

INFORME FINAL

Título del proyecto: *“Estudios de microbiota intestinal asociada a Lupus Eritematoso Sistémico. Búsqueda de nuevos biomarcadores en patologías complejas con componente inflamatorio.”*

Director: **Dr. Alberto Penas Steinhardt.**

Investigadora Adjunto CONICET

Investigadores colaboradores:

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

El lupus eritematoso sistémico (LES) implica un florido conjunto de manifestaciones clínicas cuyo origen autorreactivo se caracteriza por una sobreactivación del sistema inmune y la producción de una gran cantidad de autoanticuerpos. Por ser una patología compleja con un componente inflamatorio, su patogenia aún no se conoce en su totalidad, suponiéndose factores predisponentes tanto genéticos como ambientales. Actualmente, se sabe que el papel del microbioma humano es crucial en el mantenimiento del equilibrio transreino entre los microorganismos comensales y el sistema inmune. En el marco del presente Proyecto de Investigación, estudiamos la microbiota intestinal de pacientes argentinos con diferentes estadios de LES que recibieron o no diferentes tratamientos mediante secuenciación 16S de la materia fecal. En cuanto a los resultados obtenidos, encontramos claras diferencias en la estructura poblacional (distancias Unifrac ponderadas y no ponderadas, p-valor <0,05) y microbioma central entre casos y controles. Además, los géneros *Collinsella*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y los metabolismos de degradación de aromáticos estaban sobrerrepresentados en el grupo LES. El tratamiento médico también fue determinante, ya que varias vías metabólicas microbianas se vieron influenciadas por la terapia inmunosupresora. En particular, el metabolismo de degradación de la alantoína se expresó de manera diferencial en el grupo de pacientes que recibieron inmunosupresores. Finalmente, realizamos un modelo de regresión logística (LASSO: operador de selección y contracción absoluta mínima) considerando variables tales como la microbiota central, los taxones bacterianos diferencialmente abundantes y las vías metabólicas diferencialmente abundantes (p<0,05). El modelo predijo que los pacientes con LES podrían estar asociados con una mayor abundancia relativa de la vía de oxidación del formaldehído (RUMP_PWY). Por el contrario, la preponderancia de la ruta de biosíntesis y activación del cetodesoxioctonato (Kdo) (PWY_1269) y los géneros *Lachnospiraceae_UCG_004*, *Lachnospira*, *Victivallis* y *UCG_003* (género perteneciente a la familia *Oscillospiraceae* de la clase *Clostridia*) se asociaron con un fenotipo control. En general, los resultados obtenidos podrían contribuir al desarrollo de herramientas diagnósticas integrales para la fenotipificación integral de pacientes con LES. En este sentido, estudiar el perfil microbiano comensal y los posibles patobiontes asociados al LES en nuestra población propone estrategias más efectivas y precisas para explorar posibles tratamientos basados en la microbiota de pacientes con LES.

III. PALABRAS CLAVE

MICROBIOTA, LUPUS

IV. ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) involves a florid set of clinical manifestations whose autoreactive origin is characterized by an overactivation of the immune system and the production of a large amount of autoantibodies. As it is a complex pathology with an inflammatory component, its pathogenesis is not yet fully understood, with both genetic and environmental predisposing factors being assumed. Currently, it is known that the role of the human microbiome is crucial in maintaining the transkingdom balance between commensal microorganisms and the immune system. Within the framework of this Research Project, we studied the intestinal microbiota of Argentine patients with different stages of SLE who received or did not receive different treatments by 16S sequencing of fecal matter. Regarding the results obtained, we found clear differences in the population structure (weighted and unweighted Unifrac distances, p -value <0.05) and core microbiome between cases and controls. Furthermore, the genera *Collinsella*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and aromatic degradation metabolisms were overrepresented in the SLE group. Medical treatment was also determinant, as several microbial metabolic pathways were influenced by immunosuppressive therapy. In particular, allantoin degradation metabolism was differentially expressed in the group of patients receiving immunosuppressants. Finally, we performed a logistic regression model (LASSO: least absolute shrinkage and selection operator) considering variables such as core microbiota, differentially abundant bacterial taxa and differentially abundant metabolic pathways ($p < 0.05$). The model predicted that SLE patients might be associated with a higher relative abundance of the formaldehyde oxidation pathway (RUMP_PWY). In contrast, the preponderance of the ketodeoxyoctonate (Kdo) biosynthesis and activation pathway (PWY_1269) and the genera *Lachnospiraceae_UCG_004*, *Lachnospira*, *Victivallis* and *UCG_003* (genus belonging to the *Oscillospiraceae* family of the *Clostridia* class) were associated with a control phenotype. Overall, the results obtained could contribute to the development of comprehensive diagnostic tools for the comprehensive phenotyping of SLE patients. In this sense, studying the commensal microbial profile and the potential pathobionts associated with SLE in our population proposes more effective and precise strategies to explore potential microbiota-based treatments of SLE patients.

V. KEY WORDS

MICROBIOTA, LUPUS

VI. INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune y multisistémica. La etiología es desconocida, pero existen factores que están relacionados con la presencia de la enfermedad, tales como desregulación del sistema inmune, factores genéticos, hormonales y ambientales. Afecta principalmente a mujeres jóvenes y cursa con períodos de remisión y recaída. Sus manifestaciones clínicas presentan una gravedad variable, comprometiendo principalmente a la piel, articulaciones, riñones, pulmones, sistema nervioso, membranas serosas y la sangre, entre otros. Esta variabilidad clínica y la presencia de alteraciones inmunológicas, principalmente la producción de autoanticuerpos dirigidos contra uno o más componentes del núcleo y citoplasma celular, son las características principales de esta entidad.(Tsokos et al. 2016)

Tradicionalmente se utilizaron los criterios de American College of Rheumatology (ACR) 1982 revisados en 1997 para la clasificación de LES, a fin de facilitar la comparación de los pacientes en los estudios epidemiológicos y ensayos clínicos. En 2012 el grupo de trabajo SLICC (The Systemic Lupus International Collaborating Clinics) propuso una revisión de los mismos para mejorar las debilidades de los criterios ACR de 1997.(Aringer 2019)

La heterogeneidad de la población de pacientes se traduce en retos significativos no sólo en la clasificación de la actividad de la enfermedad, sino también para el establecimiento de la respuesta terapéutica a nuevos fármacos candidatos y estrategias terapéuticas personalizadas. Por esta razón es mandatorio identificar biomarcadores específicos que tendrán un impacto en toda la amplia variedad de lupus, o alternativamente definan subconjuntos de LES únicas que puedan requerir y responder a diferentes terapias personalizadas.

Hoy sabemos que los microbios intestinales desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la salud humana. El tracto gastrointestinal humano contiene una diversa colección de microorganismos, quienes desarrollan funciones biológicas del intestino como el suministro de nutrientes esenciales, la digestión, la detoxificación, así como en la defensa contra los patógenos, la modulación del sistema inmunitario y el impedir el asentamiento de microorganismos foráneos potencialmente patógenos. En los últimos años se ha demostrado una directa relación entre disbiosis de las comunidades microbianas intestinales y numerosas enfermedades. Debido a la importancia de la flora intestinal para la salud humana, estas poblaciones han sido analizadas intensamente en los últimos tiempos con la llegada de la nueva generación de técnicas de secuenciación masiva (Next

Generation Sequencing, o NGS) ha sido posible la secuenciación directa de los microorganismos, evitando así la necesidad de cultivarlos.

En los últimos años, el campo de la inmunología se ha visto revolucionado por la creciente comprensión del papel fundamental de la microbiota intestinal en la inducción, entrenamiento y función del sistema inmunológico del huésped. A su vez, el sistema inmunológico ha evolucionado en gran medida como un medio para mantener la relación simbiótica del huésped con estos microbios tan diversos y cambiantes. En condiciones favorables, la alianza entre el sistema inmunológico y la microbiota comensal permite la inducción de respuestas protectoras contra patógenos y el mantenimiento de vías reguladoras involucradas en el mantenimiento de la tolerancia a antígenos inofensivos. Sin embargo, cambios profundos en el contexto ambiental podrían conducir a la selección de una microbiota que carece de la resiliencia y diversidad necesarias para establecer respuestas inmunes equilibradas (Zhang et al. 2021). Estudios recientes demuestran que la disbiosis intestinal en pacientes con LES tendría un efecto directo sobre el fenotipo y las funciones de las células T, células B y células dendríticas plasmocitoides (pDC), promoviendo la alteración de la tolerancia inmunológica a clones de células T o B autorreactivos en pacientes con LES en el intestino (Chen et al. 2021). En este sentido, cada vez son más (Chang and Choi 2023) los trabajos que correlacionan los anticuerpos autoinmunes con fenómenos de disbiosis en el LES, situando al microbioma como un actor clave en su patogénesis (Chang and Choi 2023) [10] [11].

Es por ello que en presente proyecto de investigación nos propusimos estudiar la microbiota intestinal de pacientes con LES y de individuos control con el fin de evaluar cambios en su estructuración y diversidad que puedan ser utilizados como herramientas diagnósticas, pronósticas y de seguimiento de la enfermedad así como también como posibles dianas terapéuticas.

VII. METODOLOGÍA

VIII. Características de la población de estudio:

* Indicadores a analizar:

Variantes de secuencia de los amplicones

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.

2. Datos Metagenómicos de Población del AMBA:

* Indicadores a analizar:

A partir de la secuenciación de muestras de ADN obtenidas de heces de recolección domiciliaria, se obtendrán los datos de diversidad y abundancia de microorganismos intestinales, así como la riqueza metabólica asociada en cada contexto patológico estudiado.

Se evaluará la presencia de disbiosis intestinal asociada LES, y potenciales efectos benéficos de intervenciones nutricionales como pro y prebióticos específicos para nuestra población.

a) Descripción del ámbito de estudio.

Se estudiarán individuos mayores de 18 años de edad, asistentes al Servicio de Inmunología del Hospital Posadas, provenientes de la región metropolitana de Buenos Aires. Todos los participantes firmarán el consentimiento informado por escrito aprobado por el Comité de Ética del Hospital Posadas (de acuerdo a los principios bioéticos de la Declaración de Helsinki), correspondiente al presente protocolo de estudio aprobado por el Comité de Docencia e Investigación dicho Hospital. Se recibirán muestras de materia fecal en tubos de recolección entregados por los investigadores responsables del proyecto, para su recolección domiciliaria.

b) Tipo de estudio y diseño.

Se trata de un estudio transversal del tipo caso-control.

c) Población:

- Selección de individuos para Grupo Control:

Criterio de inclusión: individuos voluntarios sanos, normopeso, sin historia de enfermedades inflamatorias asistentes al Servicio de Inmunología. Dichos voluntarios serán reclutados por el

equipo médico, pudiendo tratarse de familiares o amigos no convivientes con el paciente del servicio que deseen participar el proyecto.

Criterio de exclusión: 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) y HIV positivos.

- Selección de Casos:

Criterios de inclusión: Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de LES que cumplan criterios de clasificación SLICC y hayan firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión: Embarazo, uso de antibióticos en los últimos 3 meses, neoplasia (hematológica o tumor sólido), pacientes en terapia de reemplazo renal, trasplantados, HIV positivos.

En el seguimiento de los pacientes con LES pueden observarse dos escenarios posibles:

-Pacientes bajo tratamiento inmunosupresor (definido por la toma de cualquier fármaco inmunosupresor, como azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, leflunomida, glucocorticoides, etc, en los últimos seis meses)

-Pacientes sin tratamiento inmunosupresor

A su vez, cada uno de estos grupos puede subdividirse según el patrón de actividad de la enfermedad. En este punto usamos un índice global que valora 24 ítems de variables clínicas atribuidas al LES y variables de laboratorio: Índice de actividad de Lupus Eritematoso Sistémico (SLEDAI) (ANEXO I, Tabla 3). Según el puntaje obtenido, se dividen en 2 categorías:

-SLEDAI < 4: LES sin actividad

-SLEDAI > 4: LES con actividad

Quedarían entonces definidos 4 subgrupos:

-Grupo A: Pacientes sin tratamiento inmunosupresor, sin actividad.

-Grupo B: Pacientes sin tratamiento inmunosupresor, con actividad.

-Grupo C: Pacientes bajo tratamiento inmunosupresor, sin actividad.

-Grupo D: Pacientes bajo tratamiento inmunosupresor, con actividad.

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

Se estudiará un total de 30 individuos de cada grupo para el estudio de la microbiota intestinal. Para el cálculo de la potencia muestral se consideró la prueba de Dirichlet-multinomial (Rosa et al. 2012), la cual utilizando un nivel de significación del 5%, un número de reads por sujeto igual a 500 y un tamaño de muestral $n=30$ / grupo otorgaría un poder estadístico del 96,5%. Las muestras de heces serán colectadas en un frasco estéril de boca ancha, aproximadamente 5 g

serán alicuotadas y congeladas a -80°C hasta su uso. La extracción del DNA se realizará a partir de 200 mg de heces mediante el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinará mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y espectrofotometría en un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Para amplificar los fragmentos de gen 16S rRNA, será utilizado 30 ng de ADN purificado. Las regiones hipervariables V3 y V4 del gen 16S bacteriano. Para la construcción de la biblioteca se utilizará el Kit de Preparación Nextera XT DNA Library (Illumina, San Diego, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. En este caso, cada muestra de ADN se fragmentará simultáneamente y se marcará con adaptadores que permitan el multiplexado de 96 muestras mediante la incorporación de secuencias de índice de Nextera XT v2 Kit índice A (Illumina, San Diego, CA). Todos los segmentos de las regiones variables del gen 16S rRNA serán normalizados y multiplexados en un solo tubo. La secuenciación se llevará a cabo utilizando un secuenciador MiSeq. De esta manera, las bibliotecas se secuenciarán en las direcciones 5' y 3', garantizando secuencias de 300-500 bp de largo y $\sim 150x$ cobertura promedio para la identificación taxonómica.

Fuentes Primarias:

* Características de la población de estudio:

Metodología: mediante el empleo de cuestionarios auto-administrados, se solicitará que los voluntarios especifiquen datos personales y de estilo de vida. Con respecto a la dieta, se empleará un cuestionario auto-administrado sobre frecuencia de consumo de alimentos adaptado de los “Cuestionarios de Frecuencia de Consumo de Alimentos” (CFCA) y en el que fueron incluidos los grupos de alimentos que más contribuyen a la ingesta de energía y macronutrientes.

* Datos Metagenómicos de Población del AMBA:

Metodología: mediante el empleo de herramientas bioinformáticas como PERMANOVA y ANOSIM implementadas en el paquete vegan R, se evaluará la riqueza genética de los metagenomas intestinales de los individuos participantes.

Fuentes Secundarias:

Se emplearán bases públicas de datos metagenómicos (Greengenes, SILVA, etc.) para la asignación de ASVs (amplicón sequences variants) mediante los programas bioinformáticos previamente mencionados.

e) Plan de análisis de los resultados.

Las diferencias univariadas entre datos cualitativos (fenotípicos y ambientales) se estudiarán a través del test de Chi2 o del test exacto de Fisher. Las diferencias entre los datos cuantitativos

(fenotípicos y ambientales) se estudiarán aplicando el ANOVA de Kruskal-Wallis o el ANOVA de una vía (en ambos casos, prueba post hoc de Student-Newman-Keuls). El análisis de la covarianza será aplicado a efectos de verificar la influencia de potenciales variables confusoras. Para el análisis multivariable se empleará regresión logística múltiple. En los contrastes estadísticos se rechazará la hipótesis nula si el nivel de significación es $p < 0,05$, dos colas.

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

Las secuencias generadas a partir de secuenciación serán analizadas mediante el software QIIME para la identificación de ASVs, así como la asignación taxonómica y el análisis estadístico. Con este fin se contrastarán las secuencias obtenidas con aquellas depositadas en bases de datos específicas (Greengenes, Ribosomal Database Project) De esta manera, se asignará a cada lectura a un phylum, clase, familia y género, siempre y cuando la asignación taxonómica fuera inequívoca dentro de un umbral de confianza del 80%. Las secuencias obtenidas en este estudio serán remitidas y puestas a disposición en NCBI SRA database.

Se procederá a medir si las comunidades microbianas en diferentes muestras eran significativamente diferentes por grupos, en concreto sujetos sanos vs enfermos, mediante Análisis de Coordenadas Principales (Principal Coordinates Analysis, PCoA), para mostrar si la composición de especies presentaba diferencias entre dichos grupos. Para ello se utilizará el programa Unifrac, especialmente diseñado para describir y comparar comunidades microbianas en base a secuenciación masiva de genes marcadores filogenéticos. Alternativamente se utilizará DESeq2 para realizar ensayos pareados de dos clases (por sujeto) para la abundancia relativa diferencial y ensayos no pareados para asociaciones entre la abundancia diferencial dentro de los sujetos control y la EII. La abundancia de OTU entre las clases se considerará significativamente diferente si su valor de p ajustado fuera $< 0,1$ y su OR estimado fuera $> 1,5$ o $< 1 / 1,5$.

IX. RESULTADOS

Gracias al cumplimiento de los objetivos planteados hemos podido publicar recientemente un trabajo referido a Lupus Eritematoso Sistémico (LES) 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 (Quesada et al. 2024).

Se logró caracterizar la microbiota de pacientes con LES y de individuos controles tal como se había propuesto. Así como también establecer las diferencias entre grupos. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

Composición microbiana

Las lecturas de baja calidad y las secuencias de quimeras se filtraron y eliminaron de ruido de los datos sin procesar con DADA2, lo que finalmente produjo un promedio de 46,862 lecturas por muestra. Estas lecturas correspondieron a 5.460 características e identificaron 412 géneros de la base de datos de referencia Silva. Aproximadamente el 99,69% de los géneros en controles sin LES y pacientes con LES tienen una frecuencia relativa entre 0 y 5%. Mientras que el resto está representado por los géneros *Bacteroides* en ambos grupos. Todos estos géneros pertenecen al filo Bacteroidota. (datos no mostrados) .

Diversidad alfa y beta

Se calculó el índice de diversidad de Shannon y se comparó su distribución para determinar si había diferencias en la riqueza o uniformidad de las muestras entre ambos grupos. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en diversidad de Shannon, riqueza de Chao1 y Uniformidad (*Evenness pielou*) (Figura 1. A, B). Observamos que la curva de rarefacción llegó a una meseta, lo que indica que la profundidad de secuenciación era suficiente para medir la comunidad bacteriana (datos no mostrados). En términos de diversidad beta, calculamos distancias UniFrac composicionales robustas no ponderadas y ponderadas y las trazamos con elipses que representan el 95% de los intervalos de confianza de cada grupo. La variabilidad se explicó por los dos primeros componentes principales y las diferencias entre los controles sin LES y los pacientes con LES fueron significativas para el análisis de diversidad ponderado y no ponderado (valor de $p < 0,05$) (Figura 1. C,D).

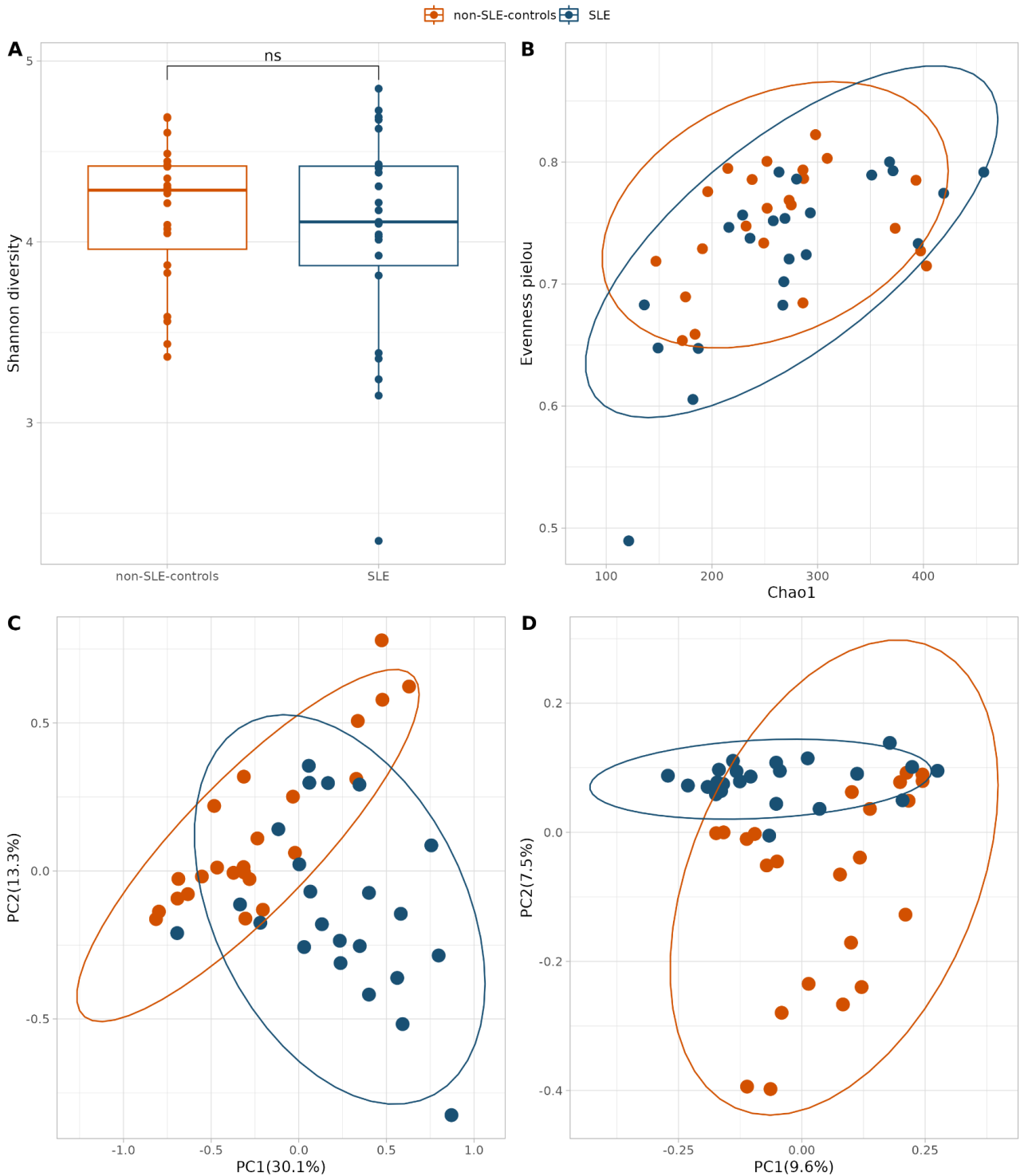


Figura 1: Comparación de la comunidad de microbiota de pacientes con LES y grupos de control sin LES. Medidas de diversidad de Shannon para diversidad alfa y prueba de Wilcoxon entre grupos (valor de $p < 0,05$) (A). Representación de riqueza (índice de Chao1) y uniformidad (índice de Pielou) en un diagrama de puntos (B). Análisis de coordenadas principales Gráficos PCoA de

diversidad beta (distancias Unifrac ponderadas y no ponderadas) para pacientes y controles (C,D). Los colores se asignan por grupo: naranja para controles sin LES y azul oscuro para pacientes con LES.

Taxones diferencialmente abundantes y análisis funcional entre pacientes y controles.

Se utilizó un algoritmo compositivo ANCOM-BC (Composiciones de microbiomas con corrección de sesgo), con una tasa de detección de 0,7 para estudiar taxones diferencialmente abundantes entre grupos. El marco ANCOM identificó siete taxones: el grupo Lachnospiraceae NK4A136 y *Odoribacter*, se encontraron significativamente mejorados en los controles sin LES (Figura 2.A). Mientras *Collinsella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Marvinbryantia* mejoraron significativamente en pacientes con LES (valor de $p < 0,05$).

Para predecir la capacidad funcional de la microbiota intestinal en controles sin LES y pacientes con LES, utilizamos una línea completa de PICRUSt2, implementada en QIIME2. PICRUSt utiliza un algoritmo extendido de reconstrucción del estado ancestral para estimar qué familias de genes están presentes y luego combina familias de genes para estimar la composición microbiana. Para predecir las capacidades funcionales, nos centramos principalmente en el metabolismo microbiano. Notamos diferencias significativas en ciertas funciones metabólicas en la microbiota intestinal de nuestros grupos, utilizando MetaCyc Metabolic Pathways. Encontramos treinta y dos vías metabólicas significativamente mejoradas en pacientes con LES, mientras que solo cinco vías aparecieron en controles sin LES como diferenciales (Figura 2. B). Entre las familias de genes asociadas con las vías metabólicas, el Kdo2-lípido A (un componente del lipopolisacárido en la mayoría de las bacterias Gram-negativas) y la vía reductora de la acetil coenzima A, estuvieron representadas en los controles sin LES. Por otro lado, en pacientes con LES, algunas familias de genes asociadas con la degradación de aromáticos, la generación de metabolitos precursores de energía y la biosíntesis de ácido teicoico parecieron mejorar significativamente en comparación con los controles sin LES.

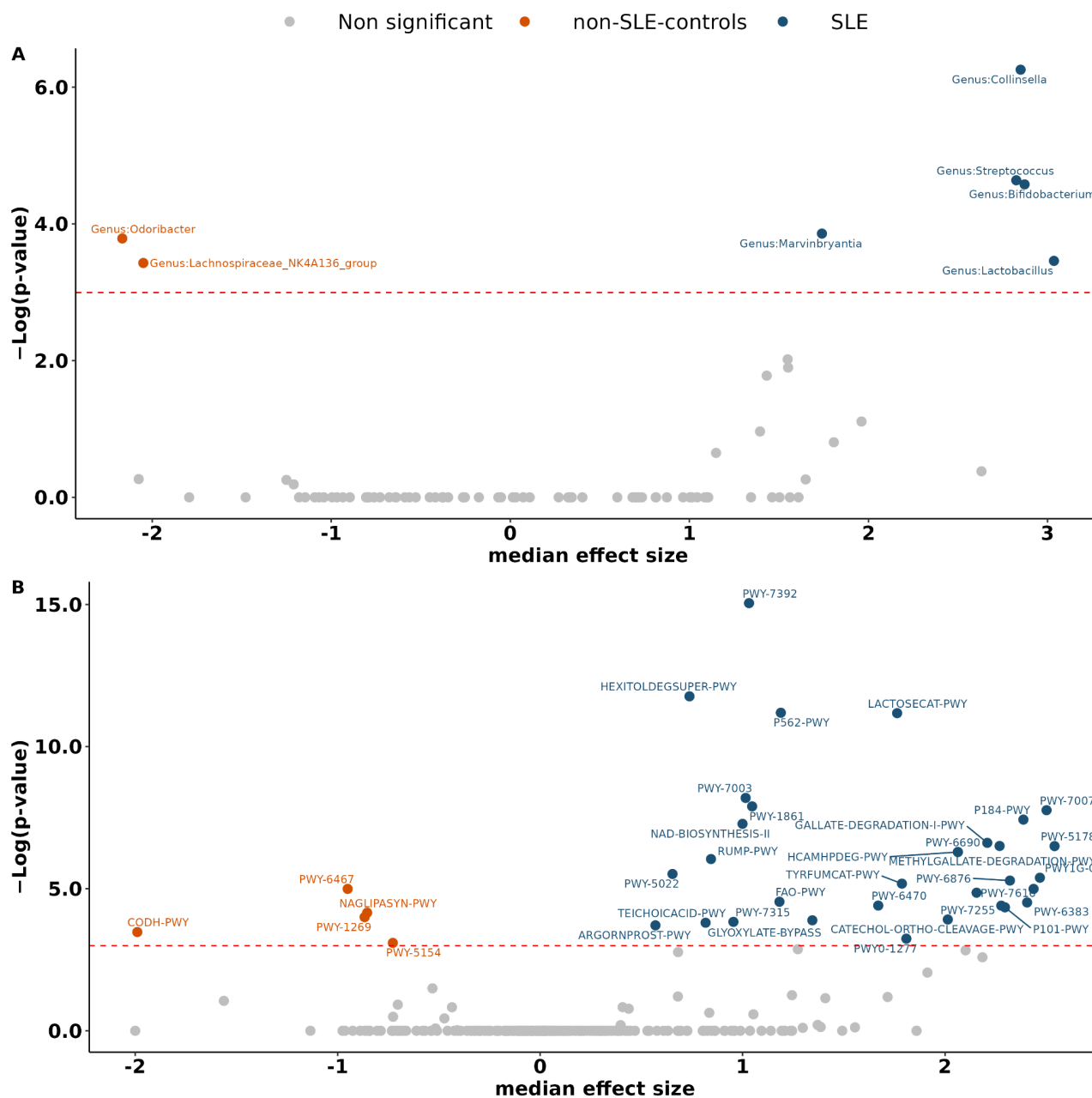


Figura 2: Taxones abundantes y análisis funcional. Gráfico de volcán de géneros diferencialmente abundantes entre grupos (A). Gráfico volcánico de los metabolismos diferencialmente abundantes entre los grupos (B). Las líneas discontinuas rojas representan un umbral de significancia (valor $p = 0,05$). El naranja o el azul oscuro representan géneros importantes o metabolismos más abundantes. En gris se representan los elementos no significativos.

Para evaluar el efecto del tratamiento en pacientes con LES, analizamos las abundancias diferenciales de géneros y metabolismos entre los pacientes que recibieron o no agentes inmunosupresores en comparación con los controles (Figura 3).

Si bien *Odoribacter* reaparece como un género diferencial en los controles, nuevos géneros como *Eubacterium_hallii_group*, *Dorea*, *Blautia*, *Family_XIII_AD3011_group* parecen mejorar significativamente en el subgrupo de pacientes con LES que reciben terapia inmunosupresora (Figura 3. A). Por otro lado, el análisis de los metabolismos diferenciales entre controles y pacientes que toman inmunosupresores mostró que el grupo de pacientes con LES continúa representado por la mayoría de las vías reportadas en la Figura 2.B con la excepción de una nueva vía representativa relacionada con degradación de la alantoína (Figura 3. B). En el contexto de géneros divergentes entre los sujetos de control y la cohorte que se abstuvo de agentes inmunosupresores, *Collinsella*, *Prevotella* y *Slackia* emergieron como representantes notables dentro de este último grupo (Figura 3. C). Por el contrario, no se identificaron géneros diferenciales discernibles entre los sujetos de control. Además, la vía metabólica discernida exhibida por el grupo PWY-2941 libre de inmunosupresores pertenece a la biosíntesis de L-lisina, uno de los 10 aminoácidos esenciales para los humanos. Finalmente, aparece una única vía metabólica en el grupo de controles (PWY-5741) que se relaciona con la generación de metabolitos precursores y energía (Figura 3. D). También se estudiaron los géneros y metabolismos diferenciales entre los grupos de pacientes que tomaban y no tomaban inmunosupresores (con - I o sin - I), pero el análisis no reveló diferencias significativas entre los grupos de pacientes (datos no mostrados).

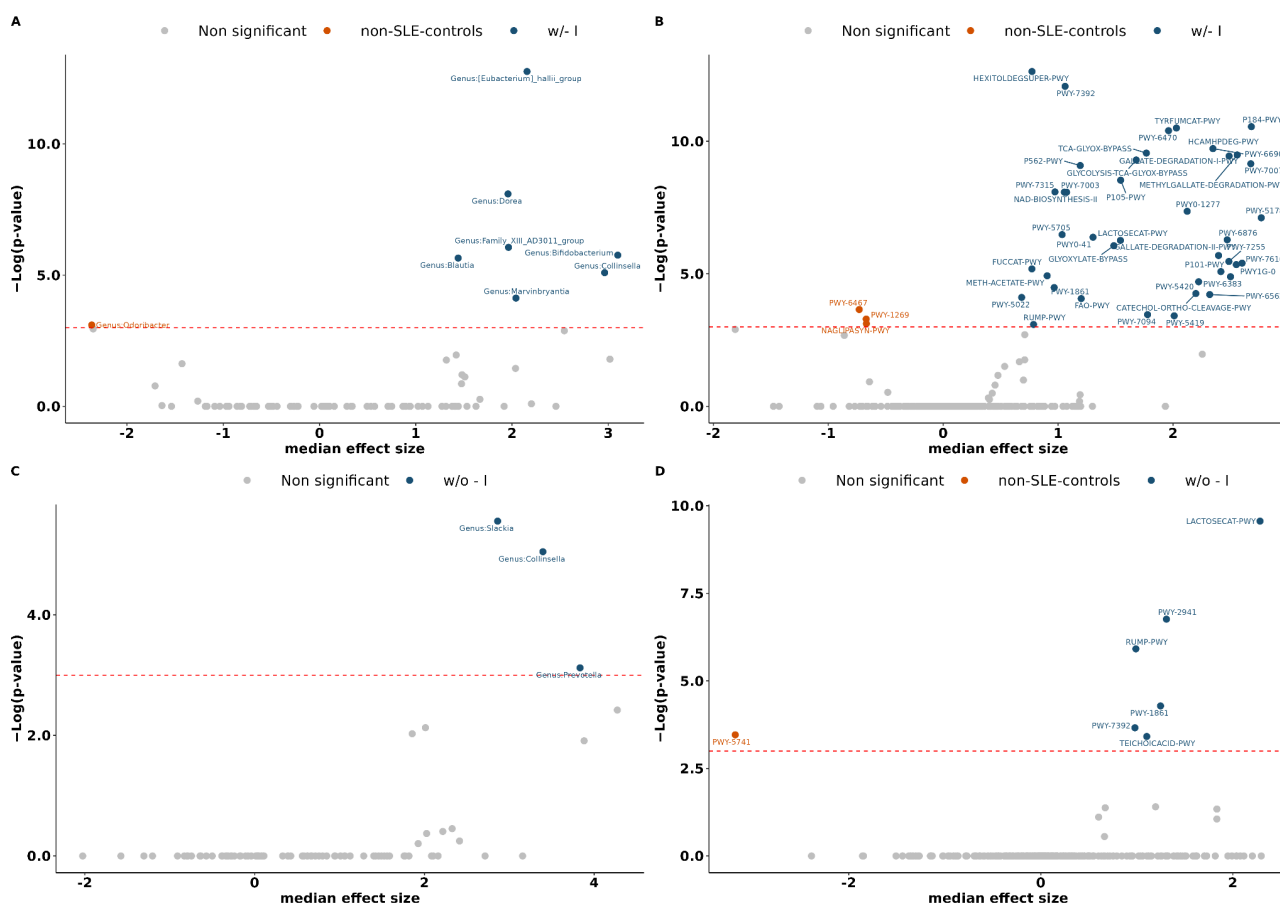


Figura 3: Taxones abundantes y análisis funcional con respecto a la inmunosupresión. Gráficos de volcán de los géneros diferencialmente abundantes entre controles sin LES y pacientes bajo tratamiento inmunosupresor (w/-I) (A). En la figura (C) se muestran los gráficos de volcanes de los géneros diferencialmente abundantes entre los controles sin LES y los pacientes sin tratamiento inmunosupresor (w/oI). Gráfico de volcán de los metabolismos diferencialmente abundantes entre pacientes con (B) o sin (D) inmunosupresores en comparación con el grupo de control. Las líneas discontinuas rojas representan un umbral de significancia (valor $p = 0,05$). El naranja o el azul oscuro representan géneros importantes o metabolismos más abundantes. En gris se representan los elementos no significativos.

Microbiota central común

Para los controles sin LES, se identificaron 80 géneros bacterianos como microbiota central, correspondientes al 25,97% de los géneros presentes en el grupo. En ambos grupos de pacientes con LES, con y sin tratamiento inmunosupresor, la microbiota central estaba compuesta por 74 géneros, correspondientes al 29,72 % y el 33,94 % del total de géneros identificados, respectivamente (

Figura 5. A, B) . Los géneros fueron asignados como microbiota central considerando una prevalencia $\geq 50\%$ y un umbral de detección $\geq 0,1\%$ (o bien una frecuencia $\geq 0,001$). Al evaluar géneros centrales compartidos o exclusivos entre grupos, se encontraron 50 géneros en la triple intersección, y solo unas pocas características centrales estaban representadas exclusivamente en cada grupo. En este sentido, hubo 17 géneros presentes en los controles sin LES que se perdieron en la microbiota central de los pacientes con LES, siendo 7 géneros específicos para el grupo inmunodeprimido y 14 específicos para el grupo no tratado (Figura 4. B).

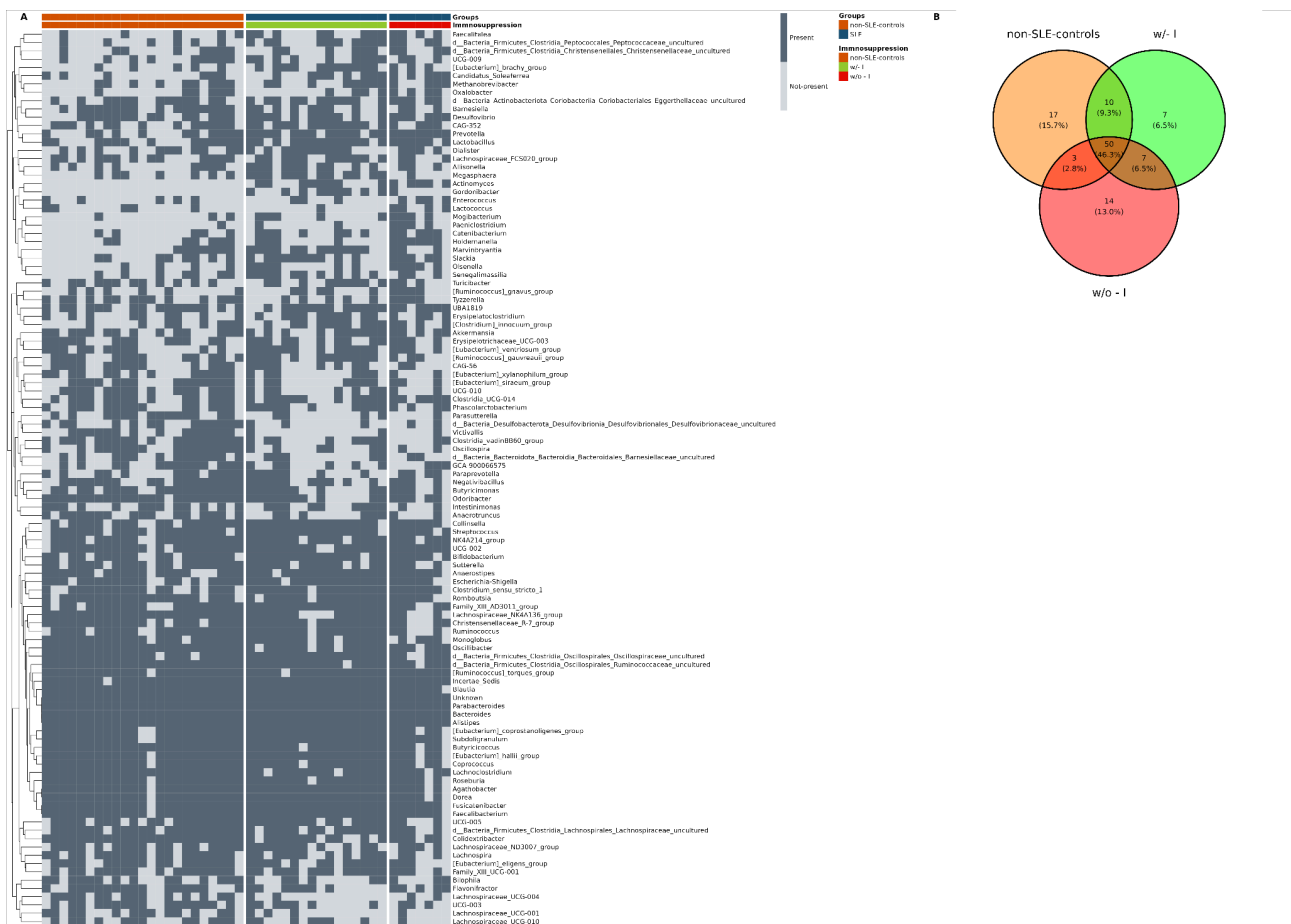


Figura 4: Microbiota central. El mapa de calor describe controles sin LES y pacientes con LES con (w/- I) o sin (w/oI) inmunosupresión (A). El diagrama de Venn representa géneros centrales compartidos/exclusivos entre grupos (B).

Parte de los resultados metagenómicos obtenidos en el trabajo fueron presentados en las reuniones conjuntas de Biociencias de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).

X. CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

El LES es una de las enfermedades autoinmunes más prevalentes, caracterizada por un curso cíclico, donde se alternan períodos de exacerbaciones y remisiones. En el presente trabajo caracterizamos por primera vez en nuestra región, biomarcadores epigenéticos y perfiles microbianos intestinales asociados con pacientes con LES en el área metropolitana de BA. Evaluamos el estado activo y el tratamiento médico para estratificar a los pacientes y evaluamos la abundancia microbiana, las funciones metabólicas generales predichas asociadas a la microbiota y los microorganismos centrales dentro de los grupos. 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 LES en el mundo. Esto se traduce en un desafío diagnóstico notable, especialmente en los países subdesarrollados donde el diagnóstico temprano o el tratamiento adecuado no siempre es accesible para las enfermedades crónicas.

Es importante señalar que aunque el tamaño de la muestra podría mejorarse, este estudio piloto contribuyó al conocimiento de algoritmos integrales de clasificación fenotípica, centrándose sobre disbiosis intestinal asociada a pacientes con LES en la población argentina. Sería fundamental realizar caracterizaciones funcionales, como proteómica o metabolómica, así como estudios longitudinales de shotgun metagenómico en pacientes con LES de Sudamérica. Esto podría mejorar las limitaciones de muestreo y considerar el metabolismo de la mucosa intestinal dentro de nuestros factores ambientales locales, permitiendo una mejor comprensión del papel de la disbiosis intestinal en esta enfermedad crónica de etiología desconocida.

En general, nuestro análisis de la firma microbiana específica relacionada con el desarrollo del LES en nuestra región proporciona una primera exploración de las características asociadas a la enfermedad en Buenos Aires (BA) y su área metropolitana, que constituye una megalópolis siendo la segunda más grande aglomeración poblada de América del Sur y el hemisferio sur.

Estos datos proporcionan un conocimiento profundo de la microbiota intestinal en LES, evidencian su relación con la disbiosis y a su vez proporciona un puntapié inicial para futuros estudios que hagan foco en la microbiota para posibles tratamientos, diagnósticos y estudios pronósticos de la enfermedad.

XI. AGRADECIMIENTOS

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.

XII. BIBLIOGRAFÍA



Dr. Alberto Penas Steinhardt

- Aringer, Martin. 2019. "EULAR/ACR Classification Criteria for SLE." *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 49 (3S): S14–17.
- Chang, Sung-Ho, and Youngnim Choi. 2023. "Gut Dysbiosis in Autoimmune Diseases: Association with Mortality." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13 (March): 1157918.
- Chen, Bei-Di, Xin-Miao Jia, Jia-Yue Xu, Li-Dan Zhao, Jun-Yi Ji, Bing-Xuan Wu, Yue Ma, et al. 2021. "An Autoimmunogenic and Proinflammatory Profile Defined by the Gut Microbiota of Patients With Untreated Systemic Lupus Erythematosus." *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 73 (2): 232–43.
- Quesada, Sofia, Ayelén Daiana Rosso, Florencia Mascardi, Valeria Soler-Rivero, Pablo Aguilera, Sebastian Nicolas Mascuka, Andrea Boiro, et al. 2024. "Integrative Analysis of Systemic Lupus Erythematosus Biomarkers: Role of Fecal Hsa-Mir-223-3p and Gut Microbiota in Transkingdom Dynamics." *Molecular Immunology* 171 (July): 77–92.
- Tsokos, George C., Mindy S. Lo, Patricia Costa Reis, and Kathleen E. Sullivan. 2016. "New Insights into the Immunopathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus." *Nature Reviews. Rheumatology* 12 (12): 716–30.
- Zhang, Lingshu, Pingying Qing, Hang Yang, Yongkang Wu, Yi Liu, and Yubin Luo. 2021. "Gut Microbiome and Metabolites in Systemic Lupus Erythematosus: Link, Mechanisms and Intervention." *Frontiers in Immunology* 12 (July): 686501.