



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Desarrollo de técnica de homogeneización para cultivo de microorganismos a partir de tejido pulmonar”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

LOURDES ANDUNI

Director de Seminario de Título: Dr. Fabien Magne

Profesor Patrocinante: Dr. Francisco Chavez

Enero 2023

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr(ta).

LOURDES ANDUNI

“Desarrollo de técnica de homogeneización para cultivo de microorganismos a partir de tejido pulmonar”

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Fabien Magne

Director Seminario de Título

Dr. Francisco Chavez

Profesor Patrocinante

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Nicolas Guiliani

Presidente Comisión

Dr. Sergio Alvarez

Evaluador

Santiago de Chile, 2023

“El papel de lo infinitamente pequeño en la naturaleza,
es infinitamente grande”

Louis Pasteur

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Fabien Magne que aceptó ser mi tutor de este Seminario de Título, por su confianza inicial en mí aun siendo estudiante de otra facultad, por su paciencia, su tiempo, por aceptar trabajar conmigo en un contexto incierto por la pandemia y permitirme que realizara este trabajo sobre un tema que me encanta. A los integrantes de su laboratorio: Alejandra, Pamela y Héctor por la ayuda con los experimentos y sus consejos. A todas las personas del Programa de Microbiología y Micología de la Facultad de Medicina que me ayudaron y apoyaron con mis actividades del laboratorio.

Al Doctor Francisco Chavez por aceptar ser mi Profesor Patrocinante y por transmitir tanto entusiasmo en sus clases cuando hablaba de microbiota.

A mis amigos/as de la universidad, por los trabajos en equipo, charlas, risas y apoyo en cada paso de este camino. A mis amigas de la vida, que no entienden cuando les hablo de lo que estudio, pero me motivan e inspiran a hacer lo que me gusta e ir tras lo que me propongo.

Y finalmente a mi familia. Gracias mamá, papá y a mis hermanos. Gracias por su apoyo, cariño y aliento en todo lo que hago, y en especial durante cada etapa de mi vida universitaria; haber entrado y finalizado en esta carrera no habría sido posible sin ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Microbiota.....	1
1.2. Importancia del estudio de microbiota.....	2
1.3. Microbiota pulmonar.....	4
1.3.1 Los pulmones no son estériles.....	4
1.3.2 Rol de la microbiota pulmonar en la salud.....	5
1.3.3 Metodologías para el estudio de la microbiota pulmonar.....	7
1.4 Homogeneización del tejido.....	9
1.5 Objetivo general.....	11

1.6	Objetivos específicos.....	11
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1.	Cepas y medio de cultivo.....	12
2.2.	Experimento animal.....	14
2.3.	Protocolo de homogeneización por “bead-beating”.....	15
2.4.	Caracterización de la microbiota a partir del tejido pulmonar.....	16
2.5.	Extracción del ADN.....	16
2.6.	Secuenciación masiva del gen ARNr 16S.....	17
3.	RESULTADOS.....	18
3.1.	Curvas de crecimiento de los microorganismos.....	18
3.2.	Evaluación del efecto del tiempo y del tamaño de las microesferas en la homogeneización por “bead-beating” sobre la sobrevivencia de los microorganismos.....	20
3.3.	Efectividad de la técnica de homogeneización desarrollada en tejido pulmonar de ratones.....	25
3.4.	Caracterización de la microbiota pulmonar de ratones por método de cultivo usando la técnica de homogeneización por “bead-beating”.....	27
3.4.1	Concentración de ADN extraído del tejido pulmonar, del homogeneizado y de los cultivos líquidos bacterianos.....	27
3.4.2	Recuperación de microorganismos a partir del tejido homogeneizado..	29
3.4.3	Cultivo de la microbiota pulmonar a partir del tejido homogeneizado....	31

4.	DISCUSIÓN.....	36
5.	CONCLUSIONES.....	40
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de solución S.

Tabla 2. Composición de la solución A, B y C.

Tabla 3. Recuento de microorganismos en pulmón de ratones control.

Tabla 4. Concentración de ADN (ng/μl) obtenido a partir de muestras de tejido pulmonar.

Tabla 5. Crecimiento de taxas bacterianas en diferentes condiciones de cultivo.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción entre microbioma y hospedero.

Figura 2. Curva de crecimiento de *E. coli*.

Figura 3. Curva de crecimiento de *S. aureus*.

Figura 4. Curva de crecimiento de *C. albicans*.

Figura 5. Impacto de la homogeneización sobre la sobrevivencia de *E. coli*.

Figura 6. Impacto de la homogeneización sobre la sobrevivencia de *S. aureus*.

Figura 7. Impacto de la homogeneización sobre la sobrevivencia de *C. albicans*.

Figura 8. Porcentajes de recuperación de la inoculación de *E. coli*, *S. aureus* y *C. Albicans* en pulmones de ratones.

Figura 9. Diagrama de Venn de la diversidad bacteriana observada en el tejido pulmonar y homogeneizado.

Figura 10. Abundancia relativa de las especies bacterianas recuperadas luego de la homogeneización por “bead-beating”.

Figura 11. Diagrama de Venn de la diversidad bacteriana observada en el tejido pulmonar homogeneizado y los cultivos.

Figura 12. Abundancia relativa de las especies bacterianas cultivadas a partir del tejido pulmonar homogeneizado.

Figura 13. Porcentaje de especies bacterianas cultivadas a partir del tejido pulmonar.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ANAC: Medio de cultivo enriquecido con mucina.

BHI: Infusión de cerebro y corazón (por sus siglas en inglés “Brain Heart Infusion”).

LPS: Lipopolisacáridos.

RESUMEN

Durante décadas se creyó que los pulmones eran órganos estériles a pesar de que esto siempre careció de fundamentos. Actualmente se sabe que no es así gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular las cuales han permitido evidenciar una estrecha relación entre la microbiota en las áreas respiratorias inferiores y la homeostasis del hospedero. Sin embargo, estas técnicas están basadas en la secuenciación de ADN microbiano, lo que puede corresponder a microorganismos vivos, pero también muertos. Para llevar a cabo el cultivo de microorganismos a partir de tejidos de pulmón es necesario homogeneizar previamente el tejido para liberar los microorganismos adheridos, mientras se debe mantener la integridad de los microorganismos presentes y también limitar los riesgos de contaminación. Dentro de las técnicas de homogeneización de tejidos, se eligió evaluar la técnica por “bead-beating” o ruptura con microesferas, que consiste en el contacto mecánico del tejido con microesferas provocando así la ruptura de la membrana celular y la separación de los microbios que la habitan.

El objetivo general del presente Seminario de Título es la evaluación de una técnica de homogeneización del tejido de pulmón que permita a posteriori el cultivo de los microorganismos que componen la microbiota pulmonar. Para ello se evaluó el efecto de la técnica de homogeneización por “bead-beating” en cultivos líquidos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* para determinar cuáles parámetros afectan en menor medida su sobrevivencia. Luego se evaluaron los parámetros escogidos sobre una muestra de pulmón de ratones, el cual fue inoculado con un “pool” conformado por los mismos microorganismos. Por último, la técnica de homogeneización por “bead-beating” fue aplicada para la caracterización de la microbiota pulmonar de ratones usando métodos de cultivo.

Los parámetros más efectivos para la recuperación de los microorganismos analizados en cultivo líquido fueron la homogeneización por “bead-beating” durante 1 minuto con microesferas de 2,3 mm de diámetro. Luego de aplicar la técnica sobre el tejido pulmonar, se logró recuperar el 70% del “pool” de microorganismos inoculado artificialmente en el modelo animal. Por último, tras aplicar la técnica de homogeneización desarrollada, se logró recuperar y cultivar las especies bacterianas dominantes de la microbiota pulmonar del modelo animal.

Este trabajo contribuye en proveer una técnica efectiva para el cultivo de microorganismos que constituyen la mayor proporción de la microbiota pulmonar en ratones como así también podría utilizarse en otros estudios para comprender los mecanismos de interacción entre microorganismo-huésped de las bacterias más abundantes en el pulmón, las cuales son claves para poder desarrollar blancos terapéuticos contra enfermedades pulmonares. Sería necesario optimizar los métodos de cultivo desarrollado en este trabajo para una mejor caracterización de la microbiota pulmonar.

ABSTRACT

For decades it was believed that the lungs were sterile organs despite the fact that this claim has always been unfounded. It is currently known that this is not true thanks to the development of molecular biology techniques which have revealed a close relationship between the microbiota in the lower respiratory areas and host homeostasis. However, these techniques are based on microbial DNA sequencing, which can correspond to living microorganisms, but also dead ones. To carry out the culture of microorganisms from lung tissues, it is necessary to previously homogenize the tissue in order to release the adhered microorganisms, while maintaining the integrity of the microorganisms present and also limiting the risks of contamination. Within the tissue homogenization techniques, it was chosen to evaluate the technique by "bead-beating" or rupture with microspheres, which consists on the mechanical contact of the tissue with beads, thus causing the rupture of the cell membrane and separation of the microbes that they inhabit it.

The principal objective of this work is the evaluation of a lung tissue homogenization technique that allows a posteriori cultivation of the microorganisms that are part of the lung microbiota. First, the effect of the bead-beating homogenization technique was evaluated in liquid cultures of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to determine which parameters affect their survival to a lesser extent. The chosen parameters were then evaluated on a mouse lung sample, which was inoculated with a pool made up of the same microorganisms. Finally, the bead-beating homogenization technique was applied for the characterization of the lung microbiota of mice using culture methods.

The most effective parameters for the recovery of the microorganisms analyzed in liquid culture were the homogenization by bead-beating for 1 minute with 2.3 mm

beats. After applying the technique on the lung tissue, it was possible to recover 70% of the pool of microorganisms artificially inoculated in the animal model. Finally, after applying the homogenization technique developed, it was possible to recover and cultivate the dominant bacterial species of the lung microbiota of the animal model.

Finally, this work contributes to providing an effective technique for the cultivation of microorganisms that constitute the largest proportion of the lung microbiota in mice and could be used in studies to understand the mechanisms of interaction between microorganisms and hosts of the most abundant bacteria in the lung, which are key to developing therapeutic targets against lung diseases. However, it is necessary to optimize the culture methods for a better characterization of the lung microbiota.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Microbiota

Han pasado más de 70 años desde que se usó el término “microbioma” por primera vez para poder referirse a la interacción entre una comunidad microbiana y donde habita (Mohr, 1952). En 2001, el biólogo molecular Joshua Lederberg utilizó este término para poder referirse a la importancia de los microorganismos que habitan el cuerpo humano, ya que estos eran usualmente ignorados como determinantes de la salud y la enfermedad (Lederberg J, McCray A, 2001).

El interés por esta interacción ha incrementado en los últimos años gracias a los numerosos estudios que han demostrado su importancia en la vida humana. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de nuevas tecnologías de biología molecular como la metatranscriptómica, metagenómica, metabolómica y herramientas bioinformáticas. Estos avances han ayudado a comprender la contribución de los diferentes microbiomas en los seres humanos y su importancia en la salud y las enfermedades humanas (Aguilar-Pulido y col., 2016) incluidas las respuestas a medicamentos (Mikov, 1994) y la susceptibilidad a distintos tipos de enfermedades ya sea del tipo infecciosas (Taha y col., 1998) como crónicas (Tang y col., 2013).

Es importante la distinción entre microbioma y otro término que a menudo es utilizado como su sinónimo: la microbiota. El primero hace referencia a “el conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos en un nicho ecológico dado”. Por otra parte, microbiota hace referencia “a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado, como el pulmón humano” (Domingo & Sánchez, 2017). Dado que este trabajo se centra sobre la identificación de los distintos tipos de microorganismos que habitan el pulmón, se usará el término microbiota.

1.2 Importancia del estudio de la microbiota

Los primeros estudios sobre este tema datan del siglo XVII cuando Antonie Van Leewenhoek observó por primera vez bacterias en muestras fecales. Una de sus observaciones fue que la aparición de estos microorganismos en el mismo lugar (tracto gastrointestinal) podrían asociarse con el estado de salud y enfermedad de la persona (Dobell, 1920). Actualmente el interés por entender esta relación se mantiene vigente y en creciente aumento, la novedad son los avances tecnológicos que han permitido estudiar con mayor profundidad esta interacción.

Las enfermedades más prevalentes de la actualidad guardan una estrecha relación con la microbiota y esto ocurre debido al papel modulador que ejerce la microbiota en su hospedero (Hou y col., 2022). En humanos por ejemplo se ha encontrado que los lipopolisacáridos (LPS) que constituyen la membrana externa de las bacterias Gram negativas son factores inflamatorios que al interactuar con células del sistema inmune innato desencadenan resistencia a la insulina en personas con dietas altas en grasas debido a la interacción entre microbios intestinales y sistema inmune del hospedero (Cani, 2018). De hecho, se ha encontrado que en humanos hay un incremento en el nivel de LPS circulante en personas con diabetes y obesidad (Amar y col., 2008).

También se ha encontrado que metabolitos producidos por la microbiota intestinal como ácidos grasos de cadena corta, lactato, metabolitos del triptófano y otros aminoácidos como el glutamato y fenilalanina pueden atravesar la barrera hematoencefálica y tener efectos en el cerebro. Existe evidencia que personas con trastornos neuropsiquiátricos importantes, incluido el trastorno depresivo mayor (MDD), presentan una alteración en el eje microbiota-intestino-cerebro (Ortega y col., 2022). No es de extrañar que existan trabajos que sugieren como blanco terapéutico

la modificación de la microbiota intestinal en pacientes con enfermedades neuropsiquiátricas (como la depresión, Parkinson, esquizofrenia, entre otras) ya que esto afectaría la comunicación intestino-cerebro (Grochowska y col., 2018).

Además, se ha reportado que los metabolitos producidos por la microbiota intestinal podrían ser útiles para el diagnóstico y tratamientos de cáncer, como por ejemplo el cáncer colonrectal (Peng & Wong, 2021).

Dentro de las enfermedades respiratorias se ha reportado que, en casos de asma, enfermedad crónica que actualmente afecta a más de 300 millones de personas en todo el mundo y se prevé que aumente a 400 millones en 2025 (Christiansen & Zuraw, 2019), las *Proteobacterias* parecen ser el filo más dominante en pacientes con la enfermedad, en comparación con voluntarios no asmáticos según lo observado en varios estudios en humanos (Huang y cols., 2015; Marri y col., 2013). En un modelo de ratón, se determinó que la inhalación de una cepa inocua de *Escherichia coli* podría reprogramar las células dendríticas y los macrófagos en los pulmones, dando como resultado protección contra las respuestas alérgicas (Nembrini y col., 2011). Incluso se han identificado cambios en la microbiota pulmonar en pacientes con COVID-19, y el enriquecimiento de la microbiota pulmonar con bacterias que se encuentran en el tracto intestinal se correlacionarían con la aparición del síndrome de dificultad respiratoria aguda y los resultados a largo plazo (Shen y cols., 2020).

Estos hallazgos son solo unos de los tantos ejemplos que han llevado a postular que la microbiota podría ser un órgano más del cuerpo humano o “segundo genoma” (Ma y col., 2018), pues está claro que tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo humano.

1.3 Microbiota pulmonar

1.3.1 Los pulmones no son estériles

Durante mucho tiempo se creyó que los pulmones eran órganos estériles, aunque esto siempre careció de fundamentos. Tal aseveración fue publicada a finales del siglo XIX (Hildebrandt, 1888) a partir de un trabajo donde se realizaron experimentos en la mucosa nasal y traqueal extirpada de conejos, en donde se observó un mínimo crecimiento microbiano.

En un trabajo de investigación publicado en 2016, se nombraron los tres errores conceptuales claves que dieron lugar a tales dichos sin argumentos durante tanto tiempo: en primer lugar, las pruebas realizadas para determinar la presencia de microorganismos no fueron las adecuadas, pues aquellas utilizadas tenían por objetivo identificar patógenos, no caracterizar la microbiota presente en las vías respiratorias. Lo segundo fue que se asumió que la microbiota de otros órganos contaminan los pulmones. Se supuso que la comunidad de microorganismos no era propia de los pulmones, sino procedente del tracto respiratorio superior. El tercer error estuvo relacionado con la migración constante de microbios que habitan los pulmones, y esto dio lugar a asociar de manera errónea los conceptos de esterilidad y ausencia de microbios residentes (Dickson y col., 2016).

Estas ideas erróneas probablemente hayan influido en poco interés de la comunidad científica en estudiar la microbiota de este órgano en comparación al resto del cuerpo humano. En 2007 por ejemplo, el Proyecto de Microbioma Humano (HMP) se agregó a la Hoja de Ruta de Investigación Médica de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) con el objetivo de estudiar con más detalle el microbioma humano, pero se excluyó el sistema respiratorio de las vías respiratorias inferiores por no ser una zona de interés (Turnbaugh y col., 2007; Wu & Segal, 2017). Sin embargo, desde el 2009 los

pulmones empezaron a recibir mayor interés y éste ha ido en aumento en los últimos años. Especialmente desde que el Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre de Estados Unidos, patrocinó un Proyecto del Microbioma del Pulmón y el VIH, entre otros proyectos específicos (Segal y col., 2014).

Actualmente, gracias a los nuevos métodos de secuenciación masiva entre otros, se ha demostrado que los pulmones están habitados por comunidades microbianas complejas, cuyas interacciones con el hospedero podrían ser claves para el desarrollo o la severidad de enfermedades pulmonares (Wu & Segal, 2017).

1.3.2 Rol de la microbiota pulmonar en la salud

Con el avance de las técnicas y herramientas bioinformáticas, los estudios sobre la relación entre la microbiota pulmonar y las enfermedades crecieron en los últimos años. Existen evidencias de que, al igual que otras superficies epiteliales, la microbiota de las vías respiratorias ejerce un efecto sobre la homeostasis inmunológica de la mucosa pulmonar en individuos normales (Segal y col., 2014).

Los microbios residentes en los pulmones afectan la fisiopatología de enfermedades pulmonares ya que estos modulan la respuesta inmune en las vías respiratorias tal como lo muestra la Figura 1. Se ha reportado que existe una asociación entre una limitada exposición microbiana del hospedero con deficiencias en células del sistema inmune (subconjunto de células T auxiliares tipo 1 (Th1)-Th2, células T reguladoras) y anomalías inmunitarias innatas. Según la “hipótesis de la higiene”, esta baja exposición produciría una inadecuada maduración de las células del sistema inmune. De la misma manera, mayor uso de antibióticos y mejoras en las condiciones sanitarias (por el uso de agentes químicos antibacterianos, por ejemplo) pueden también limitar la exposición a los microbios ambientales y en consecuencia estar relacionados con el aumento de enfermedades autoinmunes (Ege y col., 2011; Van

Nimwegen y col., 2011). Otros factores como la dieta, el ambiente y el tabaco también afectan de manera directa esta interacción. En modelos murinos se ha reportado que la exposición al tabaco altera las células del sistema inmune (IL-6) generando inflamación en los animales (Molyneaux y col., 2014; Li y col., 2019).

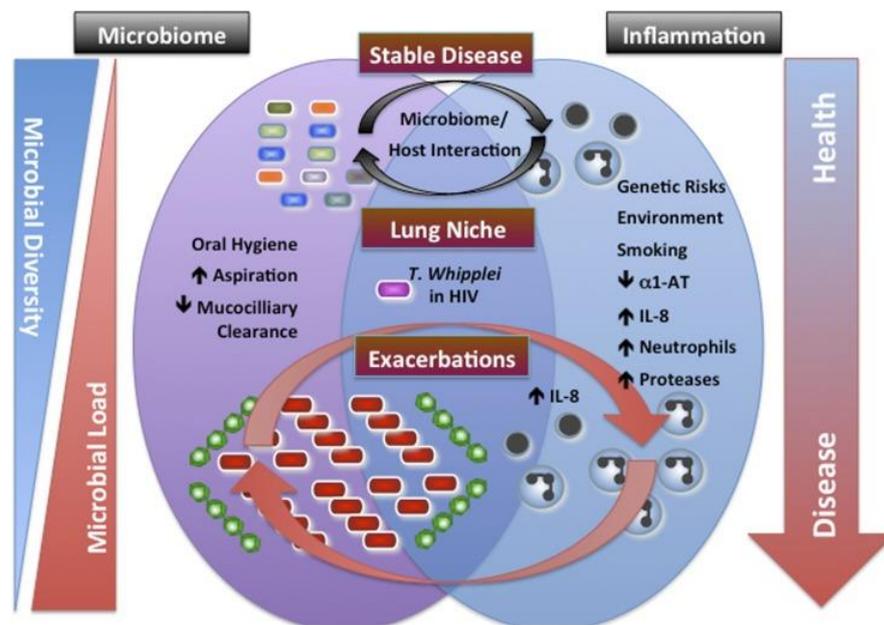


Figura 1. Interacción entre microbioma y hospedero. Imagen que representa de manera conceptual la interacción entre el microbioma pulmonar humano y la respuesta inmune del hospedero (Imagen extraída desde Segal y col., 2014).

Dado la importancia en la función fisiológica que ejerce la comunidad microbiana en la configuración de la respuesta inmune de la mucosa de las vías respiratorias (Segal y col., 2014), no es de extrañar que la progresión y exacerbación de las enfermedades pulmonares estén asociadas con cambios cuantitativos y / o cualitativos en la microbiota pulmonar. Particularmente se observaron desbalances en la microbiota pulmonar en enfermedades pulmonares como la fibrosis quística (Cox y col., 2010), bronquiectasias, asma (Huang y col., 2015; Marri y col., 2013), cáncer pulmonar (Sommariva y col., 2020) e incluso hay indicios de una posible relación con la enfermedad Covid-19 (Shen y col., 2020), por solo nombrar algunas.

Por lo tanto, enfocarse en comprender la dinámica de este órgano y la comunidad microbiana que lo habita será clave en las investigaciones futuras respecto a nuevas dianas terapéuticas.

1.3.3 Metodologías para el estudio de la microbiota pulmonar

Históricamente, ha habido muchos desafíos con respecto al análisis eficiente de las comunidades microbianas debido a la imposibilidad de identificar aquellas que no se pueden cultivar (Jeong y cols., 2021). El 70% de las especies bacterianas dentro del cuerpo humano por ejemplo no se pueden cultivar con medios de microbiología médica estándar (Suau y col., 1999). Es por esto que el desarrollo de técnicas de biología molecular cultivo-independiente como la secuenciación ADNr 16S, han permitido identificar la presencia de microorganismos difíciles de cultivar y que se encuentran en menor cantidad dentro de una comunidad, revelando así una mayor diversidad microbiana (Kumar y col., 2011; Schloss & Handelsman, 2005).

Las técnicas de biología molecular son las más importantes para el estudio de microorganismos ya que éstas son las mejores herramientas disponibles para revelar la diversidad filogenética de microorganismos dentro de ecosistemas complejos (Hold y col., 2002). Dentro de ellas, el desarrollo de técnicas ecológicas moleculares basadas en la subunidad 16S del ARNr han mejorado enormemente la comprensión de las comunidades microbianas complejas (Pace, 1997). En un estudio del 2010, gracias a la aplicación de esta herramienta sobre pacientes con asma y sanos, se demostró por primera vez que el grupo con la enfermedad presentaba una microbiota pulmonar alterada debido a la presencia de microorganismos patógenos (Hilty y col., 2010).

La identificación de las bacterias a nivel de género y especie puede realizarse por la variación en el gen codificante por el ARNr 16S, que está muy conservado en el

genoma bacteriano. La secuenciación de alto rendimiento de los amplicones del gen de ARNr 16S generados a partir de muestras biológicas produce una gran cantidad de secuencias cortas que pueden alinearse y clasificarse posteriormente de acuerdo con un nivel predefinido de homología (Dickson y col., 2013). Luego, estos datos se clasifican de acuerdo con las bases de datos taxonómicas disponibles públicamente como base de datos Greengenes, Silva y EzBioCloud (Liu y col., 2008; Park & Won, 2018). Las plataformas de secuenciación como Illumina permiten la identificación y cuantificación de comunidades microbianas completas en múltiples muestras de tejido simultáneamente (Eckburg y col., 2005). Estas técnicas sensibles, rápidas y más precisas que los métodos tradicionales que dependen del cultivo, han mejorado drásticamente en eficiencia y han disminuido su costo en las últimas décadas (Dickson y col., 2013). Además, estas no requieren que los microorganismos que se van a analizar estén vivos.

También es necesario considerar que el estudio de la microbiota pulmonar humana presenta dos grandes impedimentos: los pulmones poseen una comunidad microbiana escasa, estimada en aproximadamente $2,2 \times 10^3$ genomas bacterianos por cm^2 (Hilty y col., 2010). Por lo tanto, el ADN microbiano extraído puede ser insuficiente para la detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esto puede distorsionar la composición aparente de las comunidades microbianas y por lo tanto afectar técnicas basadas en el uso de PCR como la secuenciación de alto rendimiento. El segundo impedimento es la susceptibilidad de las muestras a la contaminación durante el proceso de extracción de ADN. Esto puede afectar los datos de secuenciación y la interpretación de la microbiota (Knapp & Hofreiter, 2010).

Pero aun encontrando una solución a dichas problemáticas, todas las técnicas anteriormente mencionadas presentan un problema mayor: al estar basadas en la

secuenciación de ADN microbiano, el material analizado puede corresponder tanto a microorganismos vivos, como también muertos.

Relacionado al anterior, el uso de técnicas de cultivo microbianos podría proporcionar información adicional. En efecto, el cultivo de microorganismos permitirá determinar la proporción de microorganismos vivos y muertos (estos últimos corresponderían a aquellos que se obtuvieron por secuenciación, pero no por cultivo), también aislar microorganismos residentes de interés con el fin de determinar su rol en la fisiología del pulmón e incluso microorganismos que están presentes en muy bajas proporciones para ser detectados por las técnicas moleculares.

1.4 Homogeneización del tejido

Dentro de las muestras más valiosas para llevar a cabo estudios microbiológicos se encuentran aquellas que se extraen a partir de los tejidos. Pero para poder separar los microorganismos adheridos es necesario utilizar técnicas que permitan la máxima eficacia, especialmente si es un tejido con baja densidad microbiana como los pulmones, y que a su vez permita conservar su viabilidad. La homogeneización es una técnica que logra cumplir dichos criterios de manera más eficaz que otras (Askar y col., 2019).

Los métodos comunes para la disrupción del tejido son los de homogeneización mecánica, que incluye el vórtice y la molienda con diferentes microesferas, la sonicación, la tecnología de ciclos de presión o el tratamiento con nitrógeno líquido y la posterior molienda del tejido congelado. En el segundo paso de la homogeneización, se pueden utilizar detergentes o métodos físicos, como el choque osmótico, la mezcla mecánica y/o el tratamiento de congelación/descongelación para la lisis celular (Cañas y col., 2007; Hahn y col., 2021). Pero la introducción de productos químicos puede comprometer el tejido a analizar y comprometer la

viabilidad de los microorganismos presentes, la lisis mecánica de tejidos es una alternativa común a los métodos enzimáticos, detergentes o basados en la tonicidad (Proctor y col., 2019).

La homogeneización por “bead-beating” es uno de los métodos de disrupción de tejido más útiles (Cañas y col., 2007), es fácil de llevar a cabo en el laboratorio y además es de bajo costo. Esta consiste en el batido de microesferas de varios tamaños y composiciones que al entrar en contacto mecánico del tejido a alta velocidad provocan la ruptura de la membrana celular facilitando así la separación de microorganismos adheridos (Burden y col., 2014). Este tipo de separación se puede lograr utilizando distintos tipos de equipos, desde agitadores vorticiales de laboratorio hasta molinos de perlas especializados.

Según los antecedentes mencionados, el cultivo de microorganismos a partir de pulmón permitiría recuperar la microbiota que habita en este órgano y así poder estudiar la interacción microbiota-hospedero. Interacción clave si se pretende buscar dianas terapéuticas a enfermedades pulmonares. Si se busca llevar a cabo el cultivo de microorganismos a partir de tejidos de pulmón, es necesario homogeneizar previamente el tejido para liberar los microorganismos adheridos al tejido sin comprometer su viabilidad y evitar riesgos de contaminación. Dado que la duración del método de homogeneización por “bead-beating” es crítica junto con el diámetro de las microesferas (Proctor y col., 2019; Goldberg, 2008), es necesario encontrar parámetros de tiempo y diámetro de las microesferas que permitan la máxima eficacia posible. Se eligió evaluar estos parámetros en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* porque estos microorganismos pertenecen a los Phylum más abundantes reportados en el pulmón de ratones y seres humanos (Barfod y col., 2013; Perez-Brocal y col., 2020); además así se cuenta con

representantes de bacterias (gram positivas como gram negativas) y del reino fungi. Por lo tanto, en el presente Seminario de Título se plantearon los siguientes objetivos.

1.5 Objetivo general

Evaluar la técnica de homogeneización por “bead-beating” para el cultivo de microorganismos obtenidos a partir de tejido pulmonar.

1.6 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la técnica de homogeneización por “bead-beating” sobre la sobrevivencia de microorganismos a partir de cultivos líquidos.
2. Probar el efecto de la técnica de homogeneización por “bead-beating” sobre la sobrevivencia de microorganismos, a partir de muestras de tejido de pulmón de ratones previamente inoculados con un “pool” de microorganismos.
3. Aplicar la técnica de homogeneización por “bead-beating” para caracterizar la microbiota pulmonar normal de ratones por método de cultivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas y medio de cultivo

Se trabajó con *Escherichia coli* que es una cepa proveniente de un aislado clínico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y *Candida albicans* ATCC29. Se mantuvieron en placas de agar MacConkey, manitol salado y Sabouraud respectivamente a 4 °C.

Las bacterias crecieron en medios líquidos “brain heart infusion” (BHI). La levadura se cultivó en medio líquido Spider (Calera y col., 2000).

El precultivo se realizó a partir de 1 colonia en 10 mL del medio líquido de cultivo correspondiente al microorganismo y se dejó crecer durante la noche a 37 °C y agitación orbital. Se inoculó 1 mililitro de precultivo en un matraz con 100 mL con el mismo medio de cultivo y todos los microorganismos crecieron a 37 °C con agitación constante. La pureza de los cultivos fue controlada por tinción de Gram. Se midió la absorbancia a 600 nm con un espectrofotómetro visible Genesys 10 (Thermo) cada 30 minutos hasta la saturación.

Para evaluar la sobrevivencia (segundo objetivo) se usaron los medios sólidos agar MacConkey, manitol salado y Spider para la detección de *E. coli*, *S. aureus* y *Candida*, respectivamente.

Para el cultivo de los microorganismos de la microbiota pulmonar, se usó dos tipos de medio líquido en aerobiosis y anaerobiosis: el medio BHI y un medio enriquecido con mucina (ANAC). La composición del medio ANAC fue elaborada según el protocolo de un medio para crecimiento anaeróbico (Miller & Hoskins, 1981) con las siguientes modificaciones: se colocó en frascos para crecimiento anaerobio previamente autoclavados 7,5 mL de la solución S (Tabla 1). Para el medio con agar,

se agregó 1,5% de agar. Luego se añadieron, en condiciones de esterilidad, 100 microlitros de la solución A, B y C (Tabla 2), además de triptófano y cisteína, los cuales se prepararon aparte del stock S. Se obtuvo así una solución final de pH≈7, a la cual se le añadió 100 µl de la muestra homogeneizada por “bead-beating”.

Tabla 1. Composición de solución S

Reactivo*	Cantidad por litro
Caseína hidrolizada	15 g
D-glucosa	1 g
Fosfato dipotásico	14,3 g
Fosfato monopotásico	2,4 g
Sulfato de amonio	1 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Resazurina	1 mg
Agua destilada	1 L

*Reactivos que componen la solución S del medio enriquecido con mucina (ANAC), según la cantidad necesaria para preparar 1 litro de solución. El pH de la solución final es 8.

Tabla 2. Composición de la solución A, B y C.

Solución A	Solución B	Solución C
0,2 g NaCl	0,2 g adenina	40 g piridoxina
0,2 g FeSO ₄	0,2 g guanina	20 mg ácido 4-aminobenzoico
0,2 g MnSO ₄	0,2 g uracilo	10 mg pantotenato de calcio
100 mL agua destilada	0,2 g xantina	10 mg riboflavina
	100 mL agua destilada	10 mg tiamina
		2 mg ácido fólico
		0,1 mg biotina
		0,1 mg vitamina B12
		100 mL agua destilada

Estas soluciones se usaron para la preparación del medio enriquecido con mucina (ANAC). Las soluciones B y C tienen pH 12.

2.2 Experimento animal

Todos los experimentos animales de este proyecto fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (N° 1067). Los experimentos animales fueron llevados a cabo por Hector Molina, mánager del laboratorio, que cuenta con un curso de capacitación en Manejo y Experimentación Animal. Todos los ratones usados en este proyecto eran cepas BALB/c, entre 2 a 3 meses de edad, machos y hembras, obtenidos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Para el segundo objetivo, se utilizaron 3 ratones para la administración intratraqueal de un “pool” de microorganismos (*E.coli* , *S. aureus* y *Candida*) resuspendido en medio BHI con una concentración de 3×10^5 UFC/mL y 3 controles a los cuales se les administró únicamente medio BHI. Para el tercer objetivo, se utilizaron 4 ratones para la caracterización de la microbiota pulmonar.

Para la administración intratraqueal, los ratones fueron previamente anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilasina. Una vez comprobado que los ratones estaban efectivamente anestesiados se procedió a ejecutar el procedimiento de intubación intratraqueal en el cual el ratón fue intubado con una cánula por vía oral hasta la tráquea, a través de la cánula se agregó un volumen de 30 μ l del vehículo (controles) o 30 μ l del “pool” de microorganismos. Dado que el máximo volumen que se puede inyectar al pulmón de estos ratones es de 30 μ l y la concentración normal en el pulmón sano de un ratón es de 10^3 a 10^5 bacterias por gramo de pulmón (Dickson y col., 2018; Yagui y col., 2021), se suministró una cantidad equivalente de microorganismos.

Posteriormente se ejecutó eutanasia por dislocación cervical y se extrajo los pulmones mediante cirugía, los pulmones fueron lavados en PBS pH 7.5. Se cortó en condiciones de esterilidad el pulmón con tijera y bisturí en fragmentos de menor tamaño posible.

2.3 Protocolo de homogeneización por “bead-beating”

Los fragmentos de pulmón cortados fueron agregados en un criotubo con las microesferas y se añadió 1 mL de medio líquido BHI.

Para la homogeneización, se utilizó un Mini-Beadbeater 16 (BioSpec) y microesferas de 0,1 y 2,3 milímetros de diámetro de zirconio/sílice (BioSpec). Se eligió el sílice ya que es el material menos denso, menos duro, generalmente es esférico y más

pequeño que otros tipos de materiales de microesferas, lo que lo convierte en menos agresivo que otros e ideal para el objetivo de este trabajo (MP Biomedicals, s.f.). Se evaluaron 3 intervalos de tiempo de homogeneización: 30, 60 y 180 segundos ya que en trabajos similares se evaluaron los mismos tiempos (Goldberg, 2021)

Para el cultivo líquido de microorganismos se colocó 1 mL del inóculo y se usó 1 g de microesferas (las cuales fueron previamente expuestas a rayos UV). Se utilizó esta proporción porque si bien se desconoce cual es el peso seco de microorganismos en 1 mL de cultivo, este es inferior a 1 g. De esta manera se cuenta con mayor masa de microesferas que de microorganismos, asegurando así mayor probabilidad de impacto al homogeneiz

2.4 Caracterización de la microbiota a partir del tejido pulmonar

Se analizaron los microorganismos del pulmón de ratón sano, para ello se utilizó el siguiente protocolo que fue estandarizado previamente en el laboratorio. Se colocaron los fragmentos de tejido pulmonar en un frasco con PBS a pH neutro, dejándolo en agitación por media hora. Se filtró con ayuda de gasas estériles. Se centrifugó a 2900 g por 10 min a 4°C. Se conservó el sobrenadante y se llevó a vortex hasta recuperar el pellet. Se pasó a un tubo de 2 mL y se centrifugó a 14000 RPM por 5 min conservando el pellet. Se congeló a -20°C hasta su uso.

2.5 Extracción del ADN

Antes de extraer el material genético de las muestras de pulmón homogeneizado se realizó lo siguiente para la obtención de pellet: se resuspendió cada muestra en 2 mL de PBS pH 7, se centrifugó en tubos Falcón de 15 mL a 14000 RPM durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 1mL de PBS pH 7. Se traspasó la suspensión a criotubos y se centrifugó nuevamente a 14000

RPM durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se conservó a -4 °C.

Para la extracción, el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS pH 7. Se utilizó el Kit extracción de ADN DNeasy (QUIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. Como control de extracción se utilizó PBS pH 7. Se determinó la concentración de ADN con el sistema de espectrofotómetro de múltiples volúmenes (Epoch™)

2.6 Secuenciación masiva del gen ARNr 16S

El análisis del material genético se realizó a partir de la solución obtenida por el Kit de extracción DNEASY POWERSOIL PRO-KIT (50) (QUIAGEN). La identificación del número y abundancia de especies en cada muestra se realizó mediante secuenciación masiva del gen bacteriano 16S ADNr realizado por la empresa Fasteris (Suiza) que utiliza la tecnología NGS (Next Generation Sequencing) la cual consiste en secuenciación de alto rendimiento.

3. RESULTADOS

3.1 Curvas de crecimiento de los microorganismos

Como este proyecto pretende evaluar el efecto de una técnica de homogeneización sobre la sobrevivencia de los microorganismos, se usaron cultivos puros de microorganismos en fase exponencial de crecimiento, ya que es durante esta fase que se encuentran más microorganismos vivos que muertos. Así, se realizaron curvas de crecimiento de las cepas *E. coli*, *S. aureus* ATCC25923 y *C. albicans* ATCC29 (Fig. 4) para determinar la fase exponencial de crecimiento de cada una de las especies. Según lo que muestra las Figuras 2-4, se determinó que la fase exponencial de *E. coli* (Fig. 2) era entre 2 y 3 horas desde la inoculación, entre 2 y 3 horas y media para *S. aureus* (Fig. 3) y entre 4 y 6 horas para *C. albicans* (Fig. 4).

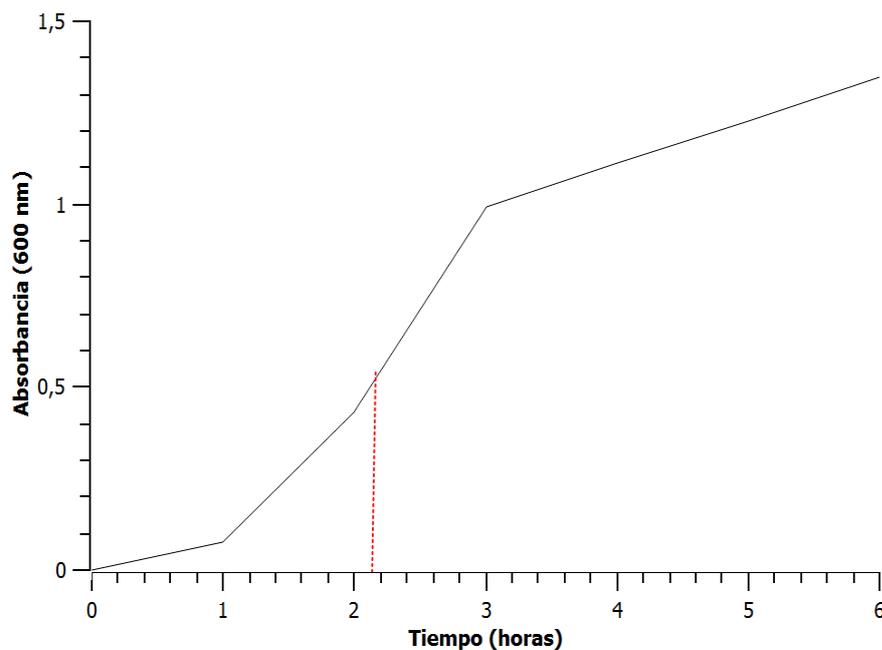


Figura 2. Curva de crecimiento de *E. coli*. Medición de la absorbancia del cultivo cada hora, a una longitud de onda de 600 nm hasta la fase estacionaria. La línea roja representa el tiempo que se eligió para detener el crecimiento del cultivo en los experimentos posteriores.

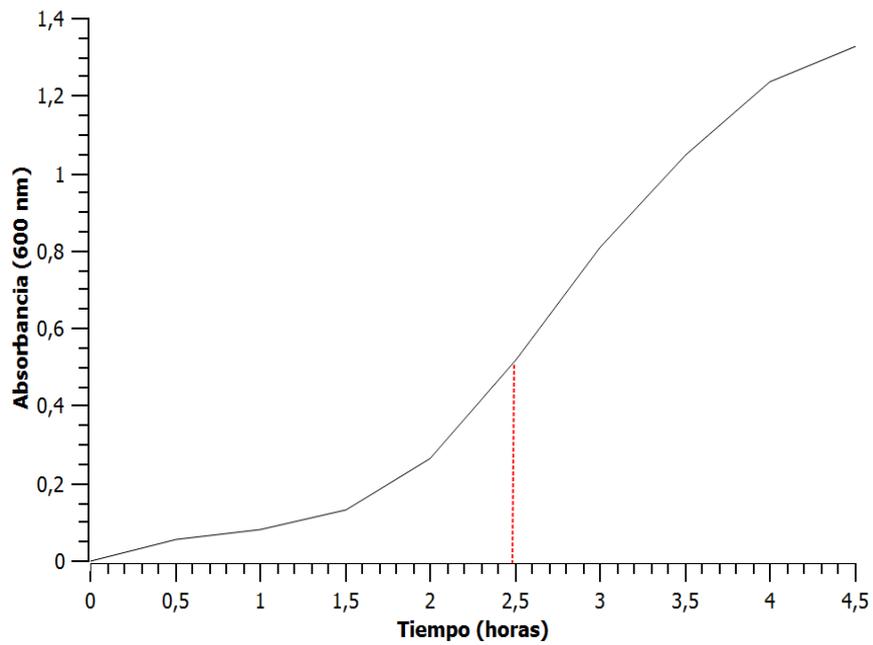


Figura 3. Curva de crecimiento de *S. aureus*. Medición de la absorbancia del cultivo cada hora a una longitud de onda de 600 nm hasta fase estacionaria. La línea roja representa el tiempo que se eligió para detener el crecimiento del cultivo en los experimentos posteriores.

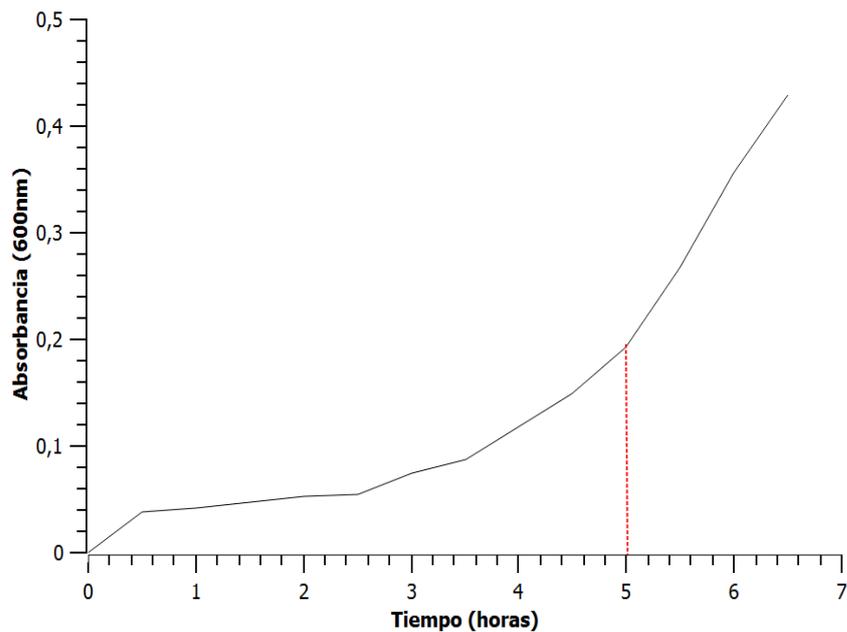


Figura 4. Curva de crecimiento de *C. albicans*. Medición de la absorbancia del cultivo cada hora a una longitud de onda de 600 nm hasta fase estacionaria. La línea roja representa el tiempo que se eligió para detener el crecimiento del cultivo.

3.2 Evaluación del efecto del tiempo y del tamaño de las microesferas en la homogeneización por “bead-beating” sobre la sobrevivencia de los microorganismos.

Se evaluaron los efectos de dos parámetros de la homogeneización por “bead-beating” sobre la sobrevivencia de los microorganismos: el tiempo de homogeneización (30, 60 y 180 segundos) y el tamaño de las microesferas (0,1 y 2,3 milímetros de diámetro). Se usaron cultivos de *E. coli*, *S. aureus* y *C. Albicans* en fase exponencial con un valor de absorbancia de 0,41, 0,52 y 0,22, respectivamente. Las concentraciones celulares de cada cultivo determinadas por recuento de colonias en placas de cultivo fueron $3,43 \times 10^8$ UFC/mL para *E. coli*, $8,38 \times 10^8$ UFC/mL para *S. aureus* y $0,75 \times 10^7$ UFC/mL para *C. albicans*. Luego de la homogeneización, los cultivos se sembraron en duplicado sobre un medio de cultivo selectivo y se dejaron en crecimiento por 24 horas a 37 °C. Se realizaron 3 repeticiones del experimento por cada cultivo.

Durante los experimentos, los cultivos en criotubos se mantuvieron a -4 °C desde la homogeneización hasta la siembra en placa. Debido a la energía cinética producida por la rotación del homogeneizador, se observó un alza de temperatura en los criotubos, lo cual se ha reportado que puede afectar los resultados al promover el crecimiento de los microorganismos (Kim & Ng, 2017).

Para evaluar el efecto de la homogeneización sobre la sobrevivencia de los microorganismos (Fig. 5-7), se comparó el número de colonias en cada placa de cultivo antes y después de la homogeneización (Shrestha y col., 2012). Por lo tanto, para obtener el porcentaje de sobrevivencia se realizó un cociente entre el logaritmo base 10 de las colonias en la placa luego de la homogeneización y las colonias en la placa control (cultivo no homogeneizado).

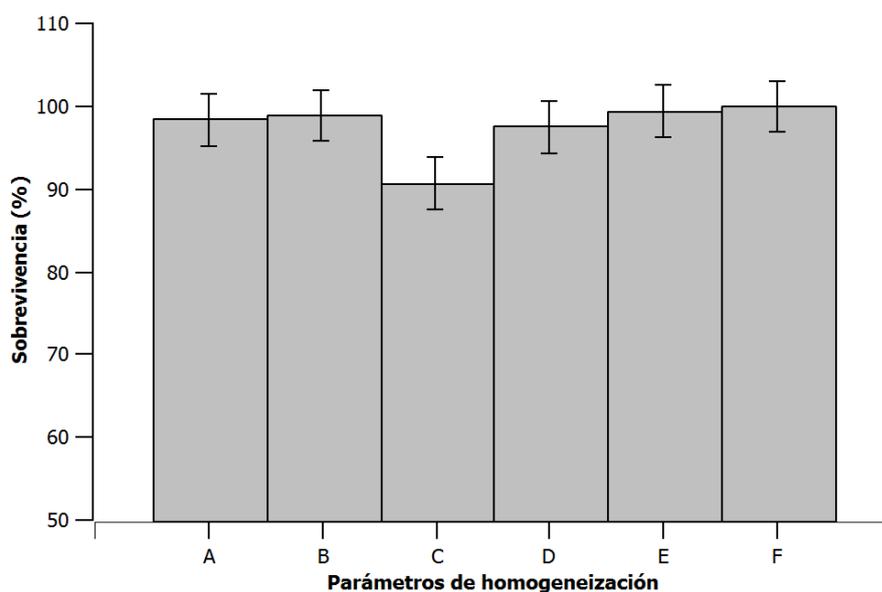


Figura 5. Impacto de la homogeneización sobre la supervivencia de *E. coli*. Cálculo en base a la razón entre UFC/mL de bacterias recuperadas e inoculadas. Los parámetros de homogeneización evaluados fueron el tiempo 30 s (A, D), 60 s (B, E) y 180 s (C,F) y el diámetro de las microesferas 0,1 mm (A-C) y 2,3 mm (D-F).

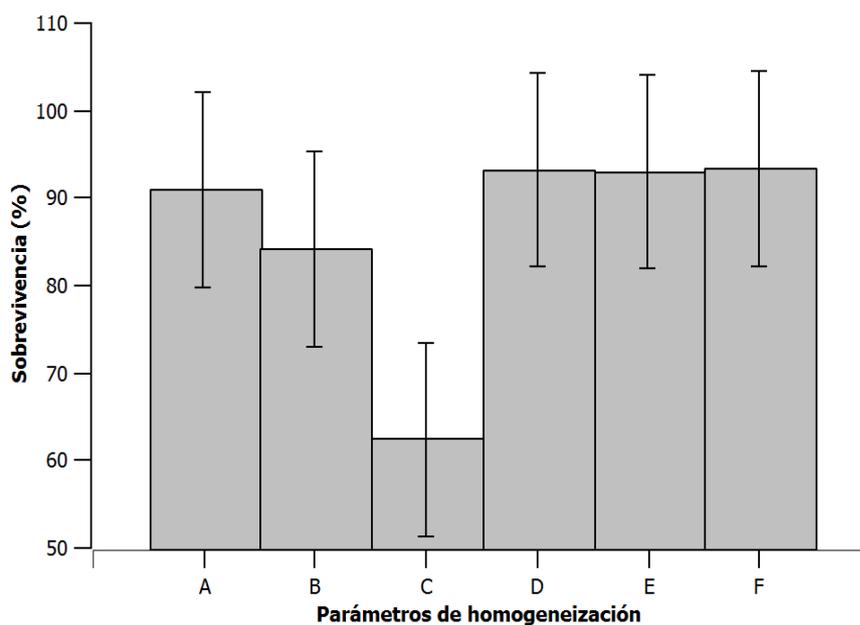


Figura 6. Impacto de la homogeneización sobre la supervivencia de *S. aureus*. Cálculo en base a la razón entre UFC/mL de bacterias recuperadas e inoculadas. Los parámetros de homogeneización evaluados fueron el tiempo 30 s (A, D), 60 s (B, E) y 180 s (C,F) y el diámetro de las microesferas 0,1 mm (A-C) y 2,3 mm (D-F).

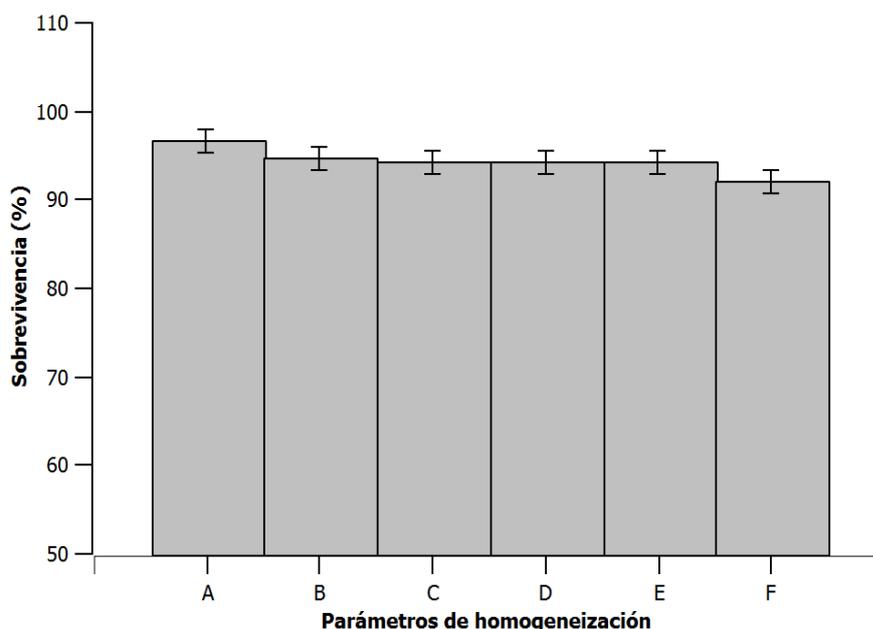


Figura 7. Impacto de la homogeneización sobre la sobrevivencia de *C. albicans*. Cálculo en base a la razón entre UFC/mL de bacterias recuperadas e inoculadas. Los parámetros de homogeneización evaluados fueron el tiempo (30, 60 y 180 segundos) y el diámetro de la microesferas (0,1 y 2,3 milímetros). Los parámetros de homogeneización evaluados fueron el tiempo 30 s (A, D), 60 s (B, E) y 180 s (C,F) y el diámetro de las microesferas 0,1 mm (A-C) y 2,3 mm (D-F).

En las Figuras 5 y 6, se observa una mayor mortalidad de las bacterias al usar microesferas de menor diámetro (0,1mm) y mayor tiempo (3 min). Por el contrario, cuando éstas fueron expuestas a las microesferas de mayor diámetro (2,3 mm), se observó una mayor supervivencia en comparación con el efecto ocasionado por las microesferas de menor diámetro. En la figura 7, la sobrevivencia de *C. Albicans* se ve más afectada al usar microesferas de 2,3 mm de diámetro y con un tiempo de homogeneización de 3 minutos. Se observó que la sobrevivencia de la levadura se ve poco afectada con el uso de microesferas de diámetro de 0,1 mm. En relación con el anterior, se decidió usar microesferas de 2,3 milímetros de diámetro y un tiempo de 1 minuto de homogeneización para la realización de los siguientes experimentos.

3.3 Efectividad de la técnica de homogeneización desarrollada en tejido pulmonar de ratones

A partir de las condiciones (tiempo y tamaño de las microesferas) establecidos anteriormente, se implementó este método de homogeneización en tejido pulmonar de ratones. Para comprobar su efectividad, se evaluó la tasa de recuperación de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, que fueron previamente administrados por vía intratraqueal en 3 animales. Se administró una dosis equivalente a 10^5 UFC de cada cepa en un mismo ratón. Luego se realizó una cirugía para retirar el pulmón que fue homogeneizado con microesferas de 2,3 mm de diámetro durante 1 minuto. Luego se sembró el homogeneizado de las muestras en placas de agar MacConkey, manitol salado y Sabouraud a distintas diluciones. Como controles, 3 ratones fueron inyectados con medio BHI.

Tabla 3. Recuento de microorganismos en pulmón de ratones control.

Microorganismos	UFC/mg	Razón [microbiota pulmonar normal/inóculo]
<i>E. coli</i>	0	0
<i>S. aureus</i>	221	0,0005
<i>C. albicans</i>	98	0,00022

Recuento de UFC por miligramo de pulmón obtenido por conteo de placas de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* a partir del homogeneizado del pulmón de ratones control. El cálculo de razón se realizó según UFC contabilizadas posterior a la homogeneización y UFC inoculadas en los ratones ("pool" de microorganismos).

Se calculó la razón entre el número de microorganismos contabilizados después de la homogeneización del tejido pulmonar y los microorganismos inoculados. Los valores obtenidos mostraron que los microorganismos de la microbiota residente del pulmón son inferiores a los inoculados (Tabla 3). Por esta razón, no se tomaron en cuenta en los análisis de estos resultados.

Según la Figura 8, se recuperó mayor cantidad de Enterobacterias luego de la homogeneización, luego levadura y en menor cantidad Estafilococos. En promedio se recuperó el 70% de los microorganismos inyectados inicialmente.

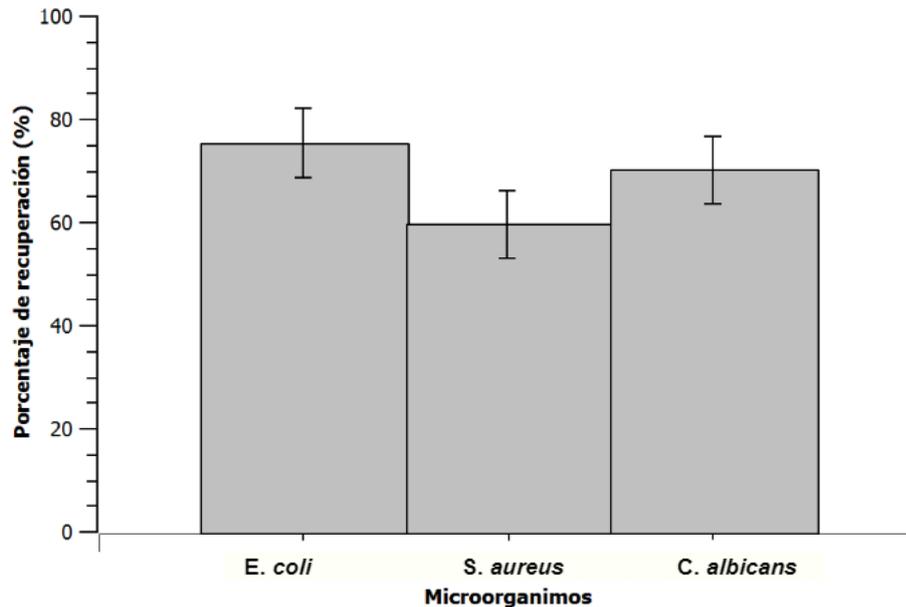


Figura 8. Porcentajes de recuperación de la inoculación de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* en pulmones de ratones. Datos obtenidos a partir de la implementación del protocolo de homogeneización desarrollado (“bead-beating” con microesferas de 2,3 nm de diámetro durante 60 segundos). El cálculo de recuperación se realizó según el porcentaje de la razón de logaritmo en base 10 de las UFC contabilizadas posterior a la homogeneización y de las UFC inoculadas en los ratones.

3.4 Caracterización de la microbiota pulmonar de ratones por método de cultivo usando la técnica de homogeneización por “bead-beating”.

Para evaluar la técnica de homogeneización por “bead-beating” sobre la detección de la microbiota pulmonar, se compararon la diversidad y la abundancia de las especies bacterianas presentes en el pulmón primero con las que están detectadas en las muestras homogeneizadas y luego con las que fueron aisladas por método de cultivo.

Por cada ratón ($n = 4$), los pulmones fueron divididos en dos: a una mitad se le aplicó el protocolo de caracterización de microbiota pulmonar (ver Materiales y Métodos). La otra mitad fue homogeneizada de acuerdo con la técnica desarrollada. También se cultivaron los microorganismos presentes en el homogenizado usando un medio BHI líquido y un medio líquido enriquecido en mucina (ANAC) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Los microorganismos presentes en el tejido de pulmón, en el homogenizado de pulmón y en los cultivados fueron identificados por secuenciación.

3.4.1 Concentración de ADN extraído del tejido pulmonar, del homogeneizado pulmonar y de los cultivos líquidos bacterianos.

Se extrajo y cuantificó el ADN de las muestras del tejido pulmonar, del tejido homogeneizado y de los cultivos líquidos bacterianos (Tabla 4). Los controles de cultivo consisten en el medio líquido (sin la muestra de pulmón).

Tabla 4. Concentración de ADN (ng/μl) obtenido a partir de muestras de tejido pulmonar.

Ratón	Tejidos pulmonares ¹	Homogeneizado pulmonar ²	Cultivos líquidos bacterianos ³			
			ANAC/aer o	ANAC/ aero	BHI/aero	BHI/ana
#1	88,8	138,5	5,9	-	38,7	18,9
#2	50,9	229,1	56,2	16,2	11,5	13,1
#3	14,6	179,9	12,5	16,1	56,1	26,8
#4	5,7	213,6	16,4	15,6	28	94,2
control	-	-	2,3	-	-	-
control	-	-	-	-	1,4	-
control	-	-	-	-	-	2,5

1, se extrajo el ADN directamente a partir del tejido pulmonar. 2, se extrajo el ADN a partir del homogeneizado obtenido utilizando el protocolo de homogeneización desarrollado. 3, se extrajo el ADN de los microorganismos que crecieron en los distintos medios de cultivos.

Según los resultados de la Tabla 8, se detectó ADN en todas las muestras y todos los controles, pero estos últimos en menor concentración. De acuerdo con el promedio de ADN obtenido por cada tipo de procedimiento, el tejido homogeneizado presenta 190,3 ng/μl (± 40,2 DE) por ratón, el tejido de pulmón 40 ng/μl (± 37,96 DE) y al calcular el promedio de todas las muestras cultivadas se obtiene 28,4 ng/μl (± 23,8 DE) por ratón. En conclusión, el homogeneizado pulmonar presenta mayor cantidad de ADN que las muestras de tejido pulmonar y que las muestras cultivadas.

3.4.2 Recuperación de microorganismos a partir del tejido homogeneizado

Para evaluar la eficiencia del método de homogeneización desarrollado anteriormente, se comparó la diversidad y la abundancia de las bacterias identificadas en el tejido pulmonar y en el homogeneizado.

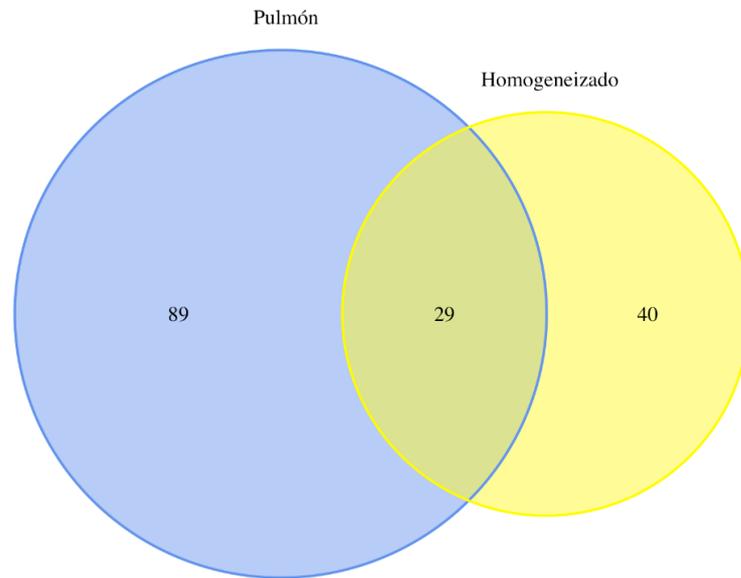


Figura 9. Diagrama de Venn de la diversidad bacteriana observada en el tejido pulmonar y homogeneizado. Diagrama de Venn que muestra las especies bacterianas identificadas a partir de tejido pulmonar al que se le aplicó el protocolo de recuperación de microbiota (Pulmón) y tejido homogeneizado por “bead-beating” (Homogeneizado). Los valores corresponden al total de especies identificadas en los 4 ratones utilizados.

El diagrama de Venn (Fig. 9) muestra que el 25% de las especies bacterianas presentes en el tejido pulmonar (29 especies bacterianas) fueron recuperadas en el homogeneizado. Sin embargo, 40 especies bacterianas identificadas en el homogeneizado no fueron detectadas en el tejido pulmonar.

A partir de la abundancia de cada especie, se evaluó la proporción de la microbiota que se recuperó con el protocolo de homogeneización. Considerando la abundancia total identificada en los tejidos de pulmón como referencia (100%), se determinó el porcentaje de bacterias recuperadas y no recuperadas (Fig. 10).

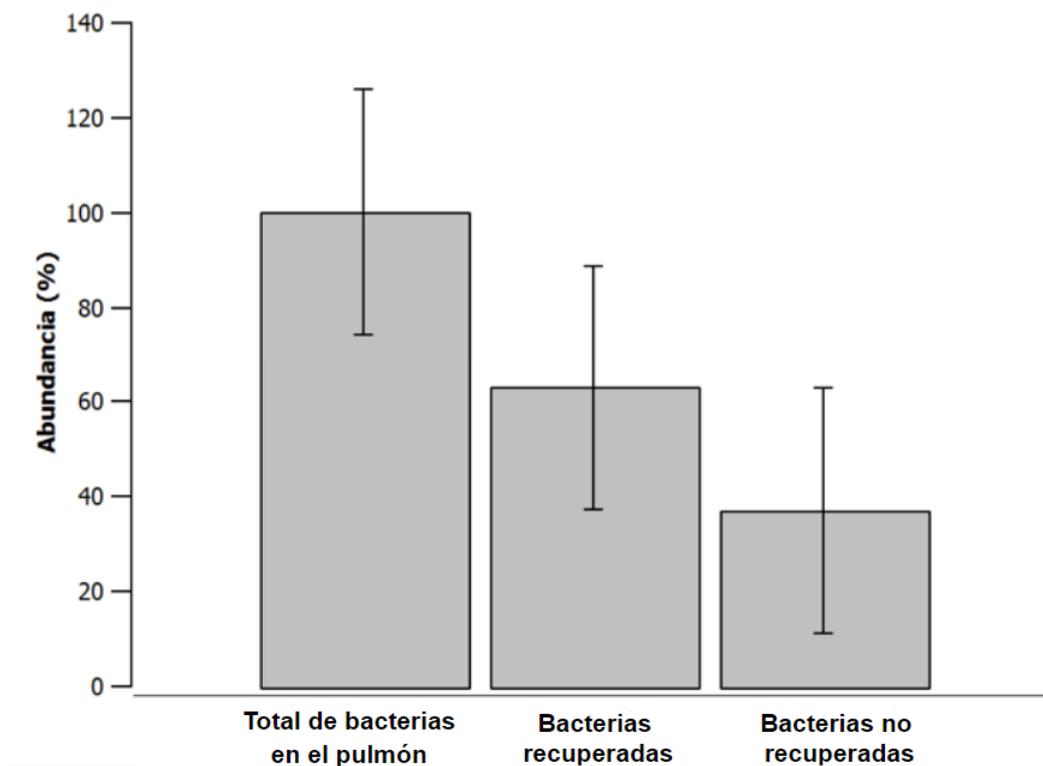


Figura 10. Abundancia relativa de las especies bacterianas recuperadas luego de la homogeneización por “bead-beating”. Considerando la abundancia total identificada en los tejidos de pulmón como referencia (100%), se determinó el porcentaje de bacterias recuperadas y no recuperadas. Los valores corresponden al total de especies identificadas en los 4 ratones utilizados.

En el histograma de la Figura 10 se observa que las especies bacterianas recuperadas en el homogeneizado representan 63% de la abundancia microbiana identificada en el tejido pulmonar. Los microorganismos no detectados en el homogeneizado representan un 37% de la microbiota pulmonar.

De acuerdo con estos datos, el método de homogeneización desarrollado en este proyecto permite recuperar las especies que son dominante en abundancia en la microbiota pulmonar.

3.4.3 Cultivo de la microbiota pulmonar a partir del tejido homogeneizado

Se estudió el potencial del tejido homogeneizado para cultivar la microbiota pulmonar. Para esto, se comparó la diversidad bacteriana observada en el homogeneizado y

los microorganismos detectados en los medios de cultivos. Se usó un medio de cultivo líquido BHI y un medio líquido enriquecido con mucina en condiciones de aerobiosis y de anaerobiosis. Este último medio de cultivo tenía como objetivo recrear las condiciones que existen en pulmón. Los microorganismos cultivados fueron identificados por secuenciación.

A partir de los resultados obtenidos por la técnica de secuenciación se realizó un gráfico de Venn (Fig. 11) para evaluar el número de especies que se pudo cultivar, siendo estas las que se identifican tanto en el tejido pulmonar homogeneizado como en el tejido que fue cultivado.

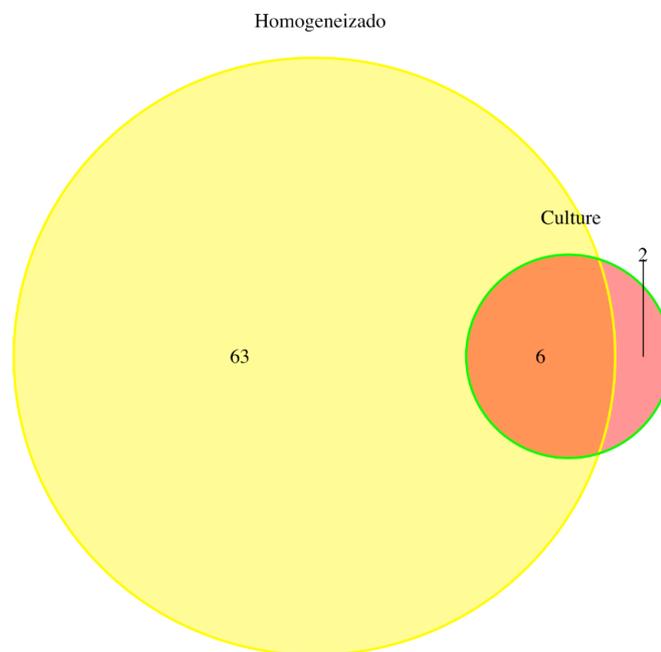


Figura 11. Diagrama de Venn de la diversidad bacteriana observada en el tejido pulmonar homogeneizado y los cultivos. Los valores corresponden al total de especies identificadas en las muestras de tejido homogeneizado y cultivado de los 4 ratones utilizados.

De acuerdo con el gráfico de Venn de la Figura 11, 9% del total de las especies bacterianas del homogeneizado (6 especies bacterianas) se cultivaron, mientras que

el 90% no se pudo cultivar. Sin embargo, se detectó en los cultivos 2 especies bacterianas que no estaban presente en el homogenizado. En término de abundancia relativa, las 6 especies bacterianas cultivadas representan 70% de los microorganismos identificados en el homogeneizado pulmonar (Fig. 12). Por otra parte, basándose en la abundancia relativa de los microorganismos identificados en el tejido pulmonar (100%), estas 6 especies bacterianas cultivadas representan 33% de la microbiota en término de abundancia (Figura 13). Estas 6 especies de bacterias pertenecen a dos *Parasuterella* sp., *Bifidobacterium pseudolongum*, *Staphylococcus lentus*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus reuteri*. En la Tabla 4 se muestran las condiciones de cultivos en las cuales fueron detectados estos microorganismos.

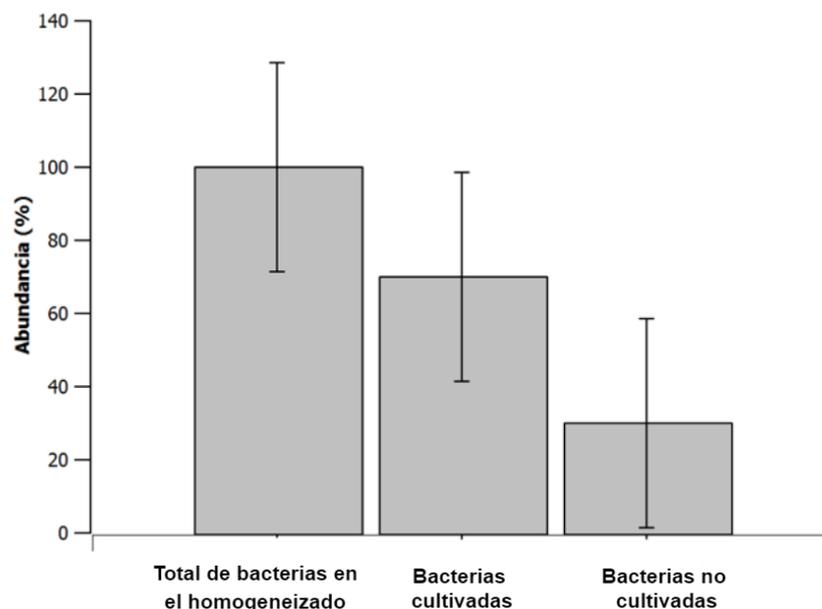


Figura 12. Abundancia relativa de las especies bacterianas cultivadas a partir del tejido pulmonar homogeneizado. Histograma con el porcentaje de bacterias que se pudieron cultivar a partir del tejido pulmonar homogeneizado. Los valores corresponden a un promedio de los resultados obtenidos en los 4 ratones utilizados. Para los datos de cultivo, se realizó un promedio de las abundancias de las 4 condiciones de cultivo utilizadas.

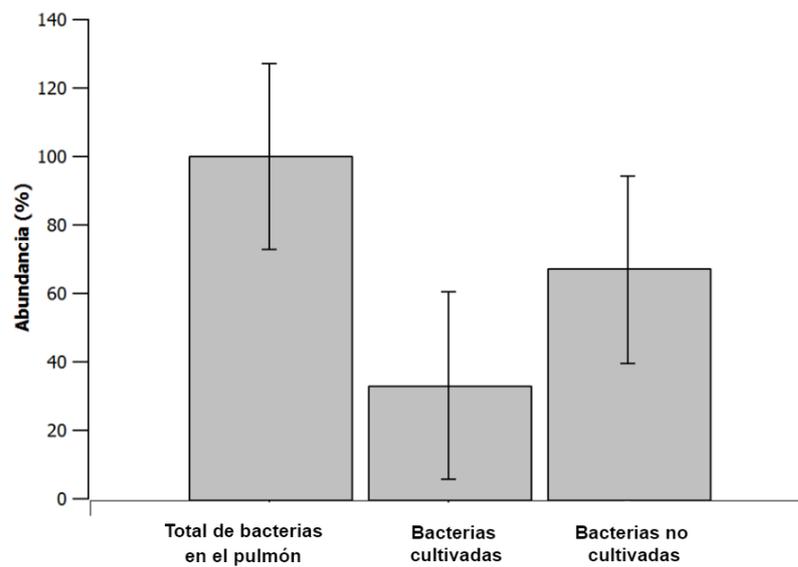


Figura 13. Porcentaje de especies bacterianas cultivadas a partir del tejido pulmonar. Histograma con porcentaje de abundancia de bacterias identificadas en el tejido pulmonar y tejido que fue cultivado luego de ser homogeneizado. Los valores corresponden a un promedio de los resultados obtenidos en los 4 ratones utilizados. Para los datos de cultivo, se realizó un promedio de las abundancias de las 4 condiciones de cultivo utilizadas.

Tabla 5. Crecimiento de taxas bacterianas en diferentes condiciones de cultivo.

Taxas	BHI/ana	BHI/aero	ANAC/ana	ANAC/aero
Especie del género <i>Parasuterella</i>	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	+	-	-	+
<i>Staphylococcus lentus</i>	-	+	-	-
Especie del género <i>Parasuterella</i>	-	+	-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	+	+	+	+
<i>Lactobacillus reuteri</i>	+	+	+	+

Resultados cualitativos a partir de la identificación de especies en cada tipo de cultivo. El símbolo “+” significa que la especie pudo crecer en la condición y “-” que no. Las condiciones de cultivo se nombran en la fila superior, primero se menciona el medio líquido de cultivo y a continuación si fue en condición anaeróbica (ana) o aeróbica (aero).

De acuerdo a la Tabla 5, se observó que *Parasuterella* sp. y *Staphylococcus lentus* crecen sólo en condición aeróbica, mientras que las condiciones de cultivo anaeróbicas benefician el crecimiento de las especies *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii* y *Bifidobacterium pseudolongum*. Estas 3 especies también son capaces de crecer en medio enriquecido con mucina. Del total de las especies evaluadas, las dos taxas de *Lactobacillus* crecen en ambos medios de cultivos empleados, además de poder hacerlo con y sin oxígeno.

4. DISCUSIÓN

Está demostrado que numerosas enfermedades pulmonares están asociadas a un desbalance de la comunidad microbiana que lo habita. Entender los mecanismos asociados a la interacción entre los microorganismos y el hospedero permitiría desarrollar modelos experimentales para descubrir la causalidad (Wu & Segal, 2017). Para poder llevar a cabo dichos estudios es necesario aislar estos microorganismos. Esta investigación pretende desarrollar un protocolo de homogeneización para poder cultivar y aislar los microorganismos que componen la microbiota pulmonar.

Estudios anteriores mostraron que el diámetro de las microesferas y el tiempo de homogeneización son factores determinantes para la homogeneización de los tejidos y que afectan la sobrevivencia de los microorganismos (Proctor y col., 2019; Goldberg, 2008). En este estudio, se observó una mayor mortalidad en las bacterias al usar las microesferas de menor diámetro (0,1 mm), mientras que con las microesferas de mayor diámetro (2,3 mm) se encontró una mayor supervivencia. En el caso de la levadura, la sobrevivencia es menor cuando es homogeneizada por el período de tiempo más largo (3 minutos). Estos resultados son concordantes con la literatura pues hay antecedentes de que para una mayor lisis bacteriana se recomienda usar microesferas de 0,10 a 0,5 mm de diámetro (Goldberg, 2008) y que, a mayor tiempo de homogeneización, es menor la viabilidad microbiana (Proctor y col., 2019). Sin embargo, las microesferas de menor diámetro (0,1 mm) que se usaron en este estudio afectaron la sobrevivencia de *C. albicans*. Estos resultados concuerdan con los de un trabajo donde se reporta mayor lisis en levaduras al usar microesferas con un diámetro entre 0,5 y 1,25 mm (Goldberg, 2008). Es por lo anterior, que en este estudio se eligió usar microesferas de 2,3 milímetros de diámetro y un tiempo de 1 minuto para la homogeneización del tejido pulmonar. Si

bien las microesferas de 2,3 mm pueden ser perjudicial para la sobrevivencia de las levaduras, se observó que la homogeneización durante 1 minuto limita estos efectos.

El protocolo de homogeneización desarrollado muestra una buena efectividad en la recuperación del "pool" de microorganismos inyectado a ratones por vía intratraqueal. En promedio, el 70% de los microorganismos inoculados fueron recuperados. Hubo un 30% de microorganismos que no se pudieron recuperar, esto pudo haber ocurrido debido a la técnica de homogeneización y/o a la manipulación del tejido durante la disección del animal que afectaron su viabilidad.

Cuando se implementó la técnica de homogeneización desarrollada para estudiar la microbiota pulmonar de los ratones sanos, se rescataron las especies bacterianas dominantes de la microbiota pulmonar. Si bien un 25% de las especies bacterianas presentes en el tejido pulmonar (29 especies bacterianas) fueron identificados en el tejido homogeneizado, estas especies bacterianas representan 63% de la abundancia de la microbiota pulmonar recuperada. Este resultado sugiere que la microbiota pulmonar estaría dominada por un grupo reducido de especies bacterianas y que gran parte de los microorganismos presentes están en una baja proporción. Los microorganismos no rescatados por el método de homogeneización corresponden a microorganismos que están en baja abundancia en la microbiota; es decir una abundancia inferior al 15% del total de bacterias identificadas en el homogeneizado. No se puede descartar que estos microorganismos pueden también ser contaminación, lo que podría explicar porque no se encuentren el tejido homogeneizado.

El cultivo del tejido homogeneizado permitió identificar solo 6 especies bacterianas. Sin embargo, estas especies bacterianas corresponden a las bacterias más abundantes en la microbiota pulmonar. Un gran porcentaje de especies bacterianas no se pudieron cultivar, lo que podría ser debido a los medios de cultivo usados, ya

que quizá estos no eran los adecuados para el crecimiento de estos microorganismos. Para poder cultivar la mayor cantidad y variedad posible de microorganismos, se utilizó un medio de cultivo BHI y un medio de cultivo líquido enriquecido con mucina (ANAC) (Miller & Hoskins, 1981). En efecto, consideramos que esta glicoproteína podría ser la principal fuente de nutrientes para los microorganismos en el pulmón (Flynn y col., 2016; Meldrum & Chotirmall, 2021). Dado que la mayoría de los microorganismos que habitan en el pulmón corresponden a microorganismos anaerobios, es posible que el cultivo anaeróbico utilizado no sea lo suficientemente óptimo. Sin embargo, los medios de cultivo usados favorecieron el crecimiento de estas seis cepas bacterianas sobre otras taxas. Esto lleva a pensar que por competencia el resto de las especies de bacterias que están en menor proporción no pudieron crecer. Sería interesante buscar medios de cultivo que pudieran favorecer el crecimiento selectivo de estos microorganismos para poder aislarlos.

Existen dos especies de bacterias identificadas en el tejido cultivado que no están presentes ni el homogeneizado ni el pulmón. De acuerdo con la información proporcionada por secuenciación, una de las especies pertenece al género *Enterobacter* y la otra especie es *Bacteroides thetaiotaomicron*. Dado que estas mismas taxas están presentes en los controles de cultivo se podría suponer que corresponden a contaminación.

El género *Lactobacillus* ha sido reportado como el género bacteriano más abundante en los pulmones de los ratones (Singh y col., 2017; Yun y col., 2014). Los resultados son coherentes con la literatura ya que dentro de las seis especies bacterianas cultivadas, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus johnsonii* presentan la mayor abundancia en el pulmón, de acuerdo con la información obtenida por secuenciación. *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus johnsonii* son anaerobios facultativos (Salveti y

col., 2018) y pueden crecer en condición aeróbica y anaeróbica. También *Bifidobacterium pseudolongum* que corresponden a los microorganismos cultivados de este proyecto es una especie anaeróbica (Bo y col., 2020). Estas especies bacterianas crecieron también en el medio ANAC, lo que sugiere que podrían sobrevivir en el pulmón a través del uso del moco secretado por el epitelio pulmonar. Esta capacidad le podría dar una ventaja sobre los otros microorganismos, lo que podría explicar que formen parte de los microorganismos en mayor abundancia en el pulmón.

También es posible que la composición del medio ANAC pueda darle una ventaja a las especies recuperadas e impedir el crecimiento de otras.

5. CONCLUSIONES

A través de los estudios realizados en este trabajo, se logró validar una técnica de homogeneización por “bead-beating” para poder aislar y cultivar microorganismos de la microbiota pulmonar de ratones. Si bien el protocolo requiere una mayor optimización, los métodos de cultivo para poder cultivar y aislar microorganismos de la microbiota pulmonar reportados en este trabajo podrían utilizarse en diversos modelos animales e incluso en muestras de tejido pulmonar humano.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J. B., Cani, P. D., Fauvel, J., Alessi, M. C., Chamontin, B., & Ferrières, J. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American journal of clinical nutrition*, 87(5), 1219–1223. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.5.1219>
- Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 12(Suppl 1), 5–16. <https://doi.org/10.4137/EBO.S36436>.
- Anaerobe System. (s.f). Brain Heart Infusion Agar. <https://anaerobesystems.com/products/plated-media/brain-heart-infusion-agar/>
- Askar, M., Ashraf, W., Scammell, B., & Bayston, R. (2019). Comparison of different human tissue processing methods for maximization of bacterial recovery. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 38(1), 149–155. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3406-4>
- Barfod, K. K., Roggenbuck, M., Hansen, L. H., Schjørring, S., Larsen, S. T., Sørensen, S. J., & Kroghelt, K. A. (2013). The murine lung microbiome in relation to the intestinal and vaginal bacterial communities. *BMC microbiology*, 13, 303. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-303>
- Bo, T. B., Wen, J., Zhao, Y. C., Tian, S. J., Zhang, X. Y., & Wang, D. H. (2020). Bifidobacterium pseudolongum reduces triglycerides by modulating gut microbiota in mice fed high-fat food. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 198, 105602. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105602>
- Burden, D., Brangs, Hall., & Gibbons, L. (2014). Bead Beating: A Primer. 10.13140/RG.2.1.4223.7207.
- Bush, J. R., & Alfa, M. J. (2020). Increasing levels of Parasutterella in the gut microbiome correlate with improving low-density lipoprotein levels in healthy adults consuming resistant potato starch during a randomised trial. *BMC nutrition*, 6(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s40795-020-00398-9>
- Blum, H.E. (2017). The Human Microbiome: An Emerging Key Player in Health and Disease. *Clinical & Biomedical Research*, 1, 85-95.
- Cani P. D. (2018). Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*, 67(9), 1716–1725. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316723>
- Calera, J. A., Zhao, X. J., & Calderone, R. (2000). Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 68(2), 518–525. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.518-525.2000>
- Cañas, B., Piñeiro, C., Calvo, E., López-Ferrer, D., & Gallardo, J. M. (2007). Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *Journal of chromatography. A*, 1153(1-2), 235–258. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.045>

Casani-Cubel, J., Benlloch, M., Sanchis-Sanchis, C. E., Marin, R., Lajara-Romance, J. M., & de la Rubia Orti, J. E. (2021). The Impact of Microbiota on the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis and the Possible Benefits of Polyphenols. An Overview. *Metabolites*, 11(2), 120. <https://doi.org/10.3390/metabo11020120>

Christiansen, S. C., & Zuraw, B. L. (2019). Treatment of Hypertension in Patients with Asthma. *The New England journal of medicine*, 381(11), 1046–1057. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1800345>

Meldrum, O. W., & Chotirmall, S. H. (2021). Mucus, Microbiomes and Pulmonary Disease. *Biomedicines*, 9(6), 675. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060675>

Cox, M. J., Allgaier, M., Taylor, B., Baek, M. S., Huang, Y. J., Daly, R. A., Karaoz, U., Andersen, G. L., Brown, R., Fujimura, K. E., Wu, B., Tran, D., Koff, J., Kleinhenz, M. E., Nielson, D., Brodie, E. L., & Lynch, S. V. (2010). Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PloS one*, 5(6), e11044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011044>

Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., & Huffnagle, G. B. (2013). The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert review of respiratory medicine*, 7(3), 245–257. <https://doi.org/10.1586/ers.13.24> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4007100/>

Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Martinez, F. J., & Huffnagle, G. B. (2016). The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annual review of physiology*, 78, 481–504. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105238>

Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Falkowski, N. R., Hunter, E. M., Ashley, S. L., & Huffnagle, G. B. (2018). The Lung Microbiota of Healthy Mice Are Highly Variable, Cluster by Environment, and Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 198(4), 497–508. <https://doi.org/10.1164/rccm.201711-2180OC>

Dekaboruah, E., Suryavanshi, M. V., Chettri, D., & Verma, A. K. (2020). Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Archives of microbiology*, 202(8), 2147–2167. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01931-x>

Denneny, E., Sahota, J., Beatson, R., Thornton, D., Burchell, J., & Porter, J. (2020). Mucins and their receptors in chronic lung disease. *Clinical & translational immunology*, 9(3), e01120. <https://doi.org/10.1002/cti2.1120>

Devereux, R., & Mundfrom, G. W. (1994). A phylogenetic tree of 16S rRNA sequences from sulfate-reducing bacteria in a sandy marine sediment. *Applied and environmental microbiology*, 60(9), 3437–3439. <https://doi.org/10.1128/aem.60.9.3437-3439.1994>

Dobell C. (1920). The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 13(Sect Hist Med), 1–15.

Domingo, S., & Sánchez-Sánchez, C. (2018). De la flora intestinal al microbioma. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(1), 51–56. <https://dx.doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>

- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, *308*(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>.
- Ege, M. J., Mayer, M., Normand, A. C., Genuneit, J., Cookson, W. O., Braun-Fahrlander, C., Heederik, D., Piarroux, R., von Mutius, E., & GABRIELA Transregio 22 Study Group (2011). Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *The New England journal of medicine*, *364*(8), 701–709. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007302>
- Flynn, J. M., Niccum, D., Dunitz, J. M., & Hunter, R. C. (2016). Evidence and Role for Bacterial Mucin Degradation in Cystic Fibrosis Airway Disease. *PLoS pathogens*, *12*(8), e1005846. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005846>
- Hou, K., Wu, Z. X., Chen, X. Y., Wang, J. Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z. S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, *7*(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Goldberg S. (2008). Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *424*, 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_1
- Goldberg S. (2021). Mechanical/Physical Methods of Cell Disruption and Tissue Homogenization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *2261*, 563–585. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1186-9_36
- Grochowska, M., Wojnar, M., & Radkowski, M. (2018). The gut microbiota in neuropsychiatric disorders. *Acta neurobiologiae experimentalis*, *78*(2), 69–81.
- Hahn, J., Moritz, M., Voß, H., Pelczar, P., Huber, S., & Schlüter, H. (2021). Tissue Sampling and Homogenization in the Sub-Microliter Scale with a Nanosecond Infrared Laser (NIRL) for Mass Spectrometric Proteomics. *International journal of molecular sciences*, *22*(19), 10833. <https://doi.org/10.3390/ijms221910833>
- Hildebrandt G. (1888). Experimentelle Untersuchungen über das Eindringen pathogener Mikroorganismen von den Luftwegen und der Lunge aus. *Beitr Pathol Anat Physiol*. *1888*;3:411–50.
- Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, et al. (2010) Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. *PLOS ONE* *5*(1): e8578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>
- Hold, G. L., Pryde, S. E., Russell, V. J., Furrer, E., & Flint, H. J. (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS microbiology ecology*, *39*(1), 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00904.x>
- Huang, Y. J., Nariya, S., Harris, J. M., Lynch, S. V., Choy, D. F., Arron, J. R., & Boushey, H. (2015). The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *136*(4), 874–884. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.044>
- Jeong, J., Yun, K., Mun, S., Chung, W. H., Choi, S. Y., Nam, Y. D., Lim, M. Y., Hong, C. P., Park, C., Ahn, Y. J., & Han, K. (2021). The effect of taxonomic classification by full-length 16S

rRNA sequencing with a synthetic long-read technology. *Scientific reports*, 11(1), 1727. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80826-9>

Kim, J., & Ng, H. L. (2017). Screening and Identifying Membrane Proteins Favorable for Crystallization. *Current protocols in protein science*, 90, 29.19.1–29.19.10. <https://doi.org/10.1002/cpp.40>

Knapp, M., & Hofreiter, M. (2010). Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives. *Genes*, 1(2), 227–243. <https://doi.org/10.3390/genes1020227>

Kumar, P. S., Brooker, M. R., Dowd, S. E., & Camerlengo, T. (2011). Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PloS one*, 6(6), e20956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020956>

Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J. M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., Levenez, F., ... Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541–546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>

Lederberg, J., & Mccray, A. T. (2001). `Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15(7), 8.

Li, K. J., Chen, Z. L., Huang, Y., Zhang, R., Luan, X. Q., Lei, T. T., & Chen, L. (2019). Dysbiosis of lower respiratory tract microbiome are associated with inflammation and microbial function variety. *Respiratory research*, 20(1), 272. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1246-0>

Liu, Z., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., & Knight, R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic acids research*, 36(18), e120. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn491>

Marri, P. R., Stern, D. A., Wright, A. L., Billheimer, D., & Martinez, F. D. (2013). Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 131(2), 346–52.e523. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.11.013>

Ma, Y., Chen, H., Lan, C., & Ren, J. (2018). Help, hope and hype: ethical considerations of human microbiome research and applications. *Protein & cell*, 9(5), 404–415. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0537-4>

Mandyam, C. (2010). Capacity Building: Building Analytical Capacity For Microbial Food Safety. *Ensuring Global Food Safety* (1 ed). Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/staphylococcus>

Mikov M. (1994). The metabolism of drugs by the gut flora. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 19(3), 201–207. <https://doi.org/10.1007/BF03188922>

MP Biomedicals. (s.f.). Bead Beating Technology Explained. <https://www.mpbio.com/eu/bead-beating-technology-explained>

Mohr, J. L. (1952). Protozoa as Indicators of Pollution. *The Scientific Monthly*, 74(1), 7–9. <http://www.jstor.org/stable/20835>

Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, 5(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>

Nembrini, C., Sichelstiel, A., Kisielow, J., Kurrer, M., Kopf, M., & Marsland, B. J. (2011). Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax*, 66(9), 755–763. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.152512>

Miller, R. S., & Hoskins, L. C. (1981). Mucin degradation in human colon ecosystems. Fecal population densities of mucin-degrading bacteria estimated by a "most probable number" method. *Gastroenterology*, 81(4), 759–765.

Molyneaux, P. L., Cox, M. J., Willis-Owen, S. A., Mallia, P., Russell, K. E., Russell, A. M., Murphy, E., Johnston, S. L., Schwartz, D. A., Wells, A. U., Cookson, W. O., Maher, T. M., & Moffatt, M. F. (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>

Ohneck, E. J., Arivett, B. A., Fiester, S. E., Wood, C. R., Metz, M. L., Simeone, G. M., & Actis, L. A. (2018). Mucin acts as a nutrient source and a signal for the differential expression of genes coding for cellular processes and virulence factors in *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, 13(1), e0190599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190599>

Ortega, M. A., Alvarez-Mon, M. A., García-Montero, C., Fraile-Martinez, O., Guijarro, L. G., Lahera, G., Monserrat, J., Valls, P., Mora, F., Rodríguez-Jiménez, R., Quintero, J., & Álvarez-Mon, M. (2022). Gut Microbiota Metabolites in Major Depressive Disorder-Deep Insights into Their Pathophysiological Role and Potential Translational Applications. *Metabolites*, 12(1), 50. <https://doi.org/10.3390/metabo12010050>

Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734–740.

Park, S. C., & Won, S. (2018). Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using Mock Community. *Genomics & informatics*, 16(4), e24. <https://doi.org/10.5808/GI.2018.16.4.e24>

Proctor, Caleb & Ryan, Gabriella & Soldat, Shelby & Easparro, Brandon & Atwood, James & Nash, Rodney. (2019). Evaluating the Impact of Bead Media Diameter and Material Composition.

Peng, Y., Nie, Y., Yu, J., & Wong, C. C. (2021). Microbial Metabolites in Colorectal Cancer: Basic and Clinical Implications. *Metabolites*, 11(3), 159. <https://doi.org/10.3390/metabo11030159>

Pérez-Brocal, V., Magne, F., Ruiz-Ruiz, S., Ponce, C. A., Bustamante, R., Martin, V. S., Gutierrez, M., Gatti, G., Vargas, S. L., & Moya, A. (2020). Optimized DNA extraction and purification method for characterization of bacterial and fungal communities in lung tissue samples. *Scientific reports*, 10(1), 17377. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74137-2>

Salveti, E., Harris, H., Felis, G. E., & O'Toole, P. W. (2018). Comparative Genomics of the Genus *Lactobacillus* Reveals Robust Phylogroups That Provide the Basis for Reclassification. *Applied and environmental microbiology*, 84(17), e00993-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00993-18>

Segal, L. N., Rom, W. N., & Weiden, M. D. (2014). Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(1), 108–116. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201310-339FR>

Shen, Z., Xiao, Y., Kang, L., Ma, W., Shi, L., Zhang, L., Zhou, Z., Yang, J., Zhong, J., Yang, D., Guo, L., Zhang, G., Li, H., Xu, Y., Chen, M., Gao, Z., Wang, J., Ren, L., & Li, M. (2020). Genomic Diversity of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 713–720. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa203>

Singh, N., Vats, A., Sharma, A. *et al.* (2017). The development of lower respiratory tract microbiome in mice. *Microbiome* 5, 61. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0277-3>

Sommariva, M., Le Noci, V., Bianchi, F., Camelliti, S., Balsari, A., Tagliabue, E., & Sfondrini, L. (2020). The lung microbiota: role in maintaining pulmonary immune homeostasis and its implications in cancer development and therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(14), 2739–2749. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03452-8>

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., & Doré, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and environmental microbiology*, 65(11), 4799–4807. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999>

Tang, W. H., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., & Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine*, 368(17), 1575–1584. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109400>

Taha, T. E., Hoover, D. R., Dallabetta, G. A., Kumwenda, N. I., Mtimavalye, L. A., Yang, L. P., Liomba, G. N., Broadhead, R. L., Chipangwi, J. D., & Miotti, P. G. (1998). Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *AIDS (London, England)*, 12(13), 1699–1706. <https://doi.org/10.1097/00002030-199813000-00019>

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>

Van Nimwegen, F. A., Penders, J., Stobberingh, E. E., Postma, D. S., Koppelman, G. H., Kerkhof, M., Reijmerink, N. E., Dompeling, E., van den Brandt, P. A., Ferreira, I., Mommers, M., & Thijs, C. (2011). Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 128(5), 948–955.e553. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.07.027>

Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V., Knight, R., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2010). Metabolic syndrome and

altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* (New York, N.Y.), 328(5975), 228–231. <https://doi.org/10.1126/science.1179721>

Wexler H. M. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical microbiology reviews*, 20(4), 593–621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>

Wilson, K. H., & Blichington, R. B. (1996). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Applied and environmental microbiology*, 62(7), 2273–2278. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2273-2278.1996>

Wu, B. G., & Segal, L. N. (2017). Lung Microbiota and Its Impact on the Mucosal Immune Phenotype. *Microbiology spectrum*, 5(3), 10.1128/microbiolspec.BAD-0005-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0005-2016>

Yagi, K., Huffnagle, G. B., Lukacs, N. W., & Asai, N. (2021). The Lung Microbiome during Health and Disease. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10872. <https://doi.org/10.3390/ijms221910872>

Yun, Y., Srinivas, G., Kuenzel, S., Linnenbrink, M., Alnahas, S., Bruce, K. D., Steinhoff, U., Baines, J. F., & Schaible, U. E. (2014). Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. *PloS one*, 9(12), e113466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113466>