



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## Grao en Bioloxía

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Microbioma da fibrose pulmonar idiopática**

**Idiopathic pulmonary fibrosis microbiome**

**Microbioma de la fibrosis pulmonar idiopática**



**Samuel Saavedra Martínez**

**Curso: 2021 - 2022.**

**Convocatoria: Xullo.**

*Directora 1: Margarita Poza Domínguez*

*Director 2: Juan Andrés Vallejo Vidal*



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Facultade de ciencias**  
**Departamento de Bioloxía**  
**Área de Microbioloxía**

**Traballo de Fin de Grao**

D.<sup>a</sup> Margarita Poza Domínguez, profesora asociada de Universidade do Departamento de Bioloxía da Universidade da Coruña e investigadora do Instituto de Investigación Biomédica da Coruña e D. Juan Andrés Vallejo Vidal, investigador do Instituto de Investigación Biomédica da Coruña, informan que a memoria do Traballo de Fin de Grao titulada "Microbioma da fibrose pulmonar idiopática" presentada por D. Samuel Saavedra Martínez, foi realizada baixo a nosa dirección e, considerándoa finalizada, autorizamos a súa presentación e defensa ante o correspondente tribunal cualificador.

Para que así conste, expedimos o presente informe na Coruña, a 21 de xullo de 2022.

**POZA**  
**DOMINGUEZ**  
**MARGARITA**  
**- 32811149Q**

Firmado  
digitalmente por  
POZA DOMINGUEZ  
MARGARITA -  
32811149Q  
Fecha: 2022.07.21  
10:10:49 +02'00'

**VALLEJO**  
**VIDAL JUAN**  
**ANDRES -**  
**53171839W**

Firmado  
digitalmente por  
VALLEJO VIDAL  
JUAN ANDRES -  
53171839W  
Fecha: 2022.07.21  
10:11:06 +02'00'

# Índice

1. Resumo / Abstract / Resumen .....	1
1.1. Resumo.....	1
1.2. Abstract .....	1
1.3. Resumen.....	2
2. Introducción .....	2
2.1. Descrición da enfermidade .....	2
2.1.1. Características xerais.....	2
2.1.2. Contexto e diferentes pneumonías.....	3
2.1.3. Factores de risco .....	3
2.1.4. Diagnóstico .....	3
2.1.5. Cadro sintomático .....	4
2.1.6. Desenvolvemento .....	4
2.2. Microbioma da FPI .....	4
2.2.1. Os virus na FPI .....	5
2.2.2. As bacterias na FPI.....	5
2.3. Secuenciación de nova xeración (SNX).....	5
3. Obxectivos.....	6
4. Materiais e métodos .....	6
4.1. Recollida das mostras.....	6
4.2. Extracción do ADN bacteriano a partir das mostras .....	7
4.2.1. Mostras líquidas .....	7
4.2.2. Mostras de hisopados .....	7
4.2.3. Parte común do protocolo de extracción de ADN bacteriano .....	7
4.3. Cuantificación do ADN. ....	9
4.4. Amplificación por PCR dunha rexión do ARNr 16S bacteriano. ....	9
4.5. Electroforese en xel de agarosa. ....	10
4.6. Purificación do ADN con contas magnéticas.....	10
4.7. PCR de indexado.....	11
4.8. Electroforese de agarosa dos produtos da PCR de indexado. ....	12
4.9. Purificación do ADN indexado con contas magnéticas.....	12
5. Resultados .....	12
6. Discusión .....	18
7. Conclusións / Conclusions / Conclusiones .....	20
7.1. Conclusións .....	20

7.2. Conclusions .....	20
7.3. Conclusiones.....	20
8. Bibliografía .....	21

## Agradecementos

Quero aproveitar a ocasión para agradecer, en primeiro lugar, o apoio que me deron os meus pais, avós e amigos, especialmente Kike. Nestes catro anos recibín un cariño e forza brutal pola súa banda. Sen eles nada disto houbera sido do xeito que foi. Tamén a todos os meus compañeiros e amigos de carreira, cos que tantas boas lembranzas xuntei.

Finalmente, agradézo vos de corazón a Margarita Poza, Juan Vallejo e ao equipo enteiro do servizo de microbioloxía do CHUAC pola grandísima oportunidade que destes para traballar con vós, por toda a paciencia e enriquecemento persoal e profesional que gañei nestes meses e, en definitiva, por todo o que fixestes por min neste tempo. Destacar a Kelly Conde e Mohammed Nasser, os cales estiveron dende o comezo, tiveron moita paciencia comigo e adicaron parte do seu tempo á miña aprendizaxe.

Aínda que non menciono a toda a xente que me axudou ou formou parte do meu camiño, sabedes abondo quen fostes. Grazas por permitirme aprender de todos vós.

## 1. Resumo / Abstract / Resumen

### 1.1. Resumo

A fibrose pulmonar idiopática é unha enfermidade respiratoria que causa inflamación e cicatrización nos pulmóns. Presenta síntomas similares a outras enfermidades respiratorias, polo que para un correcto diagnóstico é preciso unha biopsia e unha tomografía computarizada de alta resolución. Ten unha elevada mortalidade e os doentes adoitan falecer aos 3 anos dende o diagnóstico. Accións como fumar ou adicarse á labranza están relacionadas coa maior predispoñibilidade a padecer a enfermidade. Tamén se observou relación entre a presenza dalgúns virus e bacterias coa doenza. O obxectivo final, no que se enmarca o presente proxecto, consiste en identificar e analizar o microbioma dos doentes de fibrose pulmonar idiopática para tratar de comprender a súa influencia sobre a enfermidade. No presente traballo levouse a cabo a preparación de 62 mostras procedentes de hisopados orofarínxeos, broncoaspirados e de lavados broncoalveolares de doentes de fibrose pulmonar idiopática e de persoas sas, co fin de obter unhas mostras idóneas para proceder á súa secuenciación nunha plataforma de secuenciación Illumina MiSeq.

Palabras chave: Fibrose pulmonar idiopática, bacteria, microbioma, secuenciación, ARNr 16S.

### 1.2. Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis is a respiratory disease that causes inflammation and scarring in the lungs. It presents symptoms similar to many other respiratory diseases, so a biopsy and high-resolution computed tomography are necessary for a correct diagnosis of the disease. It has a very high mortality and patients usually die 3 years after diagnosis. Actions such as smoking or being a farmer are related to a greater predisposition to suffer the disease. A relationship was also observed between the presence of some viruses and bacteria with the disease. The final objective, in which the present project is framed, is to identify and analyze the microbiome of idiopathic pulmonary fibrosis patients to try to understand its influence on the disease. In the present work, 62 samples from oropharyngeal swab, bronchoaspiration and bronchoalveolar lavage of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and healthy

people were prepared to obtain samples suitable for sequencing in an Illumina MiSeq sequencing platform.

Keywords: Idiopathic pulmonary fibrosis, bacteria, microbiome, sequencing, 16S rRNA.

### 1.3. Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad respiratoria que causa inflamación y cicatrización en los pulmones. Presenta síntomas similares a otras muchas enfermedades respiratorias, por lo que para un correcto diagnóstico de la enfermedad es necesaria una biopsia y una tomografía computarizada de alta resolución. Tiene una muy elevada mortalidad y los pacientes suelen fallecer 3 años después del diagnóstico. Acciones como fumar o ser granjero están relacionadas con la mayor predisponibilidad a padecer la enfermedad. También se observó relación entre la presencia de algunos virus y bacterias con la enfermedad. El objetivo final, en el que se enmarca el presente proyecto, consiste en identificar y analizar el microbioma de los pacientes de fibrosis pulmonar idiopática para tratar de comprender su influencia sobre la enfermedad. En el presente trabajo se llevó a cabo la preparación de 62 muestras procedentes de hisopados orofaríngeos, broncoaspirados y de lavados broncoalveolares de pacientes de fibrosis pulmonar idiopática y de personas sanas, con el fin de obtener unas muestras idóneas para proceder a su secuenciación en una plataforma de secuenciación Illumina MiSeq.

Palabras clave: Fibrosis pulmonar idiopática, bacteria, microbioma, secuenciación, ARNr 16S.

## 2. Introducción

### 2.1. Descripción da enfermidade

#### 2.1.1. Características xerais

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é unha enfermidade respiratoria localizada nos pulmóns e clasificada dentro das enfermidades pulmonares intersticiais (EPI) (Quinn et al., 2019). Trátase dunha pneumonía que causa inflamación e posterior cicatrización do interior do órgano. Ademais, presenta unha orixe descoñecida, referida coa palabra “idiopática” (Nalysnyk et al., 2012).

### 2.1.2. Contexto e diferentes pneumonías

Nun pasado incluíanse moitas formas de pneumonías intersticiais idiopáticas dentro da FPI, pero agora só unha forma concreta chamada pneumonía intersticial habitual é considerada como FPI. Debido a isto, moitos dos estudos que houbo nun pasado non poden ser empregados xa que houbo un cambio de termos e concepción desta enfermidade. Os diferentes tipos de pneumonías intersticiais son os seguintes (todas precedidas polo termo “pneumonía intersticial”): habitual, descamativa, bronquiolite respiratoria, aguda, inespecífica e organizativa criptoxénica ou bronquiolite obliterante (Gross & Hunninghake, 2001).

### 2.1.3. Factores de risco

O ambiente no que se moven as persoas, entre os que se atopa o tabaquismo e as microaspiracións crónicas, poden contribuír á lesión do epitelio e á morte celular programada das células alveolares. Patoloxías previas tamén poden influír na patoxénese da FPI, entre elas atópanse as infeccións víricas crónicas tales como o herpes (King et al., 2011). Principalmente, fumar e en segundo lugar a agricultura aumentan 49.1 e 20.8 veces, respectivamente, a probabilidade de padecer a enfermidade con respecto a unha persoa non exposta a estes factores de risco. Do mesmo xeito, factores como estar exposto ao gando, ao po de madeira e metal e a restos de rocha, area e sílice aumentan as probabilidades entre 3.5 e 5 veces, fronte a unha persoa non exposta a estes factores (Taskar, 2006). Tamén, o factor da idade e de ser home aumentan as probabilidades de sufrir FPI (Gross & Hunninghake, 2001; King et al., 2011).

### 2.1.4. Diagnóstico

Diagnosticar a unha persoa con FPI é moi complexo e precísase un equipo de profesionais interdisciplinarios para a correcta identificación da enfermidade. Unha vez se sabe que a enfermidade é unha EPI, lévase a cabo tomografía computarizada de alta resolución (TCAR) e tamén unha biopsia pulmonar. Se as dúas probas son positivas pódese afirmar a presenza da enfermidade (Nalysnyk et al., 2012).

### 2.1.5. Cadro sintomático

Un doente de FPI adoita presentar diferentes síntomas que se poden confundir con outras enfermidades. Principalmente presentan dificultades respiratorias e falta de aire sen ter feito esforzos físicos importantes, ruído ao respirar ronco e grave, deterioro da función pulmonar, inflamación nos extremos dos dedos na metade dos casos (Nalysnyk et al., 2012) e tose seca que non desaparece e empeora tras falar ou facer exercicio (Vigeland et al., 2017). O refluxo gastroesofáxico está presente de 4.5 a 9 veces máis nos doentes de FPI que na poboación sa (Wakwaya & Brown, 2019), polo que pode considerarse un factor de risco.

### 2.1.6. Desenvolvemento

A enfermidade ten un rango de incidencia na poboación entre 55 e 75 anos, sendo a media do momento do diagnóstico aos 66 anos (Gross & Hunninghake, 2001). A media de supervivencia despois do diagnóstico de FPI por biopsia xira en torno aos tres anos, mais cada caso é particular (King et al., 2011).

## 2.2. Microbioma da FPI

O microbioma do epitelio do pulmón presenta unha moi diversa comunidade de microorganismos, en contra do que historicamente se cría. Existen diferentes xeitos polos cales un microorganismo pode diseminar ao aparello respiratorio, sendo o máis común no caso da FPI as microaspiracións (Invernizzi & Molyneaux, 2019). Tusir, a limpeza mucociliar e as defensas innatas e adaptativas son diferentes xeitos de eliminar parte dese microbioma. Deste xeito, establécese un equilibrio entre a entrada e a saída de microorganismos. Aínda así, este equilibrio pode verse alterado por diferentes factores como a dispoñibilidade de nutrientes, o pH, o osíxeno, a temperatura, etc, de tal maneira que a presenza dalgúns dos habitantes do microbioma pulmonar pode verse reducida ou aumentada (Varone et al., 2019).



### 2.2.1. Os virus na FPI

Os virus son o principal foco de estudo do microbioma da FPI. Crese que os Herpesvirus son un dos principais grupos que promoven o desenvolvemento da enfermidade, seguido doutros como o Torque Teno virus, Citomegalovirus ou o virus da Gripe A (Invernizzi & Molyneaux, 2019).

### 2.2.2. As bacterias na FPI

As bacterias son outros dos actores importantes no desenvolvemento da enfermidade. Viuse unha maior probabilidade de presentar diferentes xéneros como *Haemophilus*, *Neisseria*, *Streptococcus* e *Veillonella* nos doentes de FPI que nas persoas sas (Invernizzi & Molyneaux, 2019, Fastrès et al., 2017). Observouse que un 89 % das especies atopadas eran Gram-negativas, tales como *Klebsiella pneumonia*, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Acinetobacter baumannii* (Weng et al., 2019). Os doentes da enfermidade teñen unhas comunidades microbianas menos diversas que as persoas sas (Molyneaux et al., 2014), patrón que se repite normalmente en moitas outras enfermidades. Malia todo isto, non se ten claro se as bacterias son a causa ou unha consecuencia posterior da enfermidade (Fastrès et al., 2017).

### 2.3. Secuenciación de nova xeración (SNX)

A secuenciación de nova xeración é a evolución directa da secuenciación polo método de Sanger, unha técnica que ten como finalidade a determinación da orde dos nucleótidos nunha secuencia concreta de ADN. O método de Sanger foi creado no 1977 (Sanger et al., 1977) e permite secuenciar ata aproximadamente 1000 pb cunha precisión dun 99.999 % (Shendure & Ji, 2008), o cal non é abondo para secuenciar o xenoma completo ou múltiples xenomas simultaneamente dunha soa vez. A SNX, sen embargo, permite secuenciar cantidades da magnitude de xenomas enteiros ou de moitas rexións de ADN á vez, polo que o traballo que fai corenta anos levaría cantidades exorbitadas de horas, agora pódese facer en dous días.

### 3. Obxectivos

O presente traballo enmárcase dentro dun proxecto maior que ten como finalidade secuenciar o microbioma bacteriano a partir de mostras de doentes de FPI empregando a tecnoloxía Illumina e un dispositivo MiSeq, que permite a secuenciación da rexión hipervariable do ARNr 16S de múltiples individuos ao mesmo tempo (MiSeq System, 2022) para estudar a influencia das poboacións bacterianas na orixe ou no desenvolvemento da FPI.

Para chegar a ese reto maior, no presente traballo formulamos os seguintes obxectivos:

- Obter ADN de orixe bacteriana a partir de mostras de lavado broncoalveolar (LBA), broncoaspirado (BAS) e hisopado orofarínxeo (HOF) de doentes de FPI e de persoas sas (controis).
- Amplificar mediante PCR a rexión hipervariable do ARNr 16S empregando o ADN bacteriano como molde.
- Obter mostras idóneas de ADN procedente do microbioma (bacterioma) para a súa posterior secuenciación masiva.

### 4. Materiais e métodos

#### 4.1. Recollida das mostras

Para coñecer o microbioma de doentes con FPI e ver se hai unha relación entre o microbioma e esta enfermidade, empréganse mostras de doentes con FPI, nas que se analiza o microbioma mediante tecnoloxías de secuenciación de nova xeración (SNX). Precísanse mostras de doentes de FPI e de persoas sas que foron sospeitosas de padecer FPI pero que resultaron ter outra doenza. A comparativa entre os enfermos e os sans dará información sobre a influencia do microbioma na FPI.

Empregáronse tres tipos de mostras de cada persoa: LBA (lavado broncoalveolar), BAS (broncoaspirado) e HOF (hisopado orofarínxeo). Todas estas mostras son preservadas a -20°C en presenza de axentes que preservan os ácidos nucleicos.

As mostras foron obtidas polo persoal sanitario do Servizo de Pneumoloxía do Hospital Universitario da Coruña. Para a obtención das mostras de BAS e LBA faise unha

broncoscopia. Nun primeiro momento realízase o broncoaspirado e, posteriormente, o lavado broncoalveolar. Noutro momento, cun hisopo flexible faise un hisopado orofarínxeo, introducindo un hisopo pola cavidade oral ata a zona da gorxa.

## 4.2. Extracción do ADN bacteriano a partir das mostras

Segundo se a mostra é líquida (BAS e LBA) ou se está adherida a un hisopo (HOF) séguese un protocolo diferente ao comezo.

### 4.2.1. Mostras líquidas

Comezando polas mostras líquidas, desconxélanse e homoxenéizanse coa axuda dun axitador vórtex para, acto seguido, centrifúgalas (5000 rpm, 2 min, 4°C). Con isto, aparece un precipitado que non interesa e un sobrenadante do que, nunha cámara de fluxo laminar na que se traballará de aquí en adiante, se pasan 2 mL a un tubo Eppendorf. Centrifúgase o sobrenadante que se extraeu (13000 rpm, 10 min, 4°C) e continúaase coa parte común do protocolo descrita no punto 4.2.3.

### 4.2.2. Mostras de hisopados

Neste caso, ao traballar con mostras adheridas a un hisopo, é preciso desprender a mostra do hisopo. Para conseguilo, dentro dunha cámara de fluxo laminar, cúrtase o extremo do hisopo que contén a mostra e bótase nun tubo Eppendorf con 500 µL de soro fisiolóxico Braun 0.9%. Para retirar a máxima cantidade posible de mostra do extremo, axítase o tubo 3 min a máxima potencia empregando un vórtex. Unha vez pasado este tempo, cunhas pinzas estériles retírase o hisopo escorrendo o soro polas paredes do tubo ata que quede seco. Centrifúgase o líquido (13000 rpm, 30 min, 4°C) e continúaase coa parte común descrita no punto 4.2.3.

### 4.2.3. Parte común do protocolo de extracción de ADN bacteriano

Unha vez feita a última centrifugación, retírase o sobrenadante para quedar co precipitado. Engádense 100 µL de auga libre de nucleasas (Ambion) ao precipitado e

mestúrase a mostra coa axuda dunha micropipeta. Logo pásanse 100  $\mu\text{L}$  da mestura a un tubo Eppendorf novo e engádense 5  $\mu\text{L}$  dun cóctel enzimático que contén lisostafina (1.25 kU/mL) e liozima (20 mg/mL) (Lysostaphin from *Staphylococcus staphylolyticus*, Lysozyme from chicken egg white; Sigma-Aldrich) e, por outro lado, tamén se engaden 2  $\mu\text{L}$  de mutanolisina (3 kU/mL) (Mutanolysin from *Streptomyces globisporus* ATCC 21553; Sigma-Aldrich), destinada á rotura das paredes bacterianas. Ao botar estes reactivos incúbanse as mostras unha hora a 37°C con axitación continua (300 rpm). Pasado o tempo, engádense 4.5  $\mu\text{L}$  de Glucanex 2% (Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*; Sigma-Aldrich) e incúbanse as mostras (300 rpm, 15 min, 60°C). Trala incubación, engádense 50  $\mu\text{L}$  de auga libre de nucleasas (Ambion). Despois, transfírense 150  $\mu\text{L}$  da mostra a un tubo Eppendorf novo e engádense 150  $\mu\text{L}$  dun reactivo que contén 1  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (Thermo Scientific) e 150  $\mu\text{L}$  dunha solución de lise (2X T&C Lysis Buffer) (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit Bulk Reagents; Epicentre) e mestúrase utilizando un vórtex. Incúbanse as mostras (300 rpm, 15 min, 65°C). Trala incubación, métese as mostras en xeo 5 min. Despois do arrefriamento en xeo, engádense 150  $\mu\text{L}$  de *MPC Protein Precipitation Reagent* (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit Bulk Reagents; Epicentre) aos 300  $\mu\text{L}$  de mostra, que xa tiñamos, e axítase 10 s nun vórtex. A continuación, centrifúganse as mostras (14000 g, 10 min, 4°C) para que precipite unha porción da mostra. Recóllese a totalidade do sobrenadante e pásase a un tubo Eppendorf novo. Agréganse 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol á mostra e invértese o tubo entre 30 e 40 veces para, despois, volver a centrifugar (14000 g, 30 min, 4°C). Retírase o sobrenadante con coidado, para non desprender o precipitado da parede, engádense 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % e vólvese a centrifugar (14000 g, 10 min, 4°C). Retírase o etanol e vólvese engadir 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % para volver a centrifugalo (14000 g, 10 min, 4°C). O fin destes lavados con etanol é eliminar a maior cantidade de residuos do precipitado para quedar co ADN o máis puro posible. Elimínase de novo o etanol, pero desta volta téntase que non quede nada de etanol nas paredes do tubo ou na mostra xa que o seguinte paso é centrifugar o precipitado coa tapa aberta nunha centrífuga Speed Vac (Concentrator plus, complete system without rotor, 230 V/50-60 Hz; Eppendorf) (Modo V-AL; 1 hora). Finalmente, resuspéndese coa axuda dunha micropipeta o precipitado, xa seco, en 35  $\mu\text{L}$  de tampón TE (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit Bulk Reagents; Epicentre) e deixase toda a noite a 4°C ata a mañá seguinte.

### 4.3. Cuantificación do ADN.

O fin da cuantificación de ADN é determinar a concentración de ADN que presentan as mostras. Para isto, emprégase o fluorómetro Qubit (Qubit 4 Fluorometer; ThermoFisher Scientific).

Comezando, mestúrase o reactivo co tampón, nunha proporción de 1  $\mu$ L de reactivo (Qubit dsDNA HS Assay; Invitrogen) por cada 199  $\mu$ L de tampón. A partir de agora, solución de traballo. Engádense 190  $\mu$ L de solución de traballo a 10  $\mu$ L de estándares (existen dous estándares, polo que empréganse dous tubos Qubit; un para cada un) e 198  $\mu$ L de solución de traballo a 2  $\mu$ L da nosa mostra. Mestúranse 3 s no vórtex e déixanse incubando os tubos Qubit 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, introdúcese o estándar 1 no aparello, lese a concentración, métese o estándar 2, vólvese ler a concentración e así fórmase unha recta de calibrado que se empregará para obter as concentracións das mostras. Introdúcese as mostras, fanse as lecturas e obtéñense os datos da concentración de cada mostra.

### 4.4. Amplificación por PCR dunha rexión do ARNr 16S bacteriano.

Esta PCR ten o propósito de amplificar unha rexión hipervariable do ARNr 16S do xenoma bacteriano. Para isto, empréganse uns cebadores que foron deseñados especificamente para amplificar unha rexión hipervariable que permite discernir taxóns. As secuencias dos cebadores foron as seguintes;

*Forward:*

5' CGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 3'

*Reverse:*

5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC 3'

Para facer a PCR das mostras, primeiro prepárase unha mestura común de PCR dentro dunha cámara de fluxo laminar. Esta mestura contén 1.25  $\mu$ L de cebador *forward* e 1.25  $\mu$ L de cebador *reverse*, 5  $\mu$ L de auga libre de nucleasas (Ambion) e 12.5  $\mu$ L de mestura comercial que contén a polimerasa, o tampón da polimerasa, nucleótidos e  $MgCl_2$  (NZYTaQ II DNA polymerase; NZYTech). Estas cantidades son para unha única mostra, polo que se multiplica o volume polo número de mostras máis un (o control da PCR).

Axítase a mestura nun vórtex e bótanse 20  $\mu\text{L}$  en tódolos tubos de PCR. Despois, bótanse fóra da cámara 5  $\mu\text{L}$  de cada ADN molde a unha concentración máxima de 5  $\text{ng}/\mu\text{L}$  en cada tubo. No caso do control da PCR, engádense 5  $\mu\text{L}$  de auga libre de nucleasas (Ambion) no canto de ADN. Métense tódalas mostras coa mestura de PCR no termociclador e iníciase un programa con estas características:

- 1 ciclo de 5 min a  $95^{\circ}\text{C}$ .
- 25 ciclos de: 30 s a  $95^{\circ}\text{C}$ , 45 s a  $60^{\circ}\text{C}$  e 45 s a  $72^{\circ}\text{C}$ .
- 1 ciclo de 5 min a  $72^{\circ}\text{C}$ .
- Repouso a  $4^{\circ}\text{C}$  ata recoller as mostras.

#### 4.5. Electroforese en xel de agarosa.

Cos produtos de PCR listos, é preciso analizar os datos obtidos. Con este fin faise unha electroforese en xel de agarosa ao 1 %. Co xel xa feito, bótase no primeiro pozo 6 - 8  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Thermo Scientific) e nos seguintes pozos 2  $\mu\text{L}$  das mostras produto da PCR mesturadas con 8  $\mu\text{L}$  de tampón de carga (5X Green GoTaq Flexi Buffer; Promega). As mostras e o marcador de peso molecular déixanse, aproximadamente 1 h cun fluxo eléctrico de 120 V para que migren cara o polo positivo. Pasado o tempo, revélase o xel nunha cámara de radiación UV con visualizador de xeles, de onde se toma unha fotografía.

#### 4.6. Purificación do ADN con contas magnéticas.

Despois de ver que os resultados da PCR son positivos, débese purificar o ADN para eliminar calquera outro refugallo que non sexa o propio ADN. Para isto, purifícase o ADN empregando contas magnéticas (AMPure XP beads, Omega Bio-tek).

Nun primeiro momento, dáse unha centrifugación dun minuto nunha minicentrífuga. Logo, mestúranse ben as contas magnéticas uns 30 s e engádense 20  $\mu\text{L}$  de contas a cada mostra, aproveitando a punta da pipeta para mesturar cada mostra unhas 10 veces. Deixase repousar 5 min a temperatura ambiente, sen axitación. A continuación, pónense os tubos nun soporte magnético e 2 min despois retírase o sobrenadante, quedando as

contas magnéticas que reteñen o ADN na parede do tubo máis próxima aos imáns. Engádense 200  $\mu\text{L}$  de etanol 80 % recentemente preparado para lavar as contas e eliminar os residuos da mostra. Deben estar 30 s no alcohol. Pasado o tempo retírase o etanol e vólvese engadir 200  $\mu\text{L}$  de etanol. Déixanse pasar 30 s e retírase o etanol. Seguidamente, deixase que o etanol que queda na mostra se evapore. Para isto, deixase que as contas pasen dunha cor brillante (outorgada pola humidade) a unha cor mate; isto dura entorn a 5 min. Unha vez secas, engádense 52.7  $\mu\text{L}$  de tampón EB (Buffer EB; Qiagen). Este tampón ten función de elución do ADN. Retíranse os tubos do soporte magnético e mestúrase cada mostra con axuda dunha pipeta. Deixase repousar a mostra 2 min eponse, de novo, no soporte magnético, no que tamén se deixa incubando 2 min. Pasado o tempo, retíranse 50  $\mu\text{L}$  da mostra xa purificada. A mostra pódese gardar a -20°C ata o seguinte paso.

#### 4.7. PCR de indexado.

Esta PCR ten como función a marcaxe de cada mostra para que logo, con axuda de ferramentas bioinformáticas, se poda recoñecer o ADN que pertence a cada mostra. A base disto é que se agrega unha rexión coñecida ao final de cada fragmento de ADN da rexión hipervariable do ARNr 16S previamente amplificada mediante PCR.

Nesta PCR engádense 12.5  $\mu\text{L}$  de mestura comercial que contén a polimerasa tampón, nucleótidos e  $\text{MgCl}_2$  (NZYTaQ II DNA polymerase; NZYTech), 5  $\mu\text{L}$  de auga libre de nucleasas (Ambion), 2.5  $\mu\text{L}$  de mestura cos índices (as rexións que se unirán á rexión hipervariable amplificada do 16S), empregando un índice diferente para cada mostra e 5  $\mu\text{L}$  do ADN molde purificado segundo o apartado anterior. Todos estes datos son para unha mostra, polo que hai que multiplicar o volume polo número de mostras máis un (o control da PCR), agás no caso dos índices, que son diferentes para cada mostra. Axítase a mestura nun vórtex e bótanse 17.5  $\mu\text{L}$  en tódolos tubos de PCR e 2.5  $\mu\text{L}$  de mestura con índices. Despois, bótanse, fóra da cámara, 5  $\mu\text{L}$  de ADN. No caso do control da PCR, engádense 5  $\mu\text{L}$  de auga libre de nucleasas (Ambion) no canto do ADN molde. Introdúcense todas as mostras no termociclador e iníciase un programa con estas características:

- 1 ciclo de 3 min a 95°C.
- 5 ciclos de: 30 s a 95°C, 45 s a 60°C e 45 s a 72°C.
- 1 ciclo de 5 min a 72°C.
- Repouso a 4°C ata recoller as mostras.

#### 4.8. Electroforese de agarosa dos produtos da PCR de indexado.

Do mesmo xeito que no punto 4.5., faise unha electroforese para os resultados da PCR anterior. Como neste caso se engade unha rexión extra de ADN, o peso molecular será maior que na electroforese anterior. Se as mostras son positivas e o control da PCR é negativo, poderase seguir co traballo.

#### 4.9. Purificación do ADN indexado con contas magnéticas.

Vólvese a ter que purificar o ADN para eliminar calquera sustancia non desexada. Esta purificación ten algunhas modificacións con respecto á anterior, pero son unicamente no volume dos reactivos.

Séguese exactamente o mesmo protocolo que no punto 4.6. pero ao comezo bótanse 56 µL de contas magnéticas e ao final engádense 27.5 µL de tampón EB (Buffer EB; Qiagen) para, finalmente, retirar 25 µL de mostra. Pódese gardar a mostra a -20°C.

### 5. Resultados

O Servizo de Pneumoloxía do CHUAC proporcionou 62 mostras diferentes (LBA, BAS e HOF). Ademais, fixéronse dous controis, un de BAS/LBA (número 63; é o mesmo control para ambos tipos de mostras xa que se extraen da mesma rexión) e outro control de HOF (número 64), facendo un total de 64 mostras que están descritas na Táboa 1.



Táboa 1. Mostras de lavado broncoalveolar (LBA), hisopado orofarínxeo (HOF) e broncoaspirado (BAS) de enfermos de fibrose pulmonar idiopática e controis sans empregadas neste estudo. Á esquerda o número da mostra e á dereita a natureza da mesma.

Número e código da mostra	Data da extracción	Número e código da mostra	Data da extracción
(1) 1-LBA	-	(33) 33-LBA	28/04/2022
(2) 2-LBA	-	(34) 34-LBA	28/04/2022
(3) 3-LBA	-	(35) 35-LBA	28/04/2022
(4) 4-LBA	-	(36) 36-LBA	28/04/2022
(5) 5-LBA	-	(37) 1-HOF	-
(6) 6-LBA	-	(38) 2-HOF	-
(7) 7-LBA	-	(39) 3-HOF	-
(8) 8-LBA	-	(40) 4-HOF	-
(9) 9-LBA	-	(41) 5-HOF	-
(10) 10-LBA	-	(42) 6-HOF	-
(11) 11-LBA	-	(43) 7-HOF	-
(12) 12-LBA	-	(44) 8-HOF	-
(13) 13-LBA	-	(45) 9-HOF	-
(14) 14-LBA	-	(46) 10-HOF	-
(15) 15-LBA	-	(47) 11-HOF	-
(16) 16-LBA	-	(48) 12-HOF	-
(17) 17-LBA	-	(49) 13-HOF	02/05/2022
(18) 18-LBA	-	(50) 14-HOF	02/05/2022
(19) 19-LBA	-	(51) 15-HOF	02/05/2022
(20) 20-LBA	-	(52) 16-HOF	02/05/2022
(21) 21-LBA	-	(53) 17-HOF	02/05/2022
(22) 22-LBA	-	(54) 18-HOF	02/05/2022
(23) 23-LBA	-	(55) 19-HOF	02/05/2022
(24) 24-LBA	-	(56) 1-BAS	26/04/2022
(25) 25-LBA	-	(57) 2-BAS	26/04/2022
(26) 26-LBA	-	(58) 3-BAS	26/04/2022
(27) 27-LBA	-	(59) 4-BAS	27/04/2022
(28) 28-LBA	-	(60) 5-BAS	27/04/2022
(29) 29-LBA	-	(61) 6-BAS	27/04/2022
(30) 30-LBA	18/03/2022	(62) 7-BAS	27/04/2022
(31) 31-LBA	18/03/2022	(63) Control BAS/LBA	02/06/2022
(32) 32-LBA	28/04/2022	(64) Control HOF	02/06/2022

A continuación procedeuse a extraer o ADN bacteriano das mostras. Logo da extracción cuantificouse a concentración de ADN de cada mostra para poder continuar co protocolo. Os resultados da cuantificación están descritos na Táboa 2.

Táboa 2. Concentracións de ADN bacteriano (ng/μL) extraído a partir das mostras de lavado broncoalveolar (LBA), orofarínxeas (HOF), broncoaspirado (BAS) de doentes de fibrose pulmonar idiopática e controis sans.

Número e código da mostra	Concentración de ADN bacteriano	Número e código da mostra	Concentración de ADN bacteriano
(1) 1-LBA	3.63	(33) 33-LBA	2.37
(2) 2-LBA	0.356	(34) 34-LBA	2.51
(3) 3-LBA	48.7	(35) 35-LBA	0.298
(4) 4-LBA	0.696	(36) 36-LBA	2.48
(5) 5-LBA	3.7	(37) 1-HOF	0.207
(6) 6-LBA	3.54	(38) 2-HOF	0.337
(7) 7-LBA	1.36	(39) 3-HOF	0.058
(8) 8-LBA	0.092	(40) 4-HOF	0.117
(9) 9-LBA	4.9	(41) 5-HOF	0.128
(10) 10-LBA	0.487	(42) 6-HOF	5.76
(11) 11-LBA	0.216	(43) 7-HOF	Debaixo do límite
(12) 12-LBA	147	(44) 8-HOF	0.095
(13) 13-LBA	35.5	(45) 9-HOF	0.216
(14) 14-LBA	41.4	(46) 10-HOF	0.339
(15) 15-LBA	53	(47) 11-HOF	0.062
(16) 16-LBA	142.5	(48) 12-HOF	0.1
(17) 17-LBA	0.17	(49) 13-HOF	3.61
(18) 18-LBA	0.574	(50) 14-HOF	20.4
(19) 19-LBA	0.354	(51) 15-HOF	23.4
(20) 20-LBA	0.101	(52) 16-HOF	4.42
(21) 21-LBA	Debaixo do límite	(53) 17-HOF	0.224
(22) 22-LBA	2.78	(54) 18-HOF	7.01
(23) 23-LBA	0.111	(55) 19-HOF	8.95
(24) 24-LBA	1.28	(56) 1-BAS	3.92
(25) 25-LBA	2.17	(57) 2-BAS	48
(26) 26-LBA	0.204	(58) 3-BAS	33.4
(27) 27-LBA	12.7	(59) 4-BAS	20.8
(28) 28-LBA	8.82	(60) 5-BAS	14.5
(29) 29-LBA	21.3	(61) 6-BAS	14.9
(30) 30-LBA	0.889	(62) 7-BAS	2.11
(31) 31-LBA	27.6	(63) Control BAS/LBA	Debaixo do límite
(32) 32-LBA	5.01	(64) Control HOF	Debaixo do límite

Como se pode apreciar existen mostras cuxa concentración supera os 5 ng/μL. Nestes casos dilúese a mostra ata acadar a concentración anteriormente mencionada. No resto de casos emprégase directamente a mostra na concentración na que se atopa. As mostras con valor “*Debaixo do límite*” teñen unha concentración de ADN menor que o límite

inferior de detección de ADN por parte do dispositivo. Por isto non se reflexa un valor numérico.

Tal como aparece no apartado 4 realizáronse un total de dúas reaccións de PCR. Na primeira amplificouse a rexión desexada do xenoma e visualizouse o produto por medio dunha electroforese en xel de agarosa. Os produtos da primeira PCR deben presentar unha banda, cuxa intensidade dependerá da cantidade de ADN, na rexión de 550 pb (tamaño da rexión que se amplifica). Pódese visualizar por riba da banda de 500 pb (Figura 1).

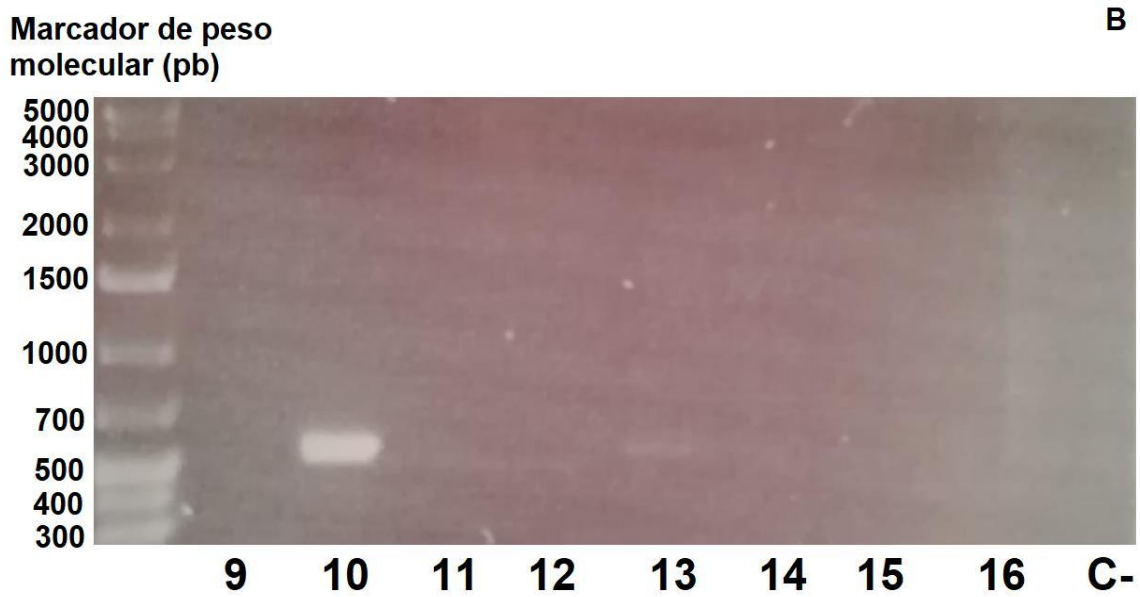
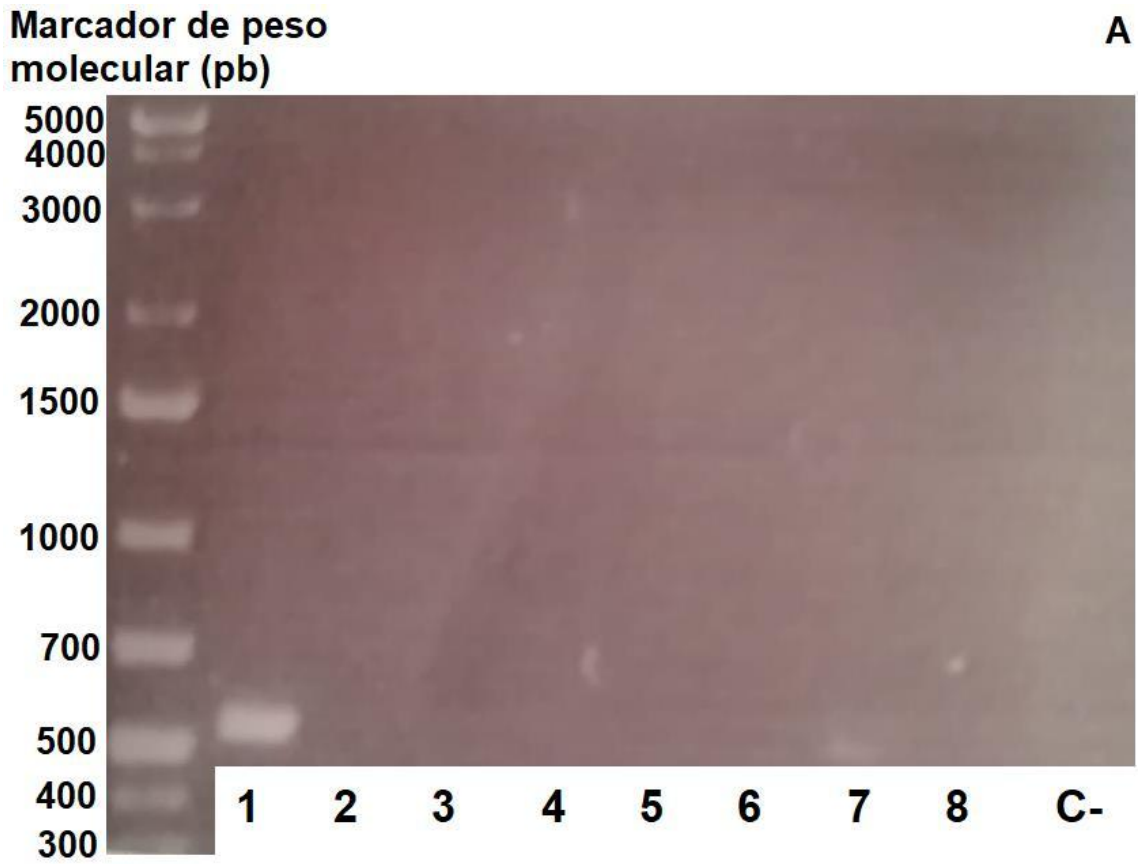


Figura 1. Resultados da amplificación por PCR da rexión hipervariable do ARNr 16S bacteriano das mostras de pacientes de fibrose pulmonar idiopática. Á esquerda, no primeiro pozo, atópase o marcador de peso molecular e cara a dereita as diferentes mostras repartidas en dous xeles de agarosa; A e B.

Como se pode observar na Figura 1 hai dúas bandas moi claras nas mostras 1 (1-LBA) e 10 (10-LBA). Estas bandas se sitúan por riba da banda de 500 pb e por debaixo da banda de 700 pb, polo que asúmese que están en torno ás 550 pb e, polo tanto, poderíanse aceptar as mostras como válidas, pero para iso tense que comprobar se o control negativo da PCR saíu realmente negativo e neste caso é así. Ademais, as mostras 7 (7-LBA) e 13 (13-LBA) presentan unha banda moi tenue, posiblemente porque a concentración de ADN é moi baixa, pero suficiente como para consideralas positivas. Neste caso poderíase repetir a PCR ou, se a concentración é suficiente, pasar ao seguinte paso. A posible explicación de que nuns pozos se vexa tan pouco ADN ou ningún é que se fixeron moitas PCR que saíron mal por diversos motivos, sendo os erros parte da aprendizaxe.

Na segunda PCR, que ten como función engadir os índices nos extremos das cadeas de ADN, o tamaño esperado é maior (660 pb) que o da PCR anterior (550 pb). Tendo en conta este tamaño, a banda debe atoparse na rexión comprendida entre a banda de 500 pb e a de 700 pb, estando un pouco máis próxima á de 700 pb. Como se pode observar na Figura 2. Isto cómprese en ambos casos, tendo bandas moi ben definidas en todas as mostras.

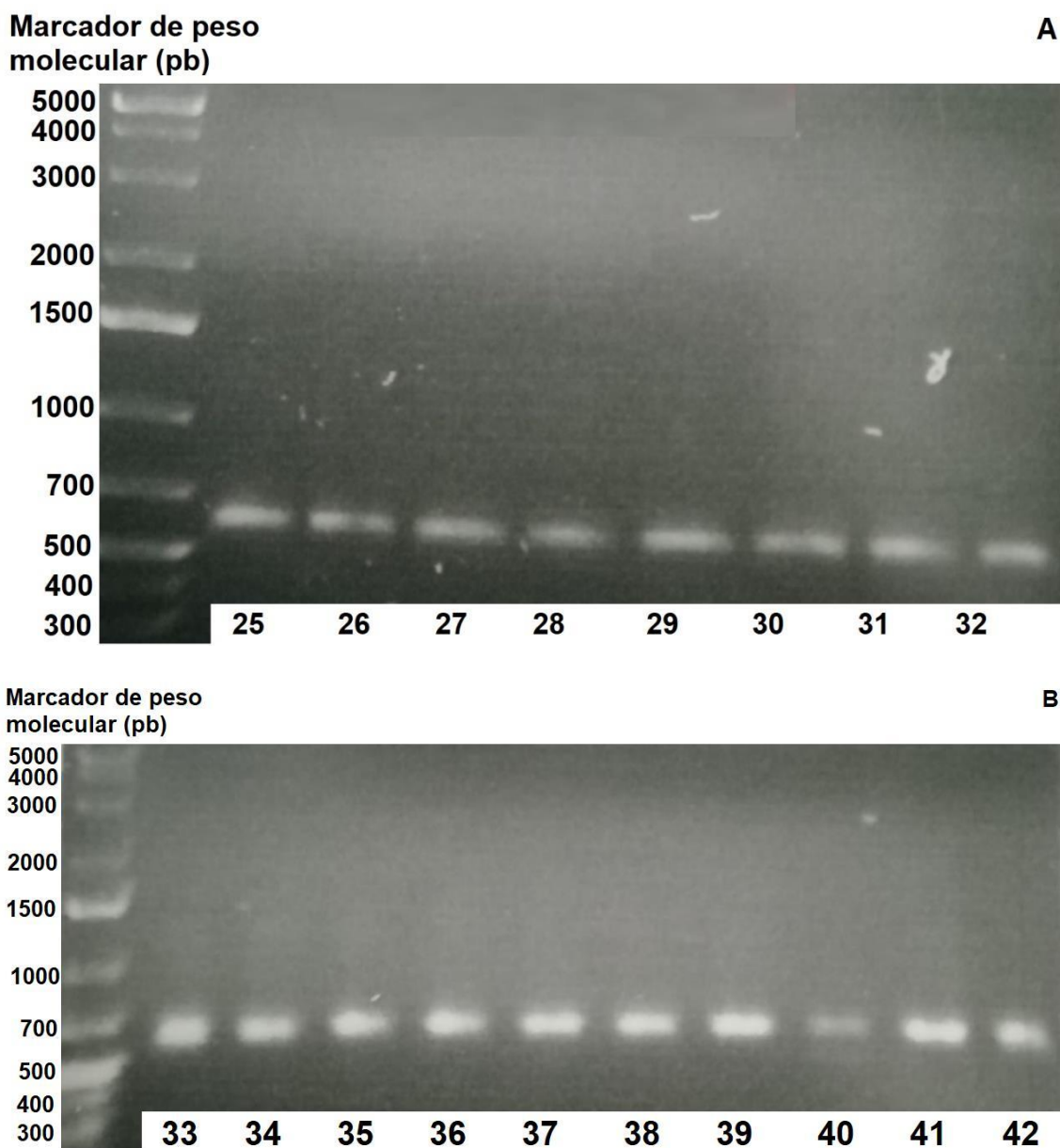


Figura 2. Resultados da amplificación por PCR da rexión hipervariable do ARNr 16S bacteriano cos índices das mostras de pacientes de fibrose pulmonar idiopática. Á esquerda, no primeiro pozo, atópase o marcador de peso molecular e cara a dereita as diferentes mostras repartidas en dous xeles de agarosa; A e B.

## 6. Discusión

A comezos deste mesmo século críase que o pulmón era estéril polo que non se incluíu en proxectos sobre o Microbioma Humano, non obstante está confirmado que non é así; existe un microbioma pulmonar. A secuenciación de nova xeración permitiu o avance acelerado do recoñecemento destas comunidades, pero existe un problema: o ADN xenómico humano, propio dos pulmóns, que está presente cando queremos analizar o

microbioma pulmonar. Polo tanto, un xeito de resolver este problema é purificar o ADN bacteriano. As bacterias patoxénicas pulmonares máis comúns a nivel de xénero foron *Acinetobacter sp.* e *Neisseria sp.* (Tong et al., 2019).

As bacterias pulmonares son indicadoras da progresión da enfermidade, alteran a inmunidade alveolar e forman parte da patoxénese en modelos animais da FPI. Unha maior carga bacteriana está relacionada cunha maior taxa de mortalidade. Tamén se observou que a alteración do microbioma pulmonar é anterior ao peor estadio da enfermidade e que esta alteración continúa ata o fin da enfermidade. Xunto con isto, existen diversas razóns para que se produza a morte por FPI malia que se cría que a principal razón era a cicatrización pulmonar. Unha destas razóns é a insuficiencia respiratoria asociada á inflamación dos pulmóns (O'Dwyer et al., 2019). O procedemento de extracción das mostras de LBA fai que non se poda descartar contaminación externa doutras bacterias, xa que se extraen mediante unha broncoscopia. Xunto a isto, en diferentes partes do tracto respiratorio atópanse diferentes perfíles microbianos, polo que a heteroxeneidade está asegurada (Zimmermann et al., 2017).

A heteroxeneidade do microbioma pulmonar en doentes de FPI estimula a lesión alveolar repetitiva, un factor moi importante dentro da patoxénese da enfermidade. Unhas posibles responsables desta heteroxeneidade son as comunidades bacterianas das vías respiratorias inferiores (Molyneaux et al., 2014).

Outros investigadores (Spagnolo et al., 2019) observaron unha relación entre o microbioma intestinal e pulmonar. Ambos microbiomas participan na función inmune e comparten parte dos organismos observados. Malia isto, non se observou, ata o momento, efecto dos metabolitos microbianos no desenvolvemento da IPF.

Existe pouca información acerca do tratamento da IPF, fora de transplantes pulmonares ou antibióticos de amplo espectro, pero cada vez tense máis claro que o microbioma pulmonar, tanto bacteriano como viral, ten un impacto moi elevado no desenvolvemento da enfermidade. Malia isto, aínda se precisa unha maior investigación e caracterización para determinar o efecto completo do microbioma xa que organismos como os fungos aínda non foron o suficientemente estudados (Invernizzi & Molyneaux, 2019).

No presente traballo realizouse con éxito a obtención e purificación de ADN bacteriano e a amplificación con índices das rexións hipervariables do ARNr 16S de máis de 60 mostras de diferente orixe de pacientes de FPI e persoas sas (controis) de tal forma que

estas poderán ser secuenciadas empregando unha plataforma Illumina MiSeq nun futuro para levar a cabo o análise do microbioma.

## 7. Conclusións / Conclusions / Conclusiones

### 7.1. Conclusións

- Extraeuse o ADN bacteriano dun conxunto de 64 mostras de BAS, LBA e HOF de doentes de FPI e controis sans.
- Realizouse unha primeira amplificación por PCR dunha rexión hipervariable do ARNr 16S bacteriano.
- Obtívose unha colección de mostras de ADN procedentes dunha rexión do ARNr 16S bacteriano aptas para proceder coa súa secuenciación futura destinada ao estudo do microbioma e á súa interacción coa fibrose pulmonar idiopática.

### 7.2. Conclusions

- Bacterial DNA was extracted from a set of 64 BAS, LBA and HOF samples from IPF patients and healthy controls.
- A first PCR amplification of a hypervariable extension of bacterial 16S rRNA was performed.
- A collection of DNA samples from a region of bacterial 16S rRNA suitable for further sequencing was obtained for the study of the microbiome and its interaction with idiopathic pulmonary fibrosis.

### 7.3. Conclusiones

- Se extrajo el ADN bacteriano de un conjunto de 64 muestras de BAS, LBA y HOF de enfermos de FPI y controles sanos.
- Se realizó una primera amplificación por PCR de una extensión hipervariable del ARNr 16S bacteriano.



- Se obtuvo una colección de muestras de ADN procedentes de una región del ARNr 16S bacteriano aptas para proceder con su secuenciación futura, destinada al estudio del microbioma y a su interacción con la fibrosis pulmonar idiopática.

## 8. Bibliografía

- Fastrès, A., Felice, F., Roels, E., Moermans, C., Corhay, J., & Bureau, F. et al. (2017). The Lung Microbiome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Promising Approach for Targeted Therapies. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(12), 2735. <https://doi.org/10.3390/ijms18122735>
- Gross, T., & Hunninghake, G. (2001). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal Of Medicine*, 345(7), 517-525. <https://doi.org/10.1056/NEJMra003200>
- Invernizzi, R., & Molyneaux, P. (2019). The contribution of infection and the respiratory microbiome in acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Review*, 28(152), 190045. <https://doi.org/10.1183/16000617.0045-2019>
- King, T., Pardo, A., & Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*, 378(9807), 1949-1961. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4)
- Molyneaux, P., Cox, M., Willis-Owen, S., Mallia, P., Russell, K., & Russell, A. et al. (2014). The Role of Bacteria in the Pathogenesis and Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 190(8), 906-913. <https://doi.org/10.1164/rccm.201403-0541OC>
- Nalysnyk, L., Cid-Ruzafa, J., Rotella, P., & Esser, D. (2012). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *European Respiratory Review*, 21(126), 355-361. <https://doi.org/10.1183/09059180.00002512>
- O'Dwyer, D., Ashley, S., Gurczynski, S., Xia, M., Wilke, C., & Falkowski, N. et al. (2019). Lung Microbiota Contribute to Pulmonary Inflammation and Disease Progression in Pulmonary Fibrosis. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 199(9), 1127-1138. <https://doi.org/10.1164/rccm.201809-1650OC>
- Quinn, C., Wisse, A., & Manns, S. (2019). Clinical course and management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 14(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s40248-019-0197-0>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135-1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>

- Spagnolo, P., Molyneaux, P., Bernardinello, N., Cocconcelli, E., Biondini, D., & Fracasso, F. et al. (2019). The Role of the Lung's Microbiome in the Pathogenesis and Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(22), 5618. <https://doi.org/10.3390/ijms20225618>
- Taskar, V. (2006). Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis an Environmental Disease?. *Proceedings Of The American Thoracic Society*, 3(4), 293-298. <https://doi.org/10.1513/pats.200512-131TK>
- Tong, X., Su, F., Xu, X., Xu, H., Yang, T., & Xu, Q. et al. (2019). Alterations to the Lung Microbiome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 9, 149. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00149>
- Varone, F., Gibiino, G., Gasbarrini, A., & Richeldi, L. (2019). Evaluation of the lung microbiome as a therapeutic target in the management of idiopathic pulmonary fibrosis: role of antioxidant/antibiotic combination therapy. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(14), 6379–6386. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_201907\\_18463](https://doi.org/10.26355/eurev_201907_18463)
- Vigeland, C., Hughes, A., & Horton, M. (2017). Etiology and treatment of cough in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine*, 123, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2016.12.016>
- Wakwaya, Y., & Brown, K. (2019). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Diagnosis and Outcomes. *The American Journal Of The Medical Sciences*, 357(5), 359-369. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2019.02.013>
- Weng, D., Chen, X., Qiu, H., Zhang, Y., Li, Q., & Zhao, M. et al. (2019). The Role of Infection in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Mediators Of Inflammation*, 2019, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2019/5160694>
- Zimmermann, A., Knecht, H., Häsler, R., Zissel, G., Gaede, K., & Hofmann, S. et al. (2017). Atopobium and Fusobacterium as novel candidates for sarcoidosis-associated microbiota. *European Respiratory Journal*, 50(6), 1600746. <https://doi.org/10.1183/13993003.00746-2016>