

# TFM Lorena Keller

*por* María Lorena KELLER

---

**Fecha de entrega:** 27-sep-2021 07:25p.m. (UTC+0200)

**Identificador de la entrega:** 1658938071

**Nombre del archivo:** ESEU01.20200DXU001805M1102\_111255088\_1122282303\_TFM\_Lorena\_Keller\_.doc  
(976K)

**Total de palabras:** 9182

**Total de caracteres:** 52527



**DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA PUESTA A PUNTO DEL  
ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LACTANTES  
MENORES DE 6 MESES CON ALERGIA A LA PROTEÍNA DE  
LECHE DE VACA EN ARGENTINA**

Trabajo final de Máster presentado a la Universidad Europea de Madrid para optar por  
el título de posgrado: Máster en Microbiota, Probióticos y Prebióticos

Autora: Bioq. María Lorena Keller

Tutoras internas: Dra. Susana Delgado Palacio, Dra. Lorena Ruiz García

Tutora externa: Dra. Silvina Quintana

Mar del Plata, Argentina

Septiembre 2021

## *Agradecimientos*

A mis tutoras, Susana, Lorena y Silvina, por su predisposición, tiempo, apoyo y generosidad brindados durante el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto de Análisis Fares Taie, por confiar en mi proyecto y hacer posible la realización de este máster.

A todos los profesores y profesoras, por su dedicación, conocimiento y sobre todo por su gran generosidad.

Al maravilloso equipo de profesionales e investigadores con quienes, si todo sale bien, llevaremos a cabo este estudio.

A mis padres, por inculcarme el estudio y esfuerzo como forma de vida, y por estar a mi lado siempre, en cada decisión y en cada paso.

Y por sobre todas las cosas, a mi hijo, Bautista, por su paciencia en este año de estudio y por las tantas horas que no pudimos jugar.

*Gracias!*

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1- Contexto y justificación del estudio. Motivo de elección del tema... 5	
2.1.1- Microbiota intestinal: composición y factores que la modulan... 5	
2.1.2- Relación entre disbiosis y enfermedad ..... 10	
2.1.3- Microbiota intestinal y alergias alimentarias..... 11	
2.1.4- Alergia a la proteína de leche de vaca..... 13	
2.1.5- Teorías propuestas..... 15	
2.2- Antecedentes del tema..... 15	
2.2.1- Evidencias en humanos ..... 15	
2.2.2- Evidencias en animales de experimentación ..... 17	
2.3- Descripción del problema.....18	
2.4- Alcances del trabajo..... 19	
2.5- Objetivos del estudio..... 19	
2.5.1- Objetivo general	
2.5.2- Objetivos específicos	
2.6- Metodología..... 19	
3. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO..... 20	
3.1- Selección de poblaciones de estudio (niños sanos y con APLV) ... 20	
3.1.1- Tamaño de la muestra y elección de los participantes ..... 20	
3.1.2- Criterios diagnósticos de APLV ..... 20	
3.1.2.1- Diagnóstico de APLV mediada por IgE..... 21	
3.1.2.2.- Diagnóstico de APLV no mediada por IgE..... 21	
3.1.3- Criterios de inclusión y de exclusión..... 22	

3.2-	Elección y justificación de la metodología a utilizar.....	22
3.2.1-	Recolección de conservación de la muestra.....	24
3.2.2-	Técnica de extracción del ADN.....	24
3.2.3-	Técnica molecular y diseño del protocolo .....	24
3.3-	Elección del software y plataforma de análisis de datos .....	25
3.4-	Análisis estadístico de los datos.....	25
3.5-	Consideraciones éticas. Consentimiento informado. Tratamiento de datos.....	26
4.	CONCLUSIONES.....	26
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	27

### ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Ventana crítica de oportunidad para realizar intervenciones que contribuyan a la conformación de una microbiota saludable.....	9
Figura 2.	Factores que predisponen al desarrollo de alergias alimentarias en individuos genéticamente susceptibles.....	11
Figura 3.	Esquema del análisis de la microbiota intestinal por secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S.....	23
Tabla 1.	Estudios de microbiota intestinal en pacientes pediátricos con y sin alergia alimentaria.....	16

### ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.	Historia clínica.....	32
ANEXO 2.	Consentimiento informado .....	33

## 1. RESUMEN

1 La microbiota es el conjunto de microorganismos que coloniza nuestro cuerpo. En especial la microbiota intestinal es la más diversa y la más abundante en cantidad de células, albergando el colon más de 100 trillones ( $10^{14}$ ) de células microbianas que representan alrededor de 1.000 especies diferentes. Estos microorganismos llevan a cabo numerosas funciones vitales para el ser humano, entre ellas la modulación de la respuesta inmune, incluyendo la tolerancia oral a los alimentos.

El término disbiosis hace referencia a alteraciones o desequilibrios de un sistema microbiano complejo, en su composición o función. La disbiosis intestinal se ha descrito en numerosos desórdenes metabólicos e inmunes, incluyendo enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad celíaca, obesidad, asma y alergias. Entre estas últimas, la alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV) es la alergia alimentaria más común en niños, presentándose generalmente antes de los 2 años de edad. Sin embargo, a pesar del desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y el avance del análisis bioinformático, aún no conocemos en detalle las bacterias implicadas en el desarrollo de enfermedades alérgicas. Además, es muy importante tener presente que la programación inmune inducida por la microbiota intestinal ocurre en los primeros años de vida, siendo este periodo la ventana de oportunidad para el desarrollo de estrategias destinadas a la prevención de las alergias.

3 El objetivo general de este trabajo es estudiar la microbiota intestinal de lactantes menores de 6 meses con diagnóstico de APLV y correlacionar los resultados con el tipo de parto y lactancia, comparando los hallazgos con un grupo control pareado de lactantes sanos. Con ello se pretende identificar los factores más relevantes que influyen la conformación de la microbiota en la edad temprana, así como establecer si determinadas alteraciones en la microbiota intestinal podrían asociarse con el desarrollo de APLV.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1- Contexto y justificación del estudio. Motivo de elección del tema

#### 2.1.1.- Microbiota intestinal: composición y factores que la modulan

La microbiota es el conjunto de microorganismos que coloniza nuestro cuerpo, principalmente bacterias, pero también virus, hongos (sobre todo levaduras), protozoos y arqueas. Se define como microbioma a todo el hábitat en que éstos se encuentran, incluyendo los microorganismos, sus genomas y las condiciones ambientales circundantes (metabolitos, elementos genéticos móviles, estructuras microbianas, moléculas de señalización, etc) (Berg, 2020; Allaband, 2019).

La microbiota intestinal, especialmente la localizada en el colon, llega a alcanzar densidades de  $10^{11}$ - $10^{12}$  células/ml (Ley, 2006; Rutayisire, 2016). Está compuesta principalmente, por dos filos de bacterias, Firmicutes y Bacteroidetes (que suponen el 90% de la microbiota intestinal) y, en menor medida, Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia (Pascal, 2018; Rutayisire, 2016). El filo Firmicutes incluye un gran número de géneros, siendo algunos de los más importantes *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Ruminococcus*. El filo Bacteroidetes incluye bacterias pertenecientes a los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*. El género principal perteneciente al filo Actinobacteria es *Bifidobacterium*. Las proteobacterias están representadas fundamentalmente por miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, mientras que el filo Verrucomicrobia está representado por el género *Akkermansia*. Las bacterias de la microbiota intestinal ejercen numerosas funciones, tales como la metabolización de alimentos que el organismo no puede procesar, como fibra dietética y carbohidratos complejos, la protección contra patógenos, la síntesis de metabolitos esenciales, como algunas vitaminas y neurotransmisores, el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal y la modulación de la respuesta inmune, incluyendo la tolerancia oral a los alimentos (Bridgman, 2016; Milani, 2017).

La microbiota intestinal se establece, diversifica y madura desde el nacimiento hasta los 2-3 primeros años de vida (Derrien, 2019; Milani, 2017). En su formación intervienen componentes genéticos, epigenéticos y ambientales. El establecimiento de la microbiota intestinal comienza por la exposición a microorganismos a través del canal de parto, y por el contacto con la piel materna y la microbiota del entorno (Akagawa, 2021). Los primeros colonizadores consisten en una mezcla de microorganismos cutáneos y entéricos, dominados por *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y estafilococos coagulasa negativa. A medida que éstos consumen el oxígeno del medio intestinal, son reemplazados por géneros anaerobios obligados tales como *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *Eubacterium* entre otros. Existen evidencias de que la microbiota intestinal evoluciona en forma simultánea con

el sistema inmunitario del bebé y con la programación metabólica y neurológica (Derrien, 2019). En esta coevolución, las bacterias comensales juegan un papel fundamental en el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa, contribuyen a la integridad y función de la barrera intestinal, inhiben la colonización por patógenos e intervienen en las respuestas linfocitarias de tipo B y T regulatoria (Bridgman, 2016).

Se han descrito varios factores que modulan el establecimiento de la microbiota intestinal en las primeras etapas de la vida, y que son determinantes para la salud del individuo durante toda su vida. Entre estos destacan dos factores clave que son el tipo de parto -vaginal o por cesárea-, y el tipo de lactancia -materna o artificial-.

El tipo de parto puede producir profundas diferencias en los patrones de colonización intestinal de los bebés. El parto vaginal permite al bebé entrar en contacto con la microbiota vaginal y fecal, lo cual resulta en una colonización neonatal dominada por *Lactobacillus* y *Prevotella* (Milani, 2017). El parto por cesárea se ha asociado con menor abundancia y diversidad de los filos Actinobacteria y Bacteroidetes, y mayor abundancia y diversidad del filo Firmicutes, en los primeros 3 meses de vida (Rutayisire, 2016). A nivel de género, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* son más frecuentes en niños nacidos por parto vaginal, a diferencia de los niños nacidos por cesárea, que presentan mayor colonización por *Clostridium* y *Lactobacillus* hasta los 3 meses de vida. Otros trabajos evidencian menor abundancia de *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* en niños nacidos por cesárea, posiblemente por efecto del uso de antibióticos en esta práctica quirúrgica. Estos niños presentan típicamente una microbiota enriquecida en *Staphylococcus* y *Streptococcus*, comparable con la microbiota de la piel materna (Milani, 2017; Pascal, 2018). Asimismo, presentan mayor cantidad de patógenos oportunistas como *Enterococcus*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Peroni, 2020). La edad gestacional es otro factor que afecta el establecimiento de la microbiota, ya que los bebés nacidos pretérmino (con menos de 37 semanas de gestación) tienen un sistema inmunitario inmaduro y frecuentemente afrontan largas estancias hospitalarias y alimentación artificial o parenteral, factores que interfieren con el establecimiento de una microbiota saludable (Milani, 2017).

Con respecto a la lactancia, hay numerosas evidencias que muestran que la leche materna contribuye al desarrollo de un microbioma saludable, ya que aporta no sólo micronutrientes y compuestos prebióticos que estimulan la colonización y el crecimiento de bacterias comensales, sino también factores inmunológicos activos, oligosacáridos y bacterias, los cuales modulan las respuestas inmunes. Hace algunos



años se pensaba que la leche materna era estéril. Sin embargo, fueron Jiménez *et al* quienes demostraron por primera vez, en un experimento en ratones con *Enterococcus* marcados genéticamente, que las bacterias pueden transferirse a los hijos a través de la leche materna (Jiménez, 2008), resultados que fueron confirmados en ensayos posteriores en humanos (Martín, 2012).

La microbiota intestinal de lactantes alimentados con leche materna es menos diversa, pero contiene altos niveles de especies del género *Bifidobacterium*, como *B. breve*, *B. bifidum* y *B. longum*, capaces de metabolizar los oligosacáridos de la leche humana (HMO), así como también menor presencia de patógenos potenciales que los niños alimentados con fórmula (Milani, 2017). Los HMO son polisacáridos complejos, que alcanzan el colon sin ser digeridos, y estimulan el crecimiento de ciertas bacterias comensales, como las bifidobacterias, actuando de esta manera como prebióticos. Han sido identificadas más de 200 estructuras de HMO diferentes, que dan cuenta de un tercio de los componentes sólidos de la leche materna, siguiendo en abundancia a la lactosa y los lípidos, y hallándose en mayor concentración (20 g/l) en el calostro humano (Akagawa, 2021). La suplementación de fórmulas infantiles con galactooligosacáridos (GOS) y fructo-oligosacáridos (FOS) en una proporción 9:1, parece simular en cierto grado el efecto de los HMO sobre la microbiota intestinal, estimulando el desarrollo de bifidobacterias. La cesación de la lactancia materna, más que la introducción de alimentos sólidos, es el principal factor que produce un cambio de la microbiota de los lactantes (Derrien, 2019).

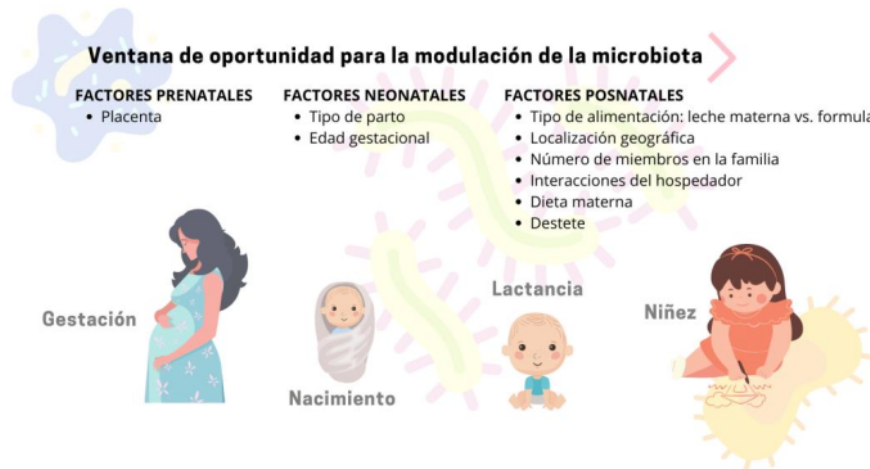
Es por estas razones que los niños nacidos por parto vaginal y alimentados con leche materna en forma exclusiva presentan el microbioma más saludable y beneficioso, con altas concentraciones de *Bifidobacterium* y bajas cantidades de *Clostridioides difficile* y *E. coli* (Peroni, 2020).

Otros factores relevantes que modulan la microbiota intestinal en la infancia temprana son: el uso de antibióticos prenatales o durante los primeros meses de la vida del bebé, la vida en ambientes rurales, el tamaño de la familia, el número de hermanos y la presencia de mascotas (Milani, 2017). Las alteraciones de la microbiota a causa del uso de antibióticos en niños han sido documentadas en varios estudios, observándose incluso hasta 2 años después de su utilización, con disminución de bifidobacterias y aumento de enterobacterias, sumado a una disminución en la diversidad (Derrien, 2019). También se ha reportado que los niños cuyas madres reciben profilaxis intraparto por colonización vaginal por estreptococos del grupo B, ruptura prematura de membranas o bien por

cesárea, exhiben alteraciones en la diversidad y riqueza de su microbiota intestinal (Shu, 2018).

Varios estudios han reportado una aparente estabilización de la microbiota intestinal hacia una configuración de adulto dentro de los 3 primeros años de vida. Uno de los mayores estudios realizados incluyó 903 niños de 4 países (Alemania, Finlandia, Suecia y EEUU) seguidos durante 3 años, en el cual se observó que después de los 31 meses los filos dominantes y la diversidad permanecieron estables, con predominio del filo Firmicutes (Derrien, 2019). En forma similar, Odamaki *et al* en 2016 estudiando 367 individuos japoneses sanos entre 0 y 104 años, reportaron que la microbiota intestinal cambia con la edad. Firmicutes fue el filo predominante en la población adulta, mientras Actinobacteria fue el más importante en menores de 1 año. La abundancia relativa de Actinobacteria en niños fue disminuyendo después del destete, y la composición de la microbiota intestinal fue acercándose a la de adulto cerca de los 3 años de edad (Akagawa, 2021).

Dado que el establecimiento y la maduración de la microbiota intestinal ocurre en los llamados “1.000 días”, que van desde la concepción hasta los primeros 2 años de vida del niño, éste período se considera una ventana crítica de oportunidad para realizar intervenciones que contribuyan a la conformación de una microbiota saludable (**Figura 1**).



**Figura1:** Adaptada de Milani *et al* (2017)

## 2.1.2- Relación entre disbiosis y enfermedad

Hasta la fecha, numerosos estudios y revisiones han remarcado la importancia crucial del desarrollo de esta simbiosis entre microbiota y hospedador para la salud del bebé, y sus consecuencias durante toda la vida (Derrien, 2019). Alteraciones en la composición y abundancia de los miembros de la microbiota intestinal en la vida temprana, denominadas disbiosis, han sido asociadas con desórdenes en la salud en niños y adultos, entre ellos sobrepeso, obesidad, manifestaciones atópicas, asma, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, síndrome de intestino irritable, enfermedades crónicas inflamatorias y condiciones relacionadas al neurodesarrollo (Iweala and Nagler, 2019; Berni Canani, 2018; Sestito, 2020).

Muchas de estas enfermedades crónicas propias de la “vida moderna”, conocidas como enfermedades crónicas no transmisibles (NCDs por sus siglas en inglés), están asociadas de forma similar con factores de riesgo medioambientales modernos, y se han incrementado en las últimas décadas. En las enfermedades metabólicas, como la diabetes, existe una inflamación crónica de bajo grado, que podría ser inducida y perpetuada por estados de disbiosis intestinal, a través de varios mecanismos. Por ejemplo, el paso del lipopolisacárido de bacterias patógenas al torrente sanguíneo causa una endotoxemia metabólica que contribuye al estado proinflamatorio. Las dietas ricas en grasas y bajas en fibras, el sedentarismo y el consumo de azúcares refinados contribuyen a la disbiosis intestinal y al aumento de la permeabilidad intestinal que perpetúa este estado inflamatorio (Noce, 2019).

En el caso de las enfermedades alérgicas, aunque factores genéticos pueden afectar la tendencia actual del desarrollo de las mismas, el rápido incremento observado en los últimos 20 años, especialmente en países industrializados, sugiere que deben existir factores ambientales. Algunos de ellos han sido identificados, como el incremento de los partos por cesárea, el uso de antibióticos y un alto consumo de dietas ricas en grasas y bajas en fibra. El hecho de que todos estos factores a su vez modulan la microbiota intestinal, sugiere un papel de la misma en el desarrollo de las alergias, sobre todo por su importante función en la regulación de la respuesta inmune y la tolerancia oral en la vida temprana (Sestito, 2020).

Por todo lo expuesto, existe un creciente interés en descubrir biomarcadores basados en el microbioma que sean capaces de predecir enfermedades y que puedan ser

utilizados a futuro para proponer estrategias terapéuticas y preventivas (Bridgman, 2016).

### 2.1.3- Microbiota intestinal y alergias alimentarias

En los últimos años la prevalencia de las **alergias alimentarias** ha mostrado un marcado crecimiento, principalmente en sociedades industrializadas en todo el mundo (Iweala and Nagler, 2019; Peroni, 2020). La alergia es la NCD de inicio más temprano, comenzando a menudo en los primeros meses de vida. Las alergias alimentarias se presentan como parte de un conjunto de manifestaciones alérgicas, conocidas como “marcha atópica”, en la cual aparece en los primeros meses la dermatitis atópica, seguida por alergias a alimentos entre los 2 y 5 años. Asma y rinitis alérgicas suelen manifestarse en la edad escolar (Iweala and Nagler, 2019).

Notablemente, la evolución de la epidemia de alergias ha crecido paralelamente con los cambios de estilo de vida en los países industrializados, tales como una progresiva urbanización, programas de sanitización ambiental, uso desmedido de antibióticos, inactividad física y consumo de alimentos altamente procesados. Todos estos cambios han llevado a una reducción de la exposición a microorganismos en la vida temprana y a una pérdida de la diversidad microbiana intestinal (Peroni, 2020).

En la **figura 2** se muestra cuáles son los factores que predisponen al desarrollo de alergias alimentarias en individuos genéticamente susceptibles.



**Figura 2.** Adaptada de Iweala and Nagler (2019)

En relación al mecanismo inmunológico de la enfermedad alérgica, se sabe que la dominancia de la respuesta tipo Th2 sobre Th1 es clave en el desarrollo de la misma. Los linfocitos Th2 producen interleucinas (IL) 4, 5 y 13, que están involucradas en el inicio y perpetuación del fenotipo alérgico. La IL-4 promueve la diferenciación de células T vírgenes a Th2 y el cambio de clase a IgE en los linfocitos B. La IL-5 actúa en la diferenciación y activación de los eosinófilos, y la IL-13 actúa también en el cambio de clase a IgE en los linfocitos B. Además, activa mastocitos y promueve la migración de eosinófilos hacia las mucosas. Por el contrario, una respuesta de tipo Th1 mediada por interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), inhibe la respuesta Th2. Como consecuencia, un desbalance inmune entre estas respuestas, dirigido hacia un incremento de la respuesta tipo Th2 aumentaría el riesgo de padecer enfermedades alérgicas. La diferenciación hacia Th1 y Th2, así como hacia otros tipos de respuestas T que son relevantes en la enfermedad alérgica, como T regulatoria (Treg), Th17 y Th9, está controlada estrictamente por mecanismos epigenéticos (Acevedo, 2021). Nagler y otros autores proponen que la tolerancia a antígenos dietarios, y por tanto la prevención de la alergia alimentaria, requiere de una respuesta inmune regulatoria específica de antígeno, y una respuesta protectora de la barrera intestinal inducida por las bacterias comensales. La interrupción de la comunicación entre el epitelio intestinal y las células inmunes por alteraciones del microbioma, impactan negativamente en la homeostasis inmune, impidiendo el desarrollo de la tolerancia oral (Iweala and Nagler, 2018).

El mecanismo primario de tolerancia oral a antígenos dietarios es la inducción de las células Treg. La respuesta tolerogénica a antígenos lumenales depende de la translocación de éstos a través de la barrera epitelial intestinal, en que intervienen las células M presentes en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Allí son captados por las células presentadoras de antígenos, fundamentalmente las células dendríticas (DC) CD103+, las cuales migran hacia los nódulos linfáticos mesentéricos y presentan dichos antígenos a los linfocitos T vírgenes. Esta interacción en presencia de ácido retinoico (metabolito de la vitamina A) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), producidos por las DC CD103+, favorece la conversión a células Tregs foxP3+ específicas de antígeno, productoras de IL-10. Algunas Tregs migran hacia el torrente sanguíneo promoviendo tolerancia sistémica y vuelven a la lámina propia donde producen TGF- $\beta$  que promueve el cambio de clase a IgA en los linfocitos B. Si bien el papel de la microbiota en la regulación de la captación y la

presentación de antígenos aún no ha sido completamente dilucidado, se sabe que en el intestino delgado, donde se absorben los antígenos alimentarios, los fagocitos mononucleares residentes en la lámina propia (MNPs) expresan el receptor de quimioquinas CX3CR1. La estimulación microbiana de los Toll-like receptors (TLRs) y la señalización mediante la proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD88) inducen la generación de extensiones de las DC en el intestino delgado. Tanto la presentación de antígenos como la producción de IL-10 por los MNPs CX3CR1+, son requeridos para la tolerancia. Se ha observado que, en ratones tratados con antibióticos, los MNPs CX3CR1+ pierden la capacidad de expresar IL-10, sugiriendo un papel crítico de la microbiota en su función (Iweala and Nagler, 2019; Shu, 2018).

Los microorganismos comensales también influyen en el desarrollo de linfocitos Tregs en forma directa a través de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que son los productos finales de la fermentación de la fibra por las bacterias comensales, en especial el grupo de los clostridios. Se ha demostrado una correlación positiva entre el número de Tregs y la concentración de AGCC. Uno de los mecanismos por los cuales los AGCC protegen contra enfermedades alérgicas es de tipo epigenético, mediante la inhibición directa de deacetilasas de histonas, que regulan la expresión de las células linfoides innatas para la protección de la barrera intestinal, a través de la producción de IL-22. Ésta induce la producción de péptidos antimicrobianos por las células de Paneth, y de mucus mediante las células Goblet en un intestino con microbiota saludable (Shu, 2018). En particular el acetato es capaz de incrementar el porcentaje y actividad de las células Tregs, causando un aumento en el estado de acetilación del promotor de foxP3+, a través de la inhibición de la deacetilasa de histona HDAC9. El butirato inhibe deacetilasas de histonas afectando la activación al menos parcial, del factor de transcripción NF-κB (Acevedo, 2021). La acetilación inducida por los AGCC producidos por *Clostridium*, *Anaerostipes* y *Eubacterium*, así como la metilación del ADN inducida por el folato sintetizado a partir de bacterias comensales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, estimulan el desarrollo y el balance inmune del intestino (Acevedo, 2012).

Todos estos datos sugieren que las células Tregs foxP3+, tanto inducidas en forma específica por los antígenos alimentarios, como por las bacterias comensales, cooperan para prevenir la respuesta alérgica a los alimentos (Shu, 2018).

#### 2.1.4- Alergia a la proteína de leche de vaca

La APLV es la alergia alimentaria más común en niños, presentándose generalmente antes de los 2 años de edad, y es reconocida como un indicador de desregulación de la respuesta inmune en la edad pediátrica (Bunyavanich, 2016; Peroni, 2020). De hecho, los niños afectados por APLV en el primer año de vida tienen un riesgo incrementado de desarrollar otras manifestaciones atópicas a lo largo de su vida, así como otros desórdenes crónicos inmunomediados (Berni Canani, 2018). La incidencia mundial es de 2 a 3 % en el primer año de vida y en la actualidad el único tratamiento posible es retirar de la dieta todos los alimentos que contengan proteínas de leche de vaca (Bunyavanich, 2016; Dong, 2018).

En cuanto a la prevalencia en Argentina, un estudio retrospectivo que analizó casos confirmados de APLV durante 11 años en un hospital universitario, detectó una prevalencia acumulada de 0,8 %, pero con un incremento porcentual de la misma, desde 0,4 % en 2004 hasta 1,2 % en 2014, es decir un incremento de tres veces en la prevalencia de esta alergia (Mehaudy, 2018). La APLV suele tener una evolución favorable con resolución espontánea hacia los 5 años de vida, ocurriendo dicha resolución en un 90 % de los casos antes de los 2 años de vida (Bozzola, 2014).

En base a la reacción inmune implicada, se distinguen tres tipos de APLV: mediada por IgE, no mediada por IgE (la mayoría debidas a reacciones de inmunidad celular) y trastornos mixtos (Díaz, 2018). Las primeras se caracterizan por la aparición de forma inmediata (menos de 2 horas desde el contacto) de sintomatología cutánea, como dermatitis atópica, o respiratoria, como rinitis o asma. En estos pacientes es posible determinar la existencia de anticuerpos IgE específicos en sangre o mediante pruebas cutáneas (*Prick test*). La APLV mediada por IgE es la forma responsable de la expresión más extrema de APLV, que es la anafilaxia. Las formas no mediadas por IgE ocasionan una sintomatología predominantemente digestiva de aparición tardía, siendo la forma más común de presentación la proctocolitis alérgica, y en la mayoría de los casos no es posible confirmar la implicación de un mecanismo inmunológico mediante pruebas complementarias (Bozzola, 2014). Otras formas de presentación son la enteropatía o la enterocolitis inducida por proteína de leche de vaca (FPIES) (Mennini, 2020).

A pesar de los avances tecnológicos en secuenciación y análisis bioinformático, aún no conocemos con exactitud los microorganismos cruciales en el desarrollo de enfermedades alérgicas, siendo las más estudiadas dermatitis atópica, eczema, rinitis alérgica y asma, con resultados controvertidos. Esto obliga a seguir avanzando en el

<sup>6</sup> estudio de la microbiota de poblaciones pediátricas, y en el conocimiento de las alteraciones que presentan los niños con APLV, teniendo en cuenta las particularidades etarias y regionales. Por otra parte, es muy importante tener presente que la programación inmune inducida por la <sup>5</sup> microbiota intestinal ocurre en los primeros años de vida, siendo este periodo la ventana en la cual las intervenciones serían efectivas en la prevención de las alergias.

#### 2.1.5- Teorías propuestas

Se han postulado algunas teorías para explicar el gran incremento que han sufrido <sup>2</sup> las enfermedades alérgicas, especialmente en los países occidentalizados. Una de ellas denominada "Teoría de la Higiene", propuesta por Strachan a fines de los 80, basada en la evidencia epidemiológica de que el contacto temprano con factores ambientales que incrementan una exposición natural a los microorganismos (como el parto vaginal, la vida en ambientes rurales, familias numerosas, presencia de mascotas y ausencia de antibióticos) <sup>1</sup> protege contra enfermedades alérgicas y autoinmunes, y predispone menos al desarrollo de diabetes, obesidad y enfermedades inflamatorias. Un ambiente extremadamente aséptico aumenta la incidencia de estos trastornos (Iweala y Nagler, 2019; Peroni, 2020). El hecho de que algunos investigadores han sugerido un papel crítico de las señales inmunorregulatorias por parte de las bacterias comensales en la regulación de la hiperreactividad alérgica, ha llevado a la reformulación de la hipótesis de la higiene como la de los "viejos amigos". Esta hipótesis propone que cambios en el entorno, la dieta y el estilo de vida de los países industrializados, sumados a una alta exposición a antibióticos, un mayor consumo de grasas saturadas y baja cantidad de fibras, han modificado la microbiota intestinal alterando de este modo el natural desarrollo de la tolerancia inmune, lo cual ha conducido al aumento de las enfermedades alérgicas (Iweala y Nagler, 2019; Rachid, 2016).

## 2.2- Antecedentes del tema

### 2.2.1- Evidencias en humanos

El primer estudio que exploró la hipótesis de que la enfermedad alérgica estaría asociada con una microbiota alterada en niños, fue realizado en Suecia en los años 90, utilizando



técnicas dependientes de cultivo. Hallaron que los niños alérgicos estaban menos colonizados con lactobacilos y tenían mayor proporción de bacterias aeróbicas y menos Bacteroidetes que los niños sin alergias (Bridgman, 2016). Sin embargo, este tipo de estudios arrojaban resultados parciales, dado que la mayoría de las bacterias intestinales no pueden ser cultivadas. Desafortunadamente, no se han realizado trabajos en esta área utilizando metagenómica total, pero numerosos estudios basados en secuenciación del ARN ribosomal 16S, han demostrado que niños con alergias alimentarias exhiben una microbiota diferente a la de aquellos sin alergias (Di Costanzo, 2020). A continuación, se mencionan los estudios publicados hasta la fecha en alergias alimentarias mediadas por IgE, resumidos en la tabla 1.

**Tabla 1.** Estudios de microbiota intestinal en pacientes pediátricos con y sin alergia alimentaria (adaptada de Di Costanzo, 2020)

	<b>Alergia alimentaria</b>	<b>Diversidad</b>	<b>Alteraciones en taxa</b>
<b>Ling et al. 2014</b> (n=34)	Leche de vaca, huevo, pescado, trigo, maní	Igual	↑ Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria ↓ Firmicutes
<b>Chen et al. 2015</b> (n=23)	Huevo, leche de vaca, trigo, maní, soja	Disminuida	↑ Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria ↓ <i>Veillonella</i>
<b>Azad et al. 2015</b> (n=12)	Leche de vaca, huevo, maní	Igual	↓ <i>Bacteroidaceae</i> y <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Berni Canani et al. 2016</b> (n=39)	Leche de vaca	NR	↑ <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> ↓ <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> y <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Inoue et al. 2017</b> (n=4)	Huevo, trigo, soja, leche de vaca, maní	NR	↑ <i>Lachnospira</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Sutterella</i> ↓ <i>Dorea</i> , <i>Akkermansia</i>
<b>Savage et al. 2018</b> (n=14)	Leche de vaca, trigo, huevo, maní, soja	Igual	↓ <i>Citrobacter</i> , <i>Oscillospira</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Dorea</i>
<b>Bunyavanich et al. 2016</b> (n=226)	Leche de vaca	NR	↑ Bacteroidetes, <i>Enterobacter</i>
<b>Fazlollahi et al. 2018</b> (n=141)	Huevo	NR	↑ <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>
<b>Dong et al. 2018</b> (n=60)	Leche de vaca	Disminuida	↑ <i>Enterobacteriaceae</i> ↓ <i>Bacteroidaceae</i>
<b>Thompson et al. 2010</b> (n=16)	Leche de vaca	NR	↑ <i>Lactobacillaceae</i> ↓ <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>

NR: no reportada

Los estudios en alergia alimentaria no mediada por IgE son aún más escasos. Por ejemplo, Berni Canani *et al* (2018) hallaron disbiosis intestinal caracterizada por enriquecimiento de *Bacteroides* y *Alistipes* en niños con APLV IgE no mediada, en comparación con el grupo control.

#### 2.2.2.- Evidencias en animales de experimentación

Estudios en animales de experimentación revelan evidencias acerca del papel de la microbiota en el desarrollo de alergias. Por una parte, ratones tratados con antibióticos han mostrado predisposición al desarrollo de enfermedad alérgica. Similarmente, ratones libres de microorganismos o *germ-free* (GF) no desarrollan tolerancia inmune y mantienen una respuesta Th2 a antígenos administrados oralmente. Este efecto puede revertirse mediante la reconstitución del microbioma a edad temprana, pero no más tarde en la vida (Di Costanzo, 2020). Otra cuestión interesante es que la microbiota intestinal es capaz de transferir susceptibilidad a alergia alimentaria, lo cual fue probado en ratones GF a los cuales se reconstituía la microbiota con aquella proveniente de un modelo de ratones susceptibles a alergia alimentaria (Noval Rivas, 2013). Un estudio del grupo de Cathryn Nagler, demostró que ratones GF estaban protegidos de desarrollar anafilaxia a la leche de vaca si se colonizaban con microbiota de niños sanos, pero no con microbiota proveniente de niños con APLV (Feehley, 2019).

Aunque cada vez surgen más evidencias de asociaciones de la microbiota con enfermedades alérgicas, algunos estudios no han hallado diferencias en la microbiota de niños con estos cuadros, o han encontrado asociación con ciertos fenotipos alérgicos pero no con otros (Bridgman, 2016). Si bien sabemos que la estructura de la microbiota en los primeros 6 meses de vida es relevante en el desarrollo de alergias, y que la disbiosis intestinal podría influenciar tanto la aparición como el curso de las alergias alimentarias, aún no se han detectado taxones específicos asociados con estas patologías (Di Costanzo, 2020). Esto puede deberse tanto a la heterogeneidad en los diseños experimentales, como al momento de la toma de muestra, los métodos utilizados para la caracterización de la microbiota, o los diferentes tipos de alergia estudiados, lo cual dificulta establecer una clara asociación entre taxones específicos y el desarrollo de alergias. Algunos autores han hallado que una disminución de la diversidad microbiana precede al desarrollo de eczema, sensibilización atópica, rinitis alérgica y asma, sugiriendo que esta pérdida de diversidad podría ser incluso más importante como factor

predictivo, que la presencia o ausencia de determinados taxones microbianos (Bridgman, 2016).

### 2.3- Descripción del problema

La microbiota de personas adultas ha sido ampliamente estudiada en distintas partes del mundo con mucho más detalle que la de los niños. Se cree que la microbiota adulta se caracteriza por ser relativamente estable y poseer resiliencia, es decir retornar al estado original tras la perturbación ocasionada por algún factor de estrés, como cambios en la dieta o ingesta de antibióticos. En contraste, sabemos muy poco de la microbiota en niños menores de 3 años y su respuesta a desafíos, probablemente debido a cuestiones prácticas y éticas de los ensayos clínicos (Derrien, 2019).

La evidencia acumulada sobre la influencia de la microbiota intestinal y sus metabolitos en el desarrollo de alergias, provee una base científica para la creación de estrategias innovadoras para la prevención y el tratamiento de las mismas, como es el uso de ciertos probióticos. Sin embargo, debido a los factores ya mencionados que intervienen en la conformación de la microbiota, es muy importante tener en cuenta parámetros etarios, étnicos, geográficos, de estilo de vida y de alimentación para el estudio y caracterización de la microbiota saludable en una determinada población, ya que su conocimiento será crítico para poder predecir alteraciones relacionadas a ciertas enfermedades.

A la fecha, no hay estudios de microbiota intestinal en lactantes sanos, en Argentina ni en Latinoamérica. En niños con enfermedades alérgicas, la mayoría de los estudios publicados internacionalmente se han enfocado en dermatitis atópica, rinitis alérgica y asma, si bien los resultados no son concluyentes. Este proyecto piloto sería el primer estudio de microbiota intestinal en población pediátrica sana y con diagnóstico de APLV en nuestro país, y creemos que sentaría una base sólida para el estudio de intervenciones a futuro en nuestro medio.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la microbiota intestinal difiere entre niños sanos y niños con APLV, y que una microbiota alterada (escasa, poco diversa, o con ausencia de determinados taxones microbianos) podría actuar como un factor predisponente para el desarrollo de alergias durante la primera infancia.

## 2.4- Alcances del trabajo

Este trabajo será realizado en lactantes de hasta 6 meses de edad, de la ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, cuyos padres manifiesten su voluntad de participar por escrito. Se estudiarán dos grupos: un grupo control sano y un grupo de niños con manifestaciones clínicas y confirmación de APLV, tanto IgE mediada como no mediada.

## 2.5- Objetivos del estudio:

### 2.5.1- Objetivo General:

- Identificar marcadores en la microbiota intestinal de lactantes menores de 6 meses, asociados al desarrollo de APLV, mediada y no mediada por IgE, y su posible influencia por factores ambientales.

### 2.5.2- Objetivos Específicos:

- Identificar marcadores en la microbiota intestinal de lactantes menores de 6 meses asociados al desarrollo de APLV, mediada y no mediada por IgE, en comparación con un grupo control de lactantes sanos.
- Establecer asociaciones entre la microbiota, tipo de parto y lactancia y desarrollo de APLV, mediada y no mediada por IgE, en comparación con un grupo control de lactantes sanos.
- En el grupo de ALPV mediada por IgE, correlacionar los valores de IgE y/o *Prick test* con taxones potencialmente asociados al desarrollo de alergias.

## 2.6- Metodología

Tipo de estudio: observacional, descriptivo, transversal y prospectivo

Metodología: caso vs control

### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL TRABAJO

#### 3.1- Selección de poblaciones de estudio (niños sanos y con APLV)

##### 3.1.1- Tamaño de la muestra y elección de los participantes

Dado que no contamos con estudios de prevalencia de APLV a nivel local, ni se ha estudiado la microbiota de lactantes en la población propuesta, en este trabajo planteamos realizar un estudio piloto con 30 niños controles sanos y 30 con diagnóstico de APLV, según los criterios de inclusión y exclusión detallados a continuación.

Los niños sanos serán seleccionados por un pediatra de un centro de salud privado de nuestra ciudad teniendo en cuenta el crecimiento dentro de los parámetros normales (progresión de peso y talla en su percentil de crecimiento acorde a tablas de la Sociedad Argentina de Pediatría), y la ausencia de cualquier tipo de manifestación alérgica desde el nacimiento hasta el momento en que ingresen al estudio, ya sean signos/síntomas dermatológicos (síndrome de alergia oral, urticaria/angioedema, dermatitis atópica), respiratorios (sibilancias, rinoconjuntivitis), digestivos (diarrea crónica, deposiciones con moco y /o sangre, vómitos y/o diarrea inmediata asociada a la ingesta de alimentos), esofagitis eosinofílica o anafilaxia.

Los niños con sospecha clínica de APLV no mediada por IgE serán evaluados por una gastroenteróloga pediatra de un centro privado especializado en patologías digestivas, mientras que los que tengan sospecha de APLV mediada por IgE serán evaluados por un alergista pediatra de consulta privada. Los profesionales ofrecerán a los padres la inclusión en el estudio, confeccionarán la historia clínica (ANEXO 1), explicando y entregando el consentimiento informado (ANEXO 2).

##### 3.1.2- Criterios diagnósticos de APLV

El diagnóstico de APLV se realizará teniendo en cuenta los criterios clínicos y de laboratorio establecidos en consensos nacionales e internacionales (Fiocchi, 2010; Koletzko, 2012).

3.1.2.1- Diagnóstico de APLV mediada por IgE: historia clínica detallada y compatible, con la aparición de síntomas inmediatos (menos de 2 h tras la ingesta), manifestaciones

cutáneas y/o respiratorias y/o digestivas ligadas a mecanismos IgE: urticaria, angioedema, síndrome de alergia oral, rinoconjuntivitis, sibilancias, hipersensibilidad gastrointestinal inmediata o anafilaxia, más la determinación de la presencia de sensibilización a proteínas de leche de vaca (mediante test cutáneos o IgE específicas) y mejoría absoluta de los síntomas al suprimir la alimentación a base de proteínas de leche de vaca y derivados.

- **Pruebas cutáneas (Prick test):** Se coloca una gota del alérgeno ( $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, caseína, histamina como control positivo y suero salino como control negativo), en la cara anterior del antebrazo, se pincha con lanceta encima de cada gota para que la solución penetre en la piel y se mide el tamaño de la pápula a los 15 minutos. Se considera positivo un tamaño de pápula superior a 3 mm; una pápula superior a 10 mm se asocia con alergia persistente.
- **Determinación de IgE específica en suero:** Se determinará la IgE específica a proteínas de la leche de vaca (PLV), con un punto de corte de 0,35 kU/L. Valores superiores a 2,5 tienen un alto valor predictivo positivo, por lo que se podría obviar la prueba de provocación.
- **Prueba de provocación oral:** su realización puede omitirse si la probabilidad de APLV es alta, basado los test cutáneos o las IgE específicas positivas, o si la misma tuviera un elevado de presentar síntomas severos (p. ej., antecedente de anafilaxia).

3.1.2.2.- **Diagnóstico de APLV no mediada por IgE:** historia clínica detallada y prueba de exclusión-provocación. La historia clínica debe evaluar antecedentes familiares y personales de atopía para establecer el riesgo, relación entre los síntomas y exposición al alimento, tiempo transcurrido entre el contacto o la ingesta del alimento y la aparición de los síntomas, características y gravedad de los mismos, edad de comienzo, historia nutricional y dietética completa y factores asociados o desencadenantes.

- **Prueba de exclusión-provocación:** es la prueba "gold standard" para confirmar el diagnóstico de APLV no mediada por IgE. Consiste en excluir la PLV y derivados de la dieta por un periodo de 4 a 6 semanas, comprobar la resolución de los síntomas y posteriormente volver a introducirla de forma controlada, excepto en los casos de FPIES. Si está alimentado con pecho exclusivo, la madre deberá realizar la dieta sin PLV de forma estricta. Si se encuentra recibiendo fórmula artificial, se indicará una fórmula extensamente hidrolizada.

### 3.1.3- Criterios de inclusión y de exclusión

Serán incluidos en el estudio lactantes entre 0 y 6 meses, nacidos a término (semana 37 a 42), por parto vaginal o cesárea, bajo lactancia materna exclusiva, fórmula o mixta.

Los criterios de exclusión son los siguientes: lactantes nacidos pretérmino (< 37 semanas), ingesta de antibióticos en las 4 semanas previas a la toma de muestra y hospitalización del niño en el mes previo por más de 48 o 72 hs. En el grupo control se excluirán además niños cuyos padres o hermanos tengan o hayan tenido APLV. Las siguientes variables maternas y del lactante serán consignadas como datos adicionales que podrían eventualmente ser analizados en función de los hallazgos de los estudios de microbiota, si el estudio escala a un N mayor en función de los resultados de este piloto: obesidad materna al inicio del embarazo (IMC > 30), consumo de probióticos durante el último mes de embarazo o durante la lactancia, antibióticos maternos durante la lactancia, profilaxis antibiótica intraparto, peso al nacer y edad gestacional del niño, número de hermanos, presencia de mascotas en el hogar y medio urbano o rural.

### 3.2- Elección y justificación de la metodología a utilizar

Actualmente, los estudios moleculares para el estudio de la microbiota intestinal pueden realizarse de tres formas: a) secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S, lo cual provee un detalle de los taxones presentes (metataxonómica), b) metagenómica total, que también determina potenciales genes funcionales, y c) análisis metatranscriptómicos que describen la expresión de dichos genes (Goodrich, 2014). En este trabajo, por cuestiones operativas y de costes, y porque además no existen antecedentes locales en el tema, realizaremos el análisis de la microbiota intestinal por secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S, como se muestra esquemáticamente en la **Figura 3**.

## Comunidad microbiana



Perfil genómico del ARN 16s ribosomal

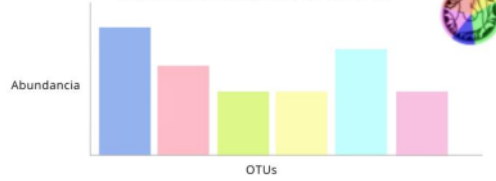
Amplificación y secuenciación del ARN 16s ribosomal



Generación de OTUs

OTU_1	OTU_2	OTU_3	OTU_4
TGAGCTATTAGCTTA	GCTAGCTAGCTAGCT	GGTATGCGTATTA	GTCAATGCTATATGCT
TGAGCTATTAGCTTA	GCTAGCTAGCTAGCT	GGTATGCGTATTA	GTCAATGCTATATGCT
TGAGCTATTAGCTTA	GCTAGCTAGCTAGCT	GGTATGCGTATTA	GTCAATGCTATATGCT
TGAGCTATTAGCTTA	GCTAGCTAGCTAGCT	GGTATGCGTATTA	GTCAATGCTATATGCT

Clasificación taxonómica de los OTUs



Perfil taxonómico de la microbiota

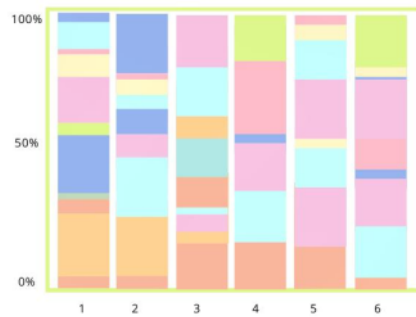


Figura 3: Adaptada de Milani *et al* (2017)



### 3.2-1. Recolección y conservación de muestra

El almacenamiento y las condiciones de transporte de las muestras en un estudio de microbiota son muy importantes debido a que impactan en el rendimiento y calidad del ADN extraído. Los investigadores coinciden en que lo más importante es que las condiciones sean constantes para todas las muestras. Los protocolos más aceptados recomiendan congelar las muestras de forma inmediata a  $-80^{\circ}\text{C}$  en hielo seco o en nitrógeno, particularmente las muestras de heces debido a su alta carga microbiana. Sin embargo, algunos trabajos como el de Lauber *et al*, indican que el almacenamiento en un rango entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 2 semanas no afecta la diversidad ni la abundancia de los principales taxones. En cambio, deben evitarse el congelado y descongelado de muestras, dado que esto sí tiene un efecto sobre la composición microbiana (Goodrich, 2014). Debido a que el congelamiento de muestras puede no ser posible para muchos laboratorios, o bien las muestras son recolectadas en lugares distantes y son los mismos pacientes quienes deben conservarlas hasta su entrega, se han estudiado otros métodos, como el uso de alcohol 95°, el kit comercial OMNIGene Gut o tarjetas para conservación de muestras de sangre de cordón, los cuales serían aptos para conservar las muestras hasta 8 semanas a cualquier temperatura inclusive ambiente, si bien aclaran que para métodos como metagenómica total o PCR cuantitativa no serían adecuados (Song, 2016). En nuestro estudio utilizaremos OMNIGene Gut OM-200 (DNA Genotek, Ontario, Canadá) como preservante, dado que las muestras deben ser trasladadas desde nuestra ciudad hasta otra distante 800 km. Para este estudio se recolectará una muestra por niño, al momento del diagnóstico.

### 3.2-2. Técnica de extracción del ADN

Se realizará la extracción de ADN de las muestras mediante el kit comercial QIAmp PowerFecal Pro DNA kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido será cuantificado en un espectrofómeto DeNovix DS-11 (Denovix, Wilmington, USA) y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2-3. Técnica molecular y diseño del protocolo

Se realizará <sup>24</sup> secuenciación de la región variable V3-V4 del gen del rARN 16S, previa <sup>13</sup> reacción en cadena de polimerasa (PCR) con los primers Pro341F/Pro805R para bacterias, y ARC344F/Arch806R para arqueas (Takahashi y col, 2014). Se realizarán al menos tres amplificaciones de cada réplica para disminuir el bias de la PCR. En todos los casos utilizará agua grado biología molecular como control negativo de la amplificación. Los amplicones resultantes serán purificados y cuantificados por espectrofotometría, y las réplicas serán combinadas en cantidades equimolares en una única muestra y secuenciadas en la plataforma Illumina MiSeq System (Illumina, San Diego, USA), garantizando 200.000 lecturas (~300 bp) por individuo para la identificación taxonómica.

### 3.3- Elección del software y plataforma de análisis de datos

El curado y filtrado por calidad, la definición de grupos taxonómicos, la clasificación de los mismos y el análisis de las secuencias resultantes se realizará utilizando el software QIIME ([www.qiime.org](http://www.qiime.org)). Las lecturas se clasificarán al nivel taxonómico más bajo posible (ej: género) en base a la base de datos Silva (<https://www.arb-silva.de/>). Las secuencias serán agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTU), en base a la identidad de secuencia (95 % para género y 97 % para especie). Se realizarán curvas de rarefacción para confirmar que se haya alcanzado la suficiente profundidad de secuenciación en todas las muestras. Se estudiará la diversidad microbiana de cada muestra mediante <sup>3</sup> los índices de alfa diversidad (índices de Shannon, Chao1, Simpson); y entre muestras en términos de beta diversidad (se evaluarán los índices de Jacqard, Bray Curtis, Weighted y Unweighted Unifrac). Se realizarán diagramas de análisis de coordenadas principales (PCA), útiles para representar la beta diversidad en diagramas de 2 o 3 dimensiones, e identificar patrones de diferenciación entre las muestras procedentes de los diferentes grupos de estudio. Se explorarán las diferencias de distribución de filo o entre comunidades microbianas en <sup>15</sup> los pacientes con alergia alimentaria en comparación con <sup>3</sup> muestras de niños sanos. Las secuencias crudas del presente proyecto serán depositadas <sup>3</sup> en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

### 3.4- Análisis estadístico de los datos

Se estratificarán los grupos control y APLV según <sup>20</sup> tipo de parto (vaginal o cesárea), y tipo de lactancia (materna exclusiva, fórmula o mixta) y se compararán los parámetros de la microbiota intestinal entre los grupos de las mismas características. Se llevará a cabo una estadística multivariada para tratar de identificar los taxones más diferenciales entre grupos/condiciones; así como su correlación con las variables de estudio. En caso de escalar el estudio a un mayor N, en el grupo de APLV, se compararán los grupos IgE mediado y no mediado para tratar de establecer diferencias.

### **3.5- Consideraciones éticas. Consentimiento informado. Tratamiento de datos**

La obtención, tratamiento, <sup>13</sup> conservación y comunicación de los datos se harán de acuerdo a lo dispuesto en la Ley de Protección de Datos Personales de nuestro país (Ley 25.326). Los datos se recogerán de forma anónima, sin utilizar ni publicar ningún dato de origen personal. El presente proyecto será presentado para evaluación y <sup>27</sup> aprobación por el Comité de Docencia e Investigación de Fares Taie Instituto de <sup>28</sup> Análisis, así como por el comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Clínicas <sup>13</sup> de la ciudad de Mar del Plata y de la Universidad Nacional de La Plata. El consentimiento de los padres se tomará a todos los participantes (ANEXO 2).

## **4. CONCLUSIONES**

Se ha diseñado un trabajo de investigación que pretende estudiar por primera vez la microbiota intestinal en lactantes con APLV en una población de Argentina, siendo además el primer estudio en Latinoamérica.

Nuestros resultados proporcionarán información sobre posibles asociaciones entre esta patología y la microbiota intestinal, a través de su comparación con la microbiota de lactantes sanos. A su vez, el análisis de los factores que modulan el establecimiento de la microbiota a temprana edad, como el tipo de parto y de lactancia, permitirán conocer su influencia en nuestro medio sobre el desarrollo de APLV.

Si bien ensayos clínicos <sup>6</sup> han demostrado que la manipulación de la microbiota intestinal con probióticos o prebióticos podría ser efectiva en la prevención primaria de la dermatitis atópica, aún no hay evidencias suficientes en otras condiciones alérgicas, como las aler-

gias alimentarias. El hallazgo de marcadores en la microbiota intestinal que puedan asociarse a APLV en nuestra población, contribuirá a generar el conocimiento necesario para evaluar si es posible prevenir su desarrollo o mejorar la sintomatología de estos pacientes a través del diseño de estrategias dirigidas a modular su microbiota.

Por otro lado, la comparación de nuestros resultados con otros estudios de investigación sobre esta temática permitirá comprobar si ciertos marcadores asociados a APLV son universales entre poblaciones de características similares de otras regiones geográficas.

Por último, este estudio piloto contribuirá a implementar y consolidar este tipo de estudios metagenómicos en nuestro laboratorio, para ser destinados a nuevos ensayos clínicos y aplicaciones futuras sobre la microbiota y sus alteraciones en otras condiciones relacionadas a la salud y la enfermedad.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo et al (2021). Perinatal and Early-Life Nutrition, Epigenetics, and Allergy. *Nutrients*, 13:721.

Akagawa et al (2021). Development of the gut microbiota and disbiosis in children. *Bioscience of Microbiota*, 40(1): 12-18

Allaband et al (2019). Studying, analyzing and interpreting gut microbiome data for clinicians. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 17(2): 218-230

Azad et al (2015). Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clin Exp Allergy*, 45(3): 632-43

Berg, Rybakova, Schloter (2020). Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8:103

Berni Canani et al (2018). Gut microbiome composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Scientific reports*, 8:12500

Berni Canani et al (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formulae expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J*, 10:742-750

Bozzola et al (2015). Alergia a la proteína de la leche de vaca. Evaluación de su resolución espontánea por medio de desafíos doble ciego placebo controlados. *Arch Alerg e Inmunol Clin*, 46(2): 44-48

Bridgman, Kozyrskyj, Scott, Becker and Azad (2016). Gut microbiota and allergic disease in children. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 116: 99-105

Bunyanavich et al (2016). Early-life gut microbiome and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol*, 138(4): 1122-1130

Chen, Chen, Kong, Chang, Huang (2016). Alterations in the gut microbiota of children with food sensitization in early life. *Pediatr Allergy Immunol*, 27:254-262

Derrien, Alvarez and de Vos (2019). The gut microbiota in the first decade of life. *Trends in Microbiology*, 27(12): 997-1008

Díaz et al (2018). Microbiota and derived parameters in fecal samples of infants with non-IgE cow's milk protein allergy under a restricted diet. *Nutrients*, 10:1481

Dong, Feng, Yan, Lyu and Xu (2018). Early-life gut microbiome and cow's milk allergy- a prospective case-control 6 month follow-up study. *Saudi J of Biol Sciences*, 25:875-880

Fazlollahi et al (2018). Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy*, 73:1515-24

Feehley et al (2019). Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nature Medicine*, 25: 448-453

Fiocchi A, Brozek J, Schünemann HJ, et al. (2010) World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol*; 21: 1-125.

Goodrich et al (2014). Conducting a microbiome study. *Cell*, 158(2): 250-262

Inoue et al (2017). A preliminary study of gut disbiosis in children with food allergy. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 81(12): 2396-2399

Iweala and Nagler (2019). The microbiome and food allergy. *Annu Rev Immunol*, 37: 377-403

Jiménez, Marín, Martín (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*, 51:270-274

Koletzko S, Niggemann B, Arato A, et al. (2012) Diagnostic Approach and Management of Cows-Milk Protein Allergy in Infants and Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*; 55: 221-9.

Ley, Peterson and Gordon (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124: 837-854

Ling et al (2014). Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl Environ Microbiol*, 80(8): 2546-54

Martín et al (2012). Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Human Lactation*, 28(1): 36-44

Mehaudy et al (2018). Prevalencia de alergia a la proteína de leche de vaca en niños en un hospital universitario de la comunidad. *Arch Arg Ped*, 3:216-233

Meninni, Fierro, Di Nardo, Pecora and Fiocchi (2020). Microbiota in non-IgE mediated food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 20:323-328

Metsälä et al (2013). Mother's and offspring's use of antibiotics and infant allergy to cow's milk. *Epidemiology*, 24(2): 303-309

Milani, et al (2017). The first colonizers of the human gut: composition, activities and Health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol and Biol Molecular Rev*; 81: e00036-17

Milani et al (2013). Assessing the fecal microbiota: an optimized Ion Torrent 16S rRNA gene-based Analysis protocol. *PLoS ONE*, 8(7): e68739.

Mitselou et al (2018). Cesarean delivery, preterm birth, and risk of food allergy: Nationwide Swedish Cohort study of more than 1 million children. *J Allergy Clin Immunol*, 142(5): 1510-1516

Noce et al (2019). Impact of Gut microbiota on onset and progression of chronic non-communicable diseases. *Nutrients*; 11:1073.

Noval Rivas et al (2013). A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 131:201-212.

Pascal et al (2018). Microbiome and allergic diseases. *Front Immunol*, 9: 1584

Penders et al (2006). Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort study. *Gut*, 56:661-667

Peroni, Nuzzi, Trambusti, Di Cicco and Comberiati (2020). Microbiome composition and its impact on the development of allergic diseases. *Front Immunol*, 11:700

Rachid and Chatila (2016). The role of the gut microbiota in food allergy. *Curr Opin Pediatr*, 28: 748-753

Rutayisire, Huang, Liu and Tao (2016). The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol*, 16:86

Savage et al (2018). A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in childhood. *Allergy*, 73:145-152

Sestito et al (2020). The role of prebiotics and probiotics in prevention of allergic diseases in infants. *Front Pediatr*; 8:583946

Song et al (2014). Preservation methods differ in fecal microbiome stability, affecting suitability for field studies. *mSystems*; 1(3): e00021-16.

Shu et al (2019). Microbiota and food allergy. *Clin Rev Allerg and Immunol*, 57(1): 83-97

Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M (2014) Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of *Bacteria* and *Archaea* Using Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE* 9(8): e105592.

Thompson-Chagoyan, Vieites, Maldonado, Edwards and Gil (2010). Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy – a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol*, 21: e394–e400.



ANEXO 1.

**PROTOCOLO MICROBIOTA EN NIÑOS SANOS Y CON APLV**

**Información del niño:**

Nombre.....

Edad.....

Fecha de nacimiento.....

Peso al nacer.....

Semanas de gestación.....

Tipo de parto: VAGINAL

CESÁREA

Lactancia (hasta los 6 meses):

MATERNA EXCLUSIVA  
FÓRMULA EXCLUSIVA  
MIXTA

Número de hermanos.....

Vivienda: URBANA

RURAL

Presencia de mascotas en el hogar.....

Antecedentes de alergia en:

MADRE.....Cuál?.....

PADRE.....Cuál?.....

HERMANOS.....Cuál?.....

(consignar Dermatitis atópica, eczema, asma, rinitis, alergia alimentaria)

**Información materna:**

Nombre.....

Número de embarazo.....

Peso al inicio del embarazo..... Altura.....IMC.....

Uso de antibióticos:

PROFILAXIS INTRA PARTO  
ÚLTIMO MES DE EMBARAZO  
LACTANCIA (mes anterior a la toma de muestra)

Uso de probióticos:

ÚLTIMO MES DE EMBARAZO  
LACTANCIA (mes anterior a la toma de muestra)

ANEXO 2.

## FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### 1. Título del estudio

#### ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LACTANTES MENORES DE 6 MESES, SANOS Y CON ALERGIA A PROTEINA DE LECHE DE VACA

### 2. Párrafo de Invitación

Se invita a su hijo a participar en este estudio de investigación para determinar la microbiota intestinal (esto es, las bacterias presentes en materia fecal). Su participación podría ayudar a determinar las concentraciones normales de las mismas, y la importancia de estas bacterias en el desarrollo de alergias alimentarias.

Antes de aceptar es importante que Ud entienda por qué se realiza y qué involucra este estudio.

Por favor tómese un tiempo para leer la información cuidadosamente y pregúntenos si hay algo que no es claro o necesita más información.

### 3. ¿Cuál es el propósito de este estudio?

La alergia a la leche de vaca es la causa más común de alergia alimentaria en lactantes y niños, probablemente porque la leche de vaca es uno de los primeros alimentos que recibe el niño. Los síntomas de esta enfermedad suelen desaparecer con el tiempo, pero a veces la enfermedad sigue y aparecen otros síntomas.

- *Si su hijo nunca ha presentado síntomas de alergia, se estudiarán las bacterias presentes en la materia fecal, con el objeto de determinar sus concentraciones normales para establecer un grupo control (sano)*
- *Si su hijo presenta síntomas compatibles con alergia a la leche de vaca, estudiaremos la materia fecal para investigar si existen cambios en ciertas bacterias y si los mismos se relacionan con esta alergia*

### 4. ¿Quiénes realizan este estudio?

Este es un estudio colaborativo, en el que participan profesionales bioquímicas y biólogas moleculares del Instituto de Análisis Fares Taie de la ciudad de Mar del Plata, investigadores de CONICET y médicos pediatras de 2 centros privados de nuestra ciudad.

SI, HE COMPRENDIDO Y ACEPTO PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Nombre y apellido..... DNI.....

Padre, madre, tutor del niño.....

Firma.....

## INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

15%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://www.farestaie.com.ar">www.farestaie.com.ar</a> Fuente de Internet	3%
2	<a href="http://www.pediatriaintegral.es">www.pediatriaintegral.es</a> Fuente de Internet	2%
3	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	2%
4	<a href="http://www.seghnp.org">www.seghnp.org</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://www.ampap.es">www.ampap.es</a> Fuente de Internet	1%
6	Eva María Gómez del Pulgar Villanueva. "Identificación de componentes de la microbiota intestinal potencialmente beneficiosos frente a la obesidad", Universitat Politecnica de Valencia, 2018 Publicación	1%
7	<a href="http://www.tdx.cat">www.tdx.cat</a> Fuente de Internet	1%

8

Fuente de Internet

1 %

9

Margherita Di Costanzo, Laura Carucci,  
Roberto Berni Canani, Giacomo Biasucci. "Gut  
Microbiome Modulation for Preventing and  
Treating Pediatric Food Allergies",  
International Journal of Molecular Sciences,  
2020

Publicación

&lt;1 %

10

[hera.ugr.es](http://hera.ugr.es)

Fuente de Internet

&lt;1 %

11

[pesquisa.bvsalud.org](http://pesquisa.bvsalud.org)

Fuente de Internet

&lt;1 %

12

Submitted to Universidad de Murcia

Trabajo del estudiante

&lt;1 %

13

[www.sap.org.ar](http://www.sap.org.ar)

Fuente de Internet

&lt;1 %

14

[liomont.com.mx](http://liomont.com.mx)

Fuente de Internet

&lt;1 %

15

[cybertesis.unmsm.edu.pe](http://cybertesis.unmsm.edu.pe)

Fuente de Internet

&lt;1 %

16

[racve.es](http://racve.es)

Fuente de Internet

&lt;1 %

17

[www.ayv.unrc.edu.ar](http://www.ayv.unrc.edu.ar)

Fuente de Internet

&lt;1 %

18	<a href="http://vbook.pub">vbook.pub</a> Fuente de Internet	<1 %
19	<a href="http://dspace.sheol.uniovi.es">dspace.sheol.uniovi.es</a> Fuente de Internet	<1 %
20	<a href="http://www.farmaciasoler.com">www.farmaciasoler.com</a> Fuente de Internet	<1 %
21	<a href="http://cdn02.pucp.education">cdn02.pucp.education</a> Fuente de Internet	<1 %
22	Submitted to Universidad Autónoma de Aguascalientes Trabajo del estudiante	<1 %
23	<a href="http://www.dexeusalergia.com">www.dexeusalergia.com</a> Fuente de Internet	<1 %
24	<a href="http://revistabiomedica.org">revistabiomedica.org</a> Fuente de Internet	<1 %
25	<a href="http://semipyp.es">semipyp.es</a> Fuente de Internet	<1 %
26	<a href="http://www.studocu.com">www.studocu.com</a> Fuente de Internet	<1 %
27	<a href="http://librosmedicos.com">librosmedicos.com</a> Fuente de Internet	<1 %
28	<a href="http://worldwidescience.org">worldwidescience.org</a> Fuente de Internet	<1 %

29

Submitted to Universidad Catolica San Antonio de Murcia

Trabajo del estudiante

<1 %

30

hablemosclaro.org

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo