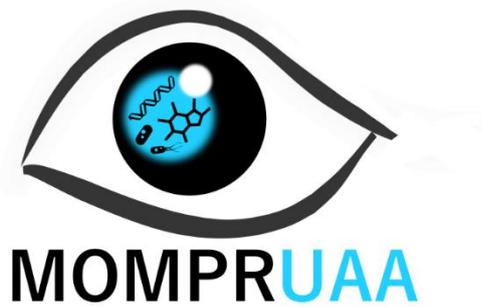

**Análisis integrado de datos multi-ómicos para establecer perfiles clínicos
y moleculares predictivos del desarrollo de uveítis recidivante en
pacientes con Espondilitis Anquilosante**



PROTOCOLO

Análisis integrado de datos multi-ómicos para establecer perfiles clínicos y moleculares predictivos del desarrollo de uveítis recidivante en pacientes con Espondilitis Anquilosante. Proyecto MOMPRUAA

INTRODUCCIÓN

La Espondilitis Anquilosante (EA) es una enfermedad reumática inflamatoria crónica fuertemente asociada con el marcador genético HLA-B27. Cursa con manifestaciones axiales (dolor e inflamación en las articulaciones sacroilíacas y en columna vertebral) y con diversas manifestaciones extraarticulares. A pesar de que el gen HLA-B27 es el factor genético más conocido implicado en la génesis de la EA, su participación no deja de ser alrededor de un 20-40% (2, 3). Por otra parte, los factores genéticos y ambientales implicados en el desarrollo y perpetuación de las diferentes manifestaciones clínicas de la EA y en especial las manifestaciones extraarticulares como la uveítis son a día de hoy muy poco conocidos.

La uveítis es la inflamación de la úvea, habitualmente se presenta con la aparición de leucocitos en la cámara anterior del humor vítreo y es una de las principales causas de ceguera adquirida en el mundo desarrollado (4). La uveítis anterior aguda (UAA) unilateral es la manifestación extraarticular más frecuente en pacientes con EA (5). La prevalencia de uveítis en los pacientes con EA se sitúa en torno al 25-50% siendo más frecuente en aquellos individuos HLA-B27 positivo (OR 4.2) (5, 6). Sin embargo, se han descrito pacientes con EA HLA-B27 negativos que presentan uveítis de repetición, lo que enfatiza la necesidad de obtener perfiles moleculares más específicos para predecir y evaluar los factores implicados en el desarrollo de la enfermedad. En un estudio reciente, se estima la incidencia de la UAA en EA en torno a 8.9/1000 personas-año (7). Además, cabe destacar que, de los pacientes con un episodio agudo de uveítis hasta en un 50% desarrollan uveítis anterior recidivante. Su presencia genera un importante incremento de la carga de enfermedad que se traduce en mayor tasa de prescripción de tratamientos, en complicaciones oculares, incluso ceguera, con unos costes sanitarios y sociales elevados (8).

En los últimos años la irrupción de técnicas computacionales y de “machine learning” avanzadas ha incrementado el interés por el análisis ómico con el objetivo de establecer modelos predictivos de la enfermedad (9). Numerosos trabajos publicados recientemente, han intentado evaluar un perfil clínico y biomolecular asociado a la incidencia, severidad y/o respuesta al tratamiento en la EA (10). Pero hasta la fecha, no se disponen de biomarcadores séricos aceptados a nivel de la práctica clínica habitual que hayan logrado ser lo suficientemente válidos para su uso como marcadores diagnósticos (10).

El desarrollo de estudios de asociación del genoma (genome-wide association studies (GWAS) basados en matrices de polimorfismos de nucleótidos (SNP) han sugerido la participación de algunos genes asociados a la respuesta inflamatoria (Polimorfismos gen de la IL23) y/o gestión de antígenos (gen ERAP1) entre otros, en la patogénesis de la EA (11). Por otro lado, nuevos biomarcadores transcriptómicos como el miRNA, también se han estudiado para su potencial utilidad como biomarcadores de diagnóstico con resultados prometedores (10). Otros estudios recientes apuntan a la posible existencia de un poligenic risk score (PRS) que en poblaciones euroasiáticas podría mejorar el valor predictivo del HLA-B27 para el desarrollo de EA (12). Sin

embargo, ninguno de estos estudios genómicos ha aportado datos concluyentes para su aplicación directa como marcadores para el diagnóstico de la EA.

Actualmente, no disponemos tampoco de ningún biomarcador asociado a UAA en pacientes con EA que permitan predecir o anticipar el desarrollo de la enfermedad. Por lo que respecta al desarrollo de UAA diversos estudios sugieren su asociación al HLA-B27 y a la presencia de espondilitis (4). Estudios previos, de nuestro grupo de trabajo han confirmado la asociación del HLA-B27 con la presencia de UAA en pacientes con espondilitis tanto en formas axiales como periféricas (6). Sin embargo, aproximadamente un 25% de pacientes con EA HLA-B27 positiva desarrollan UAA y de estos pacientes, un 50% desarrollan una enfermedad recidivante; en el desarrollo de estas formas recidivantes nuestros datos sobre la participación del HLA-B27 son controvertidos (Llop et al. in review). A todo ello debemos sumar el hecho de que pacientes con HLA-B27 sin EA desarrollan UAA recidivante y pacientes con EA HLA-B27 negativo pueden desarrollar UAA recidivante; por lo que el papel del HLA-B27 si bien es importante no es en ningún caso definitivo y su aportación como biomarcador predictor de uveítis es pobre.

En esta misma línea, no existe hasta la fecha ningún estudio que haya sido capaz de identificar un perfil clínico y biomolecular específico en pacientes con EA con riesgo de desarrollar UAA. En un estudio reciente de oftalmólogos españoles encuentran diversos biomarcadores asociados a respuesta inflamatoria y del sistema inmune (IL-6, IL-1B, IL-2, INFgM y TNFalfa) implicados en el desarrollo de UAA no infecciosa recidivante (13). En el estudio no se especifica cuantos de los pacientes evaluados eran HLA-B27 positivos o si tenían EA, pero atendiendo a que una de la causa más frecuente de UAA recidivante es el HLA-B27, puede suponerse que lo eran un buen porcentaje de los pacientes incluidos. Lo interesante del estudio es que los biomarcadores son evaluados en fases quiescentes de la enfermedad, lo que sugiere a los autores que pueden constituir una firma biológica de riesgo de padecer UAA recidivante. Además, la firma biológica se modifica sensiblemente con la ingesta de suplementos nutricionales (DHA-TG). El uso de suplementos nutricionales para el manejo de diferentes procesos oculares incluido la uveítis está bastante extendido con resultados contradictorios (14, 15). En general, se busca su efecto antioxidante y antiinflamatorio, pero es indudable la implicación de estos suplementos nutricionales en potenciales cambios en el microbioma (16). Esta línea de trabajo es especialmente sugerente, pues apoyaría la participación del microbioma intestinal como inductor ambiental en el desarrollo y perpetuación de la UAA. Gracias a los avances en las últimas décadas en el campo de metagenómica, se han descubierto nuevas especies de microorganismos. La amplificación por PCR y la secuenciación del gen 16S rRNA bacteriano de la mucosa intestinal y de muestra fecal, ha permitido entender la gran diversidad y complejidad del microbioma intestinal (17). Desequilibrios de dichos microorganismos (la microbiota) que interactúan de forma cercana con el sistema inmunológico de la mucosa intestinal, situación que se conoce como disbiosis intestinal, se han asociado con enfermedades inmunomediadas, principalmente con la enfermedad inflamatoria intestinal. Asimismo, la evidencia de que el microbioma está involucrado en la patogénesis de enfermedades extraintestinales inmunomediadas, como podría ser la EA, está aumentando, como también en enfermedades no inmunomediadas, tales como la depresión, autismo o infección por VIH (18, 19). Centrándonos en los pacientes con EA, se ha relacionado la presencia del HLA-B27 con cambios en la microbiota intestinal y de antígenos por el sistema inmune intestinal que generarían un estado de inflamación permanente controlado por IL23 que a distancia sería la responsable de las manifestaciones clínicas de la EA incluyendo la uveítis en los humanos (18). Recientemente, en

una revisión realizada por Rosenbaum et al (18), se describen 4 posibles mecanismos para explicar la participación de la microbiota intestinal en la génesis de la uveítis. En todos ellos, cambios en la microbiota desencadenan respuestas diversas del sistema autoinmune que al final conllevan al desarrollo de uveítis.

En humanos, estudios recientes han demostrado una disbiosis característica en la EA (20-22). En el estudio de Breaban et al (20) se ha descrito un incremento significativo de la especie *R. gnavus* en el grupo de espondiloartritis mostrando una correlación positiva con la actividad de la EA en pacientes con historia de enfermedad inflamatoria intestinal. En una revisión sistemática reciente que incluye datos de 28 estudios, reportan una alfa diversidad en la microbiota en pacientes con EA respecto a grupos controles, lo que sugiere que podría haber especies nocivas que participan en la patogénesis de la EA y que la EA tiene un perfil distinto de microbiota (23).

Los estudios de metagenómica y sus implicaciones en la patogénesis de diferentes enfermedades autoinmunes sistémicas son un reto a día de hoy. Ello es especialmente relevante cuando se intenta buscar asociaciones de causalidad más que simples asociaciones taxonómicas con diferentes estados clínicos y/o inducidos por determinados tratamientos como la terapia anti-TNF (24, 25). Cabe destacar, que el tratamiento con anti-TNF es un factor a tener en cuenta en la disbiosis intestinal, como lo demuestra un estudio reciente (24). En dicho trabajo, con un análisis multivariante demuestran diferencias estadísticamente significativas ($p=0.022$) en pacientes con EA tratados con anti-TNF respecto a los no tratados. Por otro lado, se ha descrito en el VIH que los hallazgos de disbiosis intestinal específica únicamente son evidentes en enfermedad crónica y no en la aguda (19), lo que puede implicar que en pacientes con un único episodio de uveítis no presenten una disbiosis intestinal específica al estar esta disbiosis posiblemente muy relacionada con la cronicidad del proceso.

En este contexto, resulta de gran interés identificar biomarcadores que se relacionen con la disbiosis intestinal. La emergente investigación en el campo de la metabolómica, estudia comprender el significado biológico de los metabolitos y puede, por tanto, ayudar a entender como el microbioma afecta al metabolismo del individuo y consecuentemente a la patogénesis de la enfermedad (26). Cabe destacar, que el microbioma fecal está compuesto por numerosos microorganismos cuyos genes son responsables de la degradación de moléculas, de la síntesis proteica, de la producción, de vías de señalización y de sustancias antimicrobianas. Durante la disbiosis, se producen de forma significativa niveles elevados y bajos de dichos metabolitos bacterianos en fluidos humanos (sangre y orina) así como en heces. De Angelis et al. (27) describieron que cambios en los niveles de especies de *Clostridium* se correlacionaban con niveles alterados de ésteres metílicos, de ácido butanoico, ésteres metílicos de ácido acético, ésteres metílicos de ácido pentanoico e indoles en las heces de niños con autismo. Otro estudio en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal mostró niveles más bajos de ácidos grasos de cadena corta en heces, mientras que en orina se observaron niveles alterados de hipurato y P-cresil sulfato en comparación con controles sanos (28). Recientemente un estudio no ha podido demostrar la presencia de una disbiosis específica asociada a la presencia de UAA, sin embargo, los datos preliminares si apuntaban a la posible existencia de un perfil metabolómico de riesgo que a su vez se asociaría con una disbiosis específica en estos pacientes (29).

La consecución del presente proyecto respondería de forma novedosa a todas estas incógnitas. La identificación de perfiles clínicos y moleculares asociados al desarrollo de uveítis junto con el

análisis de la implicación del microbioma (cofactor ambiental necesario) nos permitiría, usando herramientas tecnológicas y bioinformáticas de alto rendimiento, establecer modelos predictivos para el diagnóstico prematuro del desarrollo de uveítis. El presente proyecto se enlaza también con el plan estratégico de avanzar hacia una medicina de precisión que mejore los resultados y seguridad de los tratamientos de nuestros pacientes.

HIPÓTESIS

- Los pacientes con EA HLA-B27 positivo que desarrollan uveítis recidivante presentan un perfil clínico y biomolecular que predispone al desarrollo de la enfermedad.
- Existe en individuos predispuestos a desarrollar uveítis con un perfil de microbioma intestinal y metabolómico que actuando como cofactor ambiental es clave en el desarrollo de la enfermedad.
- La identificación de un perfil/firma biomolecular predictivo ayudará al diagnóstico precoz, pronóstico y tratamiento personalizado de los pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo principal

El objetivo principal del proyecto es aumentar la capacidad predictiva para establecer diagnósticos precoces de uveítis recidivante en pacientes con Espondilitis Anquilosante HLA-B27 positivos, mediante la combinación de datos clínicos, de microbioma, metabolómica y biomarcadores plasmáticos.

Objetivos secundarios

- Identificación de un perfil metabolómico en sangre y heces que permita establecer asociaciones de interacción del perfil microbiómico detectado y el sistema inmune de la mucosa intestinal de los pacientes con UAA y EA HLA-B27 positivos.
- Identificación de perfiles clínicos y moleculares observados en la cohorte principal de pacientes HLA-B27 positivo en una cohorte con UAA y HLAB-27 negativa con el objetivo de delimitar mejor la influencia del HLAB-27 en el desarrollo de uveítis.
- Identificación de perfiles clínicos y moleculares observados en las cohortes principales de pacientes HLAB-27 positivo sin TB en pacientes con EA HLA-B27 positivos con TB con y sin uveítis con el objetivo de delimitar mejor la influencia de la TB en el desarrollo de uveítis.

CENTROS PARTICIPANTES

- Hospital Universitari Parc Taulí (Sabadell)
- Hospital Universitari de Vall D'Hebron (Barcelona)
- Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Barcelona)
- Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona)
- Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba)
- Xarxa Assistencial Universitària de Manresa (Barcelona)
- Hospital Universitario de Basurto (Bilbao)
- Hospital General de Málaga (Málaga)

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo, de corte transversal de cohortes (casos y controles) de pacientes con EA HLA-B27 positivos con y sin UAA recidivante que no estén en TB. Se incluirán a los pacientes en seguimiento en consultas externas de oftalmología, reumatología y unidades de uveítis (unidad multidisciplinar reumatología-oftalmología) de los diferentes centros colaboradores que presenten un episodio de UAA según los criterios de inclusión. Como grupo control, cada centro seleccionará de su registro de pacientes con EA un paciente con EA HLA-B27 positivo sin uveítis, apareado por edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad y que no esté recibiendo TB. Se excluirán pacientes con TB por los cambios que este tratamiento puede inducir sobre la microbiota intestinal.

Los resultados obtenidos en esta cohorte serán valorados en 2 cohortes de validación exploratorias, una con pacientes con UAA recidivante HLA-B27 negativos y otra cohorte con y sin UAA recidivante en tratamiento con TB. La validación en estas dos cohortes nos permitirá comprobar el valor predictivo del perfil clínico y molecular encontrado en pacientes HLA-B27 positivos en dos escenarios diferentes muy relevantes genética y terapéuticamente.

SUJETOS DEL ESTUDIO

COHORTE PRINCIPAL:

- 35 pacientes con EA HLA-B27 positivo con UAA recidivante sin tratamiento biológico (TB)
- 35 pacientes cohorte control con EA HLA-B27 positivo sin uveítis y sin TB, apareados por edad, género y tiempo de evolución de la enfermedad.

COHORTES EXPLORATORIAS:

- 10 pacientes con EA HLA-B27 negativos con UAA recidivante sin TB.
- 10 pacientes con EA HLA-B27 positivos con TB con UAA recidivante.
- 10 pacientes con EA HLA-B27 positivos con TB sin UAA.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN COHORTE PRINCIPAL:

1. Criterios de inclusión para la cohorte de casos:

- Pacientes con EA HLA-B27 positivo con sacroileítis radiográfica según los criterios modificados de Nueva York, - Pacientes con residencia permanente en estado español para homogenizar hábitos dietéticos y estilo de vida.

- Pacientes con uveítis anterior aguda recidivante que presentan un episodio de UAA incidente*

** Definimos UAA incidente el presentar un episodio agudo de uveítis en un período inferior a 1 mes tras la recogida de muestras. Definimos pacientes con UAA recidivante el haber presentado previamente 1 o más episodios de UAA.*

2. Criterios de inclusión para la cohorte control:

Los mismos que para el grupo de pacientes, pero en este caso sin antecedentes de uveítis previa, ni episodios de uveítis durante todo el periodo de inclusión. Se seleccionarán los pacientes del grupo control (35) en cada centro participante apareados por edad, género y tiempo de evolución de la EA para poder balancear equilibradamente estas variables con los casos de uveítis.

3. Criterios de exclusión:

- Pacientes menores de 18 años.

- Pacientes que no firmen el consentimiento informado.

- Pacientes con otras enfermedades crónicas que puedan afectar al resultado del estudio, tales como enfermedades inflamatorias inmunomediadas y/o enfermedades autoinmunes, obesidad (IMC >30) diabetes, historia de enfermedad neoproliferativa en los últimos 5 años, enfermedad renal crónica severa, enfermedad mental severa y/o deterioro cognitivo.

- Pacientes en terapia biológica (TNFi, IL17/IL23i, JAKi) (para la cohorte principal)

- Pacientes que han recibido tratamientos o intervenciones que pueden modificar el microbioma: tratamiento antibiótico o con probióticos en los 3 meses previos, haberse sometido a una colostomía, haber recibido preparación para colonoscopia los seis meses previos y haberse sometido a cirugías extensas el mes previo.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN COHORTES EXPLORATORIAS:

Para las dos cohortes de validación se seguirán el resto de los criterios de inclusión y exclusión predefinidos en las cohortes principales.

1. Cohorte exploratoria genética: Se incluirán en esta cohorte pacientes con EA HLA-B27 negativos con UAA recidivante que presenten episodio incidente de UAA según definición previa y sin TB activa.

2. Cohorte exploratoria terapéutica: Se incluirán pacientes con EA HLA-B27 positivos con y sin UAA incidente según definición previa, que se hallen en tratamiento biológico con alguno de estos fármacos durante un período mínimo de 3 meses: TNFi, IL17/IL23i y/o JAKi.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

DATOS A RECOGER

A todos los pacientes se les tomarán datos adicionales en el momento de la inclusión en el estudio mediante un CRDe (Redcap), tales como:

- Hábitos dietéticos mediante unos cuestionarios estandarizados de dieta (FFQ)
- Grado de actividad de la enfermedad según recomendaciones de las guías de manejo en Espondiloartritis axial (SER y EULAR). Cuestionarios BASDAI, BASFI, ASAS-HI
- Medicación concomitante
- Presencia de infecciones recientes especialmente gastrointestinales (al menos 4 semanas)
- Consumo de alcohol
- Hábito tabáquico
- Viajes al extranjero recientes (> 4 semanas en los últimos 12 meses)
- Tiempo que llevan en España para los no-nativos

La base de datos central será gestionada por los investigadores del Hospital Parc Taulí de Sabadell. Los colaboradores recogerán los datos según el protocolo descrito en el anexo **Cuaderno de recogida de Datos QRD MOMPRUAA**.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

En el momento de inclusión de los pacientes al estudio se realizará una extracción sanguínea para obtener muestras de sangre (suero y plasma). También se pedirá a los pacientes que recojan y traigan al Hospital muestras de heces, en un máximo de 48h después de la extracción sanguínea. Todas las muestras deberán ser recogidas en el plazo **máximo de 4 semanas tras el episodio de UAA**.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTO

Los materiales de recogida de muestra requeridos son los siguientes:

SANGRE*:

- Tubo BD Vacutainer™ K2E (EDTA) para recogida de muestras de plasma
- Tubo BD Vacutainer™ SST™ II Advance para recogida de muestras de suero

HECES:

- Anaclín de tapón rojo para la recogida de muestra de heces en fresco
- DNA/RNA Shield Fecal Collection de tapón marrón para la recogida de muestra de heces con preservante

**Es muy importante que se utilice estos tipos de tubo para todas las muestras. Se debe registrar el tipo de anticoagulante y tubo de recolección si el recomendado no es posible. Así mismo, es importante tomar medidas para prevenir la hemólisis en las muestras de sangre por una técnica inadecuada durante la extracción de sangre. Esto puede causar resultados de pruebas de laboratorio inexactos al contaminar el plasma con el contenido de glóbulos rojos hemolizados.*

El plasma y suero se obtendrán a partir de las muestras de sangre extraídas. Las muestras se deberán procesar en el plazo máximo de 2 horas después de la extracción. El plasma y el suero se alícuotarán, respectivamente, en 6 alícuotas de 500 ul en criotubos de fondo redondo de 2 ml. Las alícuotas se almacenarán a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferiblemente en cajas. Se debe asegurar que los criotubos estén debidamente etiquetados con la información pertinente.

Las heces se almacenarán a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ directamente con los botes de recogida, sin alícuotar, previamente etiquetados con la información pertinente.

Las etiquetas, criotubos y botes de recogida de heces serán proporcionados por el Hospital Parc Taulí de Sabadell a los centros participantes.

A continuación, se detalla la codificación de los participantes y muestras:

Códigos de los centros

Centro	Codificación
Hospital Universitari Parc Taulí	101
Hospital Universitari de Vall D'Hebron	102
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol	103
Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau	104
Hospital Universitario Reina Sofía	105
Xarxa Assistencial Universitària de Manresa	106
Hospital General de Málaga	107
Hospital Universitario de Basurto	108

Códigos de las muestras

Tipo de muestra	Codificación
Plasma	Pl
Suero	Se
Heces frescas	Fmt
Heces con preservante	FmtB

La codificación de los pacientes es la siguiente:

UAA101_001

Nombre del proyecto Código del centro Número del paciente

La codificación de las muestras es la siguiente:

UAA101_001Se1.1

Nombre del proyecto Código del centro Número del paciente Tipo de muestra Donación Alícuota

El número de identificación de los participantes inscritos, con identificación del centro será el siguiente: UAA+código del centro+_número consecutivo desde el 001.

Las muestras se codificarán con el número de identificación del participante seguido del código de muestra+número consecutivo de donación+.número consecutivo de alícuota.

Las muestras almacenarán a -80°C en los centros participantes hasta el momento del envío al Hospital Parc Taulí de Sabadell, que se hará al finalizar el reclutamiento.

Los colaboradores obtendrán, procesarán y enviarán las muestras según el protocolo descrito en el anexo **Protocolo de recogida y procesamiento de muestras MOMPRUAA**.

ANÁLISIS

ANÁLISIS DEL MICROBIOMA

1. Extracción de ADN, ampliación del marcador ribosómico 16S rRNA y secuenciación masiva de los amplicones

El ADN bacteriano se extraerá de 200 mg de la muestra fecal utilizando el kit DNA MiniPrep de ZymoBIOMICS siguiendo las condiciones del fabricante. La extracción incluye un paso de lisis enzimática y mecánica, que asegura la obtención de ADN de todos los microorganismos presentes con rendimiento equivalente. La calidad y cantidad de ADN extraído se evaluará con Nanodrop y Qubit.

Se procesará muestra sin material inicial (blancos de extracción) para evaluar la contaminación del laboratorio o los reactivos de los kits en cada extracción.

2. Amplificación por PCR y secuenciación masiva de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rRNA bacteriano de las muestras de ADN obtenidas y de los blancos de extracción. La calidad y la cantidad de la amplificación por PCR se determinará utilizando Agilent Bioanalyser 2100 y el fluorómetro Qubit, respectivamente.

Tras la preparación de las reacciones de PCR se llevarán a cabo las librerías y se realizará la secuenciación masiva de las muestras mediante la tecnología Illumina Miseq obteniendo secuencias paired ends (300x2 pb) con una profundidad de secuenciación promedio alrededor de 20.000-40.000 secuencias por muestra, que abarcarán en conjunto regiones amplias e informativas de 450pb para obtener el perfil de microbiota de cada una de las muestras analizadas en el estudio.

3. Análisis bioinformático y estadístico para estudio de biodiversidad bacteriana: Control de calidad, tabla ASV, composición y análisis de diversidad.

Las secuencias se importarán en el software Quantitative Insight Into Microbial Ecology 2 (QIIME 2), que se utilizará para el procesado de las secuencias. El filtrado de calidad y eliminación de quimeras se realizará con DADA2. Las secuencias se clasificarán en ASVs (Amplicon Sequence Variant), que se utilizarán para clasificar y asignar taxonomía a las secuencias con una identidad del 99% utilizando la base de datos de referencia SILVA o la opción óptima en el momento de análisis.

4. Metagenómica

Las extracciones de ADN se usarán también para secuenciación whole genome shotgun, que nos permitirá mayor resolución taxonómica y caracterización funcional del microbioma. Para ello, se construirán las librerías correspondientes siguiendo las instrucciones del fabricante (Illumina) y se secuenciarán, con una profundidad aproximada de 35 millones de lecturas, mediante la

tecnología MiSeq (Illumina Inc.), generando secuencias paired end de aproximadamente 300bp. La calidad de las secuencias se evaluará con FastQC y cutadapt. El perfil taxonómico de las muestras se obtendrá a partir de la identificación y recuento de un set de marcadores genéticos bacterianos con MetaPhlan3. El perfil funcional se obtendrá a partir de las secuencias post-chequeo de calidad mediante la herramienta HUMAnN3.

La diversidad alfa y beta analiza las diferencias dentro y entre las muestras, respectivamente, se llevarán a cabo utilizando una profundidad de lectura equivalente para todas las muestras. La diversidad alfa estará representada por las especies observadas (riqueza o número total de ASVs y/o especies bacterianas) y el índice de Shannon (uniformidad o abundancia relativa de ASVs/especies además de la riqueza). La diversidad beta estima cuántos taxones se comparten entre las muestras y se calculará utilizando matrices de distancias Unifrac ponderadas y no ponderadas, que tienen en cuenta los enfoques cualitativos y cuantitativos, respectivamente, además del análisis filogenético.

Se utilizarán pruebas de significación no paramétricas, como la prueba por pares de Kruskal-Wallis para analizar los resultados de la diversidad alfa, o la prueba por pares de PERMANOVA para analizar la diversidad beta. Las diferencias taxonómicas se evaluarán mediante el análisis de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn en parejas en R (<http://www.R-project.org>) con los correspondientes procesos de normalización adecuados para datos composicionales (center log-ratio transformation).

ANÁLISIS METABOLÓMICO

El análisis metabolómico de las muestras de plasma recogidas incluirá una combinación de métodos complementarios dirigidos y no dirigidos mediante cromatografía líquida de rendimiento ultra alto (UHPLC) - espectrometría de masas en tándem de alta resolución (QqTOFMS), UPLCMS.

El análisis incluirá el análisis dirigido de: i) un panel de aminoácidos; ii) un panel de metabolitos implicados en el metabolismo del triptófano y fenilalanina; iii) un perfil metabolómico no dirigido utilizando ionización por electrospray positiva y negativa (ESI+/-) y una separación cromatográfica en fase reversa. El análisis de los datos metabolómicos generados se llevará a cabo de forma conjunta, e incluirá etapas de QA/QC, generación de tablas de picos, integración y alineamiento de señales y anotación de metabolitos utilizando metodología previamente desarrolladas y validadas por LEITAT, aplicadas en numerosos estudios y proyectos clínicos y preclínicos incluyendo, entre otros, Proyectos de Investigación en Salud (Instituto Carlos III, PI11/0313, PI14/0433, PI17/00127, PI17/01089, PI20/00817, PI20/00964). El procesado de datos y llevará a cabo empleando herramientas abiertas (MATLAB, R, Python) para garantizar la reproducibilidad y reutilización de los resultados a través de repositorios de datos de acceso libre.

ANÁLISIS DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS

Se analizará el perfil de citoquinas presente en el plasma de los pacientes incluidos en este estudio, mediante la tecnología Luminex, que permite en una sola muestra multiplexar la

detección de diferentes analitos. Se analizarán: IL-1b, IL-2, IL-6, IL-12, IFNg, TNF-a, IL17 and IL-23.

Mediante ELISAs se cuantificarán los niveles de calprotectina en plasma, así como los niveles de anticuerpos específicos anti -CD74.

INTEGRACIÓN DE TECNOLOGÍAS ÓMICAS Y ALGORITMOS PREDICTIVOS

Los datos de microbioma y metabolómica se integrarán, conjuntamente a los datos clínicos y biomarcadores plasmáticos, para identificar potenciales interacciones entre ambos tipos de datos que pudieran explicar el fenotipo de la cohorte. Para ello, usaremos una aproximación estadística doble, mediante pruebas multivariantes y univariantes. Para el estudio multivariante, usaremos la herramienta MOFA+, que nos permite aplicar procesos de reducción de la dimensionalidad mediante componentes principales, identificando sets de bacterias y metabolitos estrechamente relacionados entre ellos y la patología de estudio. Además, estudiaremos el potencial origen bacteriano de los metabolitos diferenciales mediante modelos de regresión LASSO usando tanto la caracterización taxonómica como funcional del microbioma.

Finalmente, se generarán modelos predictivos mediante Random Forest combinando la taxonomía y la funcionalidad del microbioma y los metabolitos de interés.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio se llevará a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y ha sido aprobado por el comité de ética local del Hospital Universitari Parc Taulí de Sabadell (Barcelona, España) y de todos los centros involucrados.

El paciente deberá firmar un consentimiento informado en el que declara haber sido debidamente informado y autoriza expresamente la inclusión en el estudio.

El tratamiento, comunicación y transferencia de los datos personales de todos los participantes se hará con cumplimiento del Reglamento 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD), así como la Ley Orgánica 3/18 de 5 de diciembre de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales (LOPD-GDD).

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificar a los participantes, y sólo la persona responsable del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con la historia clínica. La identidad de los participantes no estará disponible para ninguna otra persona excepto por una emergencia médica o requerimiento legal. Los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información). El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustarán a lo dispuesto en esta normativa.

El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 5 años tras su finalización. Posteriormente, la información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de la salud de los pacientes.

De acuerdo al Reglamento, los participantes tienen derecho a acceder a sus datos, solicitar la rectificación de los datos inexactos o, en su caso, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad). Así como limitar su tratamiento, oponerse y retirar el consentimiento de su uso para determinados fines. Para ejercitar estos derechos, deberán dirigirse al Delegado de Protección de Datos del Hospital Parc Taulí a través de dpd@tauli.cat. Así mismo tienen derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedaran satisfechos.

Los datos codificados pueden ser transmitidos a terceros y a otros países siempre para los mismos fines del estudio descrito o para su uso en publicaciones científicas y siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente (en ningún caso contendrán información que pueda identificar directamente al paciente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc). En el caso en que se produzca transferencia de datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos.

Tanto los centros participantes como el Promotor son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor.

TIMELINE

		Plan de trabajo												
Actividades		Anua	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Comité ético	1 año												
		2 año												
		3 año												
2	Visitas y recogida de pacientes	1 año												
		2 año												
		3 año												
3	Envío muestras	1 año												
		2 año												
		3 año												
4	Análisis de microbioma y metagenómica	1 año												
		2 año												
		3 año												
5	Análisis de metabolómica	1 año												
		2 año												
		3 año												
6	Análisis de biomarcadores plasmáticos	1 año												
		2 año												
		3 año												
7	Integración de tecnologías multi-ómicas	1 año												
		2 año												
		3 año												
8	Algoritmos predictivos	1 año												
		2 año												
		3 año												
9	Escritura de los resultados	1 año												
		2 año												
		3 año												
10	Comunicación de resultados	1 año												
		2 año												
		3 año												
11	Reporte final	1 año												
		2 año												
		3 año												

BIBLIOGRAFÍA

1. Sieper J, Poddubnyy D. Axial spondyloarthritis. *Lancet*. 2017;390(10089):73-84.
2. Reveille JD, Zhou X, Lee M, Weisman MH, Yi L, Gensler LS, et al. HLA class I and II alleles in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(1):66-73.
3. Reveille JD. Genetics of spondyloarthritis--beyond the MHC. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(5):296-304.
4. Rosenbaum JT. The eye in spondyloarthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2019;49(3S):S29-S31.
5. Zeboulon N, Dougados M, Gossec L. Prevalence and characteristics of uveitis in the spondyloarthropathies: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(7):955-9.
6. Arévalo M, Gratacós Masmitjà J, Moreno M, Calvet J, Orellana C, Ruiz D, et al. Influence of HLA-B27 on the Ankylosing Spondylitis phenotype: results from the REGISPONSER database. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):221.
7. Stolwijk C, Essers I, van Tubergen A, Boonen A, Bazelier MT, De Bruin ML, et al. The epidemiology of extra-articular manifestations in ankylosing spondylitis: a population-based matched cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(7):1373-8.
8. Gao X, Wendling D, Botteman MF, Carter JA, Rao S, Cifaldi M. Clinical and economic burden of extra-articular manifestations in ankylosing spondylitis patients treated with anti-tumor necrosis factor agents. *J Med Econ*. 2012;15(6):1054-63.
9. Perez-Sanchez C, Font-Ugalde P, Ruiz-Limon P, Lopez-Pedrerera C, Castro-Villegas MC, Abalos-Aguilera MC, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers of disease activity and structural damage in ankylosing spondylitis patients. *Hum Mol Genet*. 2018;27(5):875-90.
10. Reveille JD. Biomarkers in axial spondyloarthritis and low back pain: a comprehensive review. *Clin Rheumatol*. 2022;41(3):617-34.
11. Díaz-Peña R, Castro-Santos P, Durán J, Santiago C, Lucia A. The Genetics of Spondyloarthritis. *J Pers Med*. 2020;10(4).
12. Thomas GP, Willner D, Robinson PC, Cortes A, Duan R, Rudwaleit M, et al. Genetic diagnostic profiling in axial spondyloarthritis: a real world study. *Clin Exp Rheumatol*. 2017;35(2):229-33.
13. Pinazo-Durán MD, García-Medina JJ, Sanz-González SM, O'Connor JE, Casaroli-Marano RP, Valero-Velló M, et al. Signature of Circulating Biomarkers in Recurrent Non-Infectious Anterior Uveitis. Immunomodulatory Effects of DHA-Triglyceride. A Pilot Study. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(4).
14. Mun JG, Legette LL, Ikonte CJ, Mitmesser SH. Choline and DHA in Maternal and Infant Nutrition: Synergistic Implications in Brain and Eye Health. *Nutrients*. 2019;11(5).
15. Rask DMG, Puntel MR, Patzkowski JC, Patzkowski MS. Multivitamin Use in Enhanced Recovery After Surgery Protocols: A Cost Analysis. *Mil Med*. 2021;186(9-10):e1024-e8.
16. Bibbò S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrì F, Masucci L, Gasbarrini A, et al. The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(22):4742-9.
17. Pamer EG. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1173-8.
18. Rosenbaum JT, Asquith M. The microbiome and HLA-B27-associated acute anterior uveitis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(12):704-13.
19. Rocafort M, Noguera-Julian M, Rivera J, Pastor L, Guillén Y, Langhorst J, et al. Evolution of the gut microbiome following acute HIV-1 infection. *Microbiome*. 2019;7(1):73.

20. Breban M, Tap J, Leboime A, Said-Nahal R, Langella P, Chiocchia G, et al. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(9):1614-22.
21. Chen Z, Qi J, Wei Q, Zheng X, Wu X, Li X, et al. Variations in gut microbial profiles in ankylosing spondylitis: disease phenotype-related dysbiosis. *Ann Transl Med.* 2019;7(20):571.
22. Klingberg E, Magnusson MK, Strid H, Deminger A, Ståhl A, Sundin J, et al. A distinct gut microbiota composition in patients with ankylosing spondylitis is associated with increased levels of fecal calprotectin. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):248.
23. Wang L, Wang Y, Zhang P, Song C, Pan F, Li G, et al. Gut microbiota changes in patients with spondyloarthritis: A systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2022;52:151925.
24. Yin J, Sternes PR, Wang M, Song J, Morrison M, Li T, et al. Shotgun metagenomics reveals an enrichment of potentially cross-reactive bacterial epitopes in ankylosing spondylitis patients, as well as the effects of TNFi therapy upon microbiome composition. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(1):132-40.
25. Liu B, Yang L, Cui Z, Zheng J, Huang J, Zhao Q, et al. Anti-TNF- α therapy alters the gut microbiota in proteoglycan-induced ankylosing spondylitis in mice. *Microbiologyopen.* 2019;8(12):e927.
26. Daliri EB, Wei S, Oh DH, Lee BH. The human microbiome and metabolomics: Current concepts and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(16):3565-76.
27. Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients.* 2014;7(1):17-44.
28. Le Gall G, Noor SO, Ridgway K, Scovell L, Jamieson C, Johnson IT, et al. Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J Proteome Res.* 2011;10(9):4208-18.
29. Huang X, Ye Z, Cao Q, Su G, Wang Q, Deng J, et al. Gut Microbiota Composition and Fecal Metabolic Phenotype in Patients with Acute Anterior Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59(3):1523-31.