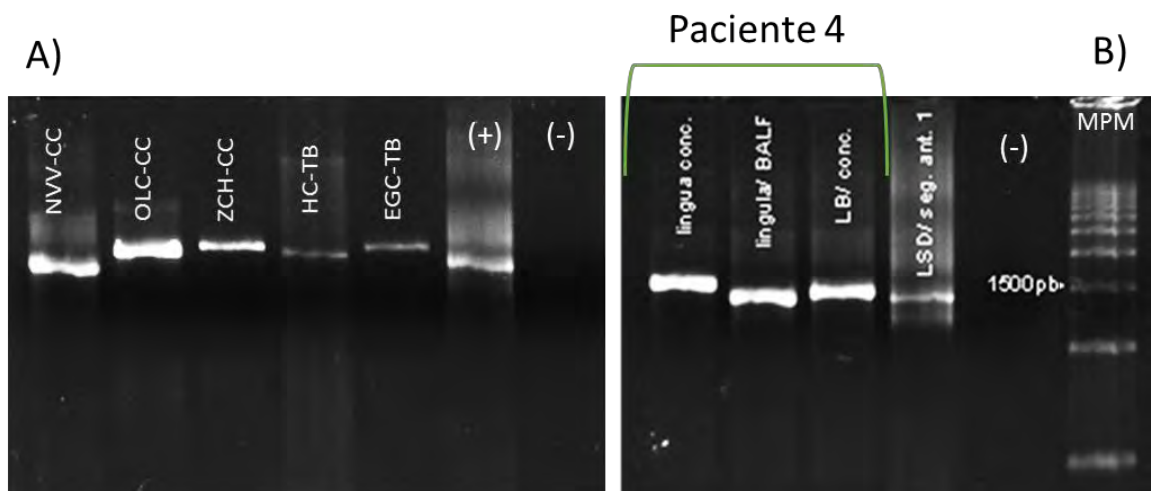


**Figura 19: Amplificación del fragmento de 1465pb con diferentes temperaturas de unión de los primers.** Gel de Agarosa donde se muestra la amplificación del producto de 1465 pb correspondiente gen 16S ribosomal completo. De izquierda a derecha carril 1 temperatura de unión de primers de 55°C, carril 2 temperatura de unión de primers de 58°C, carril 3 temperatura de unión de primers de 60°C, carril 4 temperatura de unión de primers de 62°C, carril 5 temperatura de unión de primers de 64°C, carril 7 MPM. El recuadro naranja indica la región de 1500 pb donde se encuentra la banda de amplificación.

Aún con el cambio en la temperatura de unión no se obtuvieron los resultados deseados, por lo que, se cambió al kit de amplificación para fragmentos más largos: Expand High Fidelity PCR System (Roche), los resultados de la amplificación se muestran en las Figuras 20 (paciente 1 y 3), 21A (líquido de LBA de TBP y sanos) y 21B (paciente 4) donde se observan bandas de aproximadamente 1500 pb como se esperaba.



**Figura 20: Amplificación del fragmento de 1466 pb 16S ribosomal en muestras de LBA y LB con el kit para la amplificación de fragmentos más largos.** Gel de Agarosa donde se muestra la amplificación del producto de 1465 pb al gen 16S ribosomal completo. De izquierda a derecha carriles 1-3 muestras del paciente 1, carriles 4 y 5 muestras correspondientes al paciente 3, carriles 6 y 7 BALFs del paciente 1, carril 8 BALF del paciente 3 y carril 9 MPM. El recuadro naranja indica la región de 1500 pb donde se encuentra la banda de amplificación.

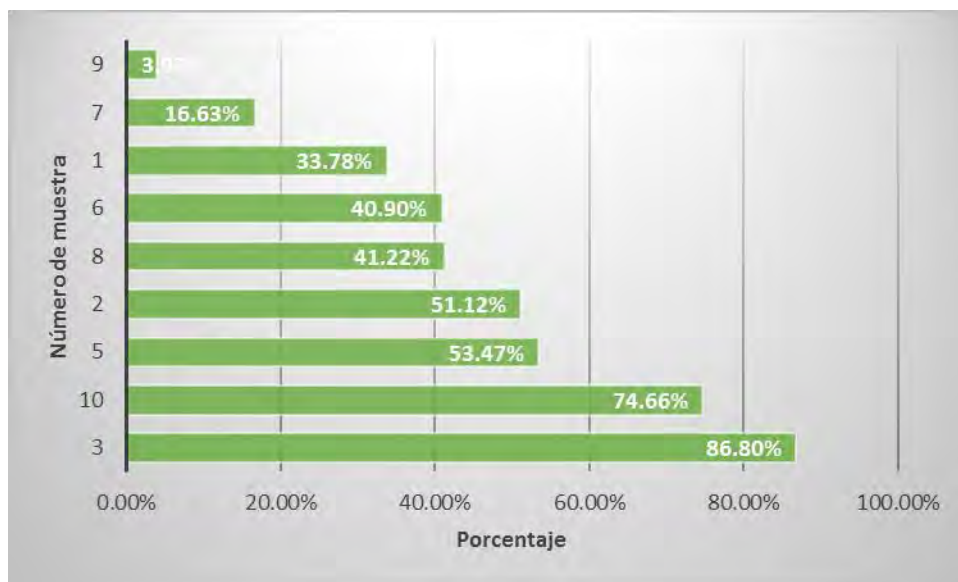


**Figura 21: Amplificación del fragmento de 1466pb en muestras de líquido de LBA y LBA.** Geles de agarosa donde se muestra la amplificación del producto de 1465 pb correspondiente al gen 16S ribosomal completo. Figura A) De izquierda a derecha carril 1-5 BALFs del INER, carril 6 control (+) y carril 7 control (-). Figura B) De izquierda a derecha carriles 1-3 muestras del paciente 4, carril 4 muestra del paciente 3, carril 5 control (-), carril 6 MPM. El recuadro naranja indica la región de 1500 pb donde se encuentra la banda de amplificación.

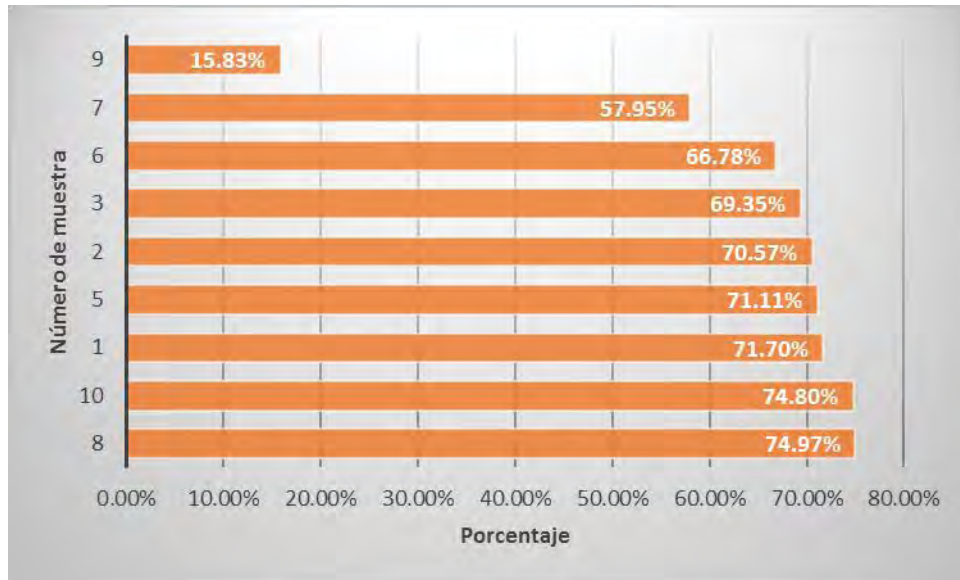
## Secuenciación de la región variable V3V4 y el gen completo 16S ribosomal.

Debido a la disponibilidad de espacio en la Flowcell utilizada para la secuenciación masiva se tuvo que hacer una selección de las muestras de las cuales fueron seleccionadas: Lóbulo medio- concentrado, LB- concentrado, Lóbulo medio- BALF, línula- BALF del paciente 1; Lóbulo medio- BALF del paciente 3, BLAFS de pacientes con TBP y sanos, de ambas muestras se secuenciaron el fragmento de 550pb y el fragmento de 1465 pb, las cuales amplificaron ambos fragmentos (550pb y 1466pb), en total fueron 9 muestras procesadas.

La secuenciación se hizo en el equipo MiSeq® (Illumina) y las secuencias generadas fueron procesadas mediante el programa MiSeq Reporter software (MSR). El número mayor de especies clasificadas se obtuvo con el gen 16S ribosomal completo, ya que la mayoría de los porcentajes se encuentran arriba del 70%, es decir más del 70% de las secuencias analizadas lograron clasificarse a nivel de género, en comparación con la región variable V3V4 donde la mayoría de los porcentajes no superan el 55%, es decir, la mitad de la mayoría de las secuencias no se pudo clasificar, figuras 22 y 23.



**Figura 22: Porcentaje de géneros clasificados con la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal.** Se muestran los porcentajes de menor a mayor número de secuencias clasificadas por muestra.



**Figura 23: Porcentaje de géneros clasificados con el gen 16S ribosomal completo.** Se muestran los porcentajes de menor a mayor número de secuencias clasificadas por muestra.

Por ultimo en las figuras 24 y 25 observamos el porcentaje de secuencias clasificadas a nivel de especie para el gen 16S ribosomal completo, el número de especies clasificada supera las 1000 y para la región variable V3V4 donde no se superan las 300 especies clasificadas, respectivamente. Podemos observar que un mayor número de especies son clasificadas utilizando el gen 16S ribosomal completo en comparación con la región variable V3V4, la mayoría de las especies logran clasificarse usando el gen completo.



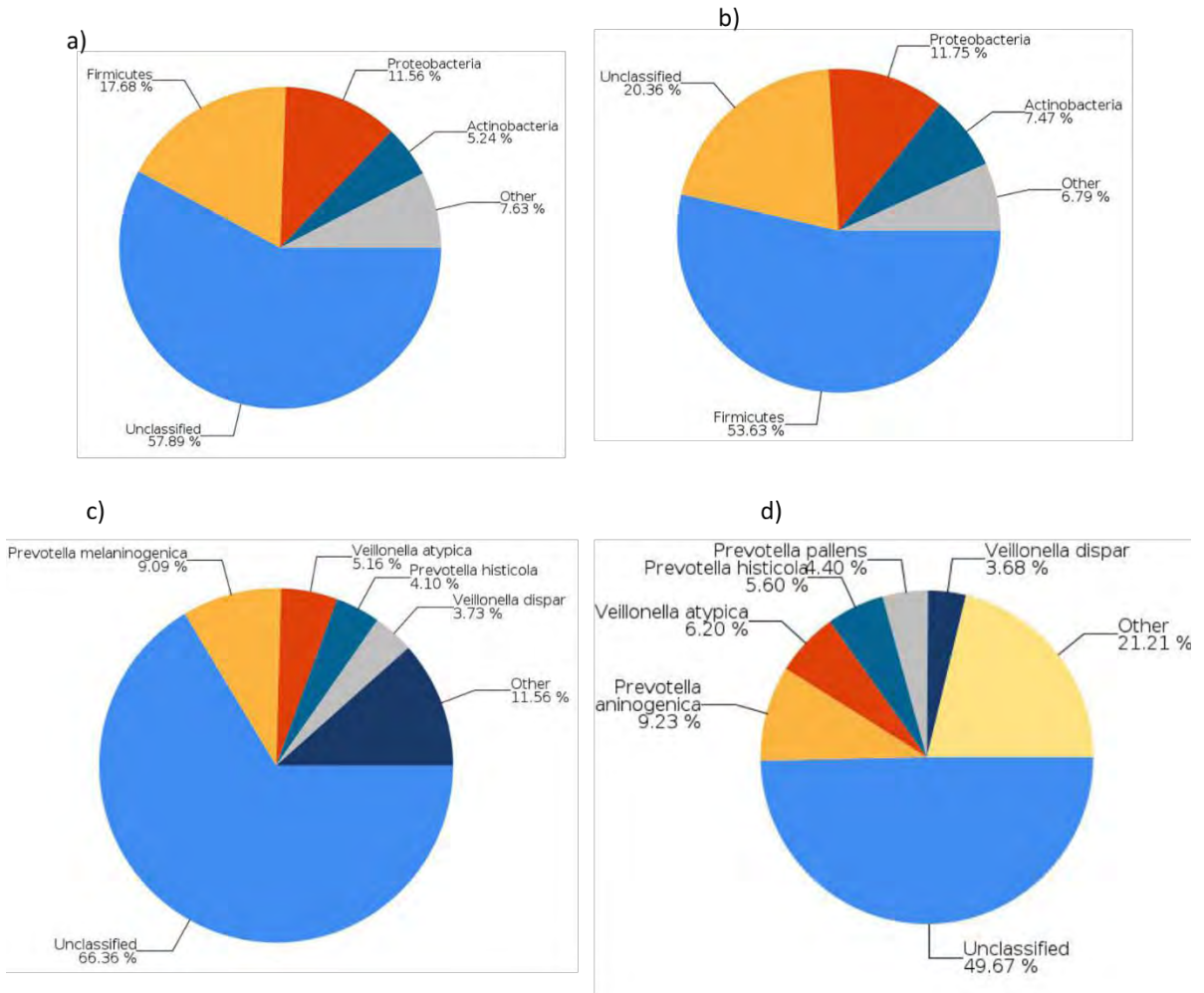
**Figura 24: Especies clasificadas con la región variable V3V4 del gen 16S ribosomal.** Se muestra el número de especies clasificadas por muestra.





**Figura 25: Especies clasificadas con el gen 16S ribosomal completo.** Se muestra el número de especies clasificadas por muestra.

Con los resultados preliminares de la secuenciación se pudieron identificar los géneros Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria figura 26 a) resultados obtenidos utilizando la región variables V3V4 y b) utilizando el gen 16S completo. A nivel de especie se identificaron *Provetella melaninogenica*, *Veillonella atypica*, *Prevotella histicola* y *Veillonella dispar*, imagen 26 c) y d) para la región variable V3V4 y para el gen completo, respectivamente.



**Figura 26: Géneros y especies clasificadas.** El porcentaje de géneros a) región V3V4 y b) gen completo y especies c) región V3V4 y d) gen completo.

## Discusión.

En el presente trabajo se logró estandarizar el volumen de la muestra, el método de concentración y la extracción del ADN de las bacterias para el procesamiento de las muestras provenientes de pulmón de pacientes con TBP: LBA, LB y BALF; evaluado inicialmente mediante la amplificación del fragmento de 550pb de la región variable V3V4 y posteriormente la amplificación del fragmento de 1465 pb del gen 16S ribosomal completo, que han sido reportados anteriormente para la caracterización del microbioma pulmonar [13, 26, 54-57].

La amplificación del gen 16S ribosomal permitió la secuenciación debido a que se encuentra ampliamente distribuido en las bacterias, conteniendo estructuralmente regiones conservadas y regiones variables, éstas últimas son las que han permitido llevar a cabo la caracterización de bacterias [39]. Para la identificación bacteriana a nivel de especie no es necesaria la secuenciación del gen 16S ribosomal completo ya que muchas secuencias pueden ser identificadas utilizando fragmentos de menor tamaño, por ejemplo las primeras 500 bases poseen la mayor variabilidad, sin embargo a la hora de identificar nuevos patógenos es necesaria la secuenciación de 16S completo [41]

Las muestras de LBA y LB, poseen un gran valor ya que su obtención implicó un procedimiento invasivo, para evitar su contaminación con la microbiota de la cavidad oral previó a la broncoscopia se realizó al voluntario un enjuague bucal con una solución de Clorehidina al 0.12%, similar el método utilizado por Iwai S. y colaboradores en 2014 para prevenir la contaminación de la muestra de pacientes con HIV-Pneumonia [58]. Por otra parte, se analizaron muestras de LBA acelular (BALF) ya que Dickson et al en 2014 reportaron la existencia de microbiota en este tipo de muestras y para su obtención se utilizó centrifugación como método de concentración [59]. Otra muestra de gran importancia son los BALFs del banco de muestras del laboratorio de Microbiología del INER, estas muestras fueron almacenadas por varios años y aún así se logró extraer material genético, por lo que se abren las posibilidades de utilizar y almacenar este tipo de muestra para la caracterización del microbioma pulmonar.

Con las muestras de LBA y LB tanto directo como concentrado y BALF, se determinó el volumen y el tipo de muestra adecuada. Existe un mayor rendimiento de amplificación cuando la muestra se encuentra concentrada, ya que las bandas de amplificación son más intensas o se logra un resultado positivo en comparación con la muestra directa. Se definió que el volumen de la muestra de LBA y LB es de 10 ml y el método de concentración fue la centrifugación a 1200rpm durante 15 min a 4°C. Se determinó que el método de extracción con 15 minutos de agitación a 1000 rpm por 55°C es más eficaz ya que logra lisar las micobacterias para obtener material genético.

En la amplificación del fragmento de 550 pb de la región V3V4 del gen 16S ribosomal inicialmente se utilizaron las condiciones del protocolo de la plataforma de illumina® ya



que hasta la fecha no se han reportado trabajos de secuenciación con muestras de LBA en pacientes con TB, pero se han registrado estudios en asma [60], fibrosis quística [61, 62], COPD [12], fumadores [14] y pneumonia [63]; y sujetos sanos [22].

Con la finalidad de amplificar las muestras negativas se aumentó la concentración de primers a 10 $\mu$ M sin embargo, las concentraciones de primers influyen en el resultado del PCR ya que a concentraciones altas pueden generarse “mispriming” y acumulación de producto inespecífico así como aumentar las probabilidades de generar dímeros de primers que son templados independientes [64]. En cuanto a la concentración de la muestra que puede ser ADN de doble o de una sola cadena o moléculas de ARN, teóricamente es suficiente con una sola copia intacta de ácido nucleico, pero es recomendable utilizar como mínimo un nanogramo de ADN clonado, un microgramo de ADN genómico ó 105 moléculas de ácido nucleico [34].

Se observó que al amplificar el fragmento de 550pb aumentando la concentración de ADN bacteriano en la muestra a 100ng y de primers a 10 $\mu$ M se incrementó la intensidad de la banda. Harris et al en 2007 [61] reportaron para muestras de LBA una concentración de ADN de 1-50ng y primers a 300 $\mu$ M. En trabajos realizados en TB en muestras de expectoración se reportaron concentraciones de 50ng de ADN bacteriano y 100 $\mu$ M de primers [15]. Aunque en nuestro trabajo estamos utilizando una mayor cantidad de ADN, comparado con estos trabajos utilizamos una menor cantidad de primers.

En cuanto al paciente 2 no se obtuvo ninguna amplificación a pesar del aumento en la cantidad de ADN y de la concentración de primers, esto posiblemente se deba a una deficiente extracción de ADN o a una ineficiente toma de muestra, ya que es una muestra de un paciente con TBP confirmada.

Los resultados posteriores se analizaron en geles de agarosa, al comparar los dos métodos utilizados para la visualización de los fragmentos de amplificación, podemos mencionar que ambos poseen ventajas y desventajas. El costo económico es más bajo en geles de agarosa que en el bioanalizador, pero en los geles de agarosa es necesario usar una mayor cantidad de la muestra, 5 $\mu$ l en comparación con 1 $\mu$ l que se usa en el bioanalizador. En este trabajo resultó eficiente el uso de geles de agarosa. El punto más importante que se tomó en cuenta para definir el método de análisis fue la economía ya que el microchip te permite obtener el resultado en 30 minutos con gran sensibilidad y requiere de 1 $\mu$ l de muestra mientras que el análisis en gel requiere más tiempo en preparar el gel, consume más muestra y reactivos y el tiempo de corrida es mayor.

La amplificación resultó más eficiente con 35 ciclos que con 25 ya que las muestras que ya habían amplificado anteriormente mostraron una mayor intensidad de banda y se logró la amplificación de muestras que no habían amplificado. La mayoría de los PCR funcionan bien con 30 ciclos, aunque pueden usarse desde 20 ciclos hasta 35, ha menor número de ciclos disminuyen el nde ci de bandas con amplificaciones

inspecciones inuyen el ha e loa menor cantidad de producto, es decir el rendimiento de la reacción disminuye y a mayor número de ciclos aumentan las amplificaciones inespecíficas [64, 65].

Las posteriores amplificaciones se realizaron con 100 ng de ADN, 10  $\mu$ M de primers y con 35 ciclos, donde se incluyen tanto a pacientes con tuberculosis y controles sanos. Para LBA Harris et al, 2007 [61] reportaron un PCR con 20 ciclos y Erb-Downward utilizaron 45 ciclos, por otra parte, en trabajos realizados con una muestra diferente al LBA se reportaron 30 ciclos [16] y en tuberculosis se reportaron 28 ciclos [20], 30 ciclos [19], 35 ciclos [18]. Al comparar el número de ciclos utilizados en este trabajo con los reportes anteriores, podemos ver que coinciden con los utilizados por Botero [18] para muestras de expectoración.

Cuando las temperaturas estándares del PCR no están dando resultados apropiados estas pueden modificarse, con la finalidad de disminuir las bandas inespecíficas. Si utilizamos una temperatura muy baja obtendremos un PCR poco específico, mientras que si utilizamos una temperatura más alta la especificidad será mayor, aunque no debe ser demasiado alta ya que no se amplificará nada, pues la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios será poco estable y la polimerasa no podrá iniciar la síntesis [65], por dicha razón se optó por ir aumenta de 2° en 2° dicha temperatura hasta alcanzar los 64°C. (55, 58, 60, 62 y 64 °C). La electroforesis mostro resultados similares para todas las temperaturas, es decir no se logró mejorar la especificidad de la amplificación.

Utilizando el fragmento de 1465 pb se logró clasificar un mayor porcentaje de secuencias no en comparación con la región V3V4. De la misma forma se logró clasificar un mayor número de especies con el mismo fragmento que con la región V3V4. Por ende resulta más beneficiosos realizar la amplificación del fragmento de 1466pb que de 550 pb.

Los resultados preliminares de secuenciación proporcionan a grandes rasgos y de manera general los componentes de la microbiota pulmar en pacientes con TB, sin embargo es necesario realizar un análisis bioinformatico más detallado para poder definir a los verdaderos habitantes del pulmón en la TBP. Los géneros Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria ya han sido reportados para pacientes con TBP [15, 18-20, 25]

Por ultimo en este trabajo se evaluaron únicamente las condiciones para el procesamiento de muestras de ADN bacteriano, sin embargo el microbioma no está compuesto únicamente por bacterias, también existe la presencia de virus, hongos y protozoarios, para trabajos posteriores sería enriquecedor realizar el análisis de los demás componentes de la microbiota pulmonar.

## Conclusiones.

De acuerdo a los resultados podemos concluir que las condiciones recomendadas para el procesamiento de muestras de LBA, LB y BALF son:

- 1) El volumen de la muestra de 10 ml.
- 2) La muestra debe concentrarse por centrifugación a 1200rpm durante 15 min a 4°.
- 3) Para asegurar la lisis de la pared celular de las micobacterias incubar la muestra a 55°C por 15 min con agitación. Y posteriormente seguir el procedimiento de la extracción de ADN bacteriano.
- 4) La amplificación debe ser con 100 ng de ADN, una concentración de cada primer de 10 µM durante 35 ciclos de amplificación.
- 5) Para la amplificación del fragmento de 1465 pb del gen 16S ribosomal es conveniente utilizar un kit para PCR para fragmentos largos, como el FastStar High Fidelity PCR System de Roche® o uno similar.
- 6) La secuenciación del fragmento de 1465pb da mayor información para la clasificación bacteriana en comparación del fragmento de 550pb.

## Anexos

### Montaje del DNA Chip

Primero se prepara una mezcla de colorante y gel, para ello se agregaron 25µl del colorante de ADN a la matriz de gel, la solución se centrifugó a 1500g  $\pm$ 20% por 10 minutos. La solución debe ser almacenada en un lugar oscuro a 4°C. Una vez hecha la solución de colorante y gel se prosiguió con la colocación de las muestras en el DNA chip, para ello se colocó el chip en la estación y se pipetearon 9µl de la mezcla previamente preparada de gel y colorante y se colocaron en la marca correspondiente. El embolo de la jeringa de la estación se colocó en 1ml y se cerró la estación, una vez que la jeringa estuvo en posición vertical se presionó hasta el seguro de la estación se dejaron pasar 30 segundos y se liberó el seguro, se dejaron pasar 5 segundos para que el embolo regresara a la posición de 10ml, se retiró el chip de la estación y se colocaron 9µl de la mezcla de colorante y gel en la segunda marca.

Después se adicionaron 5µl del marcador en los pozos para las 12 muestras y en el pozo de la escalera, sin dejar pozos vacíos. Por último, se colocó 1µl de la escalera de ADN en el pozo marcado y se colocó 1µl de cada muestra siendo una muestra por pozo, a los pozos sin muestra se les adiciono 1µl de agua desionizada; una vez finalizado se colocó el chip en el vortex por 1 min a 2400 rpm y se corrió en el Agilent 2100 bioanalyzer.

### Preparación de un gel de agarosa al 2%

En la preparación de geles se utilizaron dos tamaños dependiendo del número de muestras a evaluar: el wide y mini.

Preparación del gel Wide: Se pesaron 1.06g de agarosa y se mezclaron con 53 ml de agua.

Preparación del gel Mini: Se pesaron 0.66g de agarosa y se mezclaron con 33 ml de agua.

### Solución amortiguadora TBE 10x

Para la preparación de la solución se utilizaron tres reactivos: Tris, Ac. Bórico y EDTA. Primero se obtuvieron sus pesos moleculares y se calculó los gramos necesarios para preparar la solución a 1M:

Tris-----107.8g  
Ác. Bórico---55g  
EDTA-----7.4g

Se disolvieron en agua y antes de aforar se ajustó el pH y por último se filtró con una membrana de 0.45Mm.

## **Glosario:**

**Microbiota:** Poblaciones bacterianas que habitan un nicho específico, forman parte del microbioma..

**Microbioma:** Conjunto de poblaciones bacterianas, sus metabolitos, sus nicho y sus genomas.

**Metagenoma:** Total de ADN de una muestra.

**Metagenómica:** Estudio del material genético, principalmente de muestras ambientales.

**Clústeres:** Conjunto, grupo, conglomerado.

**Lavado secuencial:** Se refiere al LB que se toma de manera consecutiva, primero se realiza el LB normal y se recolecta el líquido, enseguida se realiza un segundo lavado y finalmente uno tercero.

## Referencias

1. *Human Microbiome Project*. [cited 2015 Marzo, 2015]; <http://www.hmpdacc.org/>.
2. Cho, I. and M.J. Blaser, *The human microbiome: at the interface of health and disease*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 260-70.
3. Blaser, M.J. and S. Falkow, *What are the consequences of the disappearing human microbiota?* Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(12): p. 887-94.
4. Baumann, P. and N.A. Moran, *Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1997. **72**(1): p. 39-48.
5. Cox, M.J., W.O. Cookson, and M.F. Moffatt, *Sequencing the human microbiome in health and disease*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(R1): p. R88-94.
6. Tlaskalova-Hogenova, H., et al., *Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases*. Immunol Lett, 2004. **93**(2-3): p. 97-108.
7. Hui, A.W., et al., *The human microbiota: a new direction in the investigation of thoracic diseases*. J Thorac Dis, 2013. **5 Suppl 2**: p. S127-31.
8. Schuurman, T., et al., *Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(2): p. 734-40.
9. Dickson, R.P. and G.B. Huffnagle, *The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease*. PLoS Pathog, 2015. **11**(7): p. e1004923.
10. Dickson, R.P., J.R. Erb-Downward, and G.B. Huffnagle, *The role of the bacterial microbiome in lung disease*. Expert Rev Respir Med, 2013. **7**(3): p. 245-57.
11. Dickson, R.P., F.J. Martinez, and G.B. Huffnagle, *The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases*. Lancet, 2014. **384**(9944): p. 691-702.
12. Erb-Downward, J.R., et al., *Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16384.
13. Charlson, E.S., et al., *Assessing bacterial populations in the lung by replicate analysis of samples from the upper and lower respiratory tracts*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e42786.
14. Morris, A., et al., *Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(10): p. 1067-75.
15. Cui, Z., et al., *Complex sputum microbial composition in patients with pulmonary tuberculosis*. BMC Microbiol, 2012. **12**: p. 276.
16. Stearns, J.C., et al., *Culture and molecular-based profiles show shifts in bacterial communities of the upper respiratory tract that occur with age*. ISME J, 2015.
17. Blainey, P.C., et al., *Quantitative analysis of the human airway microbial ecology reveals a pervasive signature for cystic fibrosis*. Sci Transl Med, 2012. **4**(153): p. 153ra130.
18. Botero, L.E., et al., *Respiratory tract clinical sample selection for microbiota analysis in patients with pulmonary tuberculosis*. Microbiome, 2014. **2**: p. 29.
19. Wu, J., et al., *Sputum microbiota associated with new, recurrent and treatment failure tuberculosis*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83445.
20. Cheung, M.K., et al., *Sputum microbiota in tuberculosis as revealed by 16S rRNA pyrosequencing*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54574.

21. Charlson, E.S., et al., *Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(6): p. 536-45.
22. Charlson, E.S., et al., *Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(8): p. 957-63.
23. *Organización mundial de la Salud*. [cited 2015 Marzo, 2015]; <http://www.who.int/es/>.
24. *Global tuberculosis Report 2014 -World Health Organization -WHO*, 2014. p. 171.
25. Krishna, P., A. Jain, and P.S. Bisen, *Microbiome diversity in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016. **35**(7): p. 1205-10.
26. Weisburg, W.G., et al., *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 697-703.
27. Petrosino, J.F., et al., *Metagenomic pyrosequencing and microbial identification*. Clin Chem, 2009. **55**(5): p. 856-66.
28. Mathews, C.K. and K.E. Van Holde, *Bioquímica*. 3\* ed. 2002, Madrid: Pearson Educación. 1335 p.
29. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Principios de bioquímica*. 3 ed ed. 2000, New York: Worth Publishers. XXIX, 1152 p.
30. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Bioquímica*. 6\* ed. 2009, Barcelona etc.: Reverté. XXXVIII, 1026 p.
31. Klug, W.S., et al., *Conceptos de genética*. 8a ed ed. 2006, Madrid etc.: Pearson-Prentice Hall. XXIX, 884 p.
32. Fonseca Dora, H.M.y.N.C., *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica*. 2010, Colombia: Universidad del Rosario. 71.
33. Phillips-Mora Wilberth , R.H.y.F.P.J., *Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo*. 1995, Costa Rica: CATIE. 185.
34. Cornejo A., A.S., Rendón B., M. Rocha, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. 2014, México: SEMARNAT. 274.
35. Pierce, B.A., *Genetics : a conceptual approach*. 4th ed. 2012, New York Basingstoke ;. xxi, 721, p.
36. Jiménez García, L.F. and H. Merchant Larios, *Biología celular y molecular*. 2003, Naucalpan de Juárez (México): Editorial Médica Panamericana. 853 p., 16 p. de lám. col.
37. D., T. and M.T. Madigan, *Brock: Biología de los microorganismos*. 12 ed ed. 2009, Madrid: Pearson Addison Wesley. XXXIII, 1259 p.
38. Cai, L., et al., *Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53649.
39. Drancourt, M., et al., *16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(10): p. 3623-30.
40. Gurtler, V. and V.A. Stanisich, *New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region*. Microbiology, 1996. **142** ( Pt 1): p. 3-16.

41. Rodicio Mdel, R. and C. Mendoza Mdel, [*Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2004. **22**(4): p. 238-45.
42. Amit-Romach, E., D. Sklan, and Z. Uni, *Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers*. *Poult Sci*, 2004. **83**(7): p. 1093-8.
43. Wilson, K.H., R.B. Blichington, and R.C. Greene, *Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction*. *J Clin Microbiol*, 1990. **28**(9): p. 1942-6.
44. Fox, G.E., et al., *Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(10): p. 4537-41.
45. Edwards, K.J., et al., *Utility of real-time amplification of selected 16S rRNA gene sequences as a tool for detection and identification of microbial signatures directly from clinical samples*. *J Med Microbiol*, 2012. **61**(Pt 5): p. 645-52.
46. Rahmani, S., et al., *Detection of bacteria by amplifying the 16S rRNA gene with universal primers and RFLP*. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 2006. **19**.
47. Klindworth, A., et al., *Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(1): p. e1.
48. Wang, Y. and P.Y. Qian, *Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7401.
49. Krebs, J.E., et al., *Lewin's genes XI*. 11th ed. 2014, Burlington, Mass.: Jones & Bartlett Learning. xxvii, 940 p.
50. Alberts, B., M. Dufort Coll, and M. Llobera i Sande, *Biología molecular de la célula*. 3a ed. 2002, Barcelona: Omega. XLVIII, 1387 p.,.
51. Brown, T.A., *Genomas*. 3a ed ed. 2008, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. XII, 738 p.
52. Lodish, H.F., et al., *Molecular cell biology*. Seventh edition, International edition / ed. 2013. xxxiii, 1154, pages.
53. Probiotek. [cited 2016 25/04/2016]; Available from: <http://www.probiotek.com/producto/gelred-nucleic-acid-gel-stain-10000x/>.
54. Toma, I., et al., *Single-molecule long-read 16S sequencing to characterize the lung microbiome from mechanically ventilated patients with suspected pneumonia*. *J Clin Microbiol*, 2014. **52**(11): p. 3913-21.
55. Rogers, G.B., et al., *Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients: 16S ribosomal DNA (rDNA) length heterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling*. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(8): p. 3548-58.
56. Rogers, G.B., et al., *characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(11): p. 5176-83.
57. Armougom, F., et al., *Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009. **28**(9): p. 1151-4.



58. Iwai, S., et al., *The lung microbiome of Ugandan HIV-infected pneumonia patients is compositionally and functionally distinct from that of San Franciscan patients.* PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95726.
59. Dickson, R.P., et al., *Cell-associated bacteria in the human lung microbiome.* Microbiome, 2014. **2**: p. 28.
60. Denner, D.R., et al., *Corticosteroid therapy and airflow obstruction influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways.* J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(5): p. 1398-1405 e3.
61. Harris, J.K., et al., *Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20529-33.
62. Hogan, D.A., et al., *Analysis of Lung Microbiota in Bronchoalveolar Lavage, Protected Brush and Sputum Samples from Subjects with Mild-To-Moderate Cystic Fibrosis Lung Disease.* PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0149998.
63. Kawanami, T., et al., *Clinical impact of methicillin-resistant staphylococcus aureus on bacterial pneumonia: cultivation and 16S ribosomal RNA gene analysis of bronchoalveolar lavage fluid.* BMC Infect Dis, 2016. **16**(1): p. 155.
64. Innis, M.A., *PCR protocols : a guide to methods and applications.* 1990, San Diego ; London: Academic Press. xviii, 482 p.
65. Eguiarte L., V.S., Aguirre X., *Ecología molecular.* 2007, Mexico: INECC. 594.