



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“Estudio de la microbiota intestinal en un modelo murino de lupus sistémico eritematoso a lo largo de la progresión de la enfermedad”

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

Solange Margot Gouët Moya

Directora del Seminario de Título: María Rosa Bono Merino

Co-directora: Macarena Angélica Varas Poblete

09 de mayo, 2022

Santiago, Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



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 Srta. Solange Margot Gouët Moya.

“Estudio de la microbiota intestinal en un modelo murino de lupus sistémico eritematoso a lo largo de la progresión de la enfermedad”

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

Dr(a)
Director Seminario de Título

María Rosa Bono Merino

Co-Director Seminario de Título

Macarena Angélica Varas Poblete

Comisión de Evaluación

Dr(a).
Presidente Comisión

Daniela Macarena Sauma Mahaluf

Dr(a).

Andrés Esteban Marcoleta Caldera

Evaluador

Santiago, 09 de mayo de 2022

Biografía

Nací en Santiago el 19 de septiembre de 1994. A los 6 años ingresé al colegio Santa Cruz, ubicado en la comuna de Santiago en el cual cursé de primero a cuarto básico. Luego junto a mi familia nos mudamos a la comuna de el Monte e ingresé al colegio Leonado Da Vinci ubicado en la comuna de Talagante, en el cual cursé de quinto básico a cuarto medio. Durante mi etapa escolar me comenzó a interesar la ciencia y por ese mismo motivo, en enero del 2011 me inscribí en el curso de Genética Humana para estudiantes de enseñanza media impartido en la escuela de verano de la facultad de Medicina.

En el año 2016 ingresé a la carrera Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Terminé mis ramos el primer semestre del año 2020 y se me otorgó el grado de licenciada el segundo semestre del mismo año. Durante ese mismo semestre comencé mi Seminario de Título a cargo de la Dra. María Rosa Bono y la Dra. Macarena Varas en el laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mis seres queridos, los cuales me han acompañado durante esta etapa académica. A mi papá, por entregarme todo su amor, sabiduría, contención y apoyo incondicional, sin el no estaría donde estoy ni sería la persona que soy.

A mis tías Ive, Lilie y Nenie, por escucharme y entregarme sus apoyos, cariños y preocupación.

A Claudio, mi compañero, por todo su apoyo y amor incondicional. A Viviana y Kevin por acompañarme en esta etapa universitaria, por ser los mejores amigos que podría haber pedido y acompañarme en todo momento.

Agradecer al laboratorio de Inmunología, a la Dra. María Rosa Bono y Dra. Daniela Sauma por haberme recibido en su laboratorio y darme la oportunidad de realizar mi Seminario de Título en el laboratorio, a todos mis compañeros de laboratorio, en especial a Pilar y Juan Pablo por su apoyo y también a Nicolás y Valeska por su ayuda en el trabajo experimental.

Finalmente, agradecer a la Dra. María Rosa Bono y Dra. Macarena Varas por guiarme y ayudarme durante este proceso y contribuir a mi formación académica.

Índice de Contenidos

Índice de Contenidos.....	ii
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras.....	vi
Abreviaturas	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis.....	7
2. Objetivos	7
2.1 Objetivo General.....	7
2.2 Objetivos Específicos	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1 Animales	8
3.2 Ensayo de ELISA.....	9
3.3 Extracción de muestras fecales de ratón.....	10
3.4 Extracción de ADN	11
3.5 Secuenciación e identificación taxonómica	11
3.6 Análisis de resultados.....	12
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES.....	36
7. BIBLIOGRAFÍA	37

Índice de Tablas

Tabla 1. Datos de los ratones a los cuales se les extrajo muestras fecales para estudiar su microbiota.....	9
Tabla 2. Criterio de identificación según metodología entregada por MR DNA	13

Índice de Figuras

Figura 1. Evaluación de autoanticuerpos anti-ADNdh por ELISA en ratones hembra y machos a lo largo de los meses.....	14
Figura 2. Gráfico de barras correspondiente a la abundancia relativa a distintos niveles taxonómicos de las bacterias obtenidas en cada muestra analizada. Se muestran los niveles taxonómicos de Filo (A), Clase (B) y Orden (C).....	16
Figura 3. Gráfico de barras correspondiente a la abundancia relativa a nivel de Familia de las bacterias obtenidas en cada muestra analizada.	18
Figura 4. Gráfico Heatmap que visualiza las veces de cambio a nivel de Filo (A) y Clase (B) calculado como la razón entre el promedio de la abundancia relativa de cada categoría y el promedio de la abundancia relativa de los machos.	21
Figura 5. Gráfico de puntos de la diversidad representada como el índice de Shannon en relación a las categorías, las cuales corresponden para ratones hembra: lúpicas, A+ y prelúpicas y para ratones macho la categoría no lúpicos.	23
Figura 6. Gráfico PCoA que visualiza las diferencias entre las muestras estudiadas a nivel de Orden.	24
Figura 7. Gráfico PCoA que visualiza las diferencias entre las muestras estudiadas a nivel de Género.	26

Abreviaturas

ADNdh:	ADN de doble hebra
DC:	Células Dendríticas (<i>Dendritic Cell</i>)
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>)
GALTs:	Tejidos linfoides asociados al intestino (<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>)
Foxp3:	Factor de transcripción Foxp3 (<i>Forkhead box p3</i>).
ARN Ro60:	ARN asociado a la ribonucleoproteína Ro60
IFN γ :	Interferón γ
IgM:	Inmunoglobulina M
IL:	Interleuquina
LES:	Lupus Eritematoso Sistémico
LT:	Linfocito T
NZB:	<i>New Zealand Black</i>
NZW:	<i>New Zealand White</i>
(NZBxNZW)F1:	Primera generación (F1) de la cruce entre ratones NZW y NZB.
PBS:	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PI:	Yoduro de propidio (<i>Propidium Iodide</i>)
Th:	Linfocito T cooperador (<i>T helper</i>)
Th17:	linfocito cooperador 17 (<i>T helper-17</i>)
Treg:	Linfocito T regulador

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de numerosos anticuerpos contra componentes del núcleo celular, como ADN doble hebra (ADNdh), provocando la afección de muchos órganos, entre ellos el riñón, provocando glomerulonefritis y proteinuria. El desarrollo de esta enfermedad se debe a componentes genéticos y factores ambientales. Uno de estos factores es la microbiota intestinal la cual modula el sistema inmune generando tolerancia, o inflamación. En pacientes con LES existe un desbalance en la microbiota y lo mismo ocurre en modelos murinos de la enfermedad. Uno de los modelos murinos que más se asemeja al LES en humanos son los ratones (NZBxNZW)F1 donde la enfermedad se da principalmente en hembras, generan proteinuria fatal y autoanticuerpos anti-ADNdh.

En este Seminario de Título estudiamos la composición de la microbiota intestinal de hembras de la cepa de ratones susceptibles de desarrollar lupus (NZBxNZW)F1 en los distintos estadios de la enfermedad y la comparemos con ratones machos de la misma cepa y de edad similares. Para esto, realizamos metabarcoding del 16S de las heces de hembras y machos (NZBxNZW)F1. Nuestros resultados muestran que algunas taxas cambian progresivamente con la enfermedad. Por un lado, los filos *Proteobacteria* y *Cyanobacteria* y la clase *Erysipelotrichia* aumentan con la enfermedad. Mientras que las clases *Bacilli* y *Tissierellia* disminuyen progresivamente con la enfermedad. Sin embargo, algunas taxas estuvieron enriquecidas específicamente en ciertos estadios del lupus y algunas fueron variables entre muestras sin observarse una correlación con la enfermedad.

Los principales resultados muestran que no existe una diferencia notable en la composición bacteriana de ratones hembras en los diferentes estadios de la

enfermedad. Sin embargo, es necesario analizar un mayor número de ratones para poder concluir acerca del rol de la microbiota intestinal en el desarrollo de lupus.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the production of numerous antibodies against components of the cell nucleus, such as double-stranded DNA (dsDNA) causing the involvement of many organs, among these the kidney, causing glomerulonephritis, and proteinuria. The development of this disease is due to genetic components and environmental factors. One of these factors is the intestinal microbiota which modulates the immune system generating tolerance or inflammation. There is an imbalance in the microbiota in SLE patients, which also occurs in murine models of the disease. One of the murine models that most closely resembles SLE in humans is (NZBxNZW)F1 mice, where the disease occurs mainly in females. They generate fatal proteinuria and anti-dsDNA autoantibodies.

In this work, we study the composition of female intestinal microbiota from the (NZBxNZW)F1 murine model susceptible to developing lupus in the different stages of the disease and we compare them with male mice of the same strain and similar ages. For this, we performed 16S metabarcoding of feces from females and males (NZBxNZW)F1. Our results show that some taxa changed with the progression of the disease. On one hand, phyla *Proteobacteria* and *Cyanobacteria* and class *Erysipelotrichia*, increase progressively with the disease. While classes *Bacilli* and *Tissierellia* decreased progressively with the progression of the disease. However, some taxa were enriched specifically in some stages of lupus and others were variables among samples with no association to disease stage.

The main results show no notable difference in the bacterial composition of female mice in the different disease stages. However, it is necessary to analyze a more significant

number of mice to conclude about the role of the intestinal microbiota in the development of lupus.

1. INTRODUCCIÓN

En humanos el lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de numerosos anticuerpos contra componentes del núcleo celular, como ADN doble hebra (ADNdh) (Ma et al., 2019). Durante el LES se generan células inmunes hiperactivas y respuestas de anticuerpos anormales (Lipsky, 2001; Ruiz et al., 2018), lo que se manifiesta como una enfermedad con síntomas heterogéneos que producen daño en múltiples órganos (Kuhn et al., 2015). Entre estos se destaca el daño renal que provoca glomerulonefritis, la que se evidencia por la presencia de proteína en la orina (proteinuria) (Kuhn et al., 2015) y el daño a nivel de medula ósea que provoca anemia hemolítica (Kokori et al., 2000). Un mayor título de anticuerpos anti ADNdh generalmente se considera un marcador de diagnóstico específico para el LES humano (Ma et al., 2019). La etiología del LES no está clara, pero la evidencia ha demostrado que está influenciada por factores genéticos y ambientales. Podemos encontrar múltiples genes y loci de susceptibilidad asociados con LES, que por sí solos no causan la enfermedad, pero en conjunto con factores ambientales, hormonales y epigenéticos, provocan una ruptura de la tolerancia hacia los autoantígenos (López et al., 2016; Ma et al., 2019; Tsokos, 2011). En conjunto, estos factores actúan sobre el sistema inmunológico causando diversas anomalías, incluida la generación de células B productoras de autoanticuerpos, células T autorreactivas y la producción anormal de citoquinas proinflamatorias. El daño tisular genera productos que son captados por autoanticuerpos que a su vez generan complejos inmunes que activan células presentadoras de antígenos, activando respuestas de tipo T inflamatorias, generando un círculo vicioso de inflamación (Luo et al., 2018; Ohl & Tenbrock, 2011). Se ha demostrado en el LES humano que los linfocitos Th17 juegan un papel fundamental

a través de la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-17, IL-22 e IL-23, involucradas en la inflamación local y destrucción de tejidos (Pan et al., 2013; Qu et al., 2013). Además, la respuesta Th17 es considerada un factor principal de autoinmunidad en el LES (Luo et al., 2018). Por el contrario, los linfocitos T reguladores (Treg) son fundamentales para la prevención de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, ya que presentan una actividad supresora de las respuestas efectoras aberrantes (Shevach, 2009). Los Treg emergen del timo y podrían expandirse en tejidos periféricos en respuesta a diversos antígenos (Feuerer et al., 2009). La mayoría de los estudios informan un número reducido o una función alterada de las células Treg circulantes en pacientes con LES (Gómez et al., 2009; López et al., 2016; Lyssuk et al., 2007; Valencia et al., 2007).

Un estudio anterior sugiere que la composición de la microbiota comensal que coloniza el intestino modula la diferenciación de las células inmunes presentes en los tejidos linfoides asociados al intestino (GALTs) (Round & Mazmanian, 2009). Específicamente, las células plasmáticas en la lámina propia están involucradas en la producción de anticuerpos IgM (inmunoglobulina M) naturales contra bacterias comensales y patógenas, así como contra células apoptóticas (Grönwall & Silverman, 2014). Varios estudios han informado sobre las funciones inmunoregulatoras de los anticuerpos IgM naturales ya que inhiben la señalización inflamatoria en las células inmunes innatas y suprimen la enfermedad autoinmune (Y. Chen et al., 2009; Grönwall et al., 2014). Por otro lado, el reconocimiento de antígenos bacterianos por las células dendríticas (DC) intestinales pueden inducir la diferenciación de LT CD4⁺ vírgenes en diferentes tipos de linfocitos Th o Treg. En condiciones fisiológicas, la microbiota normal presentada en individuos sanos favorece el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria intestinal (Mazmanian et al., 2008). Por el contrario, varios estudios sugieren que las alteraciones

en la composición de la microbiota intestinal, proceso conocido como disbiosis bacteriana, puede ser un factor crítico en el desarrollo de numerosas patologías inmunomediadas, probablemente en hospederos susceptibles a enfermedades, a través de la generación de un desequilibrio entre las células Th y Treg (López et al., 2016).

Se ha demostrado en humanos y ratones que los factores ambientales incluida la dieta, exposición a antibióticos y a microorganismos ambientales, están involucrados en la etiología del LES y además pueden influir en la composición de la microbiota del hospedero. Por ejemplo, es conocido que los antibióticos orales desencadenan brotes de LES, lo que sugiere un papel de las bacterias comensales en el LES (Luo et al., 2018). Por esto se han hecho esfuerzos para comprender los cambios en la composición de la microbiota intestinal a lo largo de la patogénesis del LES (Luo et al., 2018). Además se ha descrito que los primeros autoanticuerpos en el LES se dirigen contra un autoantígeno de unión al ARN Ro60, en donde ortólogos de esta ribonucleoproteína están presentes en bacterias comensales y serían capaces de desencadenar la autoinmunidad (Greiling et al., 2018).

Se ha observado *in vitro* que los microorganismos provenientes de muestras fecales de pacientes con LES son fuertes inductores de la diferenciación y activación de Th17 comparado con microorganismos provenientes de muestras fecales de controles sanos, lo que genera un desequilibrio en la proporción Th17/Th1. Al enriquecer *in vitro* estos microorganismos con dos cepas de *Clostridia* conocidas por su capacidad de inducir los Treg, se puede prevenir el desequilibrio Th17/Th1. Además, al enriquecerla *in vitro* estos microorganismos con *Bifidobacterium bifidum*, la cual es conocida por inducir la expresión de Foxp3, se previno la sobreactivación de linfocitos CD4⁺. Estos resultados respaldan el posible beneficio terapéutico de los probióticos que contienen cepas inductoras de linfocitos Treg para restaurar el equilibrio Treg/Th17/Th1 en el LES. De

hecho, los análisis ex vivo de muestras de pacientes con LES muestran un aumento de linfocitos Th17 y linfocitos Foxp3⁺IL-17⁺, lo que sugiere una posible transdiferenciación de linfocitos Treg a linfocitos Th17. El análisis de la microbiota fecal reveló una correlación negativa entre las poblaciones de IL-17⁺ y *Firmicutes* en controles sanos, mientras que en el LES este filo se correlacionó directamente con los niveles séricos de IFN γ , una citoquina Th1 ligeramente reducida en los pacientes (López et al., 2016).

Existen varios modelos murinos de lupus tales como ratones MRL/lpr, (NZBxNZW)F1 y B6.NZM-Sle1^{NZM2410/Aeg}Sle2^{NZM2410/Aeg}Sle3^{NZM2410/Aeg}/LmoJ llamado ratones recombinantes triple congénicos (RTC), los cuales se asemejan al LES humano y se caracterizan por niveles elevados de anticuerpos antinucleares, anemia hemolítica, proteinuria y glomerulonefritis por complejos inmunitarios progresivos (Luo et al., 2018). Se han descrito cambios en la microbiota (disminución de la familia *Lactobacillaceae* y aumento en la familia *Lachnospiraceae*) en ratones propensos al lupus del modelo MRL/lpr comparado con controles sanos (Zhang et al., 2014). Al administrar *Lactobacillus* spp a ratones MRL/lpr se observó una mejora en la nefritis lúpica (Mu et al., 2017). Esto sugiere que la enfermedad del lupus podría controlarse mediante cambios en la microbiota intestinal. En el modelo de ratón propenso al lupus SNF1, se encontró una mayor abundancia de la familia de bacterias comensales *Rikenellaceae* que se asocia con un lupus más severo (Johnson et al., 2015). Además, en ambos modelos de ratón mencionados se observó una mayor diversidad bacteriana (Johnson et al., 2015; Mu et al., 2017). En el caso de lupus en humanos, un estudio demostró que la microbiota fecal de pacientes con LES inactivos muestran una disminución significativa en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* comparado con controles sanos (Hevia et al., 2014). Esta disminución en relación de *Firmicutes/Bacteroidetes* también se ha visto en otras enfermedades autoinmunes (Luo et al., 2018). En un estudio en humanos, se

compararon pacientes con LES y pacientes sin enfermedades inmunomediadas, en el cual se encontró que los pacientes con LES activo poseían una microbiota intestinal alterada que difería en varias especies bacterianas particulares, las cuales estaban representadas de forma diferencial en los pacientes con LES, (dentro de los géneros *Odoribacter* y *Blautia* y un género sin nombre de la familia *Rikenellaceae*) comparado con los controles sin LES, siendo menos diversos. Las proporciones de *Firmicutes/Bacteroidetes* no difirieron entre microbiota intestinal de pacientes con LES y sanos. El único consenso entre ratones y humanos fue la abundancia relativa de *Lachnospiraceae*, la cual fue significativamente mayor tanto en ratones MRL/ lpr como en pacientes con LES (Luo et al., 2018).

Con respecto al modelo utilizado en este trabajo (NZBxNZW)F1, el lupus se desarrolla únicamente en hembras entre los 7 y 9 meses de edad con una sintomatología similar al LES en humanos. Con respecto a la microbiota de este modelo, se reportaron anteriormente cambios producidos en su composición a lo largo de la progresión de la enfermedad (Luo et al., 2018). En dicho trabajo se reportó que la microbiota intestinal cambió notablemente antes y después del inicio del lupus, con una mayor diversidad y representación de varias especies bacterianas a medida que el lupus progresaba. Se observaron aumentos significativos para especies bacterianas de los géneros *Clostridium*, *Dehalobacterium*, *Oscillospira*, *Dorea* (familia *Rikenellaceae*) y otro género sin nombre dentro de la familia *Ruminococcaceae*. También se encontró un aumento en la abundancia de un grupo de *Lactobacilos* en la microbiota intestinal, lo cual podría estar correlacionada con una mayor severidad en la enfermedad (Luo et al., 2018). Sin embargo, una de las limitaciones de este trabajo es que estos cambios se observaron en hembras a lo largo de la progresión de la enfermedad y su edad, pero sin tomar en cuenta que la edad también es un factor que modifica la microbiota intestinal.

Es por esto y en base a los antecedentes expuestos que muestran que la microbiota intestinal afecta el desarrollo del LES, en este seminario de título proponemos estudiar la microbiota fecal de hembras de la cepa de ratones susceptibles de desarrollar lupus (NZBxNZW)F1, en distintos estadios de la enfermedad y comparar los resultados con ratones machos de la misma cepa y edad similar.

Hipótesis

Existen diferencias en la composición de la microbiota intestinal de hembras de la cepa de ratones susceptibles de desarrollar lupus (NZBxNZW)F1 en los distintos estadios de la enfermedad.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Estudiar la composición de la microbiota intestinal en hembras de la cepa (NZBxNZW)F1 durante la progresión del lupus.

2.2 Objetivos Específicos

1.- Comparar la composición de la microbiota intestinal a distintos niveles taxonómicos en hembras (NZBxNZW)F1 obtenida de distintos estadios de la enfermedad.

2.- Evaluar la diversidad de la microbiota intestinal en hembras (NZBxNZW)F1 obtenida de distintos estadios de la enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales

El proyecto Fondecyt en el que se enmarca esta investigación tiene las aprobaciones del Comité de Ética Local de Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Los ratones son mantenidos en el Bioterio de la Fundación Ciencia y Vida, a los cuales se les aplica semanalmente un protocolo de supervisión que incluye medición de la proteinuria y peso y cada dos meses toma de muestra de sangre. El punto de término del protocolo es una pérdida de peso de 10%, momento en el cual los ratones son sacrificados.

Se utilizó el modelo murino de LES (NZBxNZW)F1 que proviene de la cruce de ratones NZB (New Zealand Black) y NZW (New Zealand White) ambos obtenidos de The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA y mantenidos en el bioterio de Fundación Ciencia y Vida por más de 6 meses.. Los datos de los ratones utilizados para la extracción de muestras fecales se detallan en la Tabla 1. Para evaluar el estado de la enfermedad en los ratones utilizados para el estudio de la microbiota fecal, se midió la cantidad de proteína en la orina de ratones hembra través de tiras reactivas Combur Test N. Este test tiene un indicador del 1 a 3, siendo 3 donde se tiene mayor presencia de proteína en la orina y los ratones con este nivel de proteinuria son considerados lúpicos o enfermos, el número 2 indica que el ratón se encuentra en un estado previo a la enfermedad y lo llamamos prelúpico, y finalmente el número 0 o 1 indica que el ratón no está enfermo.

En la Tabla 1 se muestra el sexo, la proteinuria en el caso de hembras, la caja a la cual pertenecían, su marca respectiva, la edad en días y meses, peso en gramos y el nombre de la muestra extraída correspondiente a cada ratón. El nombre de las muestras H corresponde a muestras extraídas de hembras y M corresponde a muestras extraídas

de machos. El número siguiente a la letra (H o M) corresponde al número de la muestra. Respecto a las hembras, las nomenclaturas “L”, “A+” y “PL” corresponden a lúpicas, autoanticuerpos anti-ADNdh positivo y prelúpicas respectivamente, las cuales fueron categorizadas según los parámetros descritos en la sección resultados. Con respecto a los machos no se midió proteinuria, pero se evaluó el nivel de autoanticuerpos anti-ADNdh por ensayo de ELISA.

Tabla 1. Datos de los ratones a los cuales se les extrajo muestras fecales para estudiar su microbiota.

Muestra	Sexo	Proteinuria ¹	Caja	Marca	Edad (Días)	Edad (Meses)	Pesos (g)	Nombre muestra
1	Hembra	3	BR	OI	237	7,9	42	H1L
2	Hembra	1	BR1	OI	238	7,9	39	H2PL
3	Hembra	3	BW	OD	215	7,2	25	H3L
4	Hembra	3	BW	OI	214	7,1	39	H4L
5	Hembra	3	BY	OD	192	6,4	40	H5L
6	Hembra	2	BY	SM	192	6,4	37	H6A+
7	Hembra	1	CA	OI	175	5,8	43	H7A+
8	Hembra	0	CA	SM	182	6,1	47	H8A+
9	Hembra	0	CC	SM	150	5	45	H9PL
10	Macho	-	BS	OD	237	7,9	45	M1
11	Macho	-	BS	OI	244	8,1	47	M2
12	Macho	-	BX	OD	215	7,2	39	M3
13	Macho	-	BX	SM	215	7,2	46	M4
14	Macho	-	BZ	OD	192	6,4	44	M5
15	Macho	-	BZ	OI	192	6,4	43	M6
16	Macho	-	CB	OD	175	5,8	47	M7
17	Macho	-	CB	SM	175	5,8	52	M8
18	Macho	-	CD	OI	170	5,7	50	M9

¹Proteinuria 3: lúpico; proteinuria 2: prelúpico; proteinuria 1 o 0: sanos; - no se realizó la medición.

3.2 Ensayo de ELISA

Se evaluó mediante ensayo convencional de ELISA anticuerpos anti-ADNdh en el suero de los ratones que se detallan en la tabla 1 (a excepción de la muestra M9). Para la realización de este ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano cubiertas con 65 ng de ADN de timo de cabra disuelto en 100µL de buffer SSC (NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M pH 8) por pozo. Se incubó por 18 horas a 37°C para luego lavar tres veces con PBS-Tween 0,05%. Las placas se bloquearon con PBS-Tween 0,05%

durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se agregaron los sueros de ratones diluidos 1/250 en PBS-Tween 0,05% y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la placa tres veces con PBS-Tween 0,05% y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra, conjugado a HRP diluido 1/2000 en PBS-Tween 0,05%. Finalmente, la placa se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se agregó 100 μ L por pozo del sustrato proveniente del kit TMB Substrate Reagent Set. La reacción se detuvo con 50 μ L de solución 1M de H_3PO_4 por pozo a los 5 minutos para posteriormente leer las densidades ópticas a 450 nm en un lector de placas.

Los resultados de anticuerpos anti-ADNdh obtenidos del ensayo de ELISA se graficaron utilizando el programa Graph Pad Prism V9.0.1.

3.3 Extracción de muestras fecales de ratón

Para la extracción de muestras fecales de ratones, se tomó el ratón vivo y se extrajo la feca del animal con pinzas esterilizadas para ser almacenada en un tubo eppendorf esterilizado de 1,5 mL previamente rotulado y masado. Como alternativa del procedimiento anterior, los ratones se dejaban en una caja estéril, para posteriormente extraer la muestra fecal y ser almacenada en un tubo eppendorf esterilizado de 1,5 mL previamente rotulado. Luego de la obtención de las muestras se masaron nuevamente los tubos eppendorf para obtener y registrar los miligramos de heces extraídas de cada muestra. Finalmente, las muestras se almacenaron a $-80^{\circ}C$.

3.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de bacterias presentes en las muestras fecales de ratones descritas en la Tabla 1 que fueron extraídas según lo descrito en sección 3.3, se utilizó el protocolo de extracción de ADN (versión definida como “pathogen detection” en el manual del kit) modificado del kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit, el cual consiste principalmente en homogeneizar las muestras fecales, luego se suspenden en InhibitEX Buffer que separa los inhibidores del ADN. Tras una lisis rápida, el ADN se une a la membrana de sílice QIAamp. Todos los inhibidores y contaminantes restantes se eliminan mediante pasos de lavado, luego se eluye el ADN puro e intacto de la columna.

3.5 Secuenciación e identificación taxonómica

Para obtener las secuencias de las bacterias presentes en cada muestra fecal, las muestras de ADN extraídas según lo descrito anteriormente fueron amplificadas para el gen del ARN ribosomal 16S con primers universales 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') y posteriormente secuenciadas mediante Illumina MiSeq utilizando el servicio de MR DNA (<https://www.mrdnalab.com>), quienes además realizaron la identificación taxonómica de cada uno de los zOTUs (unidades taxonómicas operacionales de distancia cero) presentes en las muestras. Previo a esto último, las secuencias deben ser depuradas, lo cual consiste en primer lugar en la remoción de los primers utilizados para la amplificación y la remoción de las secuencias cortas (menores a 150 bases) ya que son inespecíficas para la asignación. Luego utilizaron un filtro de secuencias de baja calidad en el cual asignan como máximo error esperado en la secuencia que sea de una base. Posteriormente realizaron un dereplicado en el cual agrupan secuencias idénticas e

indican la abundancia de éstas. Para la generación de los zOTUs realizaron un último paso de filtro de secuencias, el cual consta de una desonorización en el cual se busca eliminar los errores de secuencias que hayan sido producidos principalmente por errores en la amplificación. Para esto se utiliza un criterio de abundancia en el cual, si hay presente dos secuencias muy conocidas, una con alta abundancia y otra con baja abundancia, bajo ciertos parámetros se puede inferir que la secuencia de baja abundancia corresponde a la de alta abundancia, pero se le atribuye a que existe algún error en la amplificación. Posteriormente se generan los denominados zOTUs, los cuales corresponden a las secuencias agrupadas con un 100% de identidad. Finalmente, para asignar cada zOTU a su taxonomía correspondiente se realizó un BLASTn.

3.6 Análisis de resultados

Los resultados obtenidos de la secuenciación, la asignación taxonómica y el análisis de diversidad (índice de Shannon) fueron analizados con R en RStudio utilizando los paquetes phyloseq para manejar los datos de las comunidades bacterianas presentes en las muestras y ggplot2 para graficar los resultados obtenidos. Para los zOTUs que no pudieron ser identificados a nivel de género según los criterios indicados por MR DNA (los cuales se encuentran indicados en la Tabla 2), se realizó un agrupamiento generando grupos con nombres arbitrarios según estos mismos criterios para indicar cuales zOTUs se encontrarían en un mismo género sin que éste sea necesariamente identificado.

El cladograma mostrado en los gráficos de heatmap fue realizado manualmente considerando el género a las cuales pertenece cada zOTU y las relaciones entre éstos utilizando la herramienta *common tree* de la base de datos de NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi>) y el paquete de R phytools.

Tabla 2. Criterio de identificación según metodología entregada por MR DNA

Identidad de secuencia	Se puede clasificar en
Mayor a 95%	Género
Mayor a 90%	Familia
Mayor a 85%	Orden
Mayor a 80%	Clase
Mayor a 77%	Filo

4. RESULTADOS

Para caracterizar y agrupar las muestras según los estadios de la enfermedad primero procedimos a realizar un ensayo de ELISA para medir los autoanticuerpos anti-ADNdh presentes en el suero sanguíneo de los ratones descritos en Tabla 1, excepto el caso del ratón M9, para el cual no se encuentra sus datos respectivos en el ensayo de ELISA. De acuerdo con la Figura 1, se puede observar que en ratones hembra (círculos rojos) hay un aumento de la absorbancia, como es el caso del ratón H3, H4, H5, H6, H7 y H8 (hembras lúpicas o que sin tener proteinuria +3, poseen anti-ADNdh) por sobre el control positivo (C+, círculo negro). Solo las hembras prelúpicas H2 y H9 no muestran producción de autoanticuerpos. En el caso de ratones macho (triángulos azules) se observa ausencia de un aumento de la absorbancia en todas las muestras.

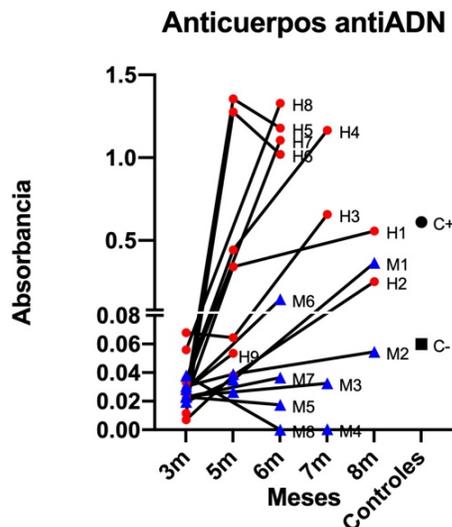


Figura 1. Evaluación de autoanticuerpos anti-ADNdh por ELISA en ratones hembras y machos a lo largo del tiempo. Los círculos rojos corresponden a muestras de ratones hembra y los triángulos azules corresponden a ratones macho. Como control negativo (C-, cuadrado negro) se utilizó suero obtenido de un ratón hembra no lúpico proveniente de una cruce NZW/Balbc y como control positivo (C+, círculo negro) se utilizó un ratón hembra lúpica. En el eje Y se utilizó un cambio en la escala del eje simbolizada por dos barras horizontales para visualizar de mejor manera los puntos que se agrupan en una baja absorbancia.

En base a estos resultados y los datos de proteinuria de las muestras pertenecientes a hembras descritos en tabla 1 (ver Materiales y Métodos, Sección 3.1), se agruparon las

muestras en tres categorías, siendo la primera “PL” (prelupico), la cual corresponde a hembras sin autoanticuerpos anti-ADNdh y proteinuria menor a 3. Luego la categoría “A+” (con autoanticuerpos positivos), la cual corresponde a hembras con alto nivel de autoanticuerpos y proteinuria menor a 3. La última categoría “L”, corresponde a hembras lúpicas que presentan un alto nivel de autoanticuerpos anti-ADNdh y proteinuria mayor a 3.

Para observar la composición microbiana de las distintas muestras, se realizaron gráficos de barra como se observan en las figuras 2 y 3. Se determinó un orden de las muestras en los gráficos, donde al lado izquierdo se muestran los resultados de las hembras lúpicas (L), seguida de los resultados de las hembras (A+) y luego hembras prelúpicas (PL). Finalmente a la derecha se encuentran las muestras pertenecientes a los machos.

En las Figuras 2 y 3 se pueden observar gráficos de barras que representa la abundancia relativa de las bacterias presentes en cada muestra a distintos niveles taxonómicos. En la Figura 2 se observan los gráficos de barras a nivel de Filo (Figura 2A), Clase (Figura 2B) y Orden (Figura 2C) para cada muestra extraída de los ratones descritos en Tabla 1. A grandes rasgos se puede observar que los gráficos son similares entre sí, lo cual se atribuye a que los filos con mayor abundancia están representados principalmente por una única clase y único orden. Según esto, lo descrito a nivel de orden se puede observar también a nivel de filo y de clase considerando la taxonomía a la cual pertenecen estos ordenes.

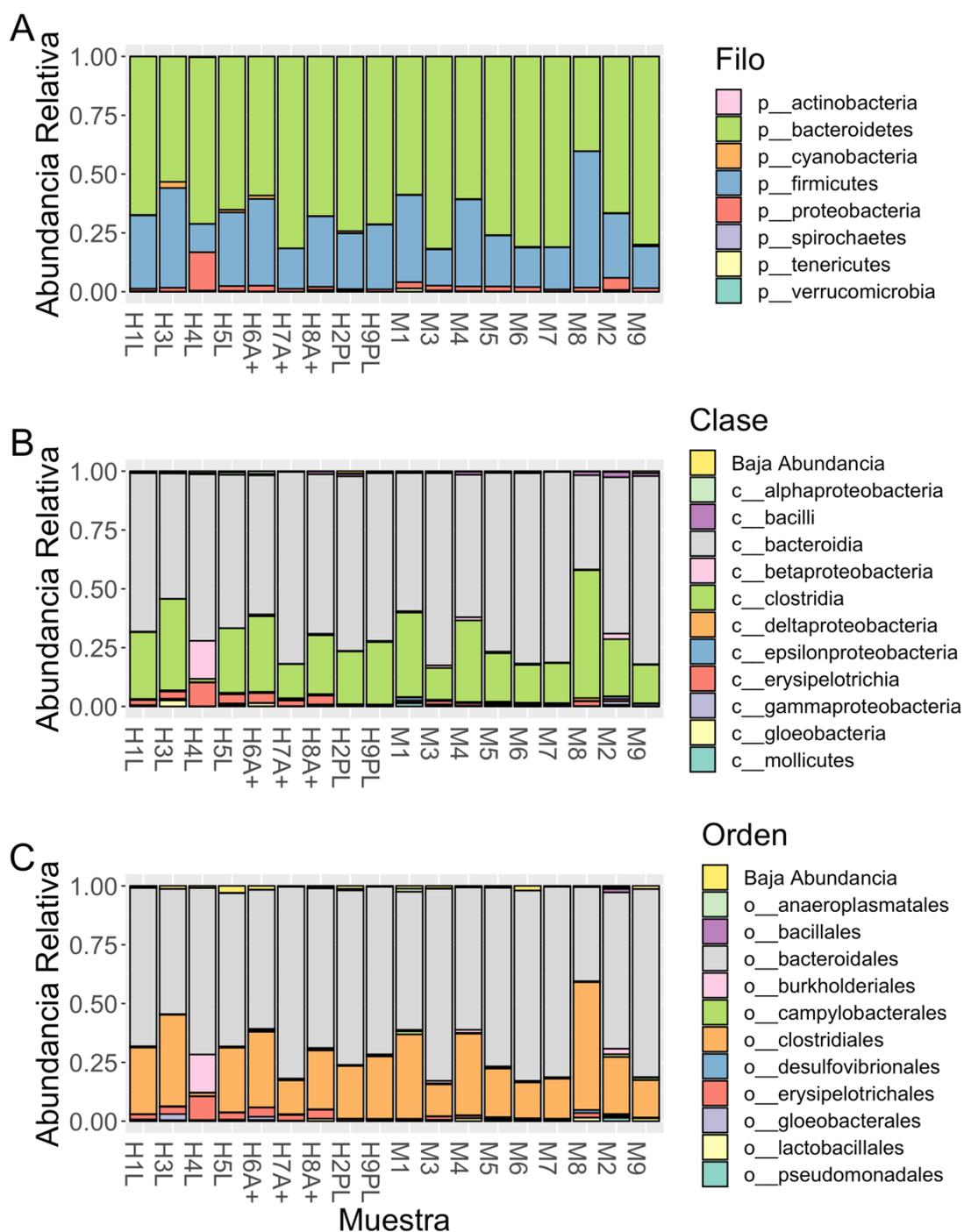


Figura 2. Gráfico de barras correspondiente a la abundancia relativa a distintos niveles taxonómicos de las bacterias obtenidas en cada muestra analizada. Se muestran los niveles taxonómicos de Filo (A), Clase (B) y Orden (C). La nomenclatura del nombre de cada muestra se detalla en Materiales y Métodos. Se denominó como “Baja Abundancia” a los niveles taxonómicos que tuvieran una abundancia relativa menor al 1% para clase y orden, las cuales fueron agrupadas para poder visualizar de mejor manera el gráfico. Gráfico realizado en Rstudio con los paquetes phyloseq y ggplot2.

Los ordenes que se encuentran en una mayor abundancia en la mayoría de las muestras corresponden a *Bacteroidales* y *Clostridiales*, representantes principales de la clase *Bacteroidia* perteneciente al filo *Bacteroidetes* y de la clase *Clostridia* perteneciente al filo *Firmicutes* respectivamente.

Se puede visualizar que la muestra H4L y M8 presentan abundancias relativas en estos 3 niveles taxonómicos que se diferencian del resto de muestras. En el caso de la muestra H4L presenta una mayor abundancia del filo *Bacteroidetes* con un 70%, seguida del filo *Proteobacteria* (representada principalmente por el orden *Burkholderiales* de la clase *Betaproteobacteria*) con un 16% y luego con un 12% del filo *Firmicutes*. Además, a diferencia del resto de las muestras, en la muestra H4L el filo *Firmicutes* está representado principalmente por el orden *Erypsipelotrichiales* perteneciente a la clase *Erypsipelotrichia*. En el caso de la muestra M8 el filo con mayor porcentaje de abundancia relativa comparado con todo el resto de las muestras corresponde a *Firmicutes* con un 58%, seguido de *Bacteroidetes* con un 48%.

A pesar de estas diferencias particulares, no se observaron grandes diferencias de los filos, clases y ordenes en los distintos estadios de la enfermedad.

En la Figura 3 se puede observar un gráfico de barra que representa las abundancias relativas de las bacterias en cada muestra a nivel de familia.

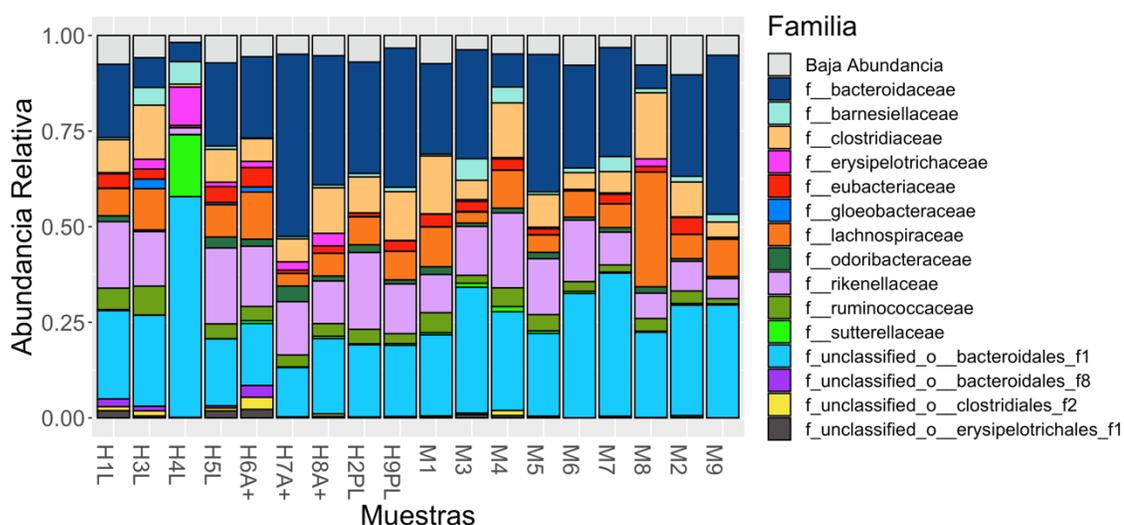


Figura 3. Gráfico de barras correspondiente a la abundancia relativa a nivel de Familia de las bacterias obtenidas en cada muestra analizada. La nomenclatura del nombre de cada muestra se detalla en Materiales y Métodos. Se denominó como “Baja Abundancia” a las familias que tuvieran una abundancia relativa menor al 2%, las cuales fueron agrupadas para poder visualizar de mejor manera el gráfico. Gráfico realizado en Rstudio con los paquetes phyloseq y ggplot2.

Se puede observar que las familias que presentan una abundancia relativa en todas las muestras corresponden a *Bacteroidaceae*, una familia del orden *Bacteroidales* no clasificada, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* y *Clostridiaceae*. Las muestras H2PL, H9PL, H7A+ y H8A+, las cuales corresponden a hembras prelúpicas y ratones hembra con autoanticuerpos anti-ADNdh y proteinuria menor a 3, presentan una disminución en su abundancia relativa de la familia del orden *Bacteroidales* no clasificada con abundancias relativas porcentuales de 18,9%, 18,6%, 12,9% y 19,7% respectivamente y un aumento de la abundancia relativa de la familia *Bacteroidaceae* de 29,2%, 36,4%, 47,7% y 33,8% respectivamente, comparado con muestras extraídas de ratones machos y de ratones hembras lúpicas. También se puede observar que la abundancia relativa de la familia *Rikenellaceae* se mantiene constante a excepción de las muestras M2, M7, M8 y M9 en las cuales son menores con abundancias relativas porcentuales de 7,8%, 8,5%, 6,6% y 5,2% respectivamente. Al igual que en la Figura 2 las muestras H4L y M8 son las muestras que presentan mayor diferencia en las abundancias relativas en

general comparado con el resto de las muestras. La muestra H4L presenta una aumentada abundancia relativa del 57,7% la familia del orden *Bacteroidales* no clasificada, seguido de la familia *Suterellaceae* con un 16,2%, la cual se observa en un porcentaje muy bajo en el resto de las muestras. La muestra M8 presenta un aumento de la abundancia relativa con un 29,9% perteneciente a la familia *Lachnospiraceae* y una disminución de la abundancia relativa de la familia *Bacteroidaceae* con un 6,1% de abundancia respecto del total de familias de la muestra.

Por lo tanto, a nivel de familia se pudo observar una composición bacteriana más variable a diferencia de los niveles taxonómicos mayores. Las bacterias pertenecientes a las familias *Rikenellaceae*, *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*, se mantuvieron constantes independientemente de los estadios de la enfermedad. Finalmente la familia *Bacteroidaceae* disminuye en las hembras lúpicas, no así en las hembras A+ y pre-lúpicas.

Para evaluar la variación de la composición de la microbiota en las 3 categorías de hembras (“Pre-Lúpico”, “A+” y “Lúpico”), se realizaron graficos de heatmap a nivel de Filo (Figura 4A) y Clase (Figura 4B) con su cladograma respectivo. Para esto se calculó la razón entre la abundancia relativa promedio de cada categoría respecto al promedio de abundancia relativa de los machos, la cual está indicada en logaritmo base 2. Respecto a los colores observados en las siguientes figuras, el color rojo representa una mayor abundancia de esa taxa en hembras de la categoría respectiva, mientras que el color azul representa una mayor abundancia de esa taxa en los machos. Los cuadros grises corresponden a la ausencia de esa taxa tanto para las hembras de la categoría respectiva como también para macho. Si la taxa está ausente solo en una de los dos, el heatmap fue modificado para poder observar uno de los dos colores intensos, es decir, si la taxa está ausente únicamente en hembras de la categoría respectiva se visualizará

de color azul intenso y si la abundancia de una taxa es cero en los machos se visualizará de color rojo intenso. Esto es importante, ya que de no hacerse esta modificación no se puede calcular el logaritmo de la división entre abundancias relativas de las muestras respectivas y no se podría observar la taxa respectiva en el heatmap.

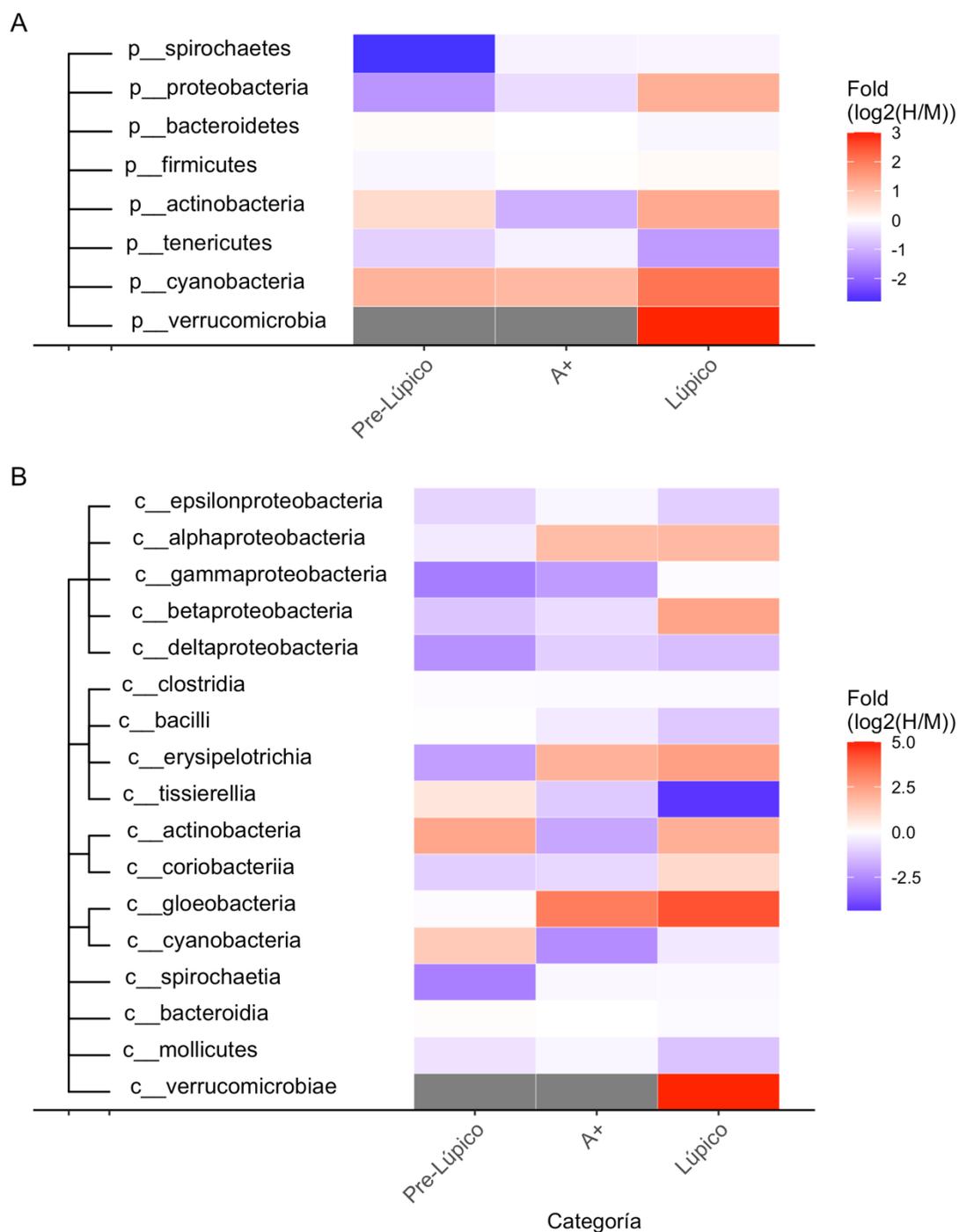


Figura 4. Gráfico Heatmap que visualiza las veces de cambio a nivel de Filo (A) y Clase (B) calculado como la razón entre el promedio de la abundancia relativa de cada categoría y el promedio de la abundancia relativa de los machos. El color rojo representa una mayor abundancia de esa taxa en hembras de la categoría respectiva mientras que el color azul representa una mayor abundancia de esa taxa en los machos. Los cuadros grises corresponden a la ausencia de esa taxa para la categoría respectiva como también para machos.

En la Figura 4 se puede observar que hay distintas variaciones de las tasas en los distintos estadios de la enfermedad. Por un lado las clases *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* y su filo correspondiente *Proteobacteria*, la clase *Gloeobacteria* y su filo correspondiente *Cyanobacteria* y la clase *Erysipelotrichia* aumentan a medida que progresa la enfermedad. Al contrario, las clases *Bacilli* y *Tissierellia* disminuyen a medida que progresa la enfermedad. Además la clase *Coriobacteriia* y su filo correspondiente *Actinobacteria* y la clase *Verrucomicrobiae* y su filo *Verrucomicrobia* aumentan únicamente en la etapa lúpica de la enfermedad. Por ultimo, la clase *Bacteroidia* y su filo correspondiente *Bacteroidetes*, la clase *Clostridia* y su filo *Firmicutes*, la clase *Mollicutes* y su filo correspondiente *Tenericutes* y las clases *Epsilonproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* permanecieron relativamente constantes en los distintos estadios de la enfermedad. Por lo tanto, se pudieron observar tasas que variaron con los distintos estadios de la enfermedad, como también tasas en las que no se observaron diferencias.

Para evaluar si se ve afectada la diversidad de la microbiota intestinal en los distintos estadios de la enfermedad, se realizó un análisis de diversidad alfa calculando el índice de Shannon en relación a las categorías de los ratones a los cuales se les extrajo la muestra. Este análisis se representa mediante un gráfico de puntos, el cual se puede observar en la Figura 5. Las categorías que se observan en el eje x para ratones hembras se encuentran: "Lúpicas", "A+" y "Pre-lúpicas". Mientras que las muestras pertenecientes a ratones machos se agruparon en la categoría "No lúpicos". Se puede observar en la Figura 5 que la categoría "Lúpico" en general presenta un índice de Shannon mayor comparado con las categorías "A+" y "Pre-lúpico", sin embargo, este índice de Shannon no supera al que presenta la categoría "No lúpico" perteneciente a muestras de ratones machos controles.

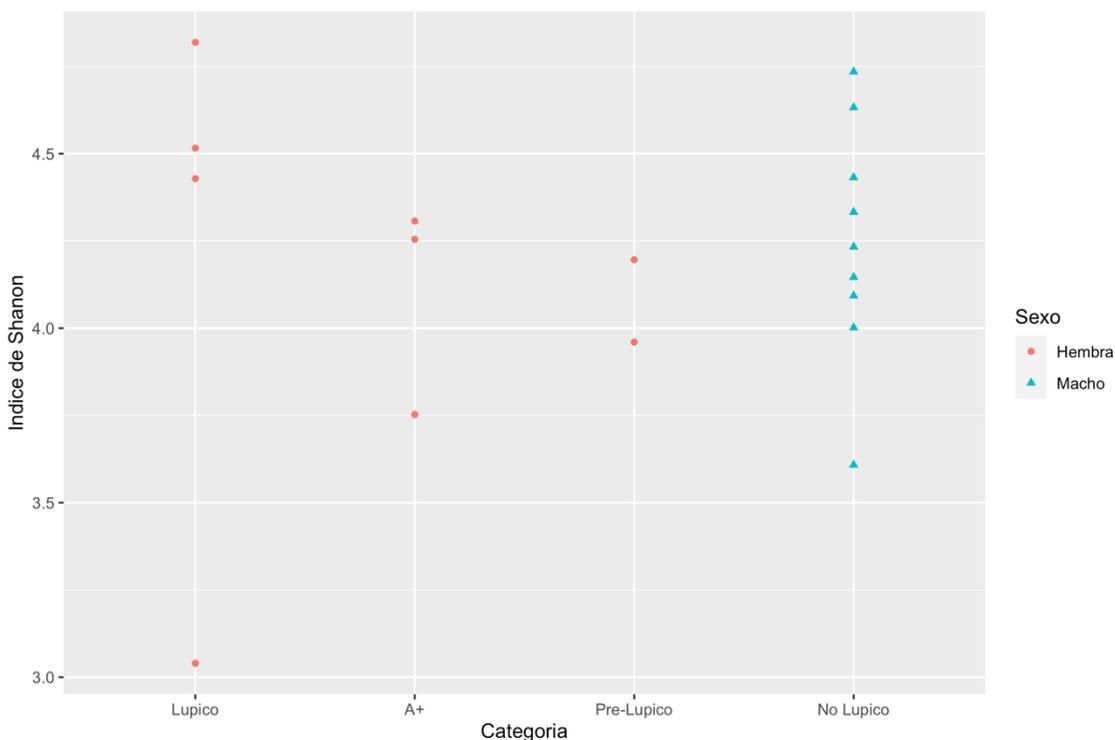


Figura 5. Gráfico de puntos de la diversidad representada como el índice de Shannon en relación con las categorías, las cuales corresponden para ratones hembra: lúpicas, A+ y prelúpicas y para ratones macho la categoría no lúpicas. Las muestras presentan una simbología según el sexo, en el cual el triángulo celeste corresponde a muestras provenientes de ratones macho y el círculo rojo corresponde a muestras provenientes de ratones hembra.

Para observar visualmente que tan diferentes son las muestras en base a su composición y abundancia taxonómica a través de su distancia espacial en el gráfico, se realizaron gráficos PCoAs los cuales permiten agrupar las muestras por similitud presente a distintos niveles taxonómicos (diversidad beta), calculado utilizando la distancia Unifrac sopesada.

La figura 6 corresponde al gráfico PCoA a nivel de orden y se puede observar que existe una agrupación espacial (círculo azul) en las muestras M3, M6, M7 y M9 las cuales corresponden a muestras de machos y H7A+ la cual corresponde a una muestra de hembra con autoanticuerpos anti-ADNdh y proteinuria menor a 3. Además, se puede

observar una segunda agrupación (círculo rojo) entre las muestras H1L, H3L y H5L las cuales corresponden a muestras de hembras lúpicas junto con la muestra H6A+ y H8A+ que corresponden a muestras de ratón hembra con autoanticuerpos anti-ADNdh. Estas muestras se encuentran agrupadas junto a las muestras que corresponden a machos M1, M2 y M4.

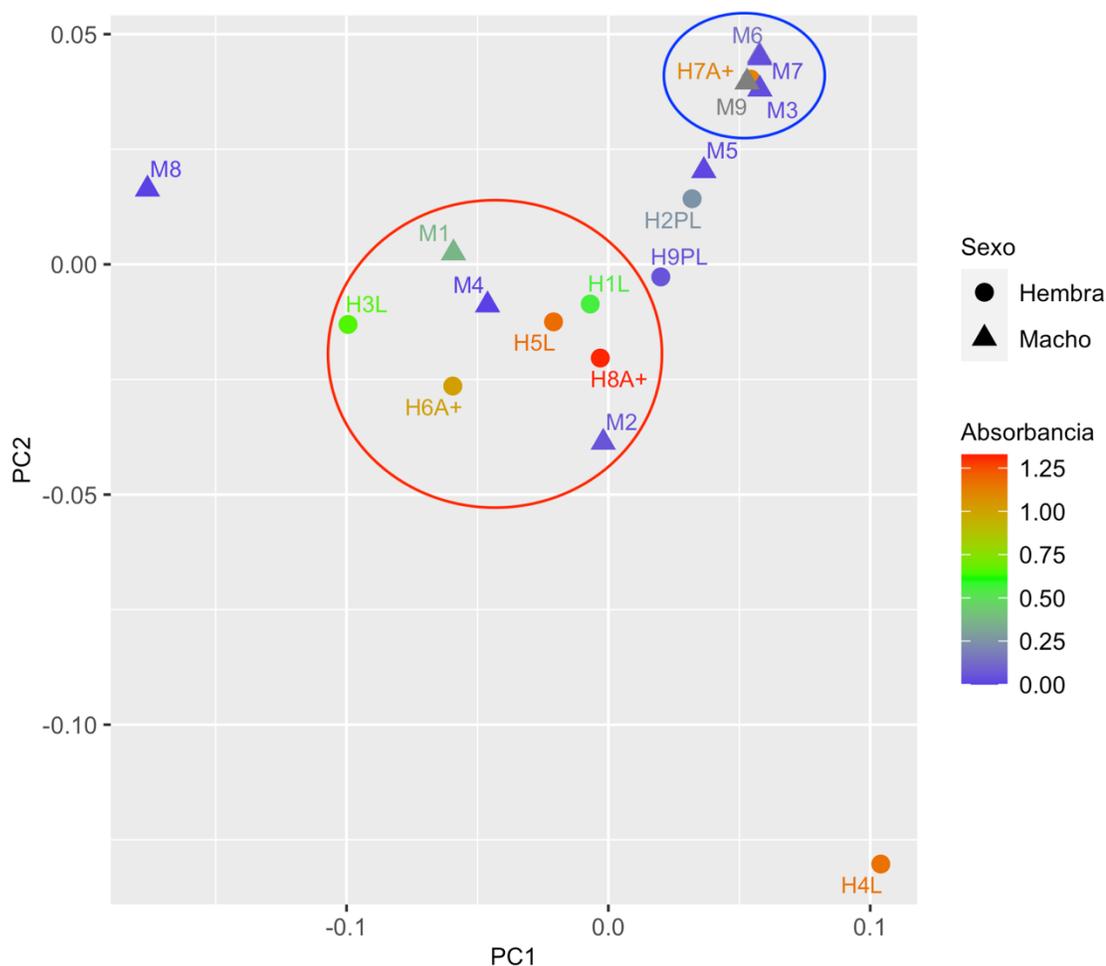


Figura 6. Gráfico PCoA que visualiza las diferencias entre las muestras estudiadas a nivel de Orden. Las muestras presentan una simbología según el sexo, en el cual el triángulo corresponde a muestras provenientes de ratones macho y el círculo corresponde a muestras provenientes de ratones hembra. Las muestras presentan un código de colores para su absorbancia respectiva. El color verde representa la absorbancia del control positivo, es decir los colores verdes a rojo indican que el ratón presenta autoanticuerpos anti-ADNdh, mientras que el color azul representa la ausencia de estos autoanticuerpos. Los círculos mostrados fueron hechos manualmente según donde se agrupan visualmente la mayoría de las hembras (rojo) y la mayoría de los machos (azul).

También se puede notar que espacialmente entre estas dos agrupaciones descritas anteriormente se encuentran las muestras M5 y H2PL y H9PL, correspondiendo estas dos últimas muestras a hembras prelúpicas. Las muestras H4L y M8 se encuentran muy alejados espacialmente de las demás muestras, lo cual se asemeja a lo descrito anteriormente en los gráficos de barra que corresponden a las Figuras 2 y 3 respecto a su composición taxonómica comparado con las demás muestras. Cabe destacar que esta distribución espacial descrita también se observó en gráficos de PCoA a nivel de filo y clase (datos no mostrados).

En la figura 7 se puede observar un gráfico de PCoA que corresponden a nivel de género. Se observa una agrupación de las muestras M3, M6, M7 y M9 (circulo azul), lo cual también se observó en la figura 6, pero con la diferencia que en la Figura 7 se alejó espacialmente la muestra H7A+ a nivel de género. La segunda agrupación (circulo rojo) que se observa en la Figura 7 corresponde a las muestras H1L y H5L, junto con la muestra H6A+ y H8A+. Además, estas muestras están agrupadas con H2PL y H9PL que corresponden a muestras de ratones hembra prelúpicas y la muestra M5 que corresponde a muestra de macho, lo cual no se observó en la Figura 6 a nivel de orden, ya que estaban espacialmente entre las dos agrupaciones.

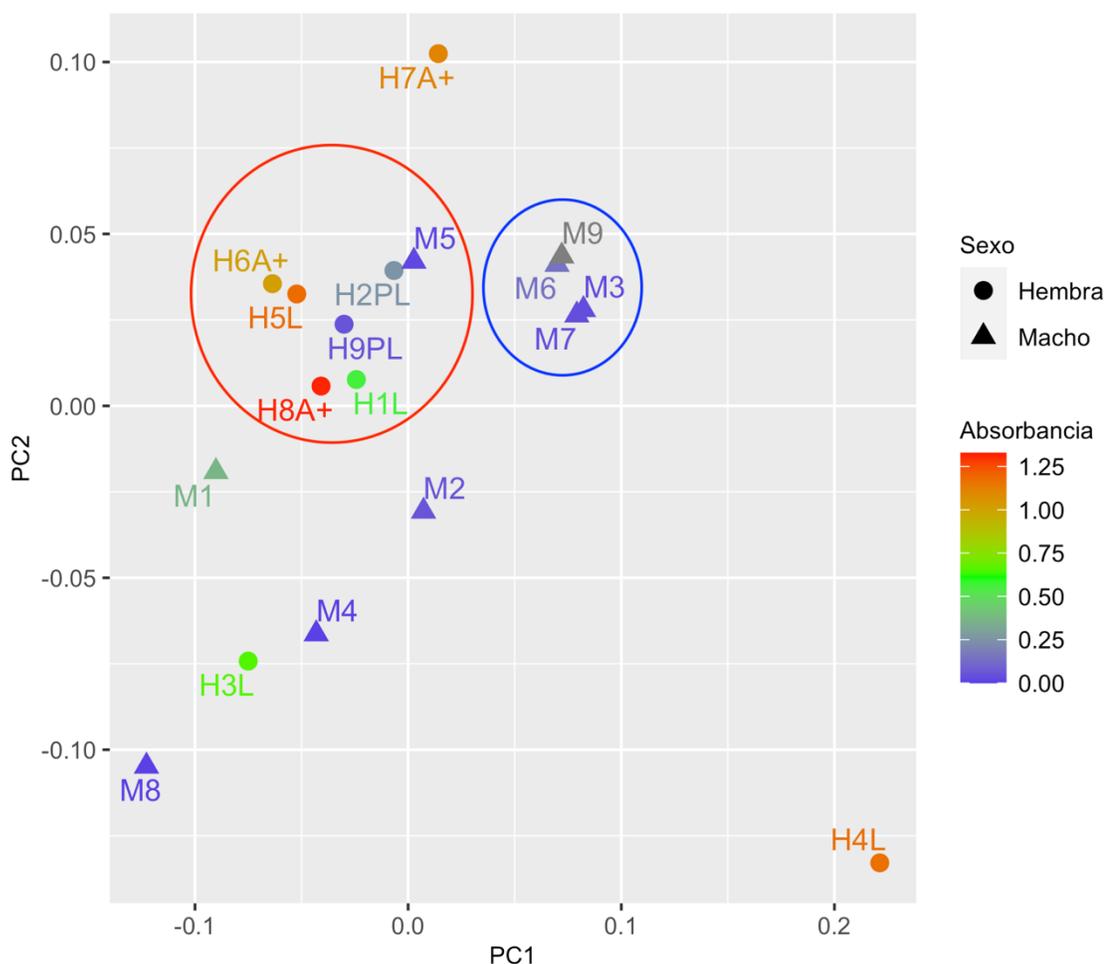


Figura 7. Gráfico PCoA que visualiza las diferencias entre las muestras estudiadas a nivel de Género. Las muestras presentan una simbología según el sexo, en el cual el triángulo corresponde a muestras provenientes de ratones macho y el círculo corresponde a muestras provenientes de ratones hembra. Las muestras presentan un *código* de colores para su absorbancia respectiva. El color verde representa la absorbancia del control positivo, es decir los colores verdes a rojo indican que el ratón presenta autoanticuerpos anti-ADNdH, mientras que el color azul representa la ausencia de estos autoanticuerpos. Los círculos mostrados fueron hechos manualmente según donde se agrupan visualmente la mayoría de las hembras (rojo) y la mayoría de los machos (azul).

Lo descrito anteriormente para esta segunda agrupación se observó también en la Figura 6 a nivel de orden y a nivel de filo y clase (datos no mostrados), con excepción de la muestra H3L que se alejó espacialmente junto con las muestras M1, M2 y M4. Las muestras M8 y H4L no variaron su distribución espacial, ya que se mantuvieron muy alejados espacialmente de las demás muestras, similar a lo descrito en la Figura 6 y en

la Figura 2 y 3 correspondientes a gráfico de PCoA a nivel de familia y gráficos de barra a nivel de filo, clase, orden y familia respectivamente, al observarse una composición taxonómica distinta a las demás muestras.

Por lo tanto, se pudo observar a grandes rasgos una agrupación espacial entre hembras lúpicas y A+ y otra agrupación para machos, además de encontrarse entre ambas agrupaciones hembras prelupicas hasta el nivel taxonómico de orden. Luego para el nivel de Género se observa una agrupación espacial entre hembras y otra entre machos, salvo excepciones particulares.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la secuenciación del 16S en las heces de los ratones fueron comparados entre las hembras enfermas de lupus (lúpicas, HL), hembras que producen autoanticuerpos pero que no presentan proteinuria (HA+), hembras sanas (prelúpicas, HPL) y machos sanos de la misma cepa (M). Observamos que en el conjunto de los ratones los filos más abundantes fueron *Bacteroidetes* seguida de *Firmicutes*, lo cual se ha descrito en la literatura como los principales filos que componen la microbiota intestinal en humanos (Qin et al., 2010).

Los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* están representados en las muestras analizadas casi en su totalidad por el orden *Bacteroidales* perteneciente a la clase *Bacteroidia* y el orden *Clostridiales* de la clase *Clostridia* respectivamente. En la literatura se ha descrito que en ratones la clase *Clostridia* tiene un efecto anti-inflamatorio al inducir la proliferación de células Treg que expresan el factor de transcripción Foxp3 (Atarashi et al., 2011). Sin embargo, para los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* y sus clases mayoritarias *Bacteroidia* y *Clostridia* no se observaron diferencias en los gráficos de heatmap en ningún estadio de la enfermedad. Otras taxas que han sido asociadas al LES son la clase *Mollicutes* del filo *Tenericutes*, que disminuyó en pacientes chinos del sexo femenino con LES (Y. Li et al., 2019) y la clase *Epsilonproteobacteria* que se encontró enriquecida en pacientes chinos del sexo femenino con LES activo (Y. Li et al., 2019). Sin embargo, en nuestro estudio estas taxas no variaron en los distintos estadios de la enfermedad.

Con respecto al filo *Actinobacteria* y una de sus clases *Coriobacteriia*, nuestros resultados muestran un aumento únicamente en las hembras lúpicas, lo cual ha sido observado para el filo *Actinobacteria* en pacientes del sexo femenino de nacionalidad china con lupus de por lo menos un año y sin tratamiento por un mes (He et al., 2016).

Por otro lado, con respecto a las otras clases pertenecientes al filo *Firmicutes*, éstas tuvieron cambios graduales en los distintos estadios de la enfermedad. Por ejemplo, la clase *Erysipelotrichia* aumentó en hembras con la progresión de la enfermedad y las clases *Bacilli* y *Tissierellia* disminuyeron con la progresión de la enfermedad. Con respecto a la clase *Erysipelotrichia* se ha reportado anteriormente que esta taxa se encuentra enriquecida en ratones lúpicos hembras del modelo RTC (SLE) (Ma et al., 2019). Para la clase *Tissierellia* no existe información en la literatura relacionada con lupus. Respecto a la clase *Bacilli* encontramos que en las muestras evaluadas, esta clase está compuesta principalmente por el orden *Lactobacillales*, el cual ha sido observado en otros estudios donde su abundancia relativa disminuye en hembras pre-lupicas de 5 semanas pertenecientes al modelo murino MRL/lpr (Mu et al., 2017).

Con respecto a la clase *Gloeobacteria* y su filo *Cyanobacteria*, aumentaron con el progreso de la enfermedad. El filo *Cyanobacteria* ha sido asociada al LES pero no a nivel de microbiota intestinal, sino que a nivel de microbiota oral, en la cual se ha observado un aumento de este filo en pacientes con LES de nacionalidad china (B. Z. Li et al., 2020).

Con respecto a las clases *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, y su filo *Proteobacteria*, en nuestro estudio aumentó su abundancia relativa a medida que progresaba la enfermedad. Este aumento del filo *Proteobacteria* ha sido reportado anteriormente en pacientes del sexo femenino de nacionalidad china con lupus de por lo menos un año y sin tratamiento por un mes (He et al., 2016).

La clase *Verrucomicrobia* que representa en su totalidad al filo *Verrucomicrobiae* está asociada exclusivamente a hembras lupicas en el gráfico de heatmap, sin embargo, estuvo presente solo en 2 muestras (H3L y H4L). Los ratones de los que se extrajo estas

muestras se encontraban compartiendo caja, lo cual podría explicar porque son las únicas que poseen esta clase, es decir, en este caso la presencia de una clase únicamente en dos muestras podría ser explicada por el efecto caja.

A nivel de familia se pudo observar una composición mas variable, aunque las bacterias pertenecientes a las familias *Rikenellaceae*, *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*, se mantuvieron constantes independientemente de la condición del ratón. En la literatura se ha reportado el aumento de bacterias de la familia *Rikenellaceae* con un LES más severo en hembras del modelo murino SNF1 (Johnson et al., 2015), un aumento de bacterias pertenecientes a la familia *Ruminococcaceae* con el progreso de la enfermedad en el modelo murino (NZBxNZW)F1 (Luo et al., 2018) y una disminución de bacterias de la familia *Lachnospiraceae* con el desarrollo de esta enfermedad en el modelo murino MRL/lpr en hembras, no así en machos (Zhang et al., 2014). Sin embargo, en la literatura se encuentran resultados opuestos en pacientes mujeres de nacionalidad china con LES de por lo menos un año y sin tratamiento por un mes (He et al., 2016) y en mujeres de origen caucásico con LES en remisión sin tratamiento a lo largo de 6 meses en los cuales hubo una disminución de bacterias pertenecientes a la familia *Ruminococcaceae* (Hevia et al., 2014).

Por otro lado, la familia *Bacteroidaceae* disminuye en las hembras lúpicas, no así en las hembras A+ y pre-lúpicas. Lo opuesto se observó para esta familia en otro estudio, en donde se vio un aumento de esta taxa en pacientes mujeres de nacionalidad china con LES de por lo menos un año y sin tratamiento por un mes (He et al., 2016).

Una posible explicación a las diferencias encontradas entre nuestros resultados y la literatura con respecto a la variación de la abundancia de algunas taxas en los diferentes estadios de la enfermedad, sería la diferencia entre los individuos estudiados, incluyendo pacientes con LES de distintas etnias y distintos modelos murinos de lupus, esto

considerando el rol que tiene el *background* genético en la determinación de la microbiota, de manera que a mayor distancia genética entre individuos, mayor es la diferencia entre las microbiotas (Hildebrand et al., 2013). En el caso de los modelos murinos, la diferencia a nivel genético sería principalmente en los loci de susceptibilidad que estos poseen, los cuales generan que los ratones propensos al lupus manifiesten la enfermedad con sintomatología distinta (Morel et al., 2011). Por ejemplo, al comparar los modelos (NZBxNZW)F1 y MRL/lpr el primero se caracteriza por desarrollar glomerulonefritis y un aumento de los anticuerpos anti-ADNdh en hembras, mientras que el segundo desarrolla una mayor variedad de autoanticuerpos, como anti-ADNdh, anti-ADN de hebra simple y anti complejos con ARN, lo que resulta en un alto número de complejos inmunes en ratones de ambos sexos (Morel et al., 2011). Sería esperable que estas diferencias fenotípicas y de sintomatología afecten a la microbiota de manera distinta. Considerando esto, podría ser interesante realizar estudios que permitan correlacionar las distintas sintomatologías del lupus con cambios en la composición de la microbiota intestinal, para saber si es que síntomas particulares de esta enfermedad son capaces de afectar la composición de la microbiota intestinal y si alguno de estos síntomas podría ser más preponderante que otro al momento de afectar a la microbiota. En el caso de las distintas etnias a las que pertenecen los pacientes, también es importante considerar las diferencias culturales entre éstas, en especial en relación a la dieta, la cual se conoce que afecta a la microbiota, como por ejemplo cambios en la ingesta de vitamina A, D y ácidos grasos insaturados, los cuales pueden afectar la abundancia de bacterias filamentosas segmentadas (Yacoub et al., 2018). Otra posible explicación de estas discrepancias, podría ser los distintos estados de la enfermedad que se estudian, ya sea un estado activo, remanente o de latencia, ya que se ha observado en hembras lupicas (NZBxNZW)F1 que su microbiota intestinal varía en los

estadios de la enfermedad (Luo et al., 2018). Adicionalmente, la mayoría de estas diferencias encontradas se observan a nivel de familia, lo cual podría ser explicado por el hecho que en este trabajo no se pudieron correlacionar la mayoría de las familias encontradas con la progresión del lupus, esto debido a que las abundancias relativas de cada familia eran altamente variables entre muestras, incluso dentro de una misma categoría.

Se ha observado que en el lupus se ve afectada la diversidad de la microbiota intestinal, sin embargo, dependiendo del estudio existe un aumento o una disminución de la diversidad con la progresión del lupus (Ma et al., 2019). Por esta razón, consideramos evaluar la diversidad alfa en nuestras muestras y encontramos que es mas alta en las muestras pertenecientes a las hembras lúpicas, comparado con las categorías “A+” y “Pre-lúpicas”, pero similar comparada con los ratones machos. Esto es similar a algunos estudios en los cuales se ha observado un aumento de la diversidad en hembras propensas al lupus del modelo murino MRL/lpr al compararlas con hembras control sanas de la cepa MRL (Zhang et al., 2014), y un aumento de la diversidad en la progresión del lupus en hembras del modelo murino (NZBxNZW)F1 (Luo et al., 2018). Sin embargo, es opuesto a otros estudios en los cuales se ha descrito que la diversidad alfa es menor en hembras del modelo murino RTC de LES de entre 34 y 36 semanas comparado con el grupo control conformado de hembras de la misma edad de la cepa C57BL/6 (Ma et al., 2019), lo mismo se ha descrito en pacientes de nacionalidad china con LES sin tratamiento previo durante 3 meses comparado con el grupo control (B. Chen et al., 2019). Estas discrepancias en el cambio de la diversidad alfa en el lupus podrían ser explicada por las diferencias en el modelo de lupus utilizado, ya que el estudio que utilizó el mismo modelo que nosotros coincidió en un aumento de la diversidad al igual que con el modelo MLR/lpr, contrario al modelo RTC y en pacientes

con LES. Por último, es importante mencionar que en el trabajo mencionado anteriormente de Luo et al., 2018 se encontró que el aumento de la diversidad observada sin tratamiento se exagera con un tratamiento inmunosupresor con dexametasona, lo cual sugiere que la diversidad no sería un indicativo del estado del lupus, debido a que estaría siendo afectada por otros factores como, por ejemplo, el tratamiento.

En este estudio se muestran los gráficos de PCoA a nivel de orden y género. No se observaron diferencias a nivel de filo, clase y orden, ni tampoco a nivel de familia y género. En los gráficos de PCoA observamos que las muestras se agruparon en dos grupos, uno de ellos formado principalmente de machos y otro que agrupa principalmente a las hembras Lúpicas y A+, donde las hembras prelúpicas poseen una posición intermedia entre ambos grupos. Mientras que a nivel de familia y género las hembras prelúpicas forman un grupo con el resto de las hembras. A nivel de especie no se realizó un gráfico de PCoA debido principalmente a que el marcador genético utilizado, el gen de la subunidad ribosomal 16S, necesitaría un 100% de identidad para poder ser definido a nivel de especie (Edgar, 2018), según lo cual muy pocos zOTUs fueron capaces de ser asignados a este nivel. Nuestros resultados muestran que existe una alta variabilidad de la microbiota intestinal, independiente del estadio del LES, pudiendo variar incluso entre ratones que habitaron la misma jaula, como es el caso de las muestras H3L/H4L y M7/M8. Datos de la literatura sugieren que el co-housing no sería un método efectivo para normalizar la microbiota (Robertson et al., 2019). Por lo tanto, es posible que diversos factores influyan en la composición de las bacterias presentes en el intestino además de los factores genéticos, ambientales, lactancia, alimentación, absorción de medicamentos y otros factores desconocidos. Otros autores sugieren que la diversidad de la microbiota intestinal estaría dada principalmente por factores estocásticos, seguidos del genotipo y luego el *co-housing* (Hildebrand et al.,

2013). Dentro de los factores desconocidos no considerados usualmente en los experimentos con ratones se encontrarían, el alojamiento diferencial, la posición social de los ratones dentro de una jaula, la manipulación de los ratones en los bioterios, ya que todos estos factores son susceptibles de generar estrés en los ratones (Deloris Alexander et al., 2006),

Es importante considerar en los resultados obtenidos, que las variaciones de la microbiota extraída de muestras de heces fecales podrían no representar de manera certera las variaciones que existen en la cepa (NZBxNZW)F1 debido al bajo número de muestras que imposibilitaron realizar análisis estadísticos para sustentar las diferencias observadas. Es por esto que los resultados de este trabajo serían una primera aproximación para dirigir experimentos posteriores en los cuales se pueda aumentar el número de muestreo de cada categoría.

Con esto en consideración, reconociendo las limitaciones de los resultados obtenidos, éstos indican que la hipótesis se confirma parcialmente, ya que algunas tasas variaron con los distintos estadios de la enfermedad, pero otras tasas no tuvieron una variación con los distintos estadios de la enfermedad. Estudiar las tasas que variaron progresivamente sería de gran importancia, ya que al prevenir estos cambios en estadios tempranos del lupus se podría retrasar la enfermedad, lo cual ha sido reportado anteriormente para el orden *Lactobacillales*, un orden que disminuiría progresivamente con la progresión de la enfermedad, que al ser inoculado en ratones hembras pre-lupicas del modelo MRL/lpr permitió disminuir los síntomas del lupus, lo cual se observó únicamente en hembras y machos castrados (Mu et al., 2017).

Finalmente, como proyecciones de este trabajo sería interesante realizar experimentos que reduzcan el efecto de las variaciones individuales extrayendo muestras de un mismo ratón a lo largo del tiempo para evaluar la dinámica de la microbiota. Por otra parte, es

necesario considerar un número bastante mayor de ratones en este tipo de estudio y enfocarse en estudiar solo hembras.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que algunas taxas de bacterias varían progresivamente con la enfermedad, además, existen algunas taxas específicas de ciertos estadios del lupus. Entre las taxas que aumentan progresivamente con la enfermedad destacan los filos *Proteobacteria* y *Cyanobacteria* y la clase *Erysipelotrichia* mientras que las taxas que disminuyeron progresivamente con la enfermedad son las clases *Bacilli* y *Tissierellia*. Por otra parte, un análisis exhaustivo de la literatura muestra numerosas inconsistencias que probablemente se deban a variables no consideradas en el diseño de estos experimentos. Finalmente sería necesario enriquecer el estudio con un mayor número de muestras que permitan un análisis estadístico más potente y cambios importantes en el diseño experimental que permitan disminuir factores de estrés en los ratones.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K., & Honda, K. (2011). Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6015), 337. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1198469>
- Chen, B., Jia, X., Xu, J., Zhao, L., Ji, J., Wu, B., Fei, Y., Yang, H., Chen, H., Zuo, X., Li, H., Pan, W., Wang, X., Ye, S., Guo, D., Wang, L., Li, J., Peng, L., Zheng, W., ... Zhang, X. (2019). Proinflammatory and autoimmunogenic gut microbiome in systemic lupus erythematosus. *BioRxiv*, 621995. <https://doi.org/10.1101/621995>
- Chen, Y., Park, Y.-B., Patel, E., & Silverman, G. J. (2009). IgM Antibodies to Apoptosis-Associated Determinants Recruit C1q and Enhance Dendritic Cell Phagocytosis of Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology*, 182(10), 6031–6043. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804191>
- Deloris Alexander, A., Orcutt, R. P., Henry, J. C., Baker, J., Bissahoyo, A. C., & Threadgill, D. W. (2006). Quantitative PCR assays for mouse enteric flora reveal strain-dependent differences in composition that are influenced by the microenvironment. *Mammalian Genome*, 17(11), 1093–1104. <https://doi.org/10.1007/s00335-006-0063-1>
- Edgar, R. C. (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*, 34(14), 2371–2375. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY113>
- Feuerer, M., Hill, J. A., Mathis, D., & Benoist, C. (2009). Foxp3+ regulatory T cells: Differentiation, specification, subphenotypes. *Nature Immunology*, 10(5), 636–645. <https://doi.org/10.1038/ni.1760>
- Gómez, J., Prado, C., López, P., Suárez, A., & Gutiérrez, C. (2009). Conserved anti-proliferative effect and poor inhibition of TNF α secretion by regulatory CD4+CD25+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, 132(3), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.05.012>
- Greiling, T. M., Dehner, C., Chen, X., Hughes, K., Iñiguez, A. J., Boccitto, M., Ruiz, D. Z., Renfroe, S. C., Vieira, S. M., Ruff, W. E., Sim, S., Kriegel, C., Glanternik, J., Chen, X., Girardi, M., Degnan, P., Costenbader, K. H., Goodman, A. L., Wolin, S. L., & Kriegel, M. A. (2018). Commensal orthologs of the human autoantigen Ro60 as triggers of autoimmunity in lupus. *Science Translational Medicine*, 10(434), 2306. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAN2306>
- Grönwall, C., Reynolds, H., Kim, J. K., Buyon, J., Goldberg, J. D., Clancy, R. M., & Silverman, G. J. (2014). Relation of carotid plaque with natural IgM antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, 153(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.03.017>
- Grönwall, C., & Silverman, G. J. (2014). Natural IgM: Beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease. *Journal of Clinical Immunology*, 34(SUPPL. 1), 12–21. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0025-4>
- He, Z., Shao, T., Li, H., Xie, Z., & Wen, C. (2016). Alterations of the gut microbiome in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Gut Pathogens*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0146-9>

- Hevia, A., Milani, C., López, P., Cuervo, A., Arboleya, S., Duranti, S., Turróni, F., González, S., Suárez, A., Gueimonde, M., Ventura, M., Sánchez, B., & Margolles, A. (2014). Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. *MBio*, *5*(5), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01548-14>
- Hildebrand, F., Nguyen, T. L. A., Brinkman, B., Yunta, R. G., Cauwe, B., Vandenabeele, P., Liston, A., & Raes, J. (2013). Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome Biology*, *14*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/GB-2013-14-1-R4/FIGURES/5>
- Johnson, B. M., Gaudreau, M. C., Al-Gadban, M. M., Gudi, R., & Vasu, C. (2015). Impact of dietary deviation on disease progression and gut microbiome composition in lupus-prone SNF1 mice. *Clinical and Experimental Immunology*, *181*(2), 323–337. <https://doi.org/10.1111/cei.12609>
- Kokori, S. I. G., Ioannidis, J. P. A., Voulgarelis, M., Tzioufas, A. G., & Moutsopoulos, H. M. (2000). Autoimmune hemolytic anemia in patients with systemic lupus erythematosus. *The American Journal of Medicine*, *108*(3), 198–204. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00413-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00413-1)
- Kuhn, A., Bonsmann, G., Anders, H. J., Herzer, P., Tenbrock, K., & Schneider, M. (2015). The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Deutsches Ärzteblatt International*, *112*(25), 423. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2015.0423>
- Li, B. Z., Zhou, H. Y., Guo, B., Chen, W. J., Tao, J. H., Cao, N. W., Chu, X. J., & Meng, X. (2020). Dysbiosis of oral microbiota is associated with systemic lupus erythematosus. *Archives of Oral Biology*, *113*, 104708. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2020.104708>
- Li, Y., Wang, H. F., Li, X., Li, H. X., Zhang, Q., Zhou, H. W., He, Y., Li, P., Fu, C., Zhang, X. H., Qiu, Y. R., & Li, J. L. (2019). Disordered intestinal microbes are associated with the activity of systemic lupus erythematosus. *Clinical Science*, *133*(7), 821–838. <https://doi.org/10.1042/CS20180841>
- Lipsky, P. E. (2001). Systemic lupus erythematosus: An autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nature Immunology*, *2*(9), 764–766. <https://doi.org/10.1038/ni0901-764>
- López, P., de Paz, B., Rodríguez-Carrio, J., Hevia, A., Sánchez, B., Margolles, A., & Suárez, A. (2016). Th17 responses and natural IgM antibodies are related to gut microbiota composition in systemic lupus erythematosus patients. *Scientific Reports*, *6*(April), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24072>
- Luo, X. M., Edwards, M. R., Mu, Q., Yu, Y., Vieson, M. D., Reilly, C. M., Ahmed, S. A., & Bankole, A. A. (2018). Gut microbiota in human systemic lupus erythematosus and a mouse model of lupus. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(4), 1–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.02288-17>
- Lyssuk, E. Yu., Torgashina, A. v., Soloviev, S. K., Nassonov, E. L., & Bykovskaia, S. N. (2007). Reduced Number and Function of CD4+ CD25 high FoxP3 + Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 601). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72005-0_12
- Ma, Y., Xu, X., Li, M., Cai, J., Wei, Q., & Niu, H. (2019). Gut microbiota promote the inflammatory response in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Molecular Medicine*, *25*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s10020-019-0102-5>

- Mazmanian, S. K., Round, J. L., & Kasper, D. L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, *453*(7195), 620–625. <https://doi.org/10.1038/nature07008>
- Morel, L., Perry, D., Sang, A., Yin, Y., & Zheng, Y. Y. (2011). Murine models of systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2011*. <https://doi.org/10.1155/2011/271694>
- Mu, Q., Zhang, H., Liao, X., Lin, K., Liu, H., Edwards, M. R., Ahmed, S. A., Yuan, R., Li, L., Cecere, T. E., Branson, D. B., Kirby, J. L., Goswami, P., Leeth, C. M., Read, K. A., Oestreich, K. J., Vieson, M. D., Reilly, C. M., & Luo, X. M. (2017). Control of lupus nephritis by changes of gut microbiota. *Microbiome*, *5*(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0300-8>
- Ohl, K., & Tenbrock, K. (2011). *Inflammatory Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus*. *2011*. <https://doi.org/10.1155/2011/432595>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Zoetendal, E. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* *2010* *464*:7285, *464*(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Robertson, S. J., Lemire, P., Maughan, H., Goethel, A., Turpin, W., Bedrani, L., Guttman, D. S., Croitoru, K., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2019). Comparison of Co-housing and Littermate Methods for Microbiota Standardization in Mouse Models. *Cell Reports*, *27*(6), 1910-1919.e2. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.04.023>
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *9*(5), 313–323. <https://doi.org/10.1038/nri2515>
- Ruiz, L., López, P., Suárez, A., Sánchez, B., & Margolles, A. (2018). The role of gut microbiota in lupus: what we know in 2018? *Expert Review of Clinical Immunology*, *14*(10), 787–792. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1519395>
- Shevach, E. M. (2009). Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity*, *30*(5), 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.010>
- Tsokos, G. C. (2011). Mechanisms of disease: Systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine*, *365*(22), 2110–2112. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1100359>
- Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G., & Lipsky, P. E. (2007). Deficient CD4 + CD25 high T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus . *The Journal of Immunology*, *178*(4), 2579–2588. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2579>
- Yacoub, R., Jacob, A., Wlaschin, J., McGregor, M., Quigg, R. J., & Alexander, J. J. (2018). Lupus: The microbiome angle. *Immunobiology*, *223*(6–7), 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.11.004>
- Zhang, H., Liao, X., Sparks, J. B., & Luo, X. M. (2014). Dynamics of gut microbiota in autoimmune lupus. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(24), 7551–7560. <https://doi.org/10.1128/AEM.02676-14>