

INFORME FINAL

Título del proyecto: **“Nuevos Horizontes en medicina de precisión: Estudios de biomarcadores moleculares intestinales y sistémicos asociados a microvesículas en Enfermedad Inflamatoria Intestinal”**

DirectorA: **Fiorella Sabrina Belforte**

Investigadora Independiente CONICET

fiorellabelforte@gmail.com

Co-Director: **Dr. Marcos Todone.**

Investigadores colaboradores: **Dr. Alberto Penas Steinhardt.**

Lugar de trabajo para la investigación: **Hospital Nacional Prof. Alejandro Posadas, Lab. Genómica Computacional GEC-UNLu**

Periodo de Informe: 2022-2033

Sede: Carrera: Central, Medicina

I. ÍNDICE

RESUMEN	2
PALABRAS CLAVE	2
ABSTRACT	3
KEY WORDS	3
INTRODUCCIÓN	4
METODOLOGÍA	6
RESULTADOS	14
CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN	19
AGRADECIMIENTOS	20
BIBLIOGRAFÍA	21

II. RESUMEN

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) representan un trastorno crónico complejo, poligénico y de etiología desconocida. Se cree que podrían ser resultado de una respuesta desregulada del sistema inmune a la microbiota comensal. Con el fin de estudiar la comunicación inter-reino entre las células de nuestro organismo y de nuestro microbioma, nos propusimos aislar vesículas extracelulares (EVs), decodificar los mensajes que transportan e intentar encontrar en dichos mensajes biomarcadores que nos permitan establecer un seguimiento y pronóstico de la enfermedad. A tal fin, se aislaron EVs de dos matrices: Fracción Acelular de Materia Fecal (FAMF) y la Fracción Acelular de Sangre Periférica (FASP). Se probaron dos tipos de aislamientos, uno con kit comercial Total Exosome Isolation Kit (from serum) de Invitrogen y el otro con una secuencia de ultracentrifugación (UC) en colchón de sacarosa y filtrado. Se compararon las eficiencias de los distintos aislamientos por DLS, TEM y calidad/cantidad de RNA obtenido. Además se probaron distintas estrategias de extracción de RNA para aumentar el rendimiento y mejorar la calidad del mismo. La integridad del RNA se evaluó a través del equipo Fragment Analyzer, en el INTA Castelar. Comparando la calidad y cantidad de RNA obtenido de los aislamientos con kit y con UC no se observaron diferencias entre ambos métodos. El volumen de muestra inicial resultó no alterar la cantidad de RNA final obtenida. Se logró optimizar el aislamiento por UC de manera tal de llegar a obtener EVs en la FAMF de tamaños de alrededor de 400 nm, y en la FASP de 200 nm. Los mencionados resultados sientan una base experimental a partir de la cual continuar con los aislamientos individuales de las muestras de pacientes para el screening y posterior validación de biomarcadores moleculares asociados a EVs en población de pacientes con EII.

III. PALABRAS CLAVE

ENFERMEDADES-INFLAMATORIAS-INTESTINALES,
BIOMARCADORES-MOLECULARES, VESÍCULAS-EXTRACELULARES

IV. ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) represent a chronic, polygenic and complex disorder of unknown etiology. It is believed that they could be the result of a deregulated response of the immune system to commensal microbiota. To study cross-kingdom communication between the cells of our body and our microbiome, we set out to isolate extracellular vesicles (EVs), decode the messages they carry, and try to find biomarkers in these messages that allow us to establish monitoring and prognosis. of the illness. For this, EVs were isolated from two matrices: the Acellular Fraction of Fecal Matter (FAMF) and the Acellular Fraction of Peripheral Blood (FASP). Two types of isolates were tested, one with a commercial total exosome isolation kit (from serum) from Invitrogen and the other with an ultracentrifugation (UC) sequence on a sucrose cushion and filtration. The efficiencies of the different isolations were compared by DLS, TEM and quality/quantity of RNA obtained. Additionally, different RNA extraction strategies were tested to increase yield and improve quality. The integrity of the RNA was evaluated through the Fragment Analyzer equipment at INTA Castelar. Comparing the quality and quantity of RNA obtained from the isolates with the kit and with UC, no differences were observed between both methods. The initial sample volume did not alter the amount of final RNA obtained. It was possible to optimize the isolation by UC in such a way that EVs were obtained in the FAMF of sizes around 400 nm and in the FASP of 200 nm. The aforementioned results establish an experimental basis from which to continue with individual isolations from patient samples for the screening and subsequent validation of molecular biomarkers associated with VE in the population of IBD patients.

V. KEY WORDS

INFLAMMATORY-BOWEL-DISEASES, MOLECULAR-BIOMARKERS,
EXTRACELLULAR-VESICLES

VI. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) representan un trastorno crónico complejo, poligénico y de etiología desconocida, que comprende dos tipos principales: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) (Dotan et al. 2006). Se cree que la EII podría ser resultado de una respuesta desregulada del sistema inmune a la microbiota comensal en un huésped genéticamente susceptible, siendo en muchos casos una entidad subdiagnosticada. La misma puede identificarse luego de meses o años después de la primera aparición de los síntomas, requiriendo de gran cantidad de información clínica, serológica, radiológicas, endoscópica y pruebas histológicas para definir su pronóstico y tratamiento (Dotan et al. 2006; Iskandar and Ciorba 2012).

El intestino alberga un sofisticado ecosistema de comunidades microbianas (microbioma), ejerciendo funciones metabólicas vitales que contribuyen a la recuperación de nutrientes y energía de sustratos no digeribles. Asimismo, la colonización microbiana es esencial para el desarrollo normal del sistema inmune, regulando la homeostasis entre carga antigénica ambiental y respuesta inmune. Cambios en el microbioma puede dar lugar a patologías de desregulación inmunitaria, incluyendo las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (Dickson 2017; de Souza and Fiocchi 2016). A pesar del reconocido impacto del ambiente en el microbioma (Jostins et al. 2012) resulta importante destacar que la mayor parte de los trabajos publicados al momento se han realizado en poblaciones europeas y norteamericanas que difieren tanto en el background genético como en diversos factores ambientales con nuestra población. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce sobre el microbioma de pueblos sudamericanos (Clemente et al. 2015). En particular nuestro grupo de Genómica Computacional (<http://gec.unlu.edu.ar/>) es pionero en el estudio de microbiomas tanto en la población general de Buenos Aires como en diversas patologías complejas con componente inflamatorio, como ser las EII (Rosso et al. 2022)(Aguilera et al. 2022)(Mazzini et al. 2021)(Dei-Cas et al. 2020)(Belforte et al. 2019). Existe un consenso en diversas patologías complejas, que la comunicación intercelular entre el sistema inmune-órganos-microbioma juega un papel importante durante la cascada de eventos que conducen al fenotipo patológico. Es por ello que resultará de sumo interés realizar estudios meta-transcriptómicos, que permitan profundizar en la distribución poblacional a nivel especie y sus funciones metabólicas asociadas en nuestros pacientes con CU.

Por otro lado, existe un consenso en diversas patologías complejas, que la comunicación intercelular entre el sistema inmune-órganos-microbioma juega un papel importante durante la cascada de eventos que conducen al fenotipo patológico. Cada año son más los trabajos que sugieren que microvesículas extracelulares (MVs) circulantes de tamaño nanométrico, incluidos los

exosomas, desempeñan un papel fundamental en dicha comunicación especialmente en procesos inflamatorios y malignos(Whittle et al. 2018). Los exosomas son pequeñas vesículas de origen exocítico secretadas por la mayoría de los tipos de células, que contienen carga específica de proteínas, así como distintas especies de ácidos nucleicos, como mRNAs y microRNAs (miRNAs), que pueden modular comportamientos en células receptoras, pudiendo utilizarse como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades humanas(Pant, Hilton, and Burczynski 2012). En particular, los miRNAs desempeñan un papel crucial en los fenómenos mediados por exosomas, siendo capaces de modular la expresión génica a distancia(Gambim et al. 2007). En consecuencia, la distribución de miRNAs a través de exosomas circulantes podría representar un mecanismo clave de señalización de largo alcance durante procesos inflamatorios clínicos y subclínicos, ofreciendo oportunidades prometedoras para evaluar biomarcadores en forma mínimamente invasiva. Sin embargo, existen numerosos estudios que revelan la expresión diferencial de miRNAs asociados en EII tanto en muestras séricas, como en materia fecal y biopsia entérica (Ji et al. 2018; Lewis et al. 2017; Béres et al. 2016), pero poco se discute cuál es la muestra que mejor refleja estadios clínicos y preclínicos, o bien asociados a distintos tratamientos durante la evolución clínica de la patología, así como tampoco la presencia de otros ARNs no codificantes que podrían estar involucrados en el mecanismo de comunicación a distancia. En un estudio racional de pacientes con sepsis, se buscaron por RNA-Seq y PCR cuantitativa (qPCR) diferencias en los perfiles de miRNAs en suero, exosomas séricos y células sanguíneas. Mientras que los exosomas y el suero comparten un número significativo de miRNAs, hubo muy poco solapamiento entre los perfiles de miRNAs de muestras celulares y extracelulares (suero y exosomas) (Reithmair et al. 2017). Esto indica la necesidad de un análisis cuidadoso de ambos compartimentos sanguíneos tanto para la búsqueda de biomarcadores como para la comprensión de mecanismos de comunicación a distancia.

Así mismo, se identificaron recientemente ARN circulares (circRNAs) como una familia de ARNs no codificantes capaces de regular la expresión génica en mamíferos(Hansen, Clausen, and Jensen 1962). El desarrollo de la secuenciación profunda de última generación de bibliotecas de ARN depletadas de ARN ribosomal, asociadas con nuevas herramientas bioinformáticas, ha proporcionado la identificación de varios circRNA nuevos en todo tipo de organismos. Recientemente, se descubrió que los circRNA endógenos pueden unirse y funcionar como esponjas de miRNAs reprimiendo su función, lo que proporciona un nuevo modelo de acción para esta clase de ncRNAs, además de indicar otro mecanismo que regula la actividad de los miRNAs. Varios estudios han asociado circRNAs con enfermedades humanas, como osteoartritis, diabetes, patologías neurodegenerativas y varios tipos de cáncer. Además, la alta estabilidad, la abundancia y

los patrones de expresión tejido específicos hacen que los circRNA sean muy atractivos para la investigación clínica (Kulcheski, Christoff, and Margis 2016). En este escenario, dada la evidencia actual sobre la interacción entre los circRNAs-miRNAs se abre un nuevo enfoque para el estudio de patologías complejas con componente inflamatorio. Es por ello que resulta interesante analizar si los circRNAs representan potenciales biomarcadores para diferenciar fenotipos de manera temprana, determinar pronóstico, así como contribuir en dilucidar qué rol cumplen en la comunicación inter-reino durante el desarrollo de EII.

VII. METODOLOGÍA

a) Definición operacional de las variables y categorías.

* Indicadores a analizar en la población de estudio:

Edad (en años)

Género (masculino/femenino)

Talla (en metros)

Peso (en kg)

Características del hábitat: zona (rural o urbana), presencia de agua potable (sí/no), descripción de los materiales de la vivienda.

Tabaquismo (sí/no, frecuencia de consumo)

Consumo de alcohol (sí/no, frecuencia de consumo)

Laboratorio completo de Análisis Clínicos

Medicación: consumo de medicamentos (sí/no), tipo de medicación, inicio de consumo de medicamentos (sí/no), consumo de hipnóticos (sí/no), consumo de ansiolíticos (sí/no), consumo de medicación psiquiátrica (sí/no), consumo de medicamentos alternativos, hierbas medicinales, homeopatía (sí/no).

Actividad física (frecuencia diaria/semanal)

Dieta: frecuencia de consumo de leche y sus derivados, huevo, pan y sus derivados, legumbres, verduras cocidas/crudas, frutas cocidas/crudas, carnes blancas/rojas, fiambres/embutidos, azúcar, mermeladas, miel, snacks, enlatados, etc.

* Indicadores a analizar de los datos Transcriptómicos de Población:

A partir de la secuenciación de última generación de muestras de ARN obtenidas de sueros, plasmas y heces de recolección domiciliaria, se procederá al screening de potenciales marcadores moleculares asociados a inflamación, obteniendo datos de niveles de expresión de diferentes tipos

de ARN no codificantes (ncRNAs) humanos, así como la presencia de ARNs no humanos que pudieran aportar el microbioma de los individuos.

Se evaluará la presencia de disbiosis intestinal asociada EII asociada a cambios transcriptómicos intestinales y sistémicos, y potenciales efectos benéficos de intervenciones nutricionales como pro y prebióticos específicos para nuestra población.

* Indicadores a analizar para la Validación de Biomarcadores:

Se evaluarán los Valores Predictivos Positivo (VPP) y Negativo (VPN) de cada biomarcador encontrado, los cuales nos darán una mayor información sobre la capacidad de los ncRNAs como biomarcadores de las EII. Dichos valores surgirán del análisis poblacional de los marcadores en diferentes contextos clínicos mediante estrategia de Stem Loop- RT-QPCR.

b) Descripción del ámbito de estudio.

Se plantea dilucidar cambios en el transcriptoma asociado a exosomas circulantes y del contexto intestinal de los individuos participantes (casos y controles), pertenecientes a la región metropolitana de Buenos Aires. Se espera a su vez correlacionar dichos cambios con datos metagenómicos obtenidos previamente en la población estudiada, así como datos fenotípicos (estadío de la patología) y factores ambientales que caracterizan a los distintos grupos de estudio propuestos.

c) Tipo de estudio y diseño.

Se trata de un estudio transversal de tipo caso-control, que por un lado intenta dilucidar mecanismos moleculares de comunicación inter-reino asociados a EII, y por otro definir nuevos biomarcadores potentes para diferenciar fenotipos y eficacia de tratamientos.

d) Población:

● Universo o población objetivo:

El presente proyecto involucra un estudio transversal de tipo caso-control. Se incorporarán a tal fin, individuos mayores de 18 años de edad, asistentes al Servicio de Gastroenterología del Hospital Posadas. Todos los participantes firmarán el consentimiento informado por escrito aprobado por el Comité de Ética del Hospital Posadas y la Universidad Nacional de Luján (de acuerdo a los principios bioéticos de la Declaración de Helsinki).

- Unidad de análisis, criterios de inclusión y exclusión:

Selección de individuos del Grupo Control: Individuos voluntarios sanos, normopeso, sin historia de enfermedades inflamatorias asistentes al Servicio de Gastroenterología, pudiendo tratarse de familiares, amigos o convivientes con el paciente del servicio que deseen participar el proyecto.

Selección de Casos de EII (grupos CU y EC): Contemplando algoritmo diagnóstico/terapéutico se establecerán los siguientes grupos de estudio:

Grupo 1: Casos de CU con tratamiento convencional (Sulfasalazina-Mesalazina)

Grupo 2: Casos de CU con tratamiento convencional más biológicos (anti-TNF, anti-Integrina)

Grupo 3: Casos de EC con tratamiento convencional (Sulfasalazina-Mesalazina)

Grupo 4: Casos de EC con tratamiento convencional más biológicos (anti-TNF, anti-Integrina)

Criterio de exclusión de individuos participantes: Haber recibido terapia con antibióticos en el último mes, dietas extremas (ej. macrobióticos, veganos), actual consumo regular de Probióticos, intervención quirúrgica en el tracto gastrointestinal (gastrectomía, cirugía bariátrica, colostomía), embarazo, neoplasia, pacientes en terapia de reemplazo renal, trasplantados e HIV.

- Población accesible. Muestra. Selección y tamaño de la muestra. Análisis de sesgos.

Con el fin de obtener información de los posibles biomarcadores a nivel sistémico e intestinal de controles y enfermos se estudiarán tres tipos de muestras: suero, plasma y fracción acelular de material fecal.

SUERO: Obtenido a partir de sangre extraída por el equipo médico a los voluntarios que participan del proyecto, a través de la centrifugación de la misma en tubos sin anticoagulante.

PLASMA: Obtenida a partir de sangre entera extraída en tubos con EDTA 5% y posteriormente centrifugada.

FRACCIÓN ACELULAR DE MATERIA FECAL (FAMF): A los pacientes que participan del proyecto se les dará un frasco estéril de boca ancha, el cual llevarán a su domicilio con buffer hipersalino DESS [34]. Allí deberán recolectar materia fecal (tamaño similar al de un maní, equivalente a 5 g aproximadamente). Una vez en el laboratorio, las muestras se fraccionarán y centrifugarán a baja velocidad (100 G durante 15 min), de manera de eliminar restos macroscópicos de alimentos de la muestra, recuperando el sobrenadante en un nuevo tubo. Los sobrenadantes se centrifugarán a mayor velocidad (8000 G durante 5 min) para pelletear las células en suspensión. Este último sobrenadante, carente de células, es el que se utilizará para aislar las vesículas extracelulares.

Para el cálculo de la potencia muestral se realizó la prueba de Dirichlet-multinomial[24]. Usando un nivel de significación del 5%, un número de “reads” por sujeto igual a 200.000 y un tamaño de muestral $n > 25$ por grupo, el resultado otorgaría un poder estadístico mayor al 90%. Por lo tanto, se estudiará un total de 30 individuos en cada grupo.

La capacidad de los biomarcadores encontrados para efectuar un diagnóstico potencial se probará utilizando el análisis de curvas Características Operativas del Receptor (ROC, por sus siglas en inglés: Receiver Operating Characteristic curve) definido por el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés: Area Under the Curve) [43]. Un gráfico de curva ROC ilustra la sensibilidad y especificidad de cada uno de los posibles puntos de corte de un test diagnóstico, que en nuestro caso sería la concentración de cada biomarcador, cuya escala de medición es continua. La capacidad discriminativa de un test diagnóstico se refiere a su habilidad para distinguir pacientes sanos versus enfermos. Para ello, el parámetro a estimar es el AUC, medida única e independiente de la prevalencia de la enfermedad en estudio. El AUC refleja qué tan bueno es el test para discriminar pacientes con y sin la enfermedad a lo largo de todo el rango de puntos de corte posibles [44].

Además se analizarán el los Valores Predictivos Positivo (VPP) y Negativo (VPN) de cada biomarcador encontrado, los cuales nos darán una mayor información sobre la capacidad de los ncRNAs como biomarcadores de las EII. En este sentido nos permitirán determinar la probabilidad de que un paciente sea definido como enfermo (E+) si la expresión del ncRNA supera un umbral (T+ o el test es positivo), o bien que haya ausencia de patología (E-) si no lo supera (E- o el test es negativo [44].

e) Selección de técnica e instrumento de recolección de datos. Fuentes primarias y secundarias. Prueba piloto del instrumento.

*** Puesta a punto de dos técnicas de aislamiento de EVs: Ultracentrifugación y Extracción con kit comercial**

De manera de aumentar el rendimiento de obtención de EVs, se realizarán pools de 5 muestras cada uno de los tres tipos de muestras antes citados (Tabla 1). A su vez, para poder realizar posteriores análisis estadísticos en la estrategia de cribado de ncRNAs (Total RNAseq), se estudiarán 3 pools por fenotipo a evaluar (controles, CU y CD).

Tabla 1. Pools de muestras para aislamiento de EVs

	Suero	Plasma	FAMF
Controles	Pool 1	Pool 1	Pool 1
	Pool 2	Pool 2	Pool 2
	Pool 3	Pool 3	Pool 3
CU	Pool 1	Pool 1	Pool 1
	Pool 2	Pool 2	Pool 2
	Pool 3	Pool 3	Pool 3
CD	Pool 1	Pool 1	Pool 1
	Pool 2	Pool 2	Pool 2
	Pool 3	Pool 3	Pool 3

El aislamiento se realizará mediante un protocolo de ultracentrifugación [35] y otro con un kit comercial “*Total exosome isolation kit*” (Invitrogen), para comparar rendimiento y calidad de las muestras obtenidas [36].

Se obtendrá ARN total de exosomas aislados con el reactivo TRIZOL (Thermo Fisher Scientific) según especificaciones del fabricante. El ARN total se cuantificará mediante espectrofotometría en un equipo NanoDrop ND-1000 y la integridad del ARN se evaluará en el equipo Fragment Analyzer.

* **Caracterización de los distintos tipos de EVs**

Para identificar y caracterizar los distintos tipos de EVs se utilizan los siguientes métodos:

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés): En el TEM, una imagen se crea por interferencia de electrones cuando el haz de electrones atraviesa la muestra. Dado que la longitud de onda del haz de electrones es más corta que la longitud de onda de la luz visible en tres órdenes de magnitud, las imágenes se registran con una resolución de 1 nm [37]. Es un método ampliamente utilizado por su capacidad para detectar y caracterizar una única vesícula extracelular.

Western Blot: A través de este ensayo inmunológico caracterizaremos la presencia de exosomas en las muestras extraídas. Los exosomas por ser formados en el cuerpo multivesicular no llevan en su membrana marcadores de origen celular, aunque en cambio presentan tetraspaninas (CD63, CD9, CD81, etc.) en su composición, lo que es utilizado como marcador general de este subtipo de EVs. Utilizaremos anticuerpos primarios para visualizar dichas moléculas de superficie.

Dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés): También conocida como espectroscopia de correlación de fotones, es una herramienta alternativa para la caracterización basada en el tamaño de las EVs. El DLS utiliza el principio de dispersión de la luz. El tamaño de las partículas se determina midiendo los cambios aleatorios (resultantes de los movimientos brownianos relativos de las partículas) en la intensidad de la luz dispersa de la suspensión de la

muestra. Es un método simple para medir el tamaño sin visualizar las partículas. El mérito de este método radica en su capacidad para medir el tamaño de partículas que van desde 1 nm a 6 μm [37].

*** RNA-Seq de EVs: cribado y determinación de la expresión diferencial de ncRNAs**

Las muestras de ARN se depletarán de ARN ribosomal (ARNr) previo a la secuenciación a realizarse según Illumina-TruSeqRNA para secuenciarse en Illumina HiSeq 120(pb). El recorte de las lecturas de baja calidad y la des-multiplexación se realizará utilizando Trimmomatic v0.32 antes de mapearse al genoma humano hg38 utilizando BWA-MEM [38]. La expresión diferencial entre dos condiciones (Controles vs EII) se determinará mediante el paquete de R edgeR [39].

*** Validación de ncRNAs target identificados mediante RT-qPCR**

Una vez identificados los posibles targets moleculares (ncRNAs) se procederá a diseñar primers específicos para poder cuantificar cada uno de ellos en muestras individuales de pacientes y controles. Se extraerá ARN de muestras de EVs de 10 individuos de cada grupo de estudio con el reactivo TRIZOL (Thermo Fisher Scientific) . Luego se procederá a realizar la retrotranscripción de los circRNAs para la cual se utilizaran Random Primers y la enzima transcriptasa inversa MMLV (Promega). Una vez generado el ADN copia (cDNA), la cuantificación de los ncRNAs se realizará por PCR en Tiempo Real o qPCR en el equipo “StepOnePlus Real-Time PCR Systems” de Applied Biosystems. Se procederá a la cuantificación absoluta mediante curva estándar generada a partir de plásmidos sintéticos conteniendo idéntica secuencia del ncRNA de interés. Se utilizará para la misma la “SYBR™ Select Master Mix” también de Applied Biosystems la cual contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación de las moléculas de interés y para su cuantificación. Para el análisis estadístico de los datos, así como también para la realización de los gráficos respectivos se utilizará el programa GraphPad Prism 6.01. Los datos de expresión se analizarán con un ANOVA en caso de distribuirse normalmente o mediante pruebas no paramétricas tales como U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis en caso de no hacerlo en caso de no hacerlo. El valor $P \leq 0.05$ se considerará significativo.

*** Identificación de circRNAs y sus potenciales miRNAs target**

Con el fin de identificar circRNAs diferencialmente expresados mediante estrategia de cribado (Total RNA-Seq) se estudiarán los ncRNAs evidenciados mediante el algoritmo CIRI [40], esta herramienta permite identificar circRNAs candidatos y su filtrado. La expresión diferencial entre dos condiciones (Controles vs EII) se determinará mediante el paquete de R edgeR [40] [39,40]. Las interacciones entre circRNAs-miRNAs serán evaluadas con el algoritmo miRanda [41] que permite buscar alineaciones de complementariedad máximas locales (dúplex antiparalelo doble cadena).

*** Validación de miRNAs target identificados bioinformáticamente mediante StemLoop-RTqPCR**

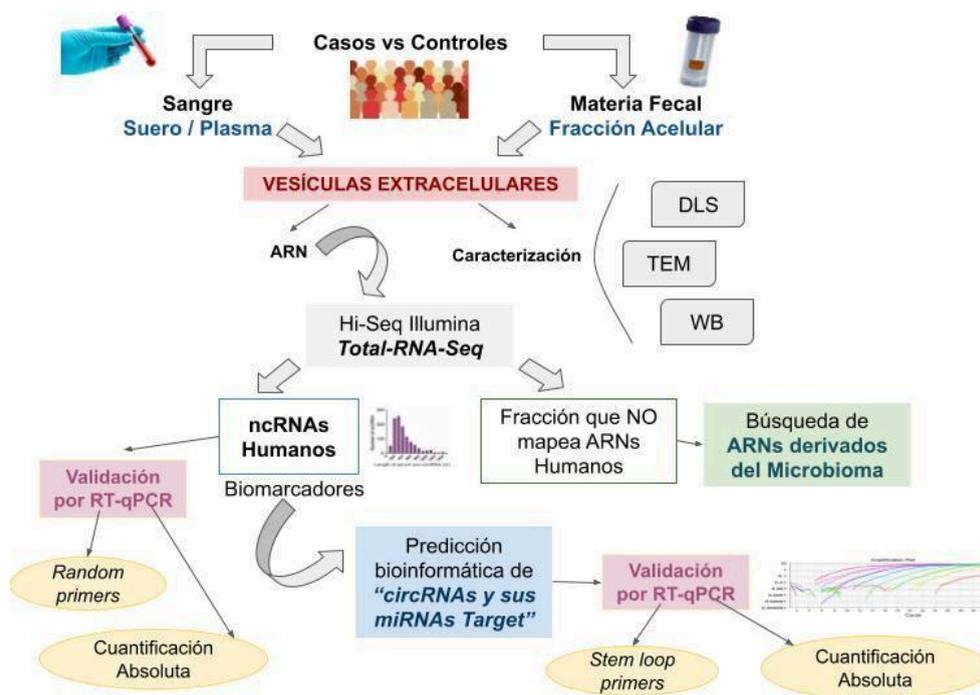
Se validará la predicción bioinformática de miRNAs Target mediante estrategia “StemLoop-RTqPCR” también a partir de ARN extraído de vesículas extracelulares de 10 muestras de cada grupo de individuos participantes, utilizando un ciclador StepOne de Applied BioSystems. Los miRNA de interés serán retro-transcriptos mediante la utilización de primers sintéticos stem-loop [42] y transcriptasa inversa MMLV (Promega). Se diseñarán primers específicos para determinar niveles de cDNA por qPCR utilizando el sistema SyberSellect MasterMix®. Se procederá a la cuantificación absoluta mediante curva estándar generada a partir de plásmidos sintéticos conteniendo idéntica secuencia a la del miRNA maduro de interés. Para el análisis estadístico de los datos, así como también para la realización de los gráficos respectivos se utilizará el programa GraphPad Prism 6.01. Los datos de expresión de miRNA se analizarán con un ANOVA en caso de distribuirse normalmente o mediante pruebas no paramétricas tales como U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis en caso de no hacerlo. El valor $P \leq 0.05$ se considerará significativo.

*** Búsqueda de ARNs de origen microbiano**

Teniendo en cuenta que en la fracción de EVs aislados, es posible encontrar microvesículas procariotas, las lecturas de Total RNA-Seq que no se encuentren en la versión hg38 del genoma humano, serán mapeadas y ensambladas mediante la plataforma Trinity [45]. Este ensamblaje permitirá identificar tanto genes candidatos no humanos que se expresaron de manera diferencial entre pacientes con EII y controles (edgeR), como la identificación taxonómica de cada transcripto ensamblado utilizando el algoritmo clasificador Krakeno [46].

f) Plan de análisis de los resultados.

En la figura a continuación se esquematiza el plan de trabajo y análisis de los resultados.



g) Plan de entrada al terreno o ámbito de investigación.

En el presente trabajo nos proponemos identificar y caracterizar nuevos biomarcadores moleculares Sistémicos e Intestinales de Enfermedades Inflammatorias Intestinales (EI), con el fin de desarrollar estrategias diagnósticas, pronósticas y de seguimiento innovadoras para este complejo conjunto de patologías de creciente detección en nuestro país. En este sentido resulta fundamental realizar una caracterización de nuestra población vinculada a biomoléculas asociadas a exosomas sanguíneos y fecales, entre las que se encuentran los ARNs no codificantes, los cuales presentan un gran potencial teragnóstico especialmente en procesos inflamatorios y malignos. Asimismo, la evidencia actual sobre la interacción entre los miRNAs y la microbiota humana, abre un nuevo enfoque para el estudio de comunicación inter-reino en éstas entidades. Es por ello que analizaremos si los miRNAs y circ-RNAs representan potenciales biomarcadores para diferenciar fenotipos de manera temprana, determinar pronóstico en familiares relacionados, y contribuir en dilucidar qué rol cumplen las alteraciones epigenéticas en el desarrollo y el curso de EII. Es por ello que resultará de gran utilidad el establecimiento de potenciales terapias nutricionales y farmacológicas personalizadas, en base a la información del transcriptoma del individuo, área que tiene grandes perspectivas en el tratamiento de EII y enfermedades relacionadas.

VIII. RESULTADOS

Resulta trascendente considerar que desde su reciente formación los desafíos del grupo se han incrementado exponencialmente. Paradójicamente, la consolidación del Grupo de Genómica Computacional (<http://gec.unlu.edu.ar/>) durante la pandemia se vio fortalecida, dado que pudimos sortear el aislamiento presencial y aprovechar la virtualidad para potenciar nuestras capacidades individuales y grupales, promoviendo la transferencia de conocimiento y generando redes interdisciplinarias de trabajo. El GeC se conforma por investigadores tanto del Departamento de Ciencias Básicas de la UNLu como del Lab. de Inmunología del INEDES (Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable CONICET-UNLU). En nuestros proyectos nos centramos en estudiar la capacidad biotransformadora que el microbioma puede tener tanto en la salud, el ambiente y hasta en las características fisicoquímicas de materiales utilizados en entornos productivos. Así mismo, considerando a los microbiomas como ecosistemas dinámicos de cientos a miles de miembros comunicándose entre sí, estudiar la dinámica de expresión de ARNs no codificantes en microvesículas de distintos entornos biológicos, propone definir estrategias diagnósticas personalizadas, así como traer luz a mecanismos de interacción microbiota-hospedador en un contexto inter-reino. Si bien nuestro grupo de reciente formación abarca iniciativas nuevas dentro de la Universidad de Luján, hemos logrado mucho apoyo tanto institucional como de financiamiento externo, lo que nos anima a seguir en esta línea de investigación en biomedicina. Como todo protocolo que utiliza muestras de voluntarios humanos, éste proyecto implica trabajo interdisciplinario, definición de criterios de recolección de datos, muestreo y logística que suelen ser tareas que llevan tiempos prolongados. Aún así, llevamos reclutados 600 individuos de la ciudad de Chivilcoy, 200 individuos en el Hospital Nacional Posadas, 100 individuos de población general de CABA, así como cohortes de diferentes proyectos en colaboración. Esto aporta un muy buen escenario para las perspectivas de los proyectos del GeC y de aquellos que tenemos en colaboración. Dicho trabajo consolida cooperación entre grupos del ámbito hospitalario con investigadores de las ciencias básicas, lo que aporta no sólo un marco bidireccional de generación de conocimiento, sino un espacio de implementación de los hallazgos resultantes para optimizar el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de patologías crónicas de gran impacto en salud pública. En cuanto al logro de los objetivos particulares, hemos publicado recientemente un trabajo vinculado a pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en población argentina y su abordaje desde una perspectiva integral de diagnóstico, contemplando datos clínicos, bioquímicos, epigenéticos y metagenómicos en un contexto de regresión logística (AD Rosso et al, *Microorganisms* 2022).

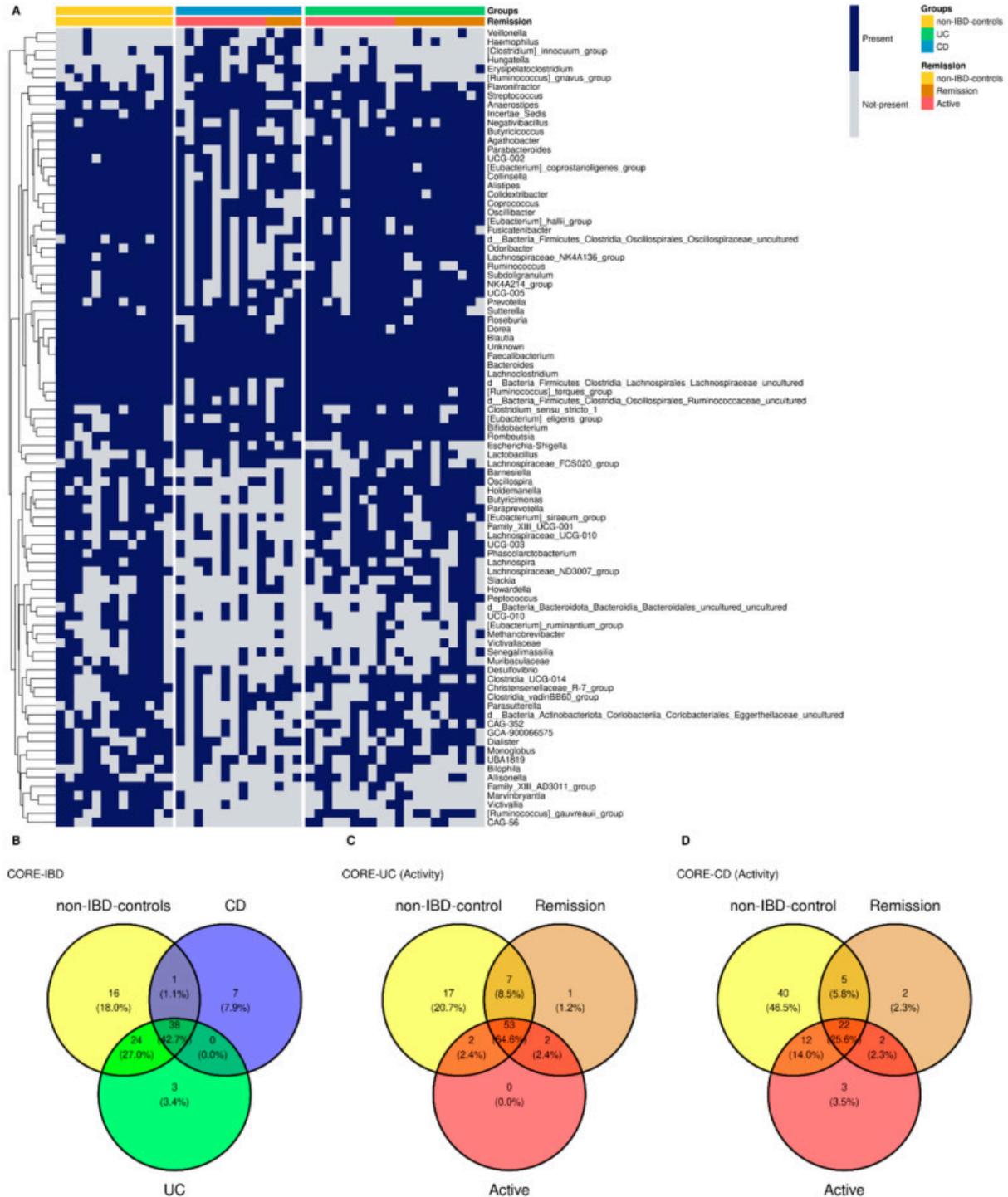


Figura 1. Representación de géneros diferenciales tanto en microbiota total (A) como en la microbiota “core” (B,C,D) de los diferentes grupos estudiados con EII, del inglés IBD o Inflammatory Bowel Disease (Microorganisms 2022).

Así mismo hemos publicado los dos primeros estudios en Buenos Aires vinculados a microbiota de población general tanto en pre pandemia (FS Belforte et al, *Frontiers in Microbiology* 2019) como durante el aislamiento social preventivo y obligatorio (P Aguilera et al, *Frontiers in Microbiology* 2022).

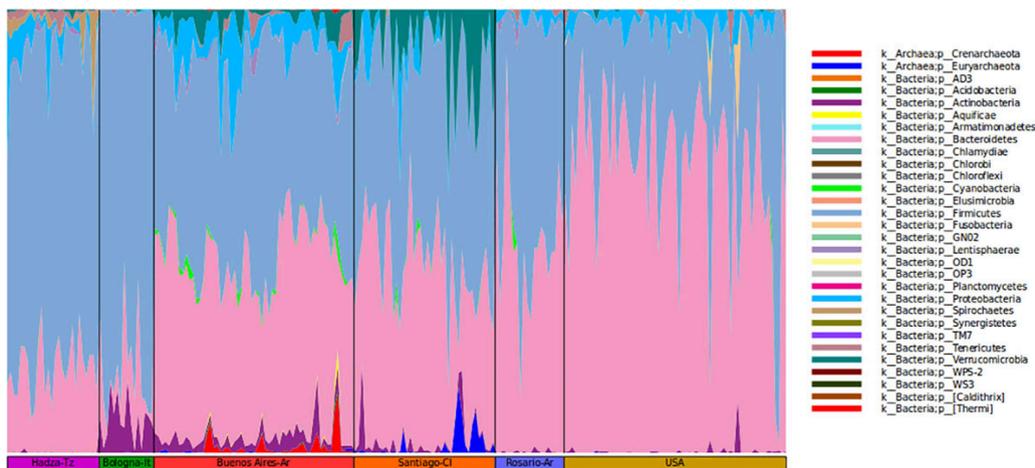


Figura 2 (izquierda). Abundancia relativa de géneros representativos de microbiota intestinal de diferentes poblaciones a nivel local y mundial (*Frontiers in Microbiology* 2019).

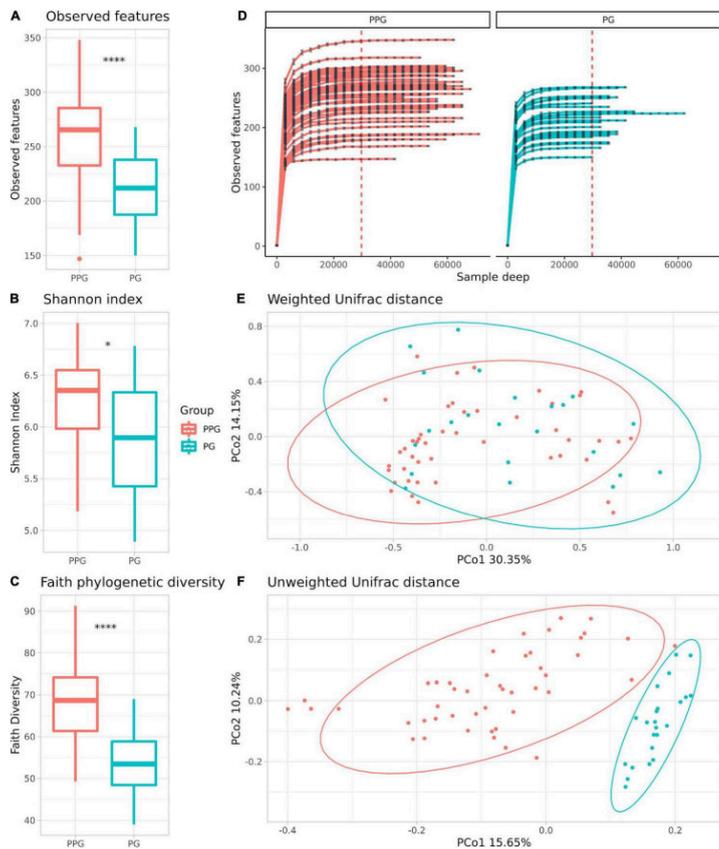


Figura 3 (derecha). Comparación de las comunidades microbianas de los grupos PPG (grupo pre-pandémico) y PG (grupo pandémico). Medidas de diversidad alfa: características observadas (A), índice de Shannon en una escala logarítmica de base 2 (B) y diversidad filogenética de fe (C). * $p = 0,026$; *** $p < 0.001$. Curvas de rarefacción de las muestras del PPG y PG (D). El eje x representa el número de secuencias muestreadas, mientras que el eje y representa una medida de

la riqueza de especies detectadas (número estimado de características observadas). La línea punteada vertical roja representa la profundidad de rarefacción elegida (muestra con la menor cantidad de secuencias). Gráficas PCoA de diversidad beta con distancias UniFrac ponderadas (E) y no ponderadas (F), respectivamente. Las elipses representan el intervalo de confianza del 95% de cada grupo. Los colores se asignan por grupo, rojo para PPG y azul para PG. (Frontiers in Microbiology 2022).

Adicionalmente, fuimos incorporados a la red **LatinBiota** (<https://www.latinbiota.net/>), que mostrará sus resultados en una próxima publicación durante 2023 de metagenomas estudiados de latinoamericanos (estrategia shotgun-seq). El GeC es actual nodo argentino del Latinbiota, convirtiéndose en 2021 en el 2do país (luego de México) con mayor número de muestras aportadas al proyecto (100 muestras estudiadas argentinas). En particular, LatinBiota es un proyecto impulsado por el Sanger Institute UK, y puesto en marcha por el Dr. Iraola, Director del Laboratorio de Genómica Microbiana del Institut Pasteur de Montevideo, quién colabora activamente en nuestros proyectos de investigación en microbioma humano.

En lo que respecta a las muestras obtenidas, fue posible la generación de un bio-banco de sueros, plasmas, sangre entera, células mononucleares y materia fecal, así como también de material extraído de las mismas (ADN, ARN, proteínas y microvesículas). Esto propició la generación de datos masivos clínicos, bioquímicos y serológicos, así como datos masivos de secuenciación de última generación de microbiota intestinal asociada a diferentes cohortes propias y en colaboración (EII: Dra. Cerezo, Hospital Posadas y Dra. Mariño IBYME; Lupus Eritematoso Sistémico: Dra. Caputo, Hospital Posadas, Psoriasis: Dr. Dei Cas, grupo Novartis; Obesidad y Cirugía Bariátrica: Dra. Gut, Hospital Italiano BsAs y Dr. Federico Rey, University of Wisconsin–Madison; Hígado Graso No Alcohólico: Dra. Trinks, ICBME). Asimismo, se están generando datos vinculados a ARNs no codificantes tanto libres como asociados a exosomas, potencialmente relacionados a distintos estadios patológicos en los distintos grupos en estudio.

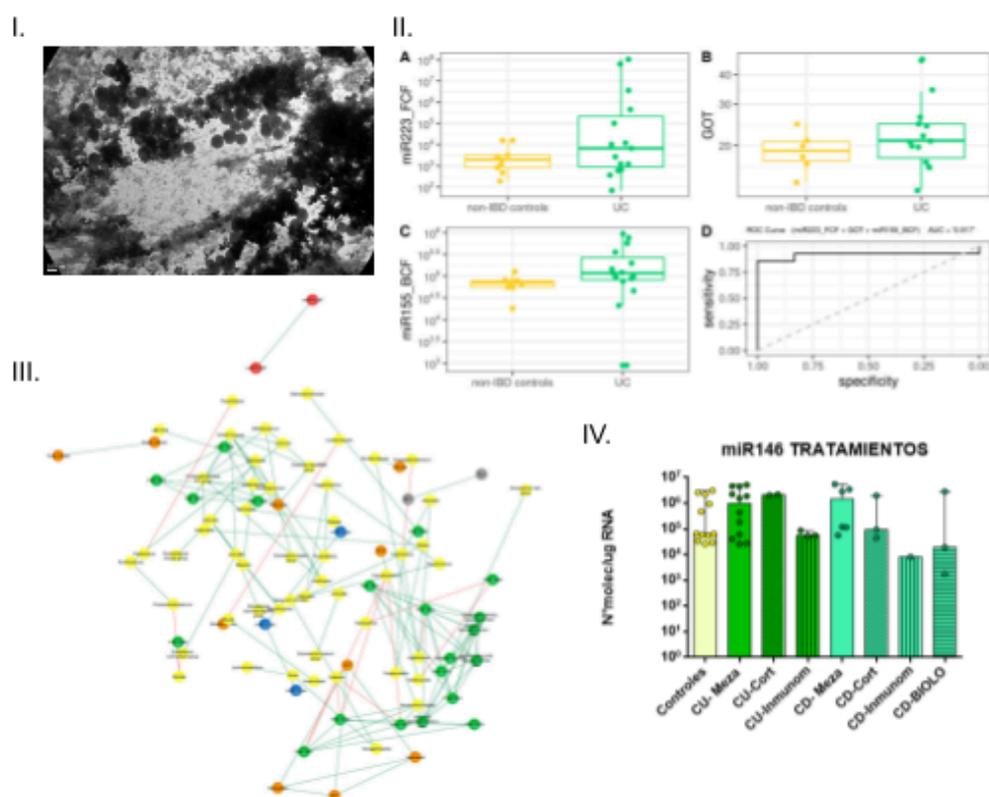


Figura 4. I. Fotografía de exosomas séricos humanos, obtenida por microscopía electrónica de transmisión (TEM). II. Box Plots representativos de un Modelo Bioquímico de predicción fenotípica en base a datos clínicos, bioquímicos y epigenéticos. Valores de las variables presentes en pacientes con CU en comparación con controles sin EII (A-C). Rendimiento del modelo bioquímico, evaluado a través del área bajo la curva ROC (D). III. Red de Correlación para CU. Características clínicas, edad, IMC (nodos grises), mediciones bioquímicas (nodos naranjas), microbiota central y taxones bacterianos diferencialmente abundantes (nodos amarillos), vías metabólicas diferencialmente abundantes estadísticamente significativas ($p < 0,05$; nodos verdes) y miRNAs sanguíneos (nodos azules) y miRNAs fecales (nodos rojos) de los pacientes con CU. Solo se muestran las correlaciones con coeficientes de correlación de Spearman superiores a 0,7. Los bordes verdes representan correlaciones positivas. Los bordes rojos representan correlaciones negativas. Las variables del modelo de regresión logística de pacientes con CU se indican en letra roja. IV. Evaluación del miR146a fecal en población de CU y CD sometidos a distintos tratamientos, respecto de controles de nuestra comunidad.

Por otra parte, cabe destacar que nuestro grupo fue pionero en nuestra región en estudiar y comparar diversos métodos de obtención, traslado y conservación de las muestras de materia fecal humana, así como distintos protocolos de extracción de ADN genómico microbial para el posterior estudio metagenómico (Belforte et al 2019). Así mismo, se han estudiado datos masivos de 16S ribosomal así como de DNA-Shotgun Sequencing (Illumina) de diferentes grupos de estudio. Esto fue posible gracias a la cooperación con el Centro de Investigación, Docencia y Extensión en Tecnologías de la Información y la Comunicación CIDETIC- UNLu (cidetic.unlu.edu.ar/). Los datos de secuenciación masiva son procesados en el CIDETIC con *servidores* propios multi core dedicados al procesamiento de grandes volúmenes de datos y a la resolución de problemas complejos.

Parte de los resultados metagenómicos obtenidos en el GeC fueron presentados en el congreso de la Asociación Latinoamericana de Microbiología: ALAM Chile 2018, en el *24th World Congress of Dermatology Milan 2019* y otros se enviaron para su presentación a varias reuniones conjuntas de Biociencias de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).

IX. CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

La epidemiología mundial de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) está cambiando rápidamente con el aumento de la incidencia y la prevalencia de la enfermedad en las regiones en desarrollo. Sriharan Selvaratnam et al. realizó una revisión sistemática entre enero de 1990 y diciembre de 2018 de la carga de EII en América del Sur y su rápido aumento, particularmente en las regiones industrializadas (Selvaratnam et al. 2019). Demostraron que existe una escasez de estudios epidemiológicos sólidos y representativos para explorar los factores de riesgo modificables y los fenotipos de enfermedades en nuestra región. Teniendo en cuenta que el continente sudamericano alberga a más de 400 millones de personas, se espera que represente una proporción significativa de los afectados por EII en el mundo. Esto se traduce en un notable desafío diagnóstico, especialmente en países subdesarrollados donde el acceso al diagnóstico o tratamiento no siempre es accesible para enfermedades crónicas.

En éste contexto, la investigación inmunológica ha evolucionado desde un punto de vista linfoide-tejido-céntrica para la comprensión de microambientes tisulares como una determinante fundamental de la respuesta inmune. Esta área de investigación ha dado lugar a la integración de la microbiota como regulador intrínseco de todas las respuestas inmunes. En la actualidad existe una explosión de descubrimientos relacionados con el papel de las comunidades microbianas y los estados de enfermedad en los seres humanos. Esto proporciona una oportunidad única para desarrollar una exploración integral de la salud humana desde una lógica multidisciplinar de

investigación. En este sentido, resulta fundamental propiciar descubrimientos vinculados a la definición de biomarcadores moleculares y metagenómicos aún no caracterizados en distintas poblaciones de nuestra región, que permitan definir estrategias terapéuticas eficaces para la restauración de un diálogo saludable entre huésped y ambiente, y así restablecer la salud del meta-organismo humano.

En la actualidad, se sabe que el entorno medio ambiental juega un rol clave en el desarrollo y sostenimiento de enfermedades de origen complejo y multifactorial. Es por ello que nos proponemos estudiar el meta-transcriptoma de nuestra población tanto en individuos control como en pacientes con CU, con estrategias secuenciación masiva (NGS). Esto contribuirá no sólo a la caracterización general de nuestro microbioma, datos aún poco explorados en nuestra región, sino también a identificar cambios en el transcriptoma asociados al proceso inflamatorio subyacente. Eso resulta sumamente valioso dado que aportaría datos correlacionables con los niveles de expresión de ARNs no codificantes (ncRNAs) tanto humanos como microbianos, así como de mensajeros clave asociados a la modulación del glioma intestinal. Así mismo, conocer los cambios en el perfil de glicosilación de IgAs del contexto intestinal, no sólo permitiría identificar potenciales biomarcadores de progresión y respuesta a tratamiento sino también dará luz a posibles mecanismos de comunicación inter-reino involucrados en la patogénesis de CU.

En este escenario, la utilización de estrategias ómicas de nueva generación proporcionan una oportunidad única de estudiar de manera integral el meta-organismo humano, donde conviven células de nuestro organismo con simbiontes comensales capaces de modular muchas de nuestras funciones vitales.

X. AGRADECIMIENTOS

Cabe destacar que nuestros proyectos vinculados a EII fueron beneficiados tanto por la Sociedad Argentina de Gastroenterología (SAGE) como por la Fundación Florencio Fiorini en auspicio de la Asociación Médica Argentina (AMA), así como recibió financiamiento del Dto. de Cs. Básicas de la UNLu, de un PICT-joven 2017 y de un PICT-grupo en formación tramo I 2019 y tramo II 2022. Por otra parte, cabe destacar que nuestro grupo fue pionero en nuestra región en estudiar y comparar diversos métodos de obtención, traslado y conservación de las muestras de materia fecal humana, así como distintos protocolos de extracción de ADN genómico microbial para el posterior estudio metagenómico (Belforte et al 2019). Así mismo, se han estudiado datos masivos de 16S ribosomal así como de DNA-Shotgun Sequencing (Illumina) de diferentes grupos de estudio. Esto fue posible gracias a la cooperación con el Centro de Investigación, Docencia y Extensión en Tecnologías de la

Información y la Comunicación CIDETIC- UNLu (cidetic.unlu.edu.ar/). Los datos de secuenciación masiva son procesados en el CIDETIC con servidores propios multi core dedicados al procesamiento de grandes volúmenes de datos y a la resolución de problemas complejos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, Pablo, María Florencia Mascardi, Fiorella Sabrina Belforte, Ayelén Daiana Rosso, Sofía Quesada, Ignacio Llovet, Gregorio Iraola, Julieta Trink, and Alberto Penas-Steinhardt. 2022. "A Two-Time Point Analysis of Gut Microbiota in the General Population of Buenos Aires and Its Variation Due to Preventive and Compulsory Social Isolation During the COVID-19 Pandemic." *Frontiers in Microbiology* 13 (March): 803121.
- Belforte, Fiorella Sabrina, Natalie Fernandez, Francisco Tonín Monzón, Ayelén Daiana Rosso, Sofía Quesada, María Cecilia Cimolai, Andrea Millán, et al. 2019. "Getting to Know the Gut Microbial Diversity of Metropolitan Buenos Aires Inhabitants." *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00965>.
- Béres, Nóra J., Dolóres Szabó, Dorottya Kocsis, Dániel Szűcs, Zoltán Kiss, Katalin E. Müller, Gábor Lendvai, et al. 2016. "Role of Altered Expression of miR-146a, miR-155, and miR-122 in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease." *Inflammatory Bowel Diseases*. <https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000687>.
- Bondt, Albert, Simone Nicolardi, Bas C. Jansen, Kathrin Stavenhagen, Dennis Blank, Guinevere S. M. Kammeijer, Radoslaw P. Kozak, et al. 2016. "Longitudinal Monitoring of Immunoglobulin A Glycosylation during Pregnancy by Simultaneous MALDI-FTICR-MS Analysis of N- and O-Glycopeptides." *Scientific Reports* 6 (June): 27955.
- Clemente, Jose C., Erica C. Pehrsson, Martin J. Blaser, Kuldip Sandhu, Zhan Gao, Bin Wang, Magda Magris, et al. 2015. "The Microbiome of Uncontacted Amerindians." *Science Advances*. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500183>.
- Dei-Cas, Ignacio, Florencia Giliberto, Leonela Luce, Hernán Dopazo, and Alberto Penas-Steinhardt. 2020. "Metagenomic Analysis of Gut Microbiota in Non-Treated Plaque Psoriasis Patients Stratified by Disease Severity: Development of a New Psoriasis-Microbiome Index." *Scientific Reports* 10 (1): 12754.
- Dickson, Iain. 2017. "Diagnosing IBD with the Gut Microbiome." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 14 (4): 195–195.
- Dotan, Iris, Sigal Fishman, Yaara Dgani, Mikael Schwartz, Amir Karban, Aaron Lerner, Oori Weishauss, et al. 2006. "Antibodies Against Laminaribioside and Chitobioside Are Novel Serologic Markers in Crohn's Disease." *Gastroenterology* 131 (2): 366–78.
- Enright, Anton J., Bino John, Ulrike Gaul, Thomas Tuschl, Chris Sander, and Debora S. Marks. 2003. "MicroRNA Targets in Drosophila." *Genome Biology* 5 (1): R1.
- Ferragut, Fátima, Alejandro J. Cagnoni, Lucas L. Colombo, Clara Sánchez Terrero, Carlota Wolfenstein-Todel, María F. Troncoso, Silvia I. Vanzulli, Gabriel A. Rabinovich, Karina V. Mariño, and María T. Elola. 2019. "Dual Knockdown of Galectin-8 and Its Glycosylated Ligand, the Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166), Synergistically Delays in Vivo Breast Cancer Growth." *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research* 1866 (8): 1338–52.
- Franzosa, Eric A., Lauren J. McIver, Gholamali Rahnavard, Luke R. Thompson, Melanie Schirmer, George Weingart, Karen Schwarzberg Lipson, et al. 2018. "Species-Level Functional Profiling of Metagenomes and Metatranscriptomes." *Nature Methods*.

<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0176-y>.

- Gambim, Marcela Helena, Alipio de Oliveira do Carmo, Luciana Marti, Sidney Veríssimo-Filho, Lucia Rossetti Lopes, and Mariano Janiszewski. 2007. "Platelet-Derived Exosomes Induce Endothelial Cell Apoptosis through Peroxynitrite Generation: Experimental Evidence for a Novel Mechanism of Septic Vascular Dysfunction." *Critical Care / the Society of Critical Care Medicine* 11 (5): R107.
- Gao, Yuan, Jinfeng Wang, and Fangqing Zhao. 2015. "CIRI: An Efficient and Unbiased Algorithm for de Novo Circular RNA Identification." *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0571-3>.
- Haas, Brian J., Alexie Papanicolaou, Moran Yassour, Manfred Grabherr, Philip D. Blood, Joshua Bowden, Matthew Brian Couger, et al. 2013. "De Novo Transcript Sequence Reconstruction from RNA-Seq Using the Trinity Platform for Reference Generation and Analysis." *Nature Protocols* 8 (8): 1494–1512.
- Hansen, Albert, Jorgen Clausen, and Rigmor Jensen. 1962. "Clearing Tissue Homogenates." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/193980a0>.
- Huang, Yen-Lin, Christophe Chassard, Martin Hausmann, Mark von Itzstein, and Thierry Hennot. 2015. "Sialic Acid Catabolism Drives Intestinal Inflammation and Microbial Dysbiosis in Mice." *Nature Communications* 6 (August): 8141.
- Iskandar, Heba N., and Matthew A. Ciorba. 2012. "Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Current Practices and Recent Advances." *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 159 (4): 313–25.
- Ji, Yahong, Xiaoli Li, Ying Zhu, Na Li, Nana Zhang, and Min Niu. 2018. "Faecal microRNA as a Biomarker of the Activity and Prognosis of Inflammatory Bowel Diseases." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503 (4): 2443–50.
- Jostins, Luke, Stephan Ripke, Rinse K. Weersma, Richard H. Duerr, Dermot P. McGovern, Ken Y. Hui, James C. Lee, et al. 2012. "Host-Microbe Interactions Have Shaped the Genetic Architecture of Inflammatory Bowel Disease." *Nature* 491 (7422): 119–24.
- Kuhn, Max. 2008. "Building Predictive Models in R Using the caret Package." *Journal of Statistical Software*. <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i05>.
- Kulcheski, Francieli Rodrigues, Ana Paula Christoff, and Rogerio Margis. 2016. "Circular RNAs Are miRNA Sponges and Can Be Used as a New Class of Biomarker." *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.011>.
- Langmead, Ben, and Steven L. Salzberg. 2012. "Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2." *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- La Rosa, Patricio S., J. Paul Brooks, Elena Deych, Edward L. Boone, David J. Edwards, Qin Wang, Erica Sodergren, George Weinstock, and William D. Shannon. 2012. "Hypothesis Testing and Power Calculations for Taxonomic-Based Human Microbiome Data." *PloS One* 7 (12): e52078.
- Lewis, Amy, Carla Felice, Tomoko Kumagai, Cecilia Lai, Kriti Singh, Rosemary R. Jeffery, Roger Feakins, et al. 2017. "The miR-200 Family Is Increased in Dysplastic Lesions in Ulcerative Colitis Patients." *PloS One* 12 (3): e0173664.
- Li, Heng, and Richard Durbin. 2010. "Fast and Accurate Long-Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform." *Bioinformatics* 26 (5): 589–95.
- Mantis, N. J., N. Rol, and B. Corthésy. 2011. "Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut." *Mucosal Immunology* 4 (6): 603–11.
- Mathias, Amandine, and Blaise Corthésy. 2011. "N-Glycans on Secretory Component: Mediators of the Interaction between Secretory IgA and Gram-Positive Commensals Sustaining Intestinal Homeostasis." *Gut Microbes* 2 (5): 287–93.
- Mazzini, Flavia Noelia, Frank Cook, John Gounarides, Sebastián Marciano, Leila Haddad, Ana Jesica Tamaroff, Paola Casciato, et al. 2021. "Plasma and Stool Metabolomics to Identify

Microbiota Derived-Biomarkers of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease: Effect of PNPLA3 Genotype.” *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society* 17 (7): 58.

Nakajima, Akira, Alexis Vogelzang, Mikako Maruya, Michio Miyajima, Megumi Murata, Aoi Son, Tomomi Kuwahara, et al. 2018. “IgA Regulates the Composition and Metabolic Function of Gut Microbiota by Promoting Symbiosis between Bacteria.” *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20180427>.

Pabst, Oliver, and Emma Slack. 2020. “IgA and the Intestinal Microbiota: The Importance of Being Specific.” *Mucosal Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0227-4>.

Palm, Noah W., Marcel R. de Zoete, Thomas W. Cullen, Natasha A. Barry, Jonathan Stefanowski, Liming Hao, Patrick H. Degnan, et al. 2014. “Immunoglobulin A Coating Identifies Colitogenic Bacteria in Inflammatory Bowel Disease.” *Cell* 158 (5): 1000–1010.

Pant, Saumya, Holly Hilton, and Michael E. Burczynski. 2012. “The Multifaceted Exosome: Biogenesis, Role in Normal and Aberrant Cellular Function, and Frontiers for Pharmacological and Biomarker Opportunities.” *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.037>.

Reithmair, Marlene, Dominik Buschmann, Melanie Märte, Benedikt Kirchner, Daniel Hagl, Ines Kaufmann, Martina Pfob, et al. 2017. “Cellular and Extracellular miRNAs Are Blood-Compartment-Specific Diagnostic Targets in Sepsis.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21 (10): 2403–11.



Dra. Fiorella S. Belforte