

Universidad de Granada

Departamento de Pediatría Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Biología

Molecular II. Facultad de Farmacia.

Tesis Doctoral

**“Estudio comparativo de la microbiota intestinal
en niños con y sin alergia a las proteínas de la
leche de vaca”**

Oscar C. Thompson Chagoyán

Granada, 2006.

**D. JOSE MALDONADO LOZANO, DOCTOR EN MEDICINA Y PROFESOR
TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA

**Que el trabajo original de investigación que presenta al superior
juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la
Universidad de Granada, D. Oscar Constantino Thompson
Chagoyán sobre el tema: “Estudio comparativo de la microbiota
intestinal en niños con y sin alergia a las proteínas de la leche de
vaca”, ha sido realizado bajo mi dirección durante los cursos
académicos 2003-2004 y 2004-2005, siendo expresión de la capacidad
técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas
que le hacen acreedor al Grado de Doctor, siempre que así lo
considere el citado Tribunal**

Fdo: JOSE MALDONADO LOZANO

Granada,

**D. ÁNGEL GIL HERNÁNDEZ, DOCTOR EN CIENCIAS Y CATEDRÁTICO
DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II DE
LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA

**Que el trabajo original de investigación que presenta al superior
juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la
Universidad de Granada, D. Oscar Constantino Thompson
Chagoyán sobre el tema: “Estudio comparativo de la microbiota
intestinal en niños con y sin alergia a las proteínas de la leche de
vaca”, ha sido realizado bajo mi dirección durante los cursos
académicos 2003-2004 y 2004-2005, siendo expresión de la capacidad
técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas
que le hacen acreedor al Grado de Doctor, siempre que así lo
considere el citado Tribunal**

Fdo: ÁNGEL GIL HERNÁNDEZ

Granada,

D. JOSÉ MARÍA VIEITES FERNÁNDEZ, DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CERTIFICA

Que el trabajo original de investigación que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, D. Oscar Constantino Thompson Chagoyán sobre el tema: “Estudio comparativo de la microbiota intestinal en niños con y sin alergia a las proteínas de la leche de vaca”, ha sido realizado bajo mi dirección durante los cursos académicos 2003-2004 y 2004-2005, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor al Grado de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal

Fdo: JOSE MARÍA VIEITES FERNÁNDEZ

Granada,

ABREVIATURAS

APLV	Alergia a proteínas de leche de vaca
βLG	β lactoglobulina
CPA	Células presentadoras de antígeno
CU	Colitis Ulcerosa
DBPCFC	Estudio de provocación a los alimentos doble ciego controlado por placebo
EC	Enfermedad de Crohn
GALT	Tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal
IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal
IgE	Inmunoglobulina E
IgA	Inmunoglobulina A
IgAs	Inmunoglobulina A secretora
IL	Interleucina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RN	Recién nacido
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
TGF-β	Factor de transformación del crecimiento tipo beta
Tr	Células T reguladoras
TRFLP	
UFC	Unidades formadoras de colonias bacterianas

Introducción

Marco teórico

Alergia a los alimentos

Epidemiología

Factores asociados al desarrollo de alergia.

Factores genéticos.

Niveles séricos de IgE neonatal

Factores ambientales

Infecciones

Colonización intestinal alterada en etapas tempranas de la vida

Edad gestacional

Fisiopatología de las enfermedades alérgicas

Alergia a proteínas de leche de vaca (APLV)

Alergia a la leche de vaca en niños alimentados al pecho

Rutas de sensibilización a las proteínas de la leche de vaca

Criterio diagnóstico

Microbiota intestinal

Composición de la microbiota en el tubo digestivo

Cavidad bucal

Estómago y duodeno

Intestino delgado

Intestino grueso

Importancia y funciones de la microbiota intestinal

Funciones metabólicas

Funciones tróficas

Funciones tróficas

Funciones protectoras

Colonización bacteriana en el intestino del niño

Colonización inicial

Nacimiento vaginal

Nacimiento por cesárea

Colonización durante el primer año de vida

Colonización a partir del segundo año

Cambios de la microbiota intestinal asociados a enfermedad

Enfermedades atópicas e hipótesis higiénica
Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD)
Obesidad
Cáncer de colon
Artritis reumatoide
Estrés
Diversidad de la microbiota en función de la dieta
Leche materna vs fórmula
Inicio de alimentos diferentes a la leche (beikost)
Técnicas utilizadas para la identificación de la microbiota intestinal
Identificación de la microbiota intestinal mediante técnicas de cultivo
Identificación de la microbiota intestinal mediante técnicas de microgenómica
Elementos utilizados en los ensayos de microgenómica
Librerías de dna genómico
Librerías de cDna:
Técnicas de microgenómica
Pruebas con sondas genéticas:
Hibridación in situ fluorescente (fish).
Métodos de huellas genéticas
Electroforesis en gel por desnaturalización en gradiente o temperatura (dgge ó tgge)]:
Análisis mediante el patrón de la longitud de los fragmentos de restricción terminales (trf)
Análisis metagenómico
Análisis genómicos de especies concretas

Material y métodos

Diseño
Fase clínica
Criterios de inclusión
Criterios de eliminación
Diagnóstico de la apvl mediada por ige
Pruebas cutáneas
Material:
Medición de IgE específica en suero

Prueba de exposición a la leche de vaca (prueba de provocación doble ciego controlada por placebo)

Administración de cuestionarios

Estudio de microbiología clásica

Preparación de los medios de cultivo bacteriano

Preparación del medio de Beerens:

Toma de muestras de heces fecales

Procesamiento y siembra de las muestras de heces

Procesamiento de las muestras

Tiempo de incubación

Determinación del número de unidades formadoras de colonias (ufc)

Identificación y cuantificación de grupos bacterianos mediante técnicas de biología molecular

TRFLP

Aislamiento del dna bacteriano de las muestras fecales.

Verificación del estado del ADN obtenido

Amplificación del adn mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Digestión de productos de pcr con enzimas de restricción

Diálisis del dna digerido

Electroforesis capilar

Preparación de las muestras

Preparación del equipo

Programación de las muestras

Lista de inyección

Análisis de los resultados obtenidos con la electroforesis.

Identificación de los grupos bacterianos

Hibridación fluorescente in situ y citometría de flujo (fish-fc)

Manejo de las muestras fecales y la fijación celular

Obtención de los datos y citometría de flujo

Sondas de oligonucléotidos

Cuantificación de los productos del metabolismo bacteriano, agua y amonio

Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

Análisis estadístico

De los cuestionarios

De las características clínicas, microbiota fecal y sus productos metabólicos

Análisis descriptivo

Análisis comparativo:

Análisis bivariado

Análisis multivariado

Resultados

Características y antecedentes familiares y personales estudiados en niños sanos y con alergia a las proteínas de la leche de vaca.

Alergia a proteínas de leche de vaca

Somatometría

Evolución de los exámenes clínicos y de laboratorio:

Pruebas cutáneas

IgE

Prueba de desafío

Recuento de microorganismos en heces de lactantes sanos y alérgicos a proteínas de leche de vaca.

Cuantificación de microorganismos en heces de lactantes sanos y alérgicos a proteínas de leche de vaca, mediante la medición de los trflps.

Cuantificación de microorganismos seleccionados en

Heces de lactantes sanos y alérgicos a proteínas de leche de vaca mediante la técnica de FISH-FC.

Cuantificación de los productos del metabolismo bacteriano, agua y ph en heces de lactantes sanos y alérgicos a proteínas de leche de vaca

Asociación entre los grupos microbianos estudiados mediante cultivos específicos y sus productos metabólicos, en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca.

Asociación entre amonio y ph con los grupos microbianos estudiados mediante cultivos específicos en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca.

Discusión

Conclusiones

Bibliografía

Anexos

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha notado un aumento progresivo de la prevalencia de las enfermedades alérgicas y este incremento epidémico se observa principalmente en los países con estilo de vida occidental, (Eggesbo 2003, Vandenplas 2004) donde los niños que pertenecen a poblaciones con el nivel económico más alto son los que tienen el riesgo más elevado de desarrollar algún tipo de sensibilización atópica en los periodos tempranos de la vida (Vandenplas 2004). Este incremento ha sido atribuido a múltiples factores entre los que destacan los asociados al ambiente, los socioeconómicos, la mayor capacidad técnica para realizar el diagnóstico y el reconocimiento de los problemas alérgicos en etapas tempranas.

Una forma de explicar el importante incremento de las enfermedades atópicas, es la *Hipótesis higiénica*, (Eggesbo 2003) la cual atribuye a la mejoría en las condiciones de higiene durante la atención del parto y el periodo postnatal temprano un papel preponderante en el retardo del contacto entre el niño y una serie de bacterias que normalmente estimulan el desarrollo del sistema inmune y la consecuente adquisición de tolerancia a múltiples antígenos (tolerancia oral). Aunque el foco de esta hipótesis inicialmente fue el papel de las infecciones tempranas, recientemente ha sido dirigida hacia la carga microbiana total en general y a la colonización intestinal normal en particular, como factores asociados a la protección contra algunas enfermedades inflamatorias crónicas y la alergia (Martinez y Holt 1999; Rautava et al 2004, Thompson-Chagoyán et al 2005).

Así mismo, se ha encontrado que la microbiota intestinal contribuye a la adquisición de tolerancia a múltiples antígenos externos (Thompson-Chagoyán et al 2005) a través de varios mecanismos, entre los que destaca el procesamiento de los

antígenos contenidos en los alimentos, por la modificación de su estructura y reducción de su inmunogenicidad (Isolauri et al 1999), debido a lo cual el sistema inmune no desencadena una acción defensiva. Puesto que, se ha comprobado que la alergia alimentaria es el resultado de la pérdida de la tolerancia a los antígenos contenidos en los alimentos es factible pensar que la microbiota intestinal de los niños con alergia es diferente a la de niños de la misma edad sin atopía.

En apoyo de esta hipótesis, se ha demostrado que algunas enfermedades alérgicas, como la dermatitis atópica, pueden ser prevenidas cuando se administran a la madre preparados orales con bacterias vivas (probióticos) durante el embarazo (Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003;361:1869-71), con lo cual se modifica la microbiota intestinal de la madre y el tipo de bacterias que posteriormente colonizan a su hijo, por esta razón se piensa que, en caso de que los cambios en la microbiota en los niños con alergia sean constantes y más o menos uniformes, pueden ser utilizados como marcadores antes de que se presenten las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Por otro lado, se sabe que la alergia a los alimentos que más frecuentemente presentan los niños es la hiperreactividad a las proteínas de la leche de vaca mediada por inmunoglobulina E (IgE); categoría que se encuentra hasta en el 60% de los casos (Sampson 2003, Host et al 1997). Esta forma de hipersensibilidad produce una amplia gama de signos y síntomas que varía desde la aparición de enrojecimiento (rash) y otras lesiones en la piel hasta el choque anafiláctico (Sicherer 2003, Magazzú y Scoglio 2002, Bone 2004); hecho que reviste gran importancia debido a que este problema inicia su aparición en el período con la velocidad más alta de crecimiento del ser humano en donde la leche es el principal o el único alimento que reciben estos niños, aunado a que

el único tratamiento efectivo conocido hasta el momento es la supresión temporal o definitiva de los productos lácteos.

La hipersensibilidad a las proteínas de la leche de vaca presenta su máxima prevalencia durante el primer año de vida donde alrededor del 2% de todos los niños presentan este problema; además, afecta entre el 6 y el 8% de todos los menores de 3 años de edad, de los cuales, el 80% desarrollará alergia al llegar a su quinto cumpleaños (Sampson 2003, Bone 2004, Sampson 1999). El 25% de niños con alergia a la leche de vaca mantienen una sensibilidad incrementada en la segunda década de la vida y el 35% de ellos adquiere otro tipo de alergia (Sampson 2003, Host et al 1997). Finalmente, en los adultos las alergias a los alimentos parecen ser menos frecuentes ya que se estima que solo entre el 2% y 2.5% de ellos están afectados (Papageorgiou 2002, Bock 1987).

Por otro lado, en España se ha descrito un incremento importante de las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos y uno de cada cuatro niños que la presentan sufre de alergia a proteínas de la leche de vaca, debido a lo cual, actualmente ocupa el tercer lugar como causa de alergia alimentaria en la infancia (24.5%), solamente detrás de la hipersensibilidad al huevo (34%) y al pescado (30%) (Benot 2001, Plaza 2004). Tomando en cuenta lo previamente expuesto, que en todo el territorio español las medidas de higiene durante la etapa perinatal son estrictas y que existe un incremento en las enfermedades alérgicas a los alimentos, se creyó conveniente realizar el presente trabajo con el objetivo de comparar la composición de la microbiota en niños con alergia comprobada a las proteínas de la leche de vaca con la de niños sanos y teniendo como hipótesis de trabajo que, “si la composición bacteriana del intestino modula el desarrollo de la respuesta inmune y la adquisición de tolerancia a los antígenos en etapas tempranas del desarrollo humano, entonces, la microbiota fecal de los niños con alergia es diferente a la de los niños sanos”.

Estas diferencias, en caso de existir y ser constantes, pueden ser propuestas como marcadores tempranos para la identificación de niños con riesgo de padecer alergia antes de que se inicie la administración de leche de vaca.

MARCO TEÓRICO

ALERGIA A LOS ALIMENTOS

El término alergia alimentaria describe cualquier reacción adversa a los alimentos que es mediada inmunológicamente y que además involucra mecanismos específicos que pueden o no ser mediados por inmunoglobulina E (IgE) (Bruijnzeel-Koomen et al 1995). Se conoce que todos los alimentos son potencialmente sensibilizantes, sin embargo, en la mayoría de los casos, los individuos reaccionan sólo a una cantidad pequeña de antígenos alimentarios y el predominio de las reacciones adversas a alimentos específicos depende en gran medida de la edad y de los hábitos alimentarios de la población estudiada.

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA ALERGIA A LOS ALIMENTOS

En todo el mundo las enfermedades atópicas tienen una tendencia de crecimiento mayor de la esperada y la alergia a los alimentos contribuye en forma muy importante a este aumento. En un estudio realizado en la Unión Europea (UE), mediante la aplicación de encuestas, se encontró que de 17280 adultos estudiados en 15 países, el 12% informó padecer algún tipo de alergia o intolerancia a los alimentos, encontrando la mayor frecuencia entre los alemanes y en los pobladores de los países escandinavos, y la menor prevalencia entre los españoles (Woods et al 2001).

No obstante, en estos estudios se ha demostrado que puede haber un grado importante de sobreestimación de los problemas alérgicos, debido a que el diagnóstico se realiza sin pruebas de reto específicas (Sicherer 2002), hecho demostrado tanto en estudios realizados con niños (Bock 1987, Eggesbo 2001), como en adultos (Young 1994, Woods 2002).

La importancia epidemiológica de la alergia a los alimentos se hace evidente en los informes de los países más industrializados y como ejemplo se puede mencionar que en los Estados Unidos, un país con unas de las mejores condiciones hospitalarias del mundo, las alergias a los alimentos afectan entre el 3.5 y el 4% de toda la población y este síndrome ocasiona entre 100 y 200 muertes por año. De igual manera, en algunos países de la Unión Europea (UE), la alergia puede afectar a más del 50% de los niños que los habitan (Bouschet 2004). Así mismo, entre los niños con problemas atópicos, existe una prevalencia bastante alta de alergia a los alimentos, ya que 35 de cada 100 pacientes que padecen dermatitis atópica moderada o severa, cursan además con alergia a los alimentos mediada por IgE (Hugh 2003) y en el 6% de todos los niños con asma, el espasmo puede ser inducido por alimentos (Novembre 1998). Por último, entre el 0.5 y el 1% de éstos niños también pueden desarrollar reacciones adversas a los aditivos de alimentos (Hugh y Sampson 2003, Fuglsang et al 1993). Éstos y otros estudios, ha mostrado que la alergia a los alimentos que con más frecuencia se presenta en la niñez es la ocasionada por las proteínas de la leche de vaca y se conoce que alrededor del 60% de estas reacciones son mediadas por IgE (Host et al 1997). Esta entidad presenta su mayor frecuencia durante el primer año de la vida, donde el 2% de los niños tienen reacciones de hipersensibilidad. (Magazzu y Scoglio 2002, Schrandt 1993). De igual manera, se ha descrito que afecta entre el 6 a 8% de los niños menores de 3 años de edad y de estos, alrededor de 80% desarrollará alergia al llegar a su quinto aniversario (Sampson 1999). Además, el 25% de los niños con alergia a la leche de vaca mantienen la sensibilidad incrementada en la segunda década de la vida y 35% de ellos adquieren otra tipo de alergia (Hugh 2003).

En el adulto, la alergia inducida por los alimentos parece ser menos frecuente ya que se estima que la prevalencia oscila entre el 2% y 2.5% (Sampson 1999, Papageorgiou 2002, Bock 1987, Hugh 2003).

Factores asociados al desarrollo de alergia.

Son múltiples los factores implicados en el incremento de la susceptibilidad alérgica y algunos de los más importantes son:

Factores genéticos.

Se conoce que gran parte de las enfermedades alérgicas son alteraciones genéticas heterogéneas. Probablemente cada uno de los fenotipos es el resultado de un tipo de herencia poligénica y la interacción compleja entre genes y medio ambiente (Vandenplas 2004). Aunque la herencia juega un papel muy importante en la aparición de enfermedades alérgicas, es necesario, sin embargo, recordar que la carga genética puede incrementar la susceptibilidad, pero no necesariamente llevar a la expresión completa de la enfermedad (Vandenplas 2004).. Esto quizá sea debido a que, en las enfermedades alérgicas, existen al menos dos locus heredables cuya expresión está fuertemente influenciada por factores ambientales, lo que da como resultado que la probabilidad que tiene un individuo de desarrollar una enfermedad alérgica no sea constante a través del tiempo aún y cuando su predisposición esté genéticamente determinada (Koning et al 1996).

Por otro lado, es frecuente que no se hereden los dos alelos y uno de los ejemplos más representativos de este hecho fue encontrado en familias británicas alérgicas, en las cuales el 60% de sus integrantes presentaron anomalías en la región 11q que solo era detectada en los alelos derivados de la madre (Cookson et al

1992) y este fenómeno pudo ser explicado por la supresión del gene “atópico” paterno mediante un mecanismo genético conocido como impronta genómica que provoca solamente la expresión de los genes de la madre (Hall 1990).

A pesar de estos aspectos genéticos, la historia familiar de atopia es considerada como un marcador temprano adecuado para la enfermedad alérgica en el niño ya que tiene sensibilidad (61%) y especificidad (83%) bastante aceptables (Koning, et al 1996, Rivas et al 1994) y es conocido que la historia positiva de alergia familiar es un factor importante de riesgo para el desarrollo de enfermedad atópica sobre todo en los recién nacidos, (Croner y Kjellman 1989, Kaufman y Frick 1976), en los cuales el riesgo de presentar alergia con padres sin la enfermedad es de alrededor del 10%, pero, si uno de los padres es alérgico, el riesgo se duplica (20%), y si ambos lo son, la posibilidad se incrementa en seis veces (60%) (Björkstén 1994). También se ha publicado que, en niños alimentados en forma exclusiva al pecho materno durante 3 meses y nacidos en familias con un miembro atópico, la posibilidad de presentar alguna enfermedad alérgica en los dos primeros años de edad puede alcanzar hasta el 50% (Rautava 2002), siendo la atopia materna el principal activador de la enfermedad (van Strien et al 2002).

Otro hallazgo consistente en la investigación epidemiológica de las enfermedades atópicas, es el hecho de que tener hermanos mayores confiere cierto grado de protección para el niño contra las enfermedades alérgicas (Eggesbo et al 2003)

Un apoyo importante de la influencia genética de las enfermedades alérgicas proviene del hallazgo de concentraciones mayores de IgE en la sangre de cordón en el sexo masculino (Kimpfen et al 1989, Hansen et al 1992, Halonen et al 1991, Bjerke et al 1994), lo cual, al menos hipotéticamente, puede ser explicado por una expresión diferencial en el o los genes que codifican la atopia en el hombre (Koning et al 1996, Bjerke et al 1994) y esta suposición se ve apoyada por el hecho de que existe mayor

número de niños atópicos que de niñas (Croner S et al 1982) y en muchos de los casos presentan más de un tipo de sensibilización (Arshad et al 2001). No obstante, aún cuando esta hipótesis cuenta con un buen número de evidencias que la apoyan, también existen reportes que desestiman esta posibilidad (Ownby et al 1991, Nielsen et al 1990)

Otro hallazgo importante en el campo de la genética de las enfermedades alérgicas es la identificación de varios genes que predisponen a la atopia, entre los hallazgos más consistentes destacan:

1. Se ha demostrado la asociación entre niveles altos de IgE total y el locus 5q31.1 en el cromosoma 5, rasgo que se hereda junto con la hiperrespuesta bronquial (Marsh 1994, Postma et al 1995) y en la misma región cromosómica se han identificado genes que codifican para la producción de varias interleucinas (IL3, IL4, IL5, IL9, IL12 e IL13), siendo la IL-4 la que se encuentra más influenciada por este locus. (Marsh et al 1994)

2. Se ha publicado la existencia de un vínculo entre un marcador localizado en el cromosoma 11q13 y la respuesta atópica de IgE en grandes genealogías (pedigríes) (Koning et al 1996, Cookson 1989, Young et al 1992). Este sitio específico en el cromosoma 11q aparece en el 20% de las alergias asociadas al 11q y representa el cambio de un aminoácido en la cadena beta del receptor de IgE de alta afinidad (Sandford et al 1993).

3. Existe evidencia de una conexión entre un gene o genes en la región α del receptor de célula T en el cromosoma 14 y la respuesta de IgE específica (Moffatt et al 1994)

4. De igual forma, un vínculo entre el asma y los niveles séricos de IgE total ha sido descrito en el cromosoma 12q (Nickel et al 1997).

Niveles séricos de IgE neonatal

El rasgo principal que distingue a los individuos atópicos de los no atópicos es su predisposición para desarrollar anticuerpos IgE antígeno-específicos a la exposición repetida a proteínas foráneas en dosis bajas (polen, polvo casero o alimentos) (Koning et al 1996). Esto resulta en niveles séricos de IgE más altos en los atópicos que en los sujetos no atópicos. Pero, aunque la tendencia a producir IgE está genéticamente determinada (Marsh et al 1981) y/o secundaria a la sensibilización intrauterina (Kjellman y Croner 1984, Magnusson 1988).

Algunos estudios realizados en gemelos sugieren que la especificidad antigénica es influenciada en mayor medida por factores ambientales (Wütrich et al 1981) aunque esta alternativa es considerada por algunos como poco probable debido a que los anticuerpos IgE presentes en la sangre de cordón parecen ser más la consecuencia de una producción espontánea no específica de IgE, probablemente por falta de supresión, más que a la estimulación antigénica exógena. Además, la historia materna de atopia, más que la del padre, tiene una alta correlación con los niveles sanguíneos altos de IgE (Bjerke T et al 1994, Bergmann et al 1995).

Presumiblemente, los niveles de IgE en sangre del cordón, aunado a la posible transferencia placentaria de IgE materna, están determinados principalmente por una reacción inmunológica fetal a los alérgenos intrauterinos y a otros factores (como el tabaquismo) con una base de determinantes genéticos de fondo. Algunos hallazgos apoyan el uso de los niveles de IgE en sangre del cordón como marcador para la predicción de atopia (Michel ey al 1980, Kjellman y Croner S. 1984, , Magnusson 1988), entre los que se encuentran: que el feto puede producir IgE desde la semana 11 de la gestación (Miller et al 1973), unido a que la IgE no cruza la barrera placentaria (Bazaraal et al 1971) y a que se ha establecido una correlación entre los sujetos con

respuesta alta de IgE y una tendencia clínica a desarrollar enfermedad atópica tanto en los niños como en los adultos (Kjellman y Johansson et al 1976).

Sin embargo, algunos autores han observado que, aunque la especificidad de la IgE de sangre de cordón es relativamente alta (94%) para predecir alergia, su sensibilidad es bastante baja debido a lo cual su valor predictivo no es muy alto y por lo tanto su relevancia como marcador único para predecir enfermedad atópica es poco importante y en ocasiones cuestionable (Merrett et al 1988, Ruiz et al 1991, Hide et al 1991, Eiriksson et al 1991, Lilja et al 1990).

Este último hecho se ve apoyado por la observación de que ocurre un rápido descenso de los niveles de IgE en las primeras semanas en la mitad de los niños nacidos de familias alérgicas (Koning, 1996, Merrett et al 1988) y que con frecuencia ocurren elevaciones transitorias de la IgE como respuesta a proteínas de los alimentos, aún en niños que no desarrollan posteriormente enfermedades atópicas (Hattevig et al 1984). Así, los niños pequeños pueden mostrar resultados positivos temporales, desarrollando anticuerpos IgE contra alérgenos alimentarios. No obstante, cuando las concentraciones de IgE se mantienen persistentemente elevadas, sí muestran una fuerte relación con la enfermedad atópica (Koning et al 1996, Hattevig et al 1984).

Se piensa que la elevación transitoria en la producción de IgE es una parte integral de la respuesta inmune normal del niño, debido a que cuando se lleva a cabo el contacto con un alérgeno no encontrado previamente, el sistema inmune “reconoce” al alérgeno y responde a él. En niños y animales inmunológicamente normales (no atópicos), esa respuesta inicial es autolimitada y desaparece en pocas semanas o meses, aún y cuando la exposición alérgica continúe presente. La respuesta inicial es reemplazada por un estado de tolerancia inmunológica específica de larga duración, hecho apoyado por estudios con animales no atópicos en los cuales la inhalación de un

alergeno produce elevación pequeña de IgE, debida a supresión selectiva de la respuesta inmune que origina un estado de tolerancia antigénica (Holt et al 1981, Holt y Leivers 1982, Sedgwick et al 1985)

Es conocido que las funciones de inducción de tolerancia son pobres en el periodo previo al destete (Nelson et al 1990), presumiblemente debido al retardo en la maduración postnatal de uno o más de los elementos clave de la función inmune de la mucosa que tienen una tasa limitada para inducir tolerancia (Koning et al 1996, Holt et al 1990). Debido a lo cual, la exposición alérgica en fases tempranas de la infancia influencia la reactividad subsecuente de las células T (Hanson 1981, Strobel y Ferguson 1984), lo que a su vez resulta en una respuesta tipo IgE persistente que conduce a un estado clínico de hipersensibilidad. Por todo ello, se ha encontrado que los niveles altos de IgE entre los 2 y 6 meses después del nacimiento no mejoran los valores predictivos de los de la sangre en cordón (Lilja y Oman H 1991, Kjellman 1994). Sin embargo, los niveles de IgE en la sangre de cordón junto con una historia positiva de alergia, especialmente en la madre, puede ser utilizada para identificar a los niños en riesgo de desarrollar enfermedades atópicas.

Factores ambientales

Muchos factores ambientales pueden actuar como alérgenos, aunque también son capaces de incrementar una respuesta IgE existente, conducir a la manifestación de enfermedad o agravar los síntomas. Entre los factores ambientales que más comúnmente desencadenan alergia son los encontrados en los alimentos, en el aire, algunos irritantes, los factores emocionales, los climáticos y estacionales, la polución química del aire y algunos agentes microbianos como el *Staphylococcus aureus* (Vandenplas 2004). Recientemente se ha concedido gran importancia a la disminución de la exposición

microbiana que ocurre, como efecto de la mejoría en las medidas de higiene, en las ciudades desarrolladas (Hopkin 2002) las cuales retardan la colonización de los niños con bacterias que normalmente favorecen el desarrollo de su sistema inmunológico.

Infecciones

Existen hallazgos contradictorios entre la infección por algunos agentes patógenos como los virus de la hepatitis B, la rubéola, el sarampión y las paperas; algunos parásitos (*Toxoplasma gondii*) y bacterias (*Helicobacter pylori*), ya que algunos autores lo indican como un posible factor protector (Bodner et al 2000) y otras como un posible factor de riesgo (Matricardi 2000, Paunio et al 2000) de padecer enfermedades atópicas.

Estos hallazgos contradictorios pueden deberse posiblemente al momento en que se lleva a cabo el contacto con los agentes patógenos ya que si bien las infecciones juegan un papel importante en la dirección del desarrollo inmunológico en la vida temprana también, algunas de ellas, pueden predisponer al sujeto a las enfermedades atópicas debido a que el impacto que tienen las infecciones en el desarrollo de un fenotipo atópico parece ser dependiente de la edad (Kilpi et al 2002), y a que el período crítico que tienen los microbios para ejercer su efecto protector se restringe a los primeros meses de vida (Rautava et al 2004), debido a lo cual, el efecto protector de los agentes infecciosos no persiste toda la vida, pero es muy efectivo al nacimiento o en periodos específicos después de que este ocurre (Bresciani et al 2005)

Entre las evidencias que apoyan el efecto protector de los agentes patógenos contra la alergia destacan: el efecto preventivo en las enfermedades alérgicas mediante la estimulación con modificadores inmunológicos tales como micobacterias, CpG y otros productos bacterianos (Bresciani 2005; Matricardi et al 2003); la exposición a

algunas endotoxinas puede igualmente prevenir la alergia +++(Bresciani M, Parisi C, Manghi G, Bonini S. The higiene hypothesis: does it function worldwide?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:147-51, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E; ALEX Study Team. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*. 2001;358:1129-33); la exposición al virus de la hepatitis A protege contra la sensibilización de todos los alérgenos transmitidos por vía aérea excepto el de la cucaracha común (Bresciani M, Parisi C, Manghi G, Bonini S. The higiene hypothesis: does it function worldwide?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:147-51, Matricardi PM, Rosmini F, Panetta V, Ferrigno L, Bonini S. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Sep;110(3):381-7).

Este efecto parece estar asociado a un polimorfismo del gen TIM-1 que funciona como receptor tanto para el virus de la hepatitis A como para la activación de las células T. Este gen dirige la respuesta inmune hacia una respuesta inflamatoria tipo Th2, con lo que la infección por este virus puede proteger de las enfermedades alérgicas (McIntire JJ, Umetsu SE, Macaubas C, Hoyte EG, Cinnioglu C, Cavalli-Sforza LL, Barsh GS, Hallmayer JF, Underhill PA, Risch NJ, Freeman GJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature*. 2003;425:576)

Se ha descrito que la seropositividad para *Helicobacter pylori* y *Toxoplasma gondii* se asocian a una menor prevalencia de enfermedades atópicas (Linneberg A, Ostergaard C, Tvede M, Andersen LP, Nielsen NH, Madsen F, Frolund L, Dirksen A, Jorgensen T. IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:847-53). Paradójicamente, los parásitos a pesar de ser inductores potentes de la repuesta Th2, reducen el riesgo de padecer enfermedades atópicas (Ndiaye M, Bousquet J. Allergies and parasitoses in sub-Saharan Africa. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26:105-13, Wilson MS, Maizels RM. Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26:35-50, Capron A, Dombrowicz D, Capron M. Helminth infections and allergic diseases: from the Th2 paradigm to regulatory networks. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26:25-34, Yazdanbakhsh M, Matricardi PM. Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26:15-24, Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-

10-producing B cells. J Immunol. 2004;173:6346-56, Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science. 2002;296:490-4) y este hecho puede ser explicado porque la infección parasitaria crónica puede en realidad dar como resultado una respuesta inflamatoria mediada por el factor de transformación del crecimiento beta (TGF- β) y la interleucina 10 (IL-10) diseñada para restringir el daño tisular por el reto antigénico continuo (Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. Trends Immunol. 2001;22:372-7)

No obstante, aún cuando existe evidencia importante para apoyar que las infecciones protegen contra las enfermedades atópicas, hasta el momento no es posible saber si realmente son las causantes de esta protección o solo es uno de los muchos factores del estilo de vida que ayudan a que esta acción se produzca (Bresciani M, Parisi C, Manghi G, Bonini S. The hygiene hypothesis: does it function worldwide?. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005;5:147-51, Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004;38:378-88, Liu AH, Murphy JR. Hygiene hypothesis: fact or fiction? J Allergy Clin Immunol. 2003;111:471-8).

En cuanto a los hallazgos de los agentes infecciosos como facilitadores de las enfermedades atópicas se puede mencionar que las endotoxinas también ocasionan espasmo bronquial (Bresciani M, Parisi C, Manghi G, Bonini S. The hygiene hypothesis: does it function worldwide?. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005;5:147-51, Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. J Allergy Clin Immunol. 2002;109:379-92, Eder W, von Mutius E Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence?. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2004;4:113-7, Liu AH. Something old, something new: indoor endotoxin, allergens and asthma. Paediatr Respir Rev. 2004;5 (Suppl):65-71). La hepatitis A incrementa el riesgo y la sensibilización a la cucaracha común y este agente es uno de los factores etiológicos más importantemente asociados al asma en las ciudades del interior de los Estados Unidos (Bresciani M, Parisi C, Manghi G, Bonini S. The hygiene hypothesis: does it function worldwide?. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005;5:147-51, Matricardi PM, Rosmini F, Panetta V, Ferrigno L, Bonini S. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. J Allergy Clin Immunol. 2002 Sep;110(3):381-7). En Dinamarca, la seropositividad para *Clostridium*

difficile, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* se asociaron a una alta prevalencia de atopia (Linneberg A, Ostergaard C, Tvede M, Andersen LP, Nielsen NH, Madsen F, Frolund L, Dirksen A, Jorgensen T. IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:847-53).

Por último, se ha encontrado que las enterotoxinas de *Staphylococcus* son inductores potentes de la liberación de IL-5 y un cofactor en la génesis de las enfermedades atópicas (Heaton T, Mallon D, Venaille T, Holt P. Staphylococcal enterotoxin induced IL-5 stimulation as a cofactor in the pathogenesis of atopic disease: the hygiene hypothesis in reverse? *Allergy.* 2003; 58: 252-6).

Colonización intestinal en etapas tempranas de la vida

El primer paso del proceso del establecimiento de la microbiota indígena en el niño inicia con la colonización intestinal por anaerobios facultativos como las enterobacterias, coliformes y los lactobacilos, seguidos por bifidobacterias y bacterias ácido lácticas. Se ha observado que la alteración de esta sucesión se asocia a un riesgo incrementado de padecer enfermedades infecciosas, inflamatorias y alérgicas en períodos posteriores de la vida. (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88).

Secundario a la buena higiene y a otros factores del estilo de vida, han ocurrido grandes alteraciones en la composición de la microbiota intestinal, por lo que una gran variedad de organismos de adquisición hospitalaria han reemplazado parcialmente a las especies de bifidobacterias y lactobacilos en los niños de países occidentales. Más aún, el proceso de colonización se desarrolla a un ritmo más lento de lo que ocurre en lugares donde las medidas de higiene no son tan estrictas (Eggesbø M, Botten G, Stigum Hein, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy?. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:420-6, Adlerberth I, Carlsson B, de Man P, Jalil F, Khan SR, Larsson P, et al. Intestinal colonization with Enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediatr Scand* 1991;80:602-10). También, se ha

demostrado que el tipo de nacimiento tiene un efecto profundo sobre el tipo de bacterias que colonizan el intestino del recién nacido y los niños que nacen por operación cesárea presentan retardo y una colonización diferencial pronunciados cuando se comparan con aquellos nacidos por vía vaginal (Eggesbø M, Botten G, Stigum Hein, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy?. J Allergy Clin Immunol 2003;112:420-6, Long SS, Swenson RM. Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. J Pediatr 1977;91:298-301). En los niños nacidos por cesárea, la colonización anaerobia es generalmente retardada y la microbiota está compuesta por bacterias microaerofílicas, anaerobios facultativos y bacterias esporuladas (*Clostridium*) que se encuentran en el medio hospitalario. Los microorganismos introducidos durante los primeros siete días de vida tienen una baja capacidad de colonización y la adquisición de *Bacteroides* anaerobios está retrasada. Anteriormente se creía que la colonización por bifidobacterias y *E. coli* era similar a la de niños nacidos por vía vaginal, (Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. J Nutr Biochem 1998; 9: 668-75), pero ahora se sabe que en países con buenas medidas de higiene transcurre un lapso considerable de tiempo antes de que se implanten *E. coli* y otras bacterias Gram (-) (Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. Microbiol Mol Rev 1998; 62: 1157-70, Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. Alim Nutr Salud 2004;11:37-48), y esta colonización diferencial del intestino tiene un carácter duradero (por encima de los 6 meses de edad) (Eggesbø M, Botten G, Stigum Hein, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy?. J Allergy Clin Immunol 2003;112:420-6, Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999;28:19-25).

Edad gestacional

En las primeras etapas de la vida los principales componentes de la barrera intestinal son inmaduros y por lo tanto, la superficie intestinal es relativamente permeable, lo cual explica parcialmente la susceptibilidad de los lactantes para la sensibilización atópica.

Se ha estimado que el niño puede estar expuesto a alrededor de 500 a 1.000 antígenos diferentes entre los 6 y 12 meses de edad (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't, Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101, Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev* 1998; 62: 1157-70) y la mayoría de ellos son excluidos por la mucosa intestinal, por lo que su integridad es necesaria para prevenir el transporte incontrolado de antígenos. El 90% de los antígenos de la dieta hace que se genere una respuesta disminuida durante el desarrollo posnatal, pero cuando la permeabilidad de la barrera está incrementada, como en los recién nacidos pretérmino, puede favorecer a la invasión de patógenos y el paso de otras sustancias dañinas que conducen a una respuesta inmune aberrante y a la sensibilización antigénica.

Los antígenos dietéticos y microbianos ingeridos son degradados por enzimas digestivas y por la microbiota intestinal, y ha sido demostrado que la tolerancia oral no se lleva a cabo sin la degradación intraluminal de las estructuras antigénicas (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88, Barone KS, Reilly MR, Flanagan MP, Michael JG Abrogation of oral tolerance by feeding encapsulated antigen. *Cell Immunol.* 2000;199:65-72) y que la microbiota intestinal tiene un impacto profundo en el desarrollo de la respuesta de anticuerpos tipo inmunoglobulina A (IgA) (Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000;83:186-92) que constituyen una

parte importante de la barrera inmunológica involucrada en la exclusión de patógenos y alérgenos en el lumen intestinal.

Además de la inmadurez de la barrera mucosa y del incremento en la permeabilidad intestinal el recién nacido (RN) prematuro tiene otros factores que incrementan la posibilidad de la sensibilización antigénica entre los que destacan un sobrecrecimiento bacteriano de un número limitado de especies y está colonizado por una menor cantidad de cepas de bacterias aerobias que el RN de término. Estas alteraciones probablemente son debidas a que el niño prematuro es manejado en un ambiente aséptico y al efecto de la administración de antimicrobianos poco tiempo después de su nacimiento (Mackowiak PA. The normal microbial flora *N Engl J Med* 1982;307:83-93, Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterstrom R. Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. *Pediatr Infect Dis J* 1986;5:533-9, Goldman DA, Leclair J, Maccone A. Bacterial colonisation of neonates admitted to an intensive care environment. *J Pediatr* 1978;93:288-93, Akata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term infants. *Eur J Pediatr* 1985;144:186-90, Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 1990;65:185-8). De igual manera, recientemente se ha demostrado que los RN de pretérmino tienen una cantidad semejante de bacterias coliformes y de lactobacilos, pero, la prevalencia de colonización es menor en el niño prematuro (Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 1990;65:185-8, Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microbiota in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 2003;Suppl 441:48-55)

El uso de antibióticos ha sido también reportado como un factor que altera la colonización intestinal del niño. El efecto muy probablemente depende de que estos medicamentos producen un ambiente relativamente libre de gérmenes, lo que permite la colonización por bacterias gram negativas y otros patógenos (Eggesbø M, Botten G, Stigum Hein, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy?. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:420-6, Bennet R, Eriksson M, Tafari N, Nord CE. Intestinal bacteria of newborn Ethiopian infants in

relation to antibiotic treatment and colonisation by potentially pathogenic gram-negative bacteria. Scand J Infect Dis 1991;23:63-9).

Fisiopatología de las enfermedades alérgicas

Existen varios mecanismos con los que cuenta el organismo para evitar que un antígeno produzca sensibilización. La primera línea de defensa es la barrera mucosa gastrointestinal que controla el transporte de antígenos y genera una respuesta inmunológica en el intestino; con ello se logra eliminar una gran cantidad de antígenos foráneos, sin embargo, aún en condiciones fisiológicas, una cantidad considerable de antígenos atraviesa esta barrera de defensa (Hart AL, Stagg AJ, Frame M, et al. Review article: the role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1383–93).

Por esta razón, el tracto gastrointestinal debe proveer una interfase protectora entre el ambiente interno y la estimulación constante de antígenos derivados de los alimentos y de microorganismos del medio externo (Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr* 2005;24:339-52) lo cual implica que además el organismo debe ser capaz de reconocer en forma adecuada los antígenos de las bacterias que normalmente habitan en el intestino y los de los alimentos que le sirven para mantener un buen estado de nutrición, y realizar todas sus funciones en forma adecuada, para prevenir que los antígenos alimentarios puedan producirle algún daño. Además debe generar una respuesta encaminada a la eliminación de todo aquello que sea potencialmente peligroso (respuesta inmune) o evitar responder a los antígenos bacterianos y de los alimentos que representan algún beneficio en su homeostasis. Al proceso en el cual se produce la anulación de la respuesta inmune se le conoce como tolerancia oral y es mediada por los linfocitos T (Garcide P, Mowat A MCI. Mechanisms of oral tolerance. *Crit Rev Immunol* 1996;17:119-37, Strobel S, Mowat AM. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 1998;19:173-81,

Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune disease. *Immunol Today* 1997;18:335, Spiekermann GM, Walker WA. Oral tolerance and its role in clinical disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:237-255, Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr* 2005;24:339-52).

La falta de respuesta de los linfocitos T a ciertos antígenos externos puede ocurrir por tres razones diferentes: la primera es que cuando los linfocitos detectan al antígeno, este último se encuentra en una forma inmunológica irrelevante (forma soluble) y es ignorado; la segunda es que cuando la célula T localiza al antígeno, en varias circunstancias resulta en la subsiguiente eliminación real o funcional de la célula (anergia o deleción), y la tercera debido a la modificación, ocasionada por células reguladoras y/o mediadores, de la respuesta inmune (Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition* (2005) 24, 339–352), debido a lo cual, el que los antígenos induzcan inmunidad o tolerancia puede ser dependiente de señales coestimuladoras que provienen de las células presentadoras de antígeno (CPA) (CD40, CD44v7, CD80 y CD86) (Garside P, McI Mowat A, Khoruts A. Oral tolerance in disease. *Gut* 1999;44:137–42, Gil A. +Por qué la tolerancia oral? *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al día* 2004;3:66–70). Cuando la tolerancia oral falla por alguna circunstancia, se produce la sensibilización a los antígenos externos y en ocasiones también a los endógenos, con lo que se desencadenan enfermedades inflamatorias, autoinmunes y alérgicas.

Para explicar la aparición de las enfermedades alérgicas se ha echado mano del paradigma del desequilibrio entre la respuesta linfocitaria Th1 y Th2 (**Figura 1**). Esta teoría tomó mucha fuerza desde que se demostró que la sensibilización atópica inicial ocurre en el útero donde un ambiente inmune polarizado hacia las células Th2 es el que prevalece (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38:378-88). Esta respuesta Th2 continúa

presente en el momento del nacimiento y a partir de entonces ocurre la maduración del sistema inmune durante el primer año de vida y la respuesta inmune predominante es la Th1. En niños que presentan enfermedades alérgicas no se produce este cambio de respuesta inmune con lo que permanece la Th2 e incluso se incrementa (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88, Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet.* 1999;353:196-200)

Sin embargo, recientemente se ha cuestionado la utilidad de esta teoría para explicar la aparición de las enfermedades alérgicas (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88) ya que con el descubrimiento de nuevas subclases de linfocitos T, existen nuevas evidencias de que estas subclases son esenciales para la adquisición y el mantenimiento de la tolerancia mucosa y sistémica ((Nagler-Anderson C. Tolerance and immunity in the intestinal immune system. *Crit Rev Immunol.* 2000;20:103-20)). Estas subclases de linfocitos T han sido llamadas células T reguladoras (Tr) o células Th₃ (Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur J Immunol.* 2000;30:2101-11) y los hallazgos en los mecanismos de la tolerancia oral subrayan la importancia de estas células en la orquestación de las respuestas tolerogénicas ya que son las principales productoras de factor de transformación del crecimiento (*Transforming growth factor-β* ó TGF-β) (Th₃) y de interleukina IL-10 (Tr) (Gil A. Por que' la tolerancia oral? *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al día* 2004;3:66-70, Spiekermann GM, Walker WA. Oral tolerance and its role in clinical disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32:237-55). Por otro lado, también ha comenzado a esclarecerse el papel del sistema inmune innato en la aparición de las enfermedades atópicas (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88, Chaouat G. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. *Clin Exp Immunol.* 2003;131:393-5)

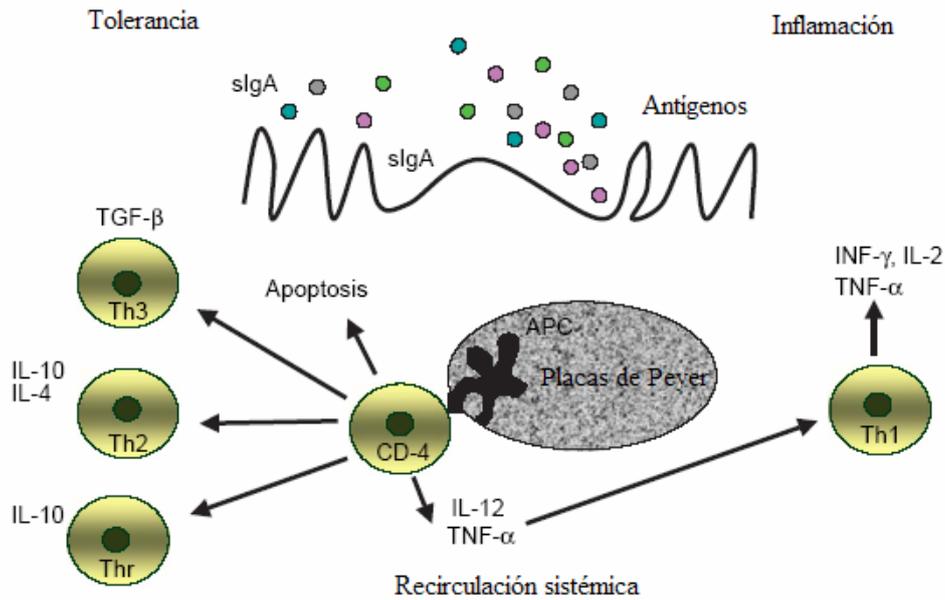


Figura 1. Representación esquemática del equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2.

Ahora se sabe que las respuestas anti-inflamatorias que favorecen la tolerancia antigénica y mantienen al organismo en un estado libre de enfermedad de las mucosas, son mediadas por la interacción coordinada entre los sistemas inmunes innato y adaptativo (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88). Esta interacción ha sido demostrada por el hecho de que los macrófagos y los monocitos al estar en contacto con antígenos microbianos inician la producción de TGF- β (Yoshioka T, Morimoto Y, Iwagaki H, Itoh H, Saito S, Kobayashi N, Yagi T, Tanaka N. Bacterial lipopolysaccharide induces transforming growth factor beta and hepatocyte growth factor through toll-like receptor 2 in cultured human colon cancer cells. *J Int Med Res.* 2001;29:409-20) y esto a su vez induce el desarrollo de células T secretoras de TGF- β (Weiner HL Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* 2001;3:947-54).

Los datos científicos recientes indican que el TGF- β e IL-10 son las citocinas más importantemente implicadas en la regulación de la tolerancia antigénica (Nagler-

Anderson C. Tolerance and immunity in the intestinal immune system. *Crit Rev Immunol.* 2000;20:103-20) y parece ser que ambos funcionan en forma sinérgica, ya que el primero favorece la producción de la citokina (Toms C, Powrie F Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2001;3:929-35). Ésta última es considerada como uno de los factores centrales en la promoción de la tolerancia a través de la microbiota intestinal comensal (Khoo UY, Proctor IE, Macpherson AJ. CD4+ T cell down-regulation in human intestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens. *J Immunol.* 1997;158:3626-34) ya que tiene, además, un impacto profundo sobre la capacidad de regulación Th1/Th2/Th3 que tienen las células dendríticas (Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997;159:4772-80, Bellinghausen I, Brand U, Steinbrink K, Enk AH, Knop J, Saloga J Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Aug;108(2):242-9) y parece que favorece el desarrollo de subclases de células T supresoras (Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood.* 2002 Apr 1;99(7):2468-76)

También se ha encontrado que el TGF- β tiene un efecto supresor tanto en las células Th1 como Th2. (Fox FE, Ford HC, Douglas R, Cherian S, Nowell PC Evidence that TGF-beta can inhibit human T-lymphocyte proliferation through paracrine and autocrine mechanisms. *Cell Immunol.* 1993;150:45-58, Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur J Immunol.* 2000;30:2101-11) por lo que el TGF- β ha sido implicado en la protección de las enfermedades autoinmunes Th1 (Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest.* 1996;98:70-7), así como en la atopia mediada por Th2 (Kalliomaki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:1251-7). En particular se ha demostrado que el TGF- β se encuentra disminuido en niños con alergia a los alimentos (Perez-Machado MA, Ashwood P, Thomson MA, Latham F, Sim R, Walker-Smith JA, Murch SH. Reduced

transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur J Immunol.* 2003;33:2307-15)

Por último, también se ha demostrado que el TGF- β tiene un efecto profundo sobre las células B (Roes J, Choi BK, Cazac BB Redirection of B cell responsiveness by transforming growth factor beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:7241-6), en la función de las células presentadoras de antígeno (Takeuchi M, Alard P, Streilein JW TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1998;160:1589-97) y contribuye al mantenimiento de la función mucosa de barrera mediante la inducción de anticuerpos IgA (Stavnezer J Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. *J Immunol.* 1995;155:1647-51, Petitprez K, Khalife J, Cetre C, Fontaine J, Lafitte S, Capron A, Grzych JM Cytokine mRNA expression in lymphoid organs associated with the expression of IgA response in the rat. *Scand J Immunol.* 1999;49:14-20)

ALERGIA A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA (APLV)

La APLV se define como una reacción adversa mediada inmunológicamente contra los antígenos de la leche de vaca (The European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition Working Group for the Diagnostic Criteria for Food Allergy. Diagnostic criteria for food allergy with predominantly intestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14:108-12) y es considerado la primera manifestación de la marcha atópica debido a que las proteínas de la leche de vaca son los primeros antígenos exógenos a los que se expone el niño en gran cantidad (Järvinen KM, Suomalainen H, Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. *Clin Exp Allergy*, 2001;31:978-87).

Los síntomas de la APLV ocurren durante el primer año de la vida y entre el 75 y el 90% aparecen durante del primer mes de edad (Jakobsson I, Lindberg T. A prospective study of cow's milk protein intolerance in Swedish infants. *Acta Paediatr Scand* 1979; 68:853-9); la mayoría de las veces inmediatamente después o en los primeros días o semanas posteriores a la exposición a fórmulas lácteas a base de leche de vaca (Gerrard JW, Perelmutter L. IgE-mediated allergy to peanut, cow's milk, and egg in children with special reference to maternal diet. *Ann Allergy* 1986; 56:351-

4). No obstante, se ha descrito que la aparición de la APLV puede ocurrir entre el 2 y el 23% de los niños durante todo el periodo de la alimentación al pecho materno (de Boissieu D, Matarazzo P, Rocchiccioli F, Dupont C. Multiple food allergy - A possible diagnosis in breastfed infants. *Acta Paediatr* 1997; 86:1042-6) y se puede encontrar entre el 0.4 y 0.5% durante la alimentación exclusiva al pecho materno (Saarinen KM, Juntunen-Backman K, Järvenpää AL, Kuitunen P, Lope L, Renlund M, et al. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: a prospective study of 6209 infants. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:457-61, Jakobsson I, Lindberg T. A prospective study of cow's milk protein intolerance in Swedish infants. *Acta Paediatr Scand* 1979; 68:853-9).

Los síntomas afectan principalmente la piel (50 a 70% de los casos), el aparato gastrointestinal (50 a 60%) y el tracto respiratorio (20 al 30%) (Host A. frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89(Suppl):33-7, Bock SA, Sampson HA. Food allergy in infancy. *Pediatr Clin North Am* 1994; 41:1047-67). La mayoría de los afectados cursan con más de un síntoma (Host A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5:1-36) y los síntomas que involucran más de un órgano o sistema ocurren entre el 58 y el 92% de los pacientes (Järvinen KM, Suomalainen H, Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. *Clin Exp Allergy*, 2001;31:978-87, Gerrard JW, MacKenzie JW, Goluboff N, Garson JZ, Maningas CS. Cow's milk allergy: prevalence and manifestations in an unselected series of newborns. *Acta Paediatr Scand* 1973;234:1-21). En los niños alimentados en forma exclusiva al pecho materno, el síntoma predominante es el eczema atópico severo y la aparición de esta entidad es muy rara después del año de edad (Host A. frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89(Suppl):33-7, Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987;79:683-8)

No existe una prueba de laboratorio o la combinación de ellas que permitan hacer el diagnóstico de certeza de la APLV, por lo que la eliminación del alimento sospechoso y los procedimientos de provocación al antígeno específico continúan siendo los pilares para dictaminar que un niño padece de la enfermedad. Las pruebas de provocación oral a los alimentos consisten en la administración de cantidades crecientes

del alimento sospechoso de causar la alergia y pueden ser de tipo abierto o ciegos. El estudio de provocación a los alimentos doble ciego controlado por placebo (*Double blind placebo controlled food challenge* o DBPCFC) es considerado el estándar de oro para realizar el diagnóstico (Vlieg-Boerstra BJ, Bijleveld CM, van der Heide S, Beusekamp BJ, Wolt-Plompen SA, Kukler J, et al. Development and validation of challenge materials for double-blind, placebo-controlled food challenges in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:341-6; Sampson A. Update of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:805-19) y la tasa de falsos negativos con esta prueba es de aproximadamente entre el 3 y el 10% de los casos, por lo que se debe seguir a estos pacientes mediante una exposición abierta al alimento sospechoso en todas sus formas de preparación posible y bajo vigilancia estrecha para asegurarse de que realmente no presentan la alergia al alimento (Caffarelli C, Petroccione T False-negative food challenges in children with suspected food allergy. *Lancet.* 2001 Dec 1;358(9296):1871-2). Las pruebas DBPCFC deben ser realizadas bajo la vigilancia estrecha de un médico y en un medio hospitalario donde se cuenten con los medios suficientes para atender una reacción anafiláctica grave (Sicherer SH. Food allergy: when and how to perform oral food challenges. *Pediatr Allergy Immunol.* 1999 Nov;10(4):226-34).

Existen tres tipos de respuesta al DBPCFC, el primero es el grupo de pacientes que responden en forma inmediata a la exposición a pequeñas cantidades del alimento sospechoso; los que responden entre 20 minutos y una hora después de la exposición (respondedores intermedios) con cantidades moderadas del alimento (120 ml por ejemplo); y aquellos que responden en forma tardía, al menos 20 h después de la ingestión de cantidades moderadas del alimento y pueden pasar entre dos y 6 días para que el problema se presente (Hill DJ, Firer MA, Shelton MJ, Hosking CS. Manifestations of milk allergy in infancy: clinical and immunologic findings. *J Pediatr.* 1986;109:270-6, Hill DJ, Hosking CS. Cow milk allergy in infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy.* 1996;26:243-6).

Para evitar el riesgo que implica realizar las pruebas de provocación, se han considerado otros estudios como las pruebas cutáneas en donde se administra mediante un pinchazo el alérgeno del alimento estudiado y se aplican también un control positivo

(histamina al 1%) y uno negativo (agua), y se considera como una prueba positiva cuando el alergen estudiado produce una respuesta de 3 mm o más grande que el del control positivo (Sampson A. Update of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:805-19). Sin embargo, se ha demostrado la poca sensibilidad y especificidad de este punto de corte (Baehler P, Chad Z, Gurbindo C, Bonin AP, Bouthillier L, Seidman EG. Distinct patterns of cow's milk allergy in infancy defined by prolonged, two-stage double-blind, placebo-controlled food challenges. *Clin Exp Allergy*. 1996 Mar;26(3):254-61), debido a lo cual se han realizado varios estudios y se ha encontrado que para la APLV, una respuesta de 8 mm tiene un 95% de valor predictivo con lo que se puede reducir en forma importante la necesidad de una prueba de provocación en los niños con estas reacciones tan intensas (Hill DJ, Hosking CS, Reyes-Benito LV. Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of in vitro with in vivo tests. *Clin Exp Allergy*. 2001 Jul;31(7):1031-5). Es necesario recordar que un resultado negativo de las pruebas cutáneas confirma la ausencia de reactividad alérgica mediada por IgE (valor predictivo negativo de 95%) (Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Jun;103(6):981-9).

Otro de los estudios utilizados en el diagnóstico de la APLV es la determinación de la IgE específica en suero, ya que se ha observado que en los niños con 2 o menos años de edad, niveles 5 kU/L tienen un valor predictivo positivo de 95% (Sampson A. Update of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:805-19; Garcia-Ara C, Boyano-Martinez T, Diaz-Pena JM, Martin-Munoz F, Reche-Frutos M, Martin-Esteban M. Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cows' milk protein in the infant. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:185-90). Se considera que los niveles de IgE específica a las proteínas de la leche de vaca pueden ser un parámetro útil para el seguimiento de los niños con APLV ya que su descenso se ha asociado al desarrollo de tolerancia (Plaza- Martín AM. Alergia a proteínas de leche de vaca. *Protocolos de la Asociación Española de Pediatría*. 2003;pp 55-66)

Afortunadamente el pronóstico de la APLV es bueno. Sin embargo, las frecuencias descritas de recuperación varían ampliamente, ya que hay estudios que

indican tolerancia a la leche en el 28% de los niños a los 2 años, 56% a los 4 años y 76% a los 6 (Bishop JM, Hill DJ, Hosking CS Natural history of cow milk allergy: clinical outcome. *J Pediatr.* 1990;116:862-7), pasando por aquellos que informan tolerancia a la leche en el 46 a 56% de los casos al año, 60 a 77% a los 2 años, 87% a los 3 años y entre el 90 y 95% a los 5 y 10 años (Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics.* 1987;79:683-8, Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy.* 1990;45:587-96); hasta aquellos que encuentran que el 56% de los niños presentan recuperación total al año, 77% a los 2 años, 87% a los 3 años, 92% a los 5 y 97% a los 15 años de edad (Host A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 2002;13 Suppl 15:23-8); y aún en un mismo grupo de investigadores existen diferencias en los porcentajes de recuperación ya que cuando se dividen en los tres grupos de respuesta a las DBPCFC encontraron que hubo tolerancia a leche en el 40% de los que presentaron sintomatología inmediata a la exposición alérgica, en el 42% de los respondedores intermedios y 25% en los tardíos en un estudio (Hill DJ, Firer MA, Ball G, Hosking CS. Recovery from milk allergy in early childhood: antibody studies. *J Pediatr.* 1989 May;114(5):761-6) y en otro realizado un año después, las frecuencias de recuperación fueron de 67%, 87% y 83% respectivamente. Estas discrepancias se deben principalmente al tiempo de seguimiento y al tipo de niños estudiados.

Alergia a la leche de vaca en niños alimentados al pecho

La eliminación de la leche de vaca en la dieta de la mujer lactante es una medida comúnmente utilizada con la finalidad de prevenir la alergia en sus hijos ya que existen varios informes sobre la desaparición de los síntomas en niños sensibilizados después de la abstinencia de leche de vaca por la madre y la sucesiva reaparición de la

sintomatología después de la reintroducción de leche en la dieta materna (de Boissieu D, Matarazzo P, Rocchiccioli F, Dupont C. Multiple food allergy - A possible diagnosis in breastfed infants. *Acta Paediatr* 1997; 86:1042-6, Järvinen K-M, Mäkinen-Kiljunen S, Suomalainen H. Cow's milk challenge via human milk evokes immune responses in suckling infants with cow's milk allergy. *J Pediatr* 1999; 135:506-12, Gerrard JW. Allergies in breast-fed babies to ingredients in breast milk. *Ann Allergy* 1979; 42:69-72, Sorva R, Mäkinen-Kiljunen S. Beta-lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:787-92). Sin embargo, los resultados, sobre todo a largo plazo, han muchas veces conflictivos y discordantes (Hattevig G, Sigues N, Kjellman B. Effects on maternal dietary avoidance during lactation on allergy in children at 10 years of age. *Acta Paediatr* 1999;88:7-12), pero han sido explicados por algunos investigadores, como debidos a que la atención se ha centrado cualitativamente pero no cuantitativamente en las proteínas de leche, y a que no se han tomado en cuenta otros factores con propiedades inmunomoduladoras como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Hoppu U, Kalliomaki M, Isolauri E. Cow's milk allergy - a matter of fat. *Allergy* 2002;57:61-2) ya que algunos PUFA han mostrado asociación con la promoción o la prevención de la inflamación alérgica (Black PN, Sharpe S. Dietary fat and asthma: is there a connection?. *Eur Respir J* 1997;10:6-12, Hoppu U, Kalliomaki M, Isolauri E. Cow's milk allergy - a matter of fat. *Allergy* 2002;57:61-2). Hecho que se ve apoyado porque la ingestión de proteínas de leche de vaca durante la lactancia no se asocia con la aparición de alergia en los hijos de estas madres, pero el consumo de dietas ricas en grasa y PUFA sí se asocia con la sensibilización a la leche de vaca en estos niños (Hoppu U, Kalliomaki M, Isolauri E. Cow's milk allergy - a matter of fat. *Allergy* 2002;57:61-2)

La aparición de los síntomas de APLV en los niños alimentados al pecho usualmente ocurre entre el primer día y los dos meses (Järvinen K-M, Mäkinen-Kiljunen S, Suomalainen H. Cow's milk challenge via human milk evokes immune responses in suckling infants with cow's milk allergy. *J Pediatr* 1999; 135:506-12, Gerrard JW. Allergies in breast-fed babies to ingredients in breast milk. *Ann Allergy* 1979; 42:69-72, Gerrard JW. Allergies in breastfed babies to foods ingested by the mother. *Clin Rev Allergy* 1984; 2:143-9), y son los mismos que se presentan en niños que son alimentados con fórmulas pero, comúnmente entre los 2 y los 3 meses de edad, aparecen primero los

síntomas gastrointestinales (regurgitación, cólico, etc), seguidos muy poco tiempo después de las manifestaciones dermatológicas (eczema) (Järvinen KM, Suomalainen H, Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. Clin Exp Allergy, 2001;31:978-87).

Los síntomas más frecuentemente descritos en niños sensibles a las proteínas de la leche de vaca presentes en la leche materna son: **eczema** (de Boissieu D, Matarazzo P, Rocchiccioli F, Dupont C. Multiple food allergy ± a possible diagnosis in breastfed infants. Acta Paediatr 1997; 86:1042-6, Isolauri E, Tahvanainen A, Peltola T, Arvola T. Breastfeeding of allergic infants. J Paediatr 1999; 134:27-32, Järvinen K-M, Mäkinen-Kiljunen S, Suomalainen H. Cow's milk challenge via human milk evokes immune responses in suckling infants with cow's milk allergy. J Paediatr 1999; 135:506-12), **los cólicos** (Jakobsson I, Lindberg T. Cow's milk proteins cause infantile colic in breast-fed infants: a double-blind crossover study. Pediatrics 1983; 71:268-71, Järvinen KM, Laine S, Järvenpää AL, Suomalainen H. Does low IgA in human milk predispose the infant to the development of cow's milk allergy? Paediatr Res 2000; 48:457-62), **la diarrea** (Järvinen KM, Suomalainen H, Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. Clin Exp Allergy, 2001;31:978-87), **la colitis** (Pittschieler K. Cow's milk protein-induced colitis in the breast-fed infant. J Paediatr Gastroenterol Nutr 1990; 10:548-9), **colitis con sangrado rectal** (Perisic VN, Filipovic D, Kokai G. Allergic colitis with rectal bleeding in an exclusively breast-fed neonate. Acta Paediatr Scand 1988; 77:163-4), **regurgitación y/o vómito** (de Boissieu D, Matarazzo P, Rocchiccioli F, Dupont C. Multiple food allergy - A possible diagnosis in breastfed infants. Acta Paediatr 1997; 86:1042-6, Järvinen K-M, Mäkinen-Kiljunen S, Suomalainen H. Cow's milk challenge via human milk evokes immune responses in suckling infants with cow's milk allergy. J Paediatr 1999; 135:506-12), **estreñimiento** (de Boissieu D, Matarazzo P, Rocchiccioli F, Dupont C. Multiple food allergy - A possible diagnosis in breastfed infants. Acta Paediatr 1997; 86:1042-6), **rinorrea** (Järvinen K-M, Mäkinen-Kiljunen S, Suomalainen H. Cow's milk challenge via human milk evokes immune responses in suckling infants with cow's milk allergy. J Paediatr 1999; 135:506-12, Gerrard JW. Allergies in breast-fed babies to ingredients in breast milk. Ann Allergy 1979; 42:69-72), **jadeo y tos** (Isolauri E, Tahvanainen A, Peltola T, Arvola T. Breastfeeding of allergic infants. J Paediatr 1999; 134:27-32), **llanto, bradicardia que pone en peligro la vida e hipotonía** (de Boissieu D, Matarazzo P, Rocchiccioli F, Dupont C. Multiple food allergy - A possible diagnosis in breastfed infants. Acta Paediatr 1997; 86:1042-6) y **el más grave, el choque anafiláctico** (Lifschitz CH, Hawkins HK, Guerra C, Byrd N. Anaphylactic shock due to cow's milk protein hypersensitivity in a breastfed infant. J Paediatr Gastroenterol Nutr 1988; 7:141-4)

Rutas de sensibilización a las proteínas de la leche de vaca

Las proteínas de la leche de vaca son absorbidas por el intestino del adulto normal y transmitidas por la leche humana (Sorva R, Mäkinen-Kiljunen S. Beta-lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:787-92, Kilshaw PJ, Cant AJ. The passage of maternal dietary proteins into human breast milk. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984; 75:8-15, Stuart CA, Twiselton R, Nicholas MK, Hide DW. Passage of cow's milk protein in breast milk. *Clin Allergy* 1984;14:533-5, Chandra RK, Puri S, Suraya C, Cheema PS. Influence of maternal food antigen avoidance during pregnancy and lactation on incidence of atopic eczema in infants. *Clin Allergy* 1986; 16:563-9, Machtinger S, Moss R. Cow's milk allergy in breast-fed infants: the role of allergen and maternal secretory IgA antibody. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:341-8), debido a lo cual la β -lactoglobulina (β -LG) es detectada en el 75% de las muestras de leche materna en concentraciones superiores a 16 mg/l (Järvinen K-M, Mäkinen-Kiljunen S, Suomalainen H. Cow's milk challenge via human milk evokes immune responses in suckling infants with cow's milk allergy. *J Pediatr* 1999; 135:506-12, Sorva R, Mäkinen-Kiljunen S. Beta-lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:787-92, Kilshaw PJ, Cant AJ. The passage of maternal dietary proteins into human breast milk. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984; 75:8-15, Stuart CA, Twiselton R, Nicholas MK, Hide DW. Passage of cow's milk protein in breast milk. *Clin Allergy* 1984; 14:533-5, Chandra RK, Puri S, Suraya C, Cheema PS. Influence of maternal food antigen avoidance during pregnancy and lactation on incidence of atopic eczema in infants. *Clin Allergy* 1986; 16:563-9) y la caseína se detecta hasta en el 50% de las muestras (Stuart CA, Twiselton R, Nicholas MK, Hide DW. Passage of cow's milk protein in breast milk. *Clin Allergy* 1984; 14:533-5, Chandra RK, Puri S, Suraya C, Cheema PS. Influence of maternal food antigen avoidance during pregnancy and lactation on incidence of atopic eczema in infants. *Clin Allergy* 1986; 16:563-9). No obstante, el efecto sensibilizante de las proteínas de los alimentos presentes en la leche humana varía entre individuos y no existe una relación clara entre sensibilización y la presencia de β -LG en la leche (Gerrard JW, Perelmutter L. IgE-mediated allergy to peanut, cow's milk, and egg in children with special reference to maternal diet. *Ann Allergy* 1986; 56:351-4, Cavagni G, Paganelli R, Caffarelli C, D'Offizi GP, Bertolini P, Aiuti F. et al. Passage of food antigens into circulation of breast-fed infants with atopic dermatitis. *Ann Allergy* 1988; 61:361-5)

Criterio diagnóstico

La forma en que se realiza el diagnóstico de alergia a las proteínas de leche de vaca en un niño alimentado al pecho materno debe incluir tres condiciones que son: en primer lugar, la desaparición de la sintomatología después de la eliminación de la leche de vaca de la dieta de la madre lactante y/o la suspensión de la alimentación al pecho, seguida de la reaparición de síntomas idénticos durante la prueba de reto a la leche de vaca y, por último, una nueva desaparición de las manifestaciones después de eliminar nuevamente la administración de la leche de vaca. Así mismo, también se debe excluir que la sintomatología se pueda deber a intolerancia a la lactosa o a infecciones intercurrentes (The European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition Working Group for the Diagnostic Criteria for Food Allergy Diagnostic criteria for food allergy with predominantly intestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14:108-12, Järvinen KM, Suomalainen H, Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. *Clin Exp Allergy*, 2001;31:978-87).

MICROBIOTA INTESTINAL

La mucosa intestinal separa al ser humano de las bacterias que se encuentran en la luz intestinal en número 10 veces mayor que todas las células eucariotas que existen en sus tejidos. Se estima que el organismo contiene alrededor de 10^{14} células, de las cuales solo el 10% son de mamífero; por lo tanto, el 90% de nuestro cuerpo está constituido por bacterias. A este conjunto de microorganismos que habitan el intestino se le conoce como microflora, microbiota intestinal o simplemente como microbiota (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Markowitz JE, Bengmark S. Probiotics in health and disease in the pediatric patient. *Pediatr Clin North Am* 2002;49: 127-41, Hooper LV, Gordon JI. Commensal host bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115-18, Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307, Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in

health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9, Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic microbiota *Gut* 1998; 42: 2-7, Bengmark S. Colonic food. Pre-and probiotics. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (Supl.): 5-7)

Se define a la microbiota intestinal como “un ecosistema abierto que comprende una amplia variedad de poblaciones microbianas metabólicamente activas que coexisten en una región espacio temporal definida y que juegan un importante papel en la salud del huésped”. Estas bacterias en conjunto pueden ser consideradas como un órgano metabólico del cuerpo que, además, tiene las propiedades de ser adaptable y rápidamente renovable (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101, Markowitz JE, Bengmark S. Probiotics in health and disease in the pediatric patient. *Pediatr Clin North Am* 2002;49: 127-41, Rao AV. Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. *J Nutr* 1999; 129 (Supl.) 1442-5)

El intestino humano aloja entre 300 y 500 especies de bacterias cultivables pertenecientes a más de 190 géneros, aunque el 99% de la población total está representada por tan solo 30 a 40 de estas especies (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101, Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307, Kleessen B, Bezirtoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb Ecol Health Dis* 2000 (Supl. 2): 53-63, Inoue R, Ushida K. Vertical and horizontal transmission of intestinal commensal bacteria in the rat model. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; 46: 213-9).

En el tracto intestinal existen cuatro diferentes tipos de hábitat: a) el lumen intestinal; b) el gel o placa de moco que recubre el epitelio en toda su extensión; c) las capas profundas de moco encontradas en las criptas intestinales; y d) la superficie de las células epiteliales mucosas. En estos sitios radican bacterias, o se encuentran en tránsito, y aunque siempre es difícil determinar si un microbio en particular es un habitante constante de un sitio específico del intestino, para diferenciarlos, al que reside en el

hábitat se le conoce como indígena o comensal, si coloniza el intestino solo bajo circunstancias anormales es un alóctono, al que no logra establecerse en el intestino se le nombra como microorganismo de tránsito, y a los que se implantan solo en situaciones de desequilibrio de la microbiota como patógenos y oportunistas (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101).

Las bacterias comensales se encuentran distribuidas a todo lo largo del tubo digestivo en cantidades que se relacionan con su capacidad para adaptarse al ambiente que lo circunda y, una vez establecidas, sus poblaciones son estables y no necesitan de reintroducciones periódicas de bacterias cuando logran que su reproducción iguale o supere la velocidad de eliminación del organismo que las alberga (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (Supl.): 1035-45).

Por esta razón, el número de unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) es alto en la boca, desciende de forma significativa en el estómago y se incrementa paulatinamente conforme se desciende hacia el recto, para alcanzar su nivel más alto en el colon (Figura 2).

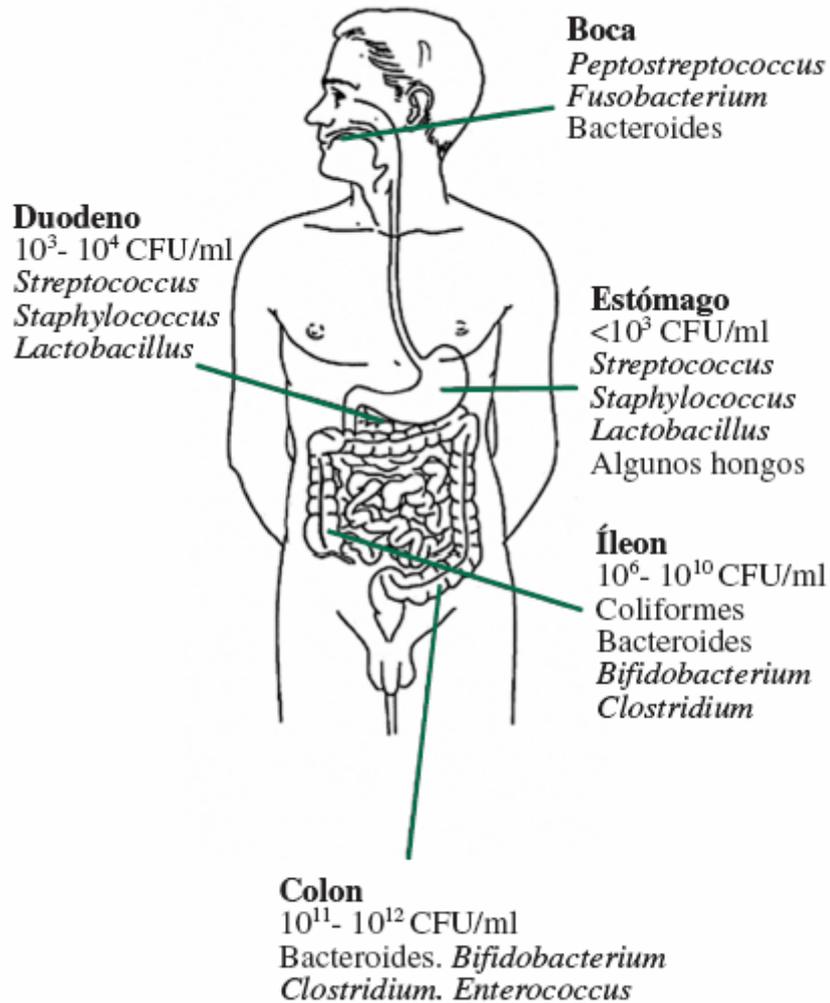


Figura 2. Cantidad de microorganismos presentes en el trayecto del tubo digestivo

Composición de la microbiota en el tubo digestivo

La microbiota del tubo digestivo difiere en el tipo y número de microorganismos dominantes en cada uno de sus segmentos y existen diferencias geográficas e individuales importantes, a pesar de lo cual existe un patrón de colonización más o menos común para todos los seres humanos (Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. Lancet 2003; 361: 512-9).

Cavidad bucal: debido al que el pH de la boca tiende a ser alcalino, la microbiota es diversa y se calcula que existen aproximadamente 500 especies diferentes. La microbiota encontrada está altamente relacionada con el estado clínico de las encías y los dientes, por lo que en una boca sana existen principalmente especies anaerobias Gram (+); en los huecos gingivales se encuentra una alta proporción de bacterias anaerobias facultativas Gram (+) (*Prevotella sp.*, *Veillonella sp.* y *Fusobacterium sp.*) y en la región supragingival se hallan sobre todo bacterias anaerobias facultativas Gram (+) (*Streptococcus sp.* y *Actinomyces sp.*) (10^{11} UFC/g de contenido). Pero cuando existen enfermedades periodontales la microbiota dominante son las especies Gram (-) anaerobias estrictas.

La lengua es reservorio de especies anaerobias obligadas y aunque las bacterias no crecen en la saliva, están presentes en ella en altas concentraciones (más de 10^8 UFC/ml) y la utilizan como medio de transporte para dirigirse a otros lugares del tracto digestivo (Kleessen B, Bezirtoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63).

Estómago y duodeno: la mayoría de las bacterias deglutidas no sobreviven en el estómago porque el jugo gástrico es extremadamente ácido (2,5 a 3,5) y, generalmente, está libre de bacterias. No obstante, inmediatamente después de las comidas el pH aumenta y el recuento microbiano aumenta hasta 10^5 UFC/ml con un descenso posterior a 10^3 UFC/ml.

Las bacterias que sobreviven al estómago son especies resistentes ácido e incluyen microorganismos Gram (+) (estreptococos, lactobacilos y levaduras) y *Helicobacter pylori* (Kleessen B, Bezirtoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63). Debido a lo agresivo de los líquidos intestinales y al tiempo corto de tránsito, en el

duodeno es difícil la colonización estable de las bacterias por lo que contiene un número relativamente bajo de microbios en tránsito (10^3 a 10^4 UFC/ml) (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. Int J Food Microbiol 1998; 41: 85-101, Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. Lancet 2003; 361: 512-9).

Intestino delgado: desde el duodeno hacia abajo, la composición de la microbiota se conoce poco debido a las dificultades inherentes a la toma de muestras en sujetos sanos, pero dado lo agresivo del medio, la microbiota es escasa y contiene usualmente menos de 10^5 UFC por mL. En el intestino delgado proximal, además de las especies encontradas en el estómago se aislan también *Haemophilus sp*, *Actinomyces sp*, algunos anaerobios (*Veillonella sp* y *Bacteroides sp*) y cantidades considerables de lactobacilos, debido al epitelio escamoso estratificado de esta zona y a la capacidad de adhesión de estas bacterias (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45).

En el yeyuno e íleon existe un incremento continuo en el número ($>10^8$ /g) y variedad de la microbiota con lo que, además de las bacterias ácido lácticas, aparecen un número considerable de bifidobacterias, grupos de anaerobios facultativos (*Bacteroides* y *Fusobacterium*) y de anaerobios estrictos que están presentes en número creciente a partir de la válvula ileocecal (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. Int J Food Microbiol 1998; 41: 85-101).

La microbiota en la parte distal del intestino delgado es mucho más densa ($> 10^9$ UFC/ml) y se asemeja a la del ciego, con gran cantidad de bacterias anaerobias obligadas y es considerada una zona de transición (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. Anu Rev Nutr 2002; 22: 283-307, Kleessen B, Bezirtoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63). Se ha establecido

que en los adultos los *Bacteroides* son las especies más comunes (10^{11}), seguidos por microorganismos Gram (+) no esporulados (10^9 a 10^{10}) como *Eubacterium*, *Lactobacillus*, cocos anaerobios (*Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Veillonella*, *Acidaminococcus* y *Streptococcus*); y el género *Clostridium* (10^7 - 10^8 UFC/g).

Intestino grueso: son comunes los microorganismos anaerobios facultativos (*Streptococcus* y *Enterococcus*). Así mismo, *Escherichia coli* es la bacteria anaerobia facultativa Gram (-) (10^8 /g de heces) que más se aísla; otros microorganismos Gram (-) como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* tienen recuentos menores. Diversos bacilos, *Staphilococcus aureus* y *Candida albicans* se aíslan en una concentración de 10^5 /g de heces. (Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63)

Los pocos estudios realizados en relación con la composición de la microbiota asociada a la mucosa del colon sugieren que las poblaciones epiteliales son similares a las del lumen aunque en cantidades menores (10^6 - 10^{10}). Sin embargo, con métodos de biología molecular, se ha encontrado que la diversidad microbiana tanto en el colon como en las heces es más grande de lo que previamente se había descrito ya que la mayoría de las bacterias encontradas con estos métodos genéticos no habían sido descritas previamente (Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of human intestinal microbial flora. Science 2005;308:1635-8). Con los métodos de cultivo convencionales, se ha descrito que las eubacterias, bifidobacterias (*B vulgatus*, *B distasonis* y *B fragilis*), *Clostridium* y los cocos Gram (+) son las especies dominantes (Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63, Mcfarlane S, Hopkins MJ, Mcfarlane GT. Bacterial growth and metabolism on sufaces in the large intestine. Microb Ecol Health Dis 2000

(Supl. 2): 64-72). En el lactante, además de la eubacterias las bifidobacterias *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* y *B. animalis* representan las especies mas importantes (Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 30: 61-7).

En el lumen las bacterias pueden vivir en forma separada, pero el examen microscópico muestra que la mayoría no se encuentran dispersas, sino en grandes conglomerados que atacan las estructuras de los restos alimentarios sólidos. El análisis microbiano de las partículas de alimento parcialmente digerido muestra que las poblaciones bacterianas crecen en superficies particulares y, al menos físicamente, las poblaciones son similares a la microbiota no adherente con predominio importante de bacteroides y bifidobacterias (Mcfarlane S, Hopkins MJ, Mcfarlane GT. Bacterial growth and metabolism on sufaces in the large intestine. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 64-72)

Por último, se ha encontrado que la microbiota asociada a la mucosa del recto es aproximadamente la misma que en el colon (Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63).

Además de las condiciones ambientales del tubo digestivo la cantidad y variedad de las bacterias en las diferentes regiones del mismo está determinada por una gran diversidad de factores complejos intrínsecos y extrínsecos (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45) (Tabla 1). De igual forma, así como el huésped directa o indirectamente influye sobre la microbiota que habita su intestino, ésta también tiene un impacto importante sobre el organismo que la aloja y estos efectos puede ser beneficiosos o perjudiciales para la salud del individuo (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. Anu Rev Nutr 2002; 22: 283-307)-

Tabla 1. Factores que afectan a la microbiota intestinal

-
1. Factores mediados por el huésped
 - pH, secreciones (inmunoglobulinas, bilis, enzimas)
 - Motilidad intestinal
 - Células exfoliadas, mucinas, tejido exudado
 2. Factores microbianos
 - Adhesión
 - Motilidad
 - Flexibilidad nutricional
 - Esporas, cápsulas, enzimas y componentes antimicrobianos
 3. Interacciones microbianas
 - Sinergia
 - Cooperación metabólica
 - Factores de crecimiento y excreción de vitaminas
 - Cambios en el EH, pH y tensión de oxígeno.
 - Antagonismo/estimulación
 - Ácidos grasos de cadena corta/aminas
 - Componentes antimicrobianos, sideroforos
 - Requerimientos nutricionales
 4. Dieta
 - Composición
 - Fibras no digeribles
 - Compuestos nitrogenados
 - Leche materna
 5. Drogas
 - Modificadores de la motilidad intestinal
 - Antibióticos
 - Antiácidos y bloqueadores de la producción de HCL
-

Importancia y funciones de la microbiota intestinal

Se conoce como microbiota normal a todas aquellas especies de microorganismos que se encuentran en el intestino de individuos sanos y que poseen una o varias funciones que pueden ser beneficiosas para la salud del huésped (Bengmark S. Colonic food. Pre-and probiotics. Am J Gastroenterol 2000; 95 (Supl.): 5-7). Estas funciones se dividen en metabólicas, tróficas y de protección (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial

interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307, Bengmark S. Colonic food. Pre-and probiotics. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (Supl.): 5-7)

Funciones metabólicas: el metabolismo microbiano es responsable de la conversión de muchas sustancias energéticas en nutrientes que pueden ser absorbidos y utilizados por el huésped (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307). La microbiota del intestino grueso juega un papel importante en los procesos digestivos del huésped, generando energía de los residuos alimentarios no absorbidos, de las células de descamación intestinal y de las secreciones a través de la fermentación de los hidratos de carbono y proteínas, así como de la absorción de los ácidos grasos de cadena corta y otros productos metabólicos (Mcfarlane S, Hopkins MJ, Mcfarlane GT. Bacterial growth and metabolism on sufaces in the large intestine. *Microb Ecol Health Dis* 2000 (Supl. 2): 64-72) que son utilizados por el huésped para suplir parte de su requerimiento de energía y por la microbiota para mantener su crecimiento y proliferación. (Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9).

Las dietas que se consumen típicamente en Europa aportan para la fermentación bacteriana entre 50 y 60 gramos de hidratos de carbono al día, los cuales producen 0,5 a 0,6 moles de ácidos grasos de cadena corta con un valor energético total de 140 a 180 kilocalorías, que representan aproximadamente el 10% del requerimiento calórico basal del individuo (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307). Esta función es tan importante que los roedores gnotobióticos, para mantener su peso, necesitan ingerir 30% más de energía que los animales con microbiota, lo que prueba que las bacterias intestinales ayudan al huésped a extraer el máximo valor energético de los alimentos (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307, Inoue R, Ushida K. Vertical and horizontal transmission of intestinal commensal

bacteria in the rat model. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; 46: 213-9). Se calcula que, en el adulto, el epitelio colónico obtiene entre el 60 y el 70% de sus necesidades energéticas a partir de los productos de fermentación bacteriana, principalmente del ácido butírico (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307). Sin embargo, ha sido descrito que el niño alimentado con pecho materno tiene una muy baja producción de ácido butírico debido a lo cual, se ha postulado que en estos niños ésta función no sea tan importante como previamente se ha creído o que los enterocitos de estos neonatos tengan características diferentes de las del adulto (Parret AM, Edwards CA. In vitro fermentation of carbohydrate by breast fec and formula fed infants. *Arch Dis Child* 1997;76:249-53).

La microbiota también contribuye a la homeostasis de los aminoácidos en el huésped. En aquellos animales no rumiantes ni coprófagos la proteína microbiana no se utiliza en gran medida por el huésped; sin embargo, una pequeña cantidad de los requerimientos de ciertos aminoácidos es proporcionado por la síntesis bacteriana. Este hecho fue observado al marcar aminoácidos con N^{15} y encontrar que entre el 1 y 20% de la lisina y la treonina circulantes de estos animales derivó de las bacterias intestinales (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101, Metges CC. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J Nutr* 2000; 130 (Supl.) 1857-64). También se ha descrito que algunas bifidobacterias marcadas con N^{15} y administradas por vía bucal, al ser destruidas en el lumen, aproximadamente el 90% de las proteínas cuyo nitrógeno luego es absorbido por el intestino y el 70% se retiene en el organismo (Gil A, Rueda R. Modulation of intestinal microflora by specific dietary components. *Microbiol Ecol Health Dis* 2000 (Supl. 2): 31-9).

Los productos de la fermentación bacteriana han sido implicados en la motilidad, la circulación y la estimulación del flujo intestinal y visceral que modulan la maquinaria metabólica intrínseca de las células del huésped, resultando en una más

eficiente absorción del agua, calcio, magnesio y hierro (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101, Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307, Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9, Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic microbiota *Gut* 1998; 42: 2-7, Younes H, Coudray C, Bellager J, Demigne C, Rayssiguier Y, Remesy C. Effects of two fermentable carbohydrates (inuline and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr* 2001; 86:479-85). Además de su capacidad para metabolizar numerosos polisacáridos de plantas, también degradan una gran variedad de glicoconjugados derivados del huésped (condroitín sulfato, mucina, hialuronato y heparina) (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307). Finalmente, los microorganismos colónicos también producen vitaminas (Younes H, Coudray C, Bellager J, Demigne C, Rayssiguier Y, Remesy C. Effects of two fermentable carbohydrates (inuline and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr* 2001; 86:479-85) por lo que los ratones gnotobióticos necesitan suplementos de vitaminas K, B y folato, que son producidas por los *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Fusobacterium* (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101, Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (Supl.) 2-4)

Funciones tróficas: posiblemente el papel más importante de la microbiota intestinal sobre la fisiología colónica es su efecto trófico en el epitelio intestinal (Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9). La diferenciación de las células epiteliales está afectada en gran medida por la interacción con los microorganismos residentes (Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular análisis of commensal host microbial relationship in the intestine. *Science* 2001; 291: 881-4) y sus productos metabólicos, principalmente por los ácidos grasos de cadena corta (butirato, acetato y propionato) que estimulan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales en el intestino humano (Bezizoglou E. The intestinal microflora during the first week of life. *Annaerobe* 1997; 3:

173-7). Además, el acetato es utilizado por los músculos esquelético y cardíaco para obtener energía y por los adipocitos para la lipogénesis (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307).

Funciones protectoras: es conocido que la microbiota intestinal indígena representa una barrera formidable para el establecimiento de poblaciones patógenas en el huésped. Este fenómeno es conocido como “interferencia bacteriana”, e incluye la producción de bacteriolisinas, productos metabólicos y otras condiciones inhibitorias como disminución del pH y depleción de los nutrientes requeridos para la multiplicación de los patógenos. A todos estos mecanismos se les conoce como efecto mucoso de barrera (Falk PG, Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev* 1998; 62: 1157-70).

Se conoce que el epitelio intestinal actúa como una barrera natural para el movimiento de bacterias patógenas, antígenos y sustancias tóxicas del lumen intestinal y esta barrera es sorprendentemente efectiva considerando las grandes cantidades de bacterias no residentes que entran al tubo digestivo diariamente. Se ha estimado que el niño puede estar expuesto a alrededor de 500 a 1.000 antígenos diferentes entre los 6 y 12 meses de edad (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101, Falk PG, Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev* 1998; 62: 1157-70) y la mayoría de ellos son excluidos por la mucosa intestinal, por lo que su integridad es necesaria para prevenir el transporte incontrolado de antígenos. El 90% de los antígenos de la dieta hace que se genere una respuesta disminuida durante el desarrollo posnatal, pero cuando la permeabilidad de la barrera está incrementada, como en los recién nacidos pretérmino, puede favorecer a la invasión de patógenos y el paso de otras sustancias dañinas que conducen a una respuesta inmune aberrante y a la

sensibilización. La modulación del transporte de antígenos ha sido atribuída a los *Lactobacilli* ya que la absorción intestinal de antígenos disminuye de manera importante en ratas tratadas con estos microorganismos (Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. Am J Gastroenterol 2000; 95 (Supl.) 2-4).

Se han descrito dos formas de efecto mucoso de barrera: la “drástica”, que elimina completamente las cepas bacterianas exógenas y la “permisiva” que permite la implantación de microorganismos en bajas cantidades (Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63). Los mecanismos que emplean las bacterias para realizar esta función incluyen la competencia por adherirse a las células epiteliales, con lo que previenen el ataque y la penetración de patógenos enteroinvasivos a dichas células (Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. Lancet 2003; 361: 512-9); esta función es esencial para el equilibrio de la microbiota intestinal, la actividad enzimática bacteriana y la estabilización de la permeabilidad intestinal (Gil A, Gil MC. Nutrientes condicionalmente esenciales. Rev Esp Pediatr 2001; 57: 13-26). La adhesión puede ser inespecífica por factores bioquímicos o específica mediante moléculas de adhesión en la superficie de las bacterias y receptores en las células epiteliales. Las bacterias comensales también inhiben el crecimiento de sus competidores mediante la producción de sustancias antimicrobianas llamadas bacteriocinas (Lievin V, Peiffer I, Hudault. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. Gut 2000; 47: 646-52, Midtvedt T. How individual colonic microorganisms respond to specific dietary components. Microb Ecol Health Dis 2000; suppl 2: 45-7) que son péptidos también conocidos como “autobióticos” y que se expresan de forma específica para cada especie (Corthier G, Barc MC, Nguyen Van P. Effect o dietary factors on colonisation resistance and colonisation. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 48-52).

La interfase entre el huésped mamífero y la microbiota es la placa de gel mucoso y las células de recubrimiento (glicocálix), que consisten en glicoconjugados en la

superficie apical del epitelio. La microbiota puede influenciar la expresión de estos glicoconjugados endoteliales utilizados como receptores de fijación por los microorganismos patógenos con lo que impide su establecimiento en el huésped (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101). Otros mecanismos con los que las bacterias intestinales protegen al huésped son la inducción de la producción de inmunoglobulina A secretora (IgAs) contra algunos patógenos, la restauración de algunos comensales dañados y la disminución de la producción de enterotoxinas, sin disminuir el número de gérmenes agresores (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101, Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev* 1998; 62: 1157-70, Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets. III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues *Immunology* 2000; 100: 119-30).

La protección contra los agentes infecciosos se completa intrínsecamente por el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT), considerado como el órgano inmune más extenso del cuerpo humano ya que el 80% (10^{10}) de todas las células que producen inmunoglobulinas se encuentran en este tejido linfoide (Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101, Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9). El GALT consiste en acumulaciones difusas de tejido linfático presentes en la lámina propia de la pared intestinal y en la placa epitelial (Hanson L, Korotkova M, Telemo E. Breast feeding, infant formulas, and immune system. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90 (Supl.): 59-63) y se ha encontrado que la colonización bacteriana del tracto gastrointestinal afecta de forma directa la composición del GALT, ya que después de la exposición a microbios luminales el número de linfocitos intraepiteliales se expande de forma significativa, los centros germinales con células productoras de inmunoglobulinas aumentan rápidamente en los

foliculos y la concentración de inmunoglobulinas se incrementa sustancialmente en suero (Tannok GW. Molecular assessment of intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (Supl.): 410-4). Se ha observado que los animales en ambientes gnotobióticos tienen bajas densidades de células linfoides en la mucosa intestinal, las estructuras foliculares especializadas son pequeñas y la concentración de inmunoglobulinas circulantes es baja (Tannok GW. Molecular assessment of intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (Supl.): 410-4, Pedone C, Bernabeau A, Postaire E, Bouley P. The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centers. *Int J Clin Pract* 1999; 53: 179-84).

La multiplicidad y complejidad de la microbiota intestinal es importante, no solo para la expansión del sistema inmune sino también para su especialización, por lo que es muy difícil inducir tolerancia inmunológica en animales gnotobióticos con una respuesta inmune específica reducida o casi nula, secundaria a la ausencia de microbiota intestinal (Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev* 1998; 62: 1157-70). La relación entre el GALT y la microbiota intestinal en etapas tempranas de la vida es crucial para el desarrollo apropiado de las interacciones entre los distintos tipos celulares de la mucosa y la inmunorregulación sistémica (Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9).

La maduración ulterior del GALT requiere de estímulos constantes de bacterias de la microbiota intestinal y numerosos estudios han mostrado que la supresión o inadecuación de tales estímulos conduce a una disminución de la superficie intestinal, alteración de los patrones enzimáticos de la mucosa, defectos en la barrera no inmune del intestino, capacidad reducida de la respuesta inflamatoria, un sistema defectuoso de IgAs, abrogación de la tolerancia oral y falta de respuesta a los antígenos no patógenos previamente encontrados en las superficies mucosas (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (Supl.): 1035-45,

Katayawa M, Dazhong X, Specian R, Deitch E. Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation. *Ann Surg* 1997; 225: 317-26). La respuesta inmune a los microbios tiene componentes innatos y adaptativos; el sistema inmune innato discrimina entre patógenos potenciales y bacterias comensales mediante el uso de receptores preformados (Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9). El GALT responde de dos formas a los antígenos que llegan al intestino: una positiva (inmunidad contra organismos patógenos) y otra negativa (a gran cantidad de antígenos alimentarios y de bacterias en el ambiente mucoso).

La tolerancia a una gran cantidad de antígenos previene al sistema inmune de una respuesta inmune excesiva. Algunos productos de la pared celular bacteriana [el peptidoglicano de las bacterias Gram (+) y Gram (-) y el lipopolisacárido de las Gram (-)] activan la inmunidad no específica y pequeñas cantidades de estos compuestos además de una secuencia específica de DNA bacteriano CpG, se liberan continuamente en la luz intestinal y parece ser que son importantes para el mantenimiento, desarrollo, función y adquisición de tolerancia inmune (Mcfarlane S, Hopkins MJ, Mcfarlane GT. Bacterial growth and metabolism on sufaces in the large intestine. *Microb Ecol Health Dis* 2000 (Supl. 2): 64-72, Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev* 1998; 62: 1157-70, Hanson L, Korotkova M, Telemo E. Breast feeding, infant formulas, and immune system. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90 (Supl.): 59-63, Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1119-27)

La microbiota es necesaria para la inducción de tolerancia a los antígenos, lo cual se ha comprobado con experimentos en ratones gnotobióticos en los cuales la tolerancia oral sólo se obtiene cuando la microbiota intestinal es reconstituida con bifidobacterias durante el período neonatal (Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1119-27). Cuando el equilibrio establecido por la microbiota se rompe, se produce la enfermedad, que en el intestino se manifiesta como diarrea y a nivel sistémico como atopía y asma.

Las infecciones gastrointestinales generalmente son producidas por virus y bacterias como *Escherichia coli*, *Campilobacter sp*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Listeria sp*, *Yersinia* y algunos protozoarios, aunque también puede ser ocasionadas por oportunistas como *Candida albicans* o *Clostridium difficile* (Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63)

Algunos cepas bacterianas del intestino, sobre todo los lactobacilos, previenen la aparición o disminuyen la duración del cuadro diarreico, especialmente cuando es producido por rotavirus, ya que estabilizan la mucosa intestinal, aumentan la actividad fagocítica y reducen la excreción fecal de virus (Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. Lancet 2003; 361: 512-9, Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. Am J Gastroenterol 2000; 95 (Supl.) 2-4, Hamilton-Miller JM. Probiotics and prebiotics: where are we going?. J Microbial Chemotherapy 2003; 52: 143). La administración de lactobacilos previene o mejora el cuadro diarreico, lo que prueba que son unos de los encargados de evitar la colonización por patógenos.

Colonización bacteriana en el intestino del niño

Colonización inicial: el feto humano y el recién nacido se consideran libres de bacterias (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. Anu Rev Nutr 2002; 22: 283-307, Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63). Sin embargo, se encuentran pequeñas cantidades de microorganismos inmediatamente después del nacimiento (5×10^4 a 5×10^5) y las bacterias más frecuentemente aisladas son *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Corynebacterium*. Cuando las membranas amnióticas se rompen las bacterias de la microbiota intestinal y vaginal materna también pueden aislarse (Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 1119-27). Bajo

circunstancias normales, la colonización inicial del intestino del niño ocurre durante el parto al ponerse en contacto con la microbiota vaginal de su madre y, posteriormente, por el contacto con la microbiota normal de sus padres. Esto lleva a la inoculación con bifidobacterias, enterobacterias, bacteroides, clostridios y cocos Gram positivos (Bjorksten B, Sepp, Julge K. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 516-20).

Un hallazgo constante es que todos los niños son inicialmente colonizados por *E. coli* y *Streptococcus*, que a veces alcanzan cifras de 10^8 a 10^{10} UFC/g de heces, por lo que se ha propuesto que son las responsables de la creación de un ambiente favorable para el establecimiento de los anaerobios de los géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Clostridium* entre los 4 y 7 días de vida (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45). Así mismo, el tipo de nacimiento tiene un efecto significativo en el desarrollo de la microbiota intestinal.

Nacimiento vaginal: normalmente la colonización se inicia durante el parto por exposición a la microbiota de la madre; a esta forma de adquisición microbiana se le conoce como transmisión vertical y a las posteriores como transmisión horizontal (Inoue R, Ushida K. Vertical and horizontal transmission of intestinal commensal bacteria in the rat model. FEMS Microbiol Ecol 2003; 46: 213-9).

Con el largo proceso del nacimiento por vía vaginal se hace más viable el aislamiento de microbios en el estómago y la boca del bebé. De hecho, inmediatamente después del nacimiento, es posible aislar de la nasofaringe del 62% de los recién nacidos bacterias que fueron aisladas en la vagina de sus madres antes del inicio del parto, y los microorganismos encontrados en el contenido gástrico del neonato entre los 5 y 10 minutos posteriores al nacimiento, son similares a los aislados en el cérvix de la madre antes del parto (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JJ.

Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. Microbiol Mol Rev 1998; 62: 1157-70).

Se han encontrado más de 18 grupos diferentes de bacterias en el tracto gastrointestinal inferior de la mujer embarazada y esas son las principales bacterias a las que está expuesto el recién nacido, siendo *E. coli* y *Streptococcus sp.* las que con mayor frecuencia se aíslan del tracto digestivo del niño (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45).

En los neonatos las bacterias aparecen en las heces durante el primer día de vida, siendo las primeras *E. coli*, *Streptococcus sp.* y *Enterococcus sp* y *Bifidobacterium* que aparecen alrededor del día 3 de vida extrauterina. Hacia el décimo día postnatal, la mayoría de los neonatos sanos a término están colonizados por una microbiota bacteriana heterogénea, en donde predomina *Bifidobacterium* en los alimentados al pecho, y una microbiota mixta en los que reciben fórmula (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. J Nutr Biochem 1998; 9: 668-75).

Nacimiento por cesárea: estos niños inician la vida prácticamente sin bacterias. El primer contacto con ellas es fortuito y los microorganismos son introducidos del ambiente por el equipo hospitalario (Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. J Nutr Biochem 1998; 9: 668-75). Los niños nacidos por cesárea pueden también estar expuestos a los microbios de su madre, pero la exposición inicial es más frecuente con gérmenes del ambiente (equipo, aire y otros niños) siendo el vector personal de enfermería (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45). Existen datos de que las mismas cepas de *Bifidobacterium* se detectaron en las heces de niños nacidos en el mismo hospital, lo que sugiere una forma de transmisión horizontal (Inoue R, Ushida K. Vertical and horizontal transmission of intestinal commensal bacteria in the rat model. FEMS Microbiol Ecol 2003; 46: 213-9).

Después del nacimiento, los microbios ambientales, orales y cutáneos pueden ser transferidos mecánicamente de la madre al recién nacido por varios mecanismos tales como la succión, los besos y el cuidado materno. (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45). En estos niños, la colonización anaerobia es generalmente retardada y la microbiota está compuesta por bacterias microaerofílicas, anaerobios facultativos y bacterias esporuladas (*Clostridium*) que se encuentran en el medio hospitalario. Entre los días 4 y 6, todos los niños nacidos por vía vaginal son colonizados por bacterias anaerobias pero sólo el 9% de los nacidos por cesárea tienen estas bacterias (Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63). Los microorganismos introducidos durante los primeros siete días de vida tienen una baja capacidad de colonización y la adquisición de bacteroides anaerobios está retrasada. Anteriormente se creía que la colonización por bifidobacterias y *E. coli* era similar a la de niños nacidos por vía vaginal, (Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. J Nutr Biochem 1998; 9: 668-75) pero ahora se sabe que en países con buenas medidas de higiene transcurre un lapso considerable de tiempo antes de que se implanten *E. coli* y otras bacterias Gram (-) (Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. Microbiol Mol Rev 1998; 62: 1157-70), y que en los niños de países en vías de desarrollo se encuentra una fuerte exposición y adquisición de bacterias en etapas tempranas de la vida (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. J Nutr Biochem 1998; 9: 668-75).

Colonización durante el primer año de vida: en todos los casos existe un aumento del número de bacterias en la primera semana; durante este tiempo se obtienen recuentos bacterianos de 10^9 UFC/g, sin que influya la vía de nacimiento. Esta similitud

se debe a que, al nacer, el ambiente en el intestino del niño muestra un potencial redox positivo, que permite la colonización inicial con anaerobios facultativos que a su vez disminuyen este potencial y permiten el crecimiento de anaerobios estrictos, los cuales aumentan paulatinamente durante la primera semana de vida, aún y cuando en los primeros días los alimentados al pecho muestran un recuento superior de colonias, debido a la contaminación por la leche y la piel maternas. La leche contiene bacterias ácido lácticas, entre las que predominan *L. gasseri* y *E. Faecium*, y es una fuente natural de bacterias para el intestino del recién nacido (Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xain J y col. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. J Pediatr 2003; 143: 754-8). Las principales especies aisladas durante esta etapa son: *Staphylococcus aureus* (4%), *S. epidermidis* (20%), *S. fecalis* (30%), *S. faecium* (10%), *S. no hemolítico* (10%) y *Enterobacteriaceae* [*E. coli* (20%), *Klebsiella aerogenes* (20%), *Proteus mirabilis* (2%), *Enterobacter cloacae* (1%), *Serratia sp* (1%) y *Pseudomonas aeruginosa* (0.5%)]. Las bacterias aerobias facultativas son seguidas de cerca por *Bifidobacterium sp.* (Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. J Nutr Biochem 1998; 9: 668-75).

Durante el primer año se establece un patrón parecido al del adulto y se desarrolla el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) que se convierte en el órgano más importante del sistema inmune adaptativo (Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 1119-27).

Colonización a partir del segundo año: la microbiota del colon de los niños es generalmente vista como casi idéntica a la de los adultos a partir de los 2 años de edad (Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63), si bien los anaerobios facultativos se encuentran en mayor concentración que en el adulto, lo que está de acuerdo con la observación de que la microbiota no se iguala a la del adulto hasta la niñez tardía. Se ha descrito que una vez que se ha establecido el clímax de la

microbiota, los grupos mayores de bacterias en las heces permanecen relativamente constantes durante el tiempo (Gronlund MM, Lehtonen OP, Enrola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal microbiota after caesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28:19-25). Y hacia el final de segundo año de vida, la microbiota del niño forma placas densas que actúan en forma efectiva como barrera para la colonización de la microbiota exógena, alcanzando una velocidad de replicación que sobrepasa los mecanismos de eliminación bacteriana del huésped (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb Ecol Health Dis* 2000 (Supl. 2): 53-63). La evolución de la microbiota en función del tiempo se presenta en la Figura 3 .

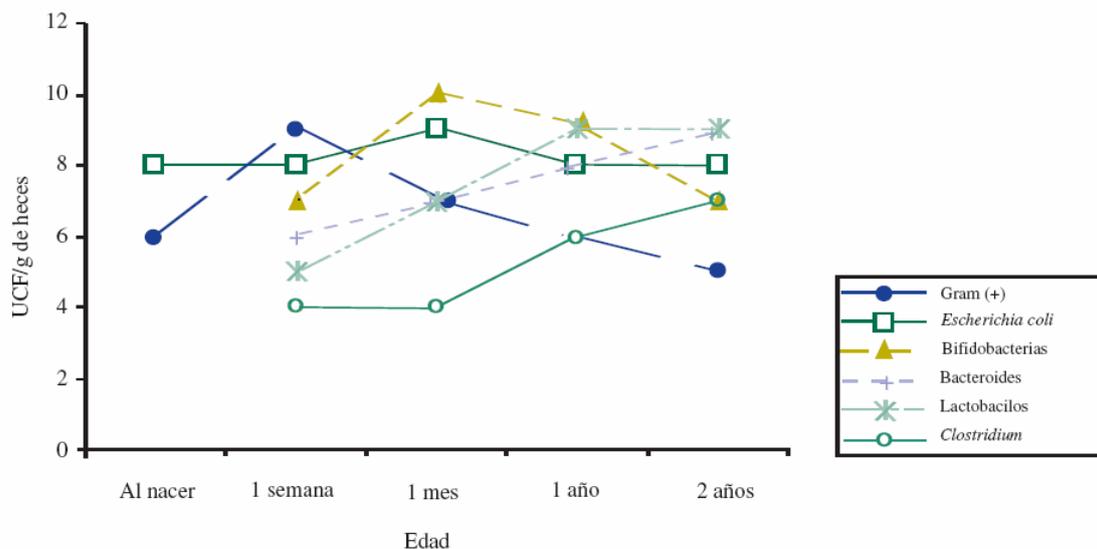


Figura 3. Cambios de la microbiota intestinal en el niño en función del tiempo

Cambios de la microbiota intestinal asociados a enfermedad

Se ha descrito una fuerte asociación entre la enfermedad y la composición de la microbiota intestinal, sin que hasta el momento se haya podido dilucidar si estos cambios son la causa o un producto a la misma enfermedad. Entre las entidades que más

se han estudiado se encuentran las enfermedades atópicas, la enfermedad inflamatoria intestinal, el cáncer de colon, la artritis reumatoide, la obesidad y el efecto que tiene el estrés sobre la composición microbiana en el intestino tanto en animales de experimentación como en el ser humano.

Enfermedades atópicas e Hipótesis higiénica:

La hipótesis higiénica de las enfermedades alérgicas implica que los avances en el control de las enfermedades y el cambio de estilo de vida en las sociedades occidentales han reducido en buena medida la extensión de la exposición a las bacterias. Por ello, si la hipótesis higiénica es cierta, las enfermedades infecciosas en la niñez temprana pueden prevenir la enfermedad alérgica, y la reducción de la prevalencia de infección provocará un incremento de la atopia (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88).

La hipótesis higiénica puede ser combinada con el paradigma Th₁/Th₂ para argumentar que el contacto reducido con los microbios y la disminución de enfermedades infecciosas en edad temprana lleva a un debilitamiento de del manejo inmunológico en la dirección Th₁ lo que resulta en una sobreactividad de la respuesta Th₂ (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88) y el incremento en la posibilidad de padecer enfermedades alérgicas

En otras palabras, el recién nacido posee una respuesta humoral dominante (tipo Th₂) y este estado es desequilibrado hacia una respuesta mediada por la inmunidad celular (tipo Th₁), posiblemente debido a infecciones durante la infancia. La primera exposición a un patógeno foráneo estimula la respuesta inmune innata, que es no específica, y se liberan mediadores como las citocinas. La inmunidad específica o

adaptativa involucra linfocitos con receptores de antígeno específicos que estimulan a su vez subespecies de linfocitos cooperadores Th (Th₁ y Th₂). Las citocinas secretadas por las células Th₁ [IL-2, interferón gamma (INF- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)] están involucradas en la inflamación y activación de células T citotóxicas (Kalliomäki M, Kirjavainen P, Enrola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 129-34) y este tipo de inmunidad está acrecentada por respuestas inmunes inducidas por microbios que incluyen esporas y hongos. (Wold AD. The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy* 1998; 53 (Supl. 46): 20-5).

Estudios en animales libres de gérmenes indican que la colonización exitosa del intestino es un prerequisite para el desarrollo de una respuesta normal del sistema inmune (Eggesbø M, Botten G, Stigum Hein, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy?. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:420-6, Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997;159:1739-45) ya que a través de diferentes mecanismos inmunoestimuladores, los microbios estimulan al sistema inmune induciendo una respuesta TH₁ no alérgica (Eggesbø M, Botten G, Stigum Hein, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy?. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:420-6, Wold AE. The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy* 1998;53:20-5, Dahlgren UI, Wold AE, Hanson LA, Midtvedt T. Expression of a dietary protein in *E. coli* renders it strongly antigenic to gut lymphoid tissue. *Immunology* 1991;73:394-7) que entre otras cosas, produce una disminución específica en la síntesis de IgE a través de diversos mecanismos lo cual disminuye la posibilidad de presentar enfermedades atópicas a pesar de tener la información genética para ello.

De acuerdo con la hipótesis higiénica, las infecciones tempranas pueden preparar la inmunidad inmadura de los niños para enfrentarse con los alérgenos y reducir la prevalencia de alergia cambiando la respuesta Th₂ por una respuesta Th₁ para lo cual el

desarrollo de la microbiota intestinal en los periodos tempranos de la vida es crucial (Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wadendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 61-7). Experimentos con animales gnotobióticos muestran que su sistema inmune se expande rápidamente en relación directa con la colonización de su intestino con microbios (Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev* 1998; 62: 1157-70), por lo que esta hipótesis también propone que el incremento de la prevalencia y severidad de las enfermedades alérgicas en los países desarrollados es debido a que los niños están expuestos con menos frecuencia a los microorganismos del tracto gastrointestinal durante su infancia (Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev* 1998; 62: 1157-70, Wold AD. The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy* 1998; 53 (Supl. 46): 20-5, Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wadendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 61-7). La exposición a cepas específicas de la microbiota comensal pueden representar la llave moduladora del sistema inmune contra la atopia y las enfermedades atópicas (Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1119-27, Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402 (Supl.): B2-4), con lo que se adjudica a la microbiota un efecto regulador en la maduración del sistema inmune (Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, Okamoto H, Ikenaga T, Tajiri Y y col. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and health control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 587-91, Sanfilippo L, Li CK, Seth R, Balwin TJ, Menozzi MG, Mahida YR. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGFbeta) by human colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 456-63) por lo que, durante las etapas tempranas de la vida, la buena higiene provoca una baja maduración del sistema inmune con el consecuente retardo en la obtención del balance entre la inmunidad Th1 y Th2 (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J*

Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in 't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. Int J Food Microbiol 1998; 41: 85-101, Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.):1046-51).

Se ha encontrado que diferencias en la microbiota intestinal preceden al desarrollo de atopia y el hallazgo más característico es una menor razón bifidobacterias: clostridios, con descenso de las primeras y aumento de los segundos (Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 1119-27, Björkstén B, Sepp, Julge K. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 516-20, Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. J Allergy Clin Immunol. 2001;107:129-34). En un estudio que comparó niños alérgicos con sanos se demostraron diferencias importantes en la microbiota intestinal caracterizadas por una menor cantidad de lactobacilos, anaerobios y bacteroides, y un efecto contrario en la cantidad de microorganismos aerobios (*Clostridium*, coliformes y *Staphylococcus aureus*), encontrando además una mayor incidencia de alergia asociada a una disminución en la cantidad de lactobacilos y aumento en la cantidad de clostridios (Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year old children. Clin Exp Allergy 1999; 29: 342-6). Otros estudios concuerdan con el hallazgo de que los niños alérgicos tienen una mayor cantidad de *Clostridium* pero también una menor cantidad de todas las bacterias productoras de ácido láctico (Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wadendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 30: 61-7, Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. Gut 2001; 48: 198-205), así como diferencias en el tipo de especies de bifidobacterias, principalmente con el remplazo de gran cantidad de *Bifidobacterium bifidum* por *Bifidobacterium adolescentis* de tipo adulto en los niños atópicos (Ouwehand AC, Isolauri E, He F, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. J Allergy Clin Immunol. 2001

Jul;108(1):144-5). Además las bifidobacterias de los niños con alergia, inducen un patrón distinto de producción de citocinas comparado con la encontrada en las de niños sanos (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88, He F, Morita H, Hashimoto H, Hosoda M, Kurisaki J, Ouwehand AC, Isolauri E, Benno Y, Salminen S. Intestinal Bifidobacterium species induce varying cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Jun;109(6):1035-6.).

Por último, varios estudios recientes demuestran el efecto beneficioso de la administración de lactobacilos sobre la enfermedad alérgica inflamatoria y la alergia alimentaria (Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast feeding might confer immunoregulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 119-21, Kalliomaki M, Dalminen S, Arrilommi M, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-9) hecho que apoya que los cambios de la microbiota intestinal juegan un papel importante en la fisiopatogenia de las enfermedades alérgicas y que varios de sus habitantes habituales pueden ser utilizados en la prevención de estos síndromes.

Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD)

Es una entidad inflamatoria crónica que se manifiesta como Colitis Ulcerativa (CU) o como Enfermedad de Crohn (EC) (Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition* (2005) 24, 339–352). Ambas entidades se localizan principalmente en áreas que tienen altas concentraciones de bacterias (región cecal e ileon terminal en la EC y el recto en la CU) (Schultz M; Scholmerich J; Rath HC. Rationale for probiotic and antibiotic treatment strategies in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis* 2003;21:105-28).

Aunque aún no se ha confirmado un agente infeccioso específico como el causante de la enfermedad, los estudios de investigación han originado evidencia convincente que sugiere que las bacterias comensales del intestino o sus productos

proveen un medio adecuado para el inicio y la perpetuación de la IBD. La mayor parte de esta evidencia proviene de estudios en animales de experimentación y algunas modificaciones de la microbiota que se han encontrado en pacientes con IBD incluyen: altas concentraciones de bacterias habitantes de la mucosa tanto en áreas con inflamación como en aquellas libres de ella (Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:44–54, Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition* (2005) 24, 339–352); incremento en el número de colonias de coliformes y bacteroides, y descenso en las bacterias ácido lácticas (Kennedy RJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Promotion for a favorable gut flora in inflammatory bowel disease. *JPEN* 2000; 24:189–95); así como de un incremento de *Escherichia coli* y lactobacilos en el colon (Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition* (2005) 24, 339–352, Borruel N, Carol M, Casellas F, et al. Increased mucosal TNF α production in Crohn's disease can be modulated in vitro by probiotic bacteria. *Gut* 2002;5:659–64, Steidler L. Microbiological and immunological strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Microbes Infect* 2001;3:1157-66) acompañado de un incremento significativo de *E coli* y *Bacteroides fragilis* en el íleon (Keighley MR, Arabi Y, Dimock F, Burdon DW, Allan RN, Alexander-Williams J. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut* 1978;19:1099-104). De igual forma, se ha observado una alta carga bacteriana en el moco intestinal de pacientes con IBD (Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbours high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 1999;117:1089-97).

Finalmente, se han descrito algunas cepas modificadas de *E. coli* en pacientes con CU y EC; de forma similar, los pacientes con IBD tienen cantidades mayores de bacterias en las superficies epiteliales que las que tienen las personas sanas. Las bacterias aisladas pertenecen a una amplia gama de géneros; algunos han sido identificados en la capa del epitelial, mientras otros se han encontrado dentro de las

células. No obstante, el papel de estas bacterias alteradas en la patogénesis de IBD permanece incierto (Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:44–54).

Obesidad

Una de las funciones principales de los microorganismos que habitan el colon es la digestión de los sustratos metabólicos (Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. *Alim Nutr Salud* 2004;11:37-48) y las fuentes principales de nutrientes son el tracto gastrointestinal y el colon. Los sustratos disponibles incluyen fibra dietética, almidones, oligosacáridos, azúcares, lípidos, proteínas, mucinas endógenas, tejido epitelial desprendido, enterocitos, restos bacterianos, ácidos biliares y colesterol (McFarland LV. Normal flora: diversity and functions. *Microb Ecol Health Dis* 2000;12:193-207, Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-9). Los principales productos metabólicos de las bacterias intestinales son los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) e incluyen los ácidos acético, propiónico y butírico. Los ácidos acético y propiónico son rápidamente absorbidos y representan la mayor fuente de energía para el huésped por lo que, si tomamos en cuenta que la típica dieta europea contiene entre 50 y 60 g de carbohidratos la cantidad de SCFA producidos por la microbiota intestinal fluctúa entre 0.5 y 0.6 mol de SCFA con un valor energético de 140 to 180 calorías, que al ser absorbidos representa alrededor del 10% de los requerimientos energéticos diarios de una persona promedio (Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. *Alim Nutr Salud* 2004;11:37-48, Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307), hecho ampliamente demostrado en animales libres de gérmenes los cuales para mantener su peso necesitan consumir 30% más de energía que aquellos que tienen microbiota (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How

host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307, Inoue R, Ushida K. Vertical and horizontal transmission of intestinal commensal bacteria in the rat model. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; 46: 213-9), lo que demuestra que las bacterias ayudan al huésped a extraer el máximo valor energético de los alimentos con lo que una cantidad considerable de energía puede ser aprovechada tanto por las bacterias comensales como por el huésped en vez de eliminadas.

Por esta razón, ha sido postulado que la microbiota de los individuos obesos es diferente de aquellos con un peso normal. Aunque, esta aseveración no ha sido probada en humanos, existe suficiente evidencia indirecta ya que en estudios con animales gnotobioticos, éstos tienen 40% menos grasa corporal que los de animales que adquirieron su microbiota desde el nacimiento. Además presentan resistencia a la insulina y un peso corporal menor que sus contrapartes a pesar de consumir mayor cantidad de alimento (Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:15718-23, Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915-20). Este último hecho puede ser convincentemente explicado por la cantidad de energía que producen las bacterias intestinales a partir de los polisacáridos de la dieta, que al ser absorbidos incrementan la cantidad de energía que puede ser almacenada.

Recientemente, se ha descrito que la microbiota intestinal es diferente entre ratones homocigotos con la mutación genética a leptina (ob/ob), los cuales presentan obesidad patológica cuando se comparan con la de sus madres portadoras, sus hermanos heterocigotos (ob/+) y sus hermanos no portadores (+/+) (Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:11070-5). Las principales diferencias encontradas en este modelo animal, fueron la reducción del reino de *Bacteroidetes* y el incremento proporcional de *Firmicutes*. Aunque, las

especies en el ratón y el humano son únicas es posible que en el hombre ocurra algo similar, tomando en cuenta que las bacterias en ambos son similares a nivel de la división superior (superreino o linaje evolucionario profundo) (Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci. 2005;102:11070-5).

Cáncer de colon

La grasa dietética y el consumo elevado de carnes rojas están asociados a un riesgo elevado de padecer cáncer de colon (Bingham SA. High meat diets and cancer risk. Proc Nutr Soc 1999;58;243-8). En contraste, una ingestión elevada de pescado, verduras, cereales integrales y calcio se comportan como factores protectores (Rafter J, Glinghammar B. Interactions between the environment and genes in the colon. Eur J Cancer Prev 1998;7 (Suppl):69-74). Aunque, la evidencia no es concluyente, la microbiota intestinal parece ser un factor ambiental que incrementa el riesgo de padecer cáncer de colon y se ha sugerido que el efecto de la dieta en los procesos carcinogénicos puede ser mediado por cambios en la microbiota intestinal y la producción de carcinógenos, cocarcinógenos y procarcinógenos (Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. Lancet 2003;361:512-9). Se ha descrito que la concentración total de *Bacteroides* y *Bifidobacterium* se asocian a un riesgo incrementado de padecer cáncer de colon (Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. Appl Environ Microbiol. 1995;61:3202-7).

Artritis reumatoide

Se ha sugerido que, tanto los factores genéticos como los ambientales están asociados en la etiología de la artritis reumatoide. Entre los factores ambientales potenciales implicados en la red de causalidad de la artritis reumatoide, los microbios y la infección representan las alternativas más populares (Midtvedt T. Intestinal bacteria and rheumatic disease. Scand J Rheumatol Suppl 1987;64:49-54) y entre las infecciones, las debidas a *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella* son las más frecuentemente implicadas como las

desencadenantes de la artritis reactiva (Toivanen P. Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:807–11), dado que sus productos de degradación han sido aislados de los tejidos sinoviales de los pacientes con esta enfermedad (Granfors K, Jalkanen S, von Essen R, Lahesmaa-Rantala R, Isomäki O, Pekkola-Heino K, et al. Yersinia antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. *N Engl J Med* 1989;320:216–21, Granfors K, Jalkanen S, Lindberg AA, Mäki-Ikola O, von Essen R, Lahesmaa-Rantala R, et al. Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. *Lancet* 1990;335:685–8). Tales hallazgos han llevado a la consideración de la posibilidad de que un fenómeno similar pueda ocurrir con las bacterias que se alojan normalmente en el tracto gastrointestinal, las cuales inducen inflamación sinovial en sujetos susceptibles y la evidencia que soporta esta suposición se basa en que los productos de degradación de las paredes bacterianas son normalmente encontradas en las células sanguíneas circulantes y en el tejido articular de los pacientes con artritis. Además, las paredes celulares de especies bacterianas representativas de la microbiota intestinal normal son artritogénicas en modelos animales y se ha encontrado alguna evidencia de que pacientes con artritis reumatoide temprana tienen una microbiota intestinal que difiere de los sujetos estudiados como control (Toivanen P. Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:807–11).

Las principales diferencias encontradas entre sujetos con y sin artritis reumatoide son la cantidad de anaerobios fecales y de microorganismos anaerobios facultativos, siendo el *Proteus mirabilis* el agente más frecuentemente implicado en estas diferencias (Kjeldsen-Kragh J. Rheumatoid arthritis treated with vegetarian diets. *Am J Clin Nutr.* 1999;70 (Suppl):594-600, Eerola E, Mottonen T, Hannonen P, Luukkainen R, Kantola I, Vuori K, Tuominen J, Toivanen P. Intestinal flora in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1994 ;33:1030-8).

Estrés

Se ha demostrado que el estrés psicológico produce efectos profundos en la microbiota intestinal tanto en animales como en seres humanos (Bailey MT, Coe CL. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microbiota in infant rhesus monkeys. *Dev Psychobiol* 1999;35:146-55, Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev* 2004;9:180-97). ESOS cambios han sido atribuidos, entre otras cosas, a la exposición bacteriana a las catecolaminas, lo cual produce un descenso significativo de lactobacilos y bifidobacterias y un efecto inverso en algunas bacterias potencialmente patógenas como *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacteroides* y *Pseudomonas aeruginosa* (Holdeman LV, Good IJ, Moore WE. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol* 1976;31:359-75, Lyte M, Ernst S. Catecholamine induced growth of Gram negative bacteria. *Life Sci* 1992;50:203-12). También se ha sido citado que la norepinefrina incrementa el crecimiento y la expresión de factores de virulencia de varias cepas de *E coli* (Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev* 2004;9:180-97) y se ha encontrado que *E coli* produce una hormona que autoinduce su crecimiento (Lyte M, Frank CD, Green BT. Production of autoinducer of growth by norepinephrine cultured *Escherichia coli* 0157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 1996;139:155-9) la cual además, en estudios *in vitro*, estimula también el crecimiento de otras cepas de microorganismos Gram negativos (Freestone PP, Haigh RD, Williams PH, Lyte M. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS Microbiol Lett* 1999;172:53-60).

Diversidad de la microbiota en función de la dieta

Leche materna vs fórmula: la colonización se inicia en el momento del nacimiento y ocurre en pocos días. El tipo de nacimiento (cesárea o parto) y la dieta (pecho o fórmula) pueden afectar el patrón de colonización (Bjorksten B, Sepp, Julge K. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 516-20, Guerin-Danan C, Chabanet C, Pedone C, Popot F, Vaissade P, Bouley C et al. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants.

Am J Clin Nutr 1998; 67: 111-7) y entre los factores involucrados en la colonización bacteriana, el tipo de leche juega un factor de primer orden (Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63).

La sucesión de microorganismos en las heces de los niños alimentados con fórmula es marcadamente mas alta en bacterias aerobias facultativas (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*) y la colonización por *Bifidobacterium* se inicia generalmente algunos días después. Los bacteroides predominan entre los anaerobios y se encuentra una gran cantidad de enterobacterias (Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. J Nutr Biochem 1998; 9: 668-75).

Después de la primera inoculación, la microbiota cambia rápidamente, presumiblemente bajo la influencia de la dieta. En los niños alimentados de forma exclusiva con leche materna en pocas semanas la microbiota es dominada por las bifidobacterias, posiblemente causado por factores estimuladores de su crecimiento presentes en la leche humana (Bjorksten B, Sepp, Julge K. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 516-20).

Inicio de alimentos diferentes a la leche (beikost): después de la introducción de alimentos sólidos las bifidobacterias no son ya dominantes y las diferencias en la microbiota se pierden y su composición es semejante a la del adulto. Durante el 2º año de vida aumenta gradualmente el número de bacteroides, cocos Gram (+) y anaerobios (*Peptococcus* y *Peptoestreptococcus*). (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Bjorksten B, Sepp, Julge K. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 516-20).

Entre los 4 y los 24 meses de edad se introducen en la dieta del niño una gran variedad de alimentos y se pierden las diferencias en la microbiota entre los niños

alimentados al pecho materno y con fórmula, existiendo un incremento de enterobacterias, principalmente *E. coli*, *Enterococcus* y *Clostridium* con incremento paralelo de *Bacteroides* y anaerobios Gram (-) (Metges CC. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. J Nutr 2000; 130 (Supl.) 1857-64, Lhoste EF, Mouzon B, Andrieux C, Gueugneau AM, Fiszlewicz M, Corring T et al. Physiological effects of a pea protein in gnotobiotic rats.: comparison with soy bean isolate and meat. Ann Nutr Metab 1998; 42: 44-54).

La introducción de alimentos sólidos a los niños alimentados con leche materna causa un gran disturbio en la microbiota intestinal; los recuentos de enterobacterias aumentan considerablemente, ocurriendo al mismo tiempo la colonización por bacteroides y *Clostridium*. Este fenómeno no se observa en niños alimentados con fórmula; en los que, la cantidad de anaerobios facultativos permanece alta a pesar de que la colonización por anaerobios estrictos continúa (Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 1999; 69 (Supl.): 1035-45, Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. Microb Ecol Health Dis 2000 (Supl. 2): 53-63, Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. J Nutr Biochem 1998; 9: 668-75).

TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Los estudios utilizados en la identificación de la microbiota intestinal se pueden dividir en tres grupos.

1º. Técnicas de cultivo: una buena cantidad de los métodos de cultivo utilizados hasta ahora son semi-selectivos y la identificación de las especies y cepas microbianas dependen de las características fenotípicas y de las características metabólicas únicas de los microbios (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004;38:378-88).

2°. Técnicas de microgenómica: Refinamientos recientes en las técnicas de biología molecular han hecho posible identificar y cuantificar la microbiota intestinal sin cultivo previo. Cebadores y sondas específicas de PCR pueden ser diseñadas basándose en regiones variables de la molécula rRNA 16S para detectar ciertas especies y grupos de bacterias. Esos métodos también pueden ser aplicados en mucosa intestinal y material de biopsia para caracterizar las diferencias entre la microbiota de la mucosa y la fecal así como para esclarecer aspectos de la interacción microbio-huésped (Ouwehand AC, Salminen S, Tolkkio S, Roberts P, Ovaska J, Salminen E Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9:184-6, Ouwehand AC, Salminen S, Roberts PJ, Ovaska J, Salminen E Disease-dependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal mucosa. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10:643-6)

3°. Análisis genómicos de especies concretas: los datos obtenidos de los estudios genómicos de algunas bacterias (*Bifidobacterium longum* y *Bacteroides thetaiotaomicron*) han provisto información importante de cómo una bacteria específica se adapta al desarrollo intestinal mediante genes específicos los cuales las habilitan para utilizar las mucinas intestinales y los oligosacáridos de la leche materna como nutrientes (Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. Science. 2003;299:2074-6, Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:14422-7).

La investigación genómica también evalúa el efecto de los mecanismos adhesivos de cepas específicas en diferentes sitios de la mucosa intestinal (Klaenhammer T, Altermann E, Arigoni F, Bolotin A, Breidt F, Broadbent J, et al Discovering lactic acid bacteria by genomics. Antonie Van Leeuwenhoek. 2002;82:29-58, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. Annu Rev Nutr. 2002;22:283-307) por lo que, al incorporar esta información con la expresión genética del huésped se podrá incrementar

el conocimiento sobre el papel de la transferencia, sucesión microbianas y las interacciones microbio-microbio y huésped-microbio

Identificación de la microbiota intestinal mediante técnicas de cultivo

Tradicionalmente la microbiota intestinal ha sido analizada a través de técnicas de cultivo microbiológico y la mayor parte del conocimiento actual proviene de estudios que resultan muy laboriosos, inexactos y que consumen una gran cantidad de tiempo, debido a que una gran cantidad de los microorganismos que habitan el intestino humano no pueden ser cultivadas con los medios especiales existentes. Las razones por las que no pueden ser cultivadas incluyen el desconocimiento de los requerimientos de crecimiento de la bacteria, la selectividad de los medios que son utilizados, el estrés impuesto por los procedimientos de cultivo, la necesidad de condiciones de anoxia estricta y las dificultades con la estimulación de las bacterias con otros microorganismos y las células del huésped (Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota. A review. *J Nutr* 2004;134:465-72).

Para obtener un estimado de la cultivabilidad de un ecosistema microbiano, generalmente se comparan los recuentos microscópicos con el recuento total de organismos viables en un medio no selectivo a base de agar, el cual estima el número de UFC por gramo de la muestra estudiada. Sin embargo, los recuentos de microorganismos viables son menores que los recuentos microscópicos totales debido al número de microorganismos muertos. Estas células muertas en las heces, pueden constituir más de un tercio de la comunidad bacteriana total (Apajalahti JH, Kettunen A, Nurminen PH, Jättilä H, Holben WE. Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:5731-5).

Por estas razones, se estima que entre el 60 y el 80% de las bacterias que constituyen la microbiota intestinal no han podido aún ser caracterizadas (Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly

anaerobic cultura-base methods. *Micrbiol Immunol* 2002;46:535-48). A pesar de estos problemas con los métodos convencionales de cultivo, se estima que existen entre 400 y 500 géneros y especies bacterianas en el colon, donde los anaerobios predominan sobre los aerobios en una razón de 100: 1.000 (Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9, Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb Ecol Health Dis* 2000 (Supl. 2): 53-63, Klaenhammer TR. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J Nutr* 2000; 130 (Supl.) 415-6)

Identificación de la microbiota intestinal mediante técnicas de microgenómica

El intestino grueso es considerado el lugar primario de la colonización bacteriana y tiene la más alta densidad y diversidad de microbios en el cuerpo humano. El estudio de su composición se realiza tradicionalmente en las heces ya que parece ser que la microbiota que ahí se encuentra es muy semejante a la encontrada en los tejidos intestinales (Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb Ecol Health Dis* 2000 (Supl. 2): 53-6). No obstante, se ha postulado que los microbios en las heces representan principalmente la microbiota que habita en la luz del sigmoides. Mientras que, la composición de la microbiota intestinal difiere tanto en el trayecto como entre el lumen y la mucosa (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:378-88). Se han comunicado recuentos totales de 10^{10} a 10^{12} UFC/ g de heces y que una gran proporción de la masa fecal (60% de los sólidos) está constituida por bacterias.

A pesar de los múltiples estudios realizados, la verdadera extensión de la microbiota del colon no es conocida debido a que muchos microorganismos no pueden ser cultivados (Hooper LV, Midvedt T, Gordon JI. How host microbial interactions shape the nutrient environment of mammalian intestine. *Anu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307) . Sin embargo, con el

advenimiento de las técnicas de biología molecular se ha indicado que hasta el 50% de la microbiota residente en el intestino humano no ha sido aún caracterizada (Rigottier-Gois, L, Le Bourhis AG, Gramet G, Rochet V, Dore J. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. FEMS Microbiol. Ecol. 2003;43:237-45, Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrøm K, Rajilic M, Vaughan EE, de Vos WM et al. Colonic Microbiota Signatures across Five Northern European Countries. Appl. Environ. Microbiol. 2005;71:4153-5) y la utilización de las nuevas herramientas moleculares han resultado en una caracterización más detallada de la composición y la concentración de microbios en heces y en la mucosa intestinal y ha descubierto un gran número de géneros y especies no identificadas agregando en conjunto más del 50% de la diversidad de la microbiota intestinal (Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004;38:378-88, Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS et al. Metagenomic análisis of the human distal gut microbiome. Science 2006;312:1355-59). Se ha calculado que más de 500 especies coexisten en el colon humano, sin embargo, el análisis estadístico de la secuenciación de amplicones, clonados de heces humanas, sugieren que existen menos de 150 unidades taxonómicas operacionales (definidas como secuencias de 16S rDNA con una diferencia de menos de 2%) (Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannon BJ. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. Appl Environ Microbiol. 2001;67:4399-406, Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Dore J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Appl Environ Microbiol. 1999;65:4799-807).

Sin embargo, a pesar de estas técnicas, muchas de esas bacterias continúan sin ser identificadas ya que la mayoría de estos métodos involucran la separación de amplicones (cadenas de DNA amplificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de 16S rDNA) basados en diferencias en las secuencias del DNA de genes de interés funcional o filogenético (Blackwood CB, Marsh T, Kim SH, Paul EA. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2003;69:926-32), con lo cual es posible identificar microorganismos

específicos en un ambiente particular, asignar roles funcionales de esos microorganismos y valorar su significado o contribución al proceso ambiental (Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins R. Molecular ecological análisis of the gastrointestinal microbiota : a review. J Nutr 2004;134:465-72)

Estos métodos de biología molecular no revelan diversidad *per se* a menos de que la comunidad sea muy simple, dado que solo una fracción de las especies indicadas por las tasas de re-hibridación del DNA o el análisis de secuencias de una librería de clones puede ser visualizada en el gel y además porque se enfocan en las bacterias dominantes dejando de lado a otras especies importantes pero que están presentes en pequeñas cantidades (Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans AD, de Vos WM. Molecular diversity of Lactobacillus spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. Appl Environ Microbiol. 2002;68:114-23).

No obstante, estas técnicas son muy útiles ya que proveen una forma para determinar la abundancia relativa de especies comunes presentes en una muestra (Blackwood CB, Marsh T, Kim SH, Paul EA. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2003;69:926-32).

Elementos utilizados en los ensayos de microgenómica

La mayoría de las técnicas genéticas son directa o indirectamente dependientes de moléculas que las bacterias emplean en su vida diaria para subsistir y que los científicos han aprendido a explotar como herramientas para la manipulación y el estudio del DNA (Techniques of Molecular Genetics <http://www.emunix.emich.edu/~rwinning/genetics/tech.htm>).

Una molécula vital para las bacterias son las endonucleasas de restricción, también conocidas como enzimas de restricción, las cuales escinden ácidos nucleicos en el interior de la molécula y le sirven a la bacteria para protegerse de la invasión de los bacteriófagos debido a que cortan el DNA, cuando éste es inyectado, y evitan su

replicación. Estas enzimas reciben su nombre de acuerdo a la especie y cepa de las que son aisladas y cada enzima de restricción reconoce diferentes secuencias del DNA pero, estas secuencias como tienen la propiedad de ser palíndromos (secuencia de bases que se leen igual en ambos sentidos) y como las cadenas del DNA son antiparalelas (A en la Figura 4), independientemente de la cadena en que se encuentren, las bases son leídas en dirección 5' a 3'. Por ejemplo cuando una enzima de restricción reconoce la secuencia GAATTC, corta la unión fosfodiéster entre G y la A en ambas cadenas (flechas verdes) y esto causa la separación de los dos segmentos del DNA (Figura 4)

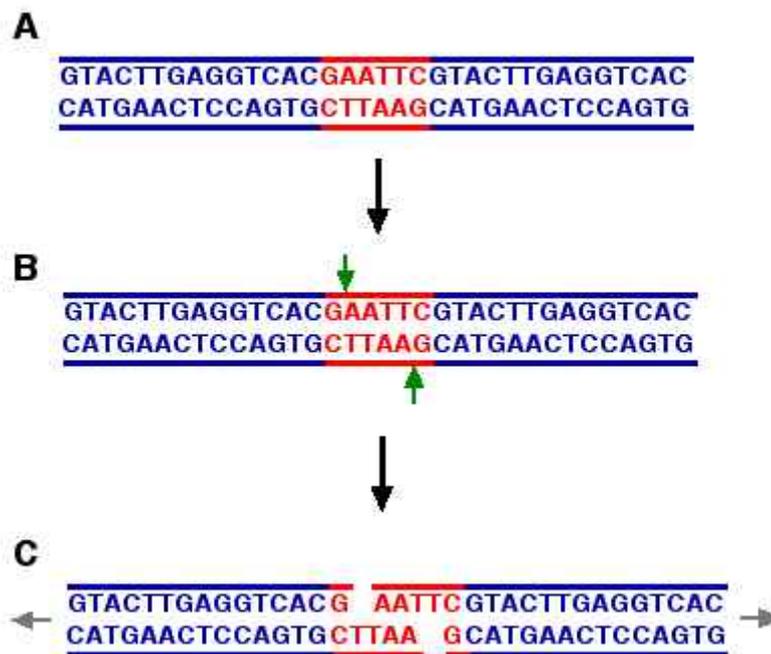


Figura 4. Esquema de obtención de fragmentos de DNA mediante corte con una enzima de restricción.

Por esta razón, las enzimas de restricción son utilizadas por los biólogos moleculares para cortar grandes moléculas de DNA en fragmentos más pequeños que pueden ser más fácilmente manipulados (Techniques of Molecular Genetics <http://www.emunix.emich.edu/~rwinning/genetics/tech.htm>). Sin embargo, este procedimiento no

permite obtener más que un gran *pool* de moléculas de DNA de las cuales se tienen que identificar las que realmente interesan, para ello se utilizan las librerías de DNA que consisten en la clonación una gran cantidad de moléculas de DNA digeridas mediante el uso de varias enzimas de restricción y que son insertadas en vectores (plasmidos, virus, etc.) para obtener moléculas de DNA recombinante. Existen dos tipos de librerías de DNA

Librerías de DNA genómico: Son obtenidas del DNA que se encuentra en el núcleo celular, el cual es fragmentado por medio de endonucleasas de restricción, ruptura mecánica o ambas

Librerías de cDNA: Son elaboradas con copias de DNA de moléculas de mRNA (cDNA), mediante la intervención de la transcriptasa inversa (Figura 5).

La diferencia entre las dos librerías es el tipo de DNA que contienen; las de cDNA representan DNA de genes que se transcriben y en las librerías de DNA genómico, el DNA no es de genes ya que estos solamente representan entre el 1 y el 5% del DNA genómico con lo que pueden contener secuencias que no están representadas en el cDNA. El tipo de librería escogido depende de la(s) secuencia(s) de DNA que se quiera(n) investigar.

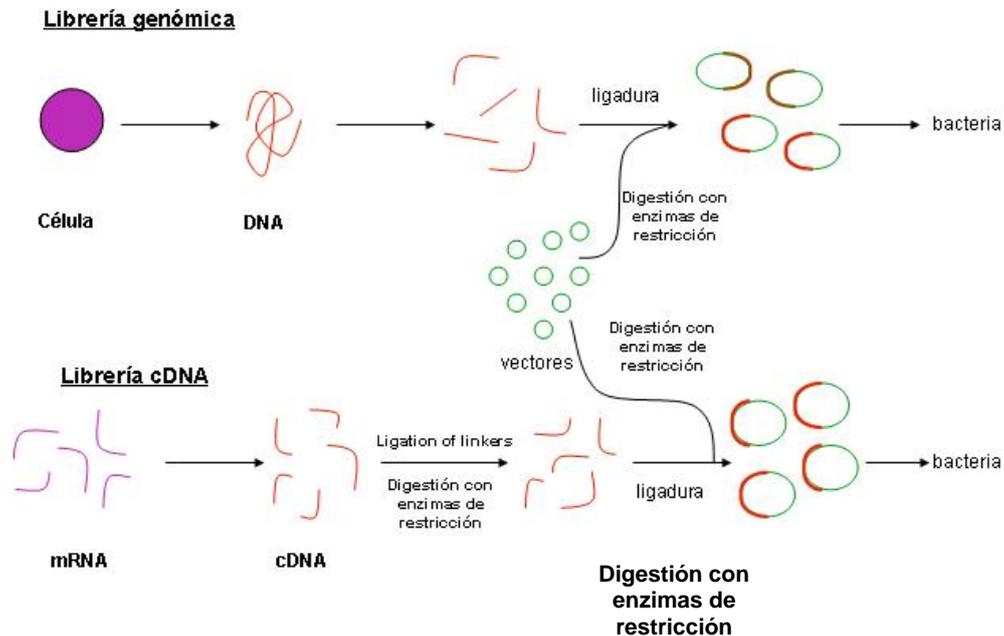


Figura 5. Construcción de una librería de DNA genómico y de cDNA

Técnicas de microgenómica

La primera técnica de microgenómica ampliamente utilizada para estudiar los sistemas microbianos fue la hibridación genómica total del DNA, la cual requiere del cultivo de la bacteria que se desea estudiar y la caracterización del genoma total del microorganismo. Con esto se logra identificar el grado de similitud entre dos agentes microbianos y se establece la base para el estudio filogenético molecular de las bacterias (Mai V, Morris G. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. J Nutr 2004;134:459-64).

En esta técnica de identificación bacteriana se utilizan genomas completos para determinar el grado de similitud entre dos microorganismos, con lo que, utilizando las secuencias de bases del DNA, se logra distinguir claramente genomas no relacionados entre sí basándose en las diferencias del porcentaje de contenido de los pares G+C.

(Rosselló-Mora, R., Amann R.. The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiol. Lett. 2001;25:39–67). Sin embargo, la hibridación del DNA, es una técnica cara, laboriosa y técnicamente compleja por lo que desde su aparición se vio restringida a unos cuantos centros de investigación y de Salud Pública alrededor del mundo (Janda JM, Abbott SL. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough?. J Clin Microbiol 2002;40:1887-91)

Actualmente, el análisis comparativo de los ácidos nucleicos ribosomales 16S y 23S (rRNAs) son una de las mejores herramientas para dilucidar la filogenia y la identidad de las bacterias (Ludwig, W., and K.-H. Schleifer. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol Rev. 1994;15:155-173), debido a las siguientes propiedades:

1. Estas moléculas son unidades funcionales constantes de los ribosomas
2. Los rRNAs están presentes en todas las bacterias
3. Son muy abundantes en número (10000 a 100000) en las células activas y por lo tanto blancos sensibles
4. En las estructuras primarias de los rRNAs, se alteran sitios de diferentes grados de conservación; existen secuencias únicas en diferentes grupos de bacterias que van desde el reino mayor a la especificidad de la especie.
5. Como los rRNAs son cadenas simples de ácidos ribonucleicos, se pueden construir secuencias complementarias de DNA. Estas secuencias pueden unirse solamente a las bacterias con las cuales tienen comparten secuencias perfectamente complementarias, con lo que se pueden identificar específicamente los microorganismos (Woese, C. R. Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 1987;51:221-71, Ludwig, W., and K.-H. Schleifer. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Rev. 1994;15:155-173).

Pruebas con sondas genéticas

Hibridación in situ fluorescente (FISH). Este método, está basado en la hibridación de oligonucleótidos sintéticamente preparados, y dirigidos contra secuencias blanco-específicas localizadas en el DNA bacteriano y la especificidad de la prueba depende en gran medida de la secuencia blanco (McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. Br J Nutr. 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37)

El proceso consiste, primero, en la separación de las hebras de DNA, mediante un procedimiento llamado desnaturalización y la posterior introducción de una sonda fluorescente de interés, que se hibridará con la muestra en el sitio diana (proceso llamado templado), donde se vuelve a formar la doble hélice. Por último la señal de la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia con lo que se puede clasificar la muestra de acuerdo a la presencia o no de fluorescencia. (Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota. A review. J Nutr 2004;134:465-72, <http://www2.uah.es/biomodel/citogene/dynacare/fishinfo.htm>).

El método Fish permite la enumeración directa de células bacterianas completas en muestras ambientales o en otras mezclas de población utilizando microscopía de fluorescencia o citometría de flujo (McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. Br J Nutr. 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37)

Las desventajas del FISH incluyen: la baja especificidad ya que el máximo poder de discriminación que se consigue es la especificidad a nivel de especie, además de que es dependiente de las secuencias de rDNA disponibles en las bases de datos, así como que pocas sondas pueden ser utilizadas en cada análisis y de que la prueba es dependiente de la permeabilidad de la célula bacteriana, la accesibilidad de la célula blanco y del número de ribosomas por célula (Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota. A review. J Nutr 2004;134:465-72, McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. Br J Nutr. 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37). Además, en el caso de análisis en heces, el nivel más bajo de detección con

esta prueba es de 10^6 células por gramo de materia fecal por lo que se puede utilizar para determinar la importancia relativa de grupos específicos o géneros de bacterias dominantes pero no la de aquellas poblaciones subdominantes (Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota. A review. J Nutr 2004;134:465-72, McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. Br J Nutr. 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37). Para facilitar la enumeración el FISH ha sido automatizado y combinado con el análisis de imagen computarizado (Jansen GJ, Wildeboer-Veloo AC, Tonk RH, Franks AH, Welling GW. Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. J Microbiol Methods. 1999;37:215-21)

Métodos de huellas genéticas

Aunque los principios y los procedimientos técnicos varían, todas estas técnicas tienen como base la PCR y la generación de perfiles de secuencias que representan la diversidad del ecosistema seleccionado.

Electroforesis en gel por desnaturalización en gradiente o temperatura (DGGE ó TGGE): La DGGE fue primero utilizada en el estudio de la diversidad bacteriana en los ecosistemas marinos (Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota. A review. J Nutr 2004;134:465-72).

Estas pruebas han sido utilizadas para diferenciar bacterias aisladas y han sido aplicadas para el rastreo de bacterias de interés y para elucidar la complejidad, dinámica y diversidad de poblaciones bacterianas incluida la microbiota intestinal. Con estas pruebas es posible la discriminación de subespecies.

El principio general de las pruebas DGGE y TGGE es la separación individual de los genes rRNA basado en diferencias de estabilidad química y de temperatura de fusión de estos genes. Para lo cual son utilizados geles de poliacrilamida que permiten un gradiente de desnaturalización lineal mediante formamida y urea en el caso de

DGGE y mediante un gradiente lineal de temperatura en el caso de la TGGE. Los estudios de DGGE y TGGE comparan el número y el patrón de bandas generados para conocer la diversidad microbiana de la muestra estudiada, sin embargo, la evaluación semicuantitativa también es posible tomando como base la intensidad de las bandas obtenidas (McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr.* 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37).

La principal limitación de estos estudios es que es necesario realizar primero el aislamiento de los microorganismos (McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr.* 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37). Sin embargo, los avances en huellas genéticas combinados con la amplificación de PCR han hecho innecesario el cultivo bacteriano. Otros problemas a los que se enfrentan es que secuencias heterogéneas pueden migrar en forma parecida con lo que la presencia de una banda en la misma posición no implica necesariamente una relación filogenética (Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:695-700), la detección de operones de rRNA heterólogos del mismo microorganismo y la pobre sensibilidad para detectar miembros con poca cantidad de individuos en la muestra, además se ha postulado que la heteroduplicación puede resultar en sobreestimación de la diversidad bacteriana (Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3854-9). Este problema sido atribuido a los productos obtenidos con la PCR, a un número incrementado de ciclos, a una concentración incrementada del molde de DNA y a la diversidad de las especies (Qiu X, Wu L, Huang H, McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM, Zhou J. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:880-7). Este problema puede ser disminuido mediante la purificación del gel de poliacrilamida antes

de la clonación o mediante la digestión con la endonucleasa I T7 (Qiu X, Wu L, Huang H, McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM, Zhou J. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:880-7).

Análisis mediante el patrón de la longitud de los fragmentos de restricción terminales (TRF), también conocida como *polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción terminales (TRFLP)*. Se obtiene mediante la amplificación del DNA de una comunidad bacteriana a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un cebador marcado con una molécula fluorescente y el corte de los amplicones con endonucleasas de restricción específicas y los fragmentos terminales marcados con fluorescencia son separados por electroforesis y visualizados por excitación de la molécula fluorescente. El elemento crucial de esta técnica es la selección de las enzimas de restricción ya que al utilizar enzimas de corte raras reduce el número de fragmentos de DNA pero requiere de la aplicación de técnicas más sofisticadas para separar los grandes fragmentos de DNA generados (McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr.* 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37). El análisis de los TFRLPs provee datos cuantitativos de cada fragmento de restricción detectado, incluyendo el tamaño de pares de bases y la intensidad de la fluorescencia (tamaño del pico) y los tamaños de los TFRLPs encontrados pueden ser comparados con bases de datos existentes (Blackwood CB, Marsh T, Kim SH, Paul EA Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Feb;69(2):926-32).

Los organismos de una comunidad son diferenciados en base a que la variación de sus secuencias resultan en TRFs de diferentes longitudes con lo cual se crea un patrón único de esa comunidad. (Kaplan CW, Kitts CL. Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J Microbiol Methods.* 2003;54:121-5). (Figura 6)

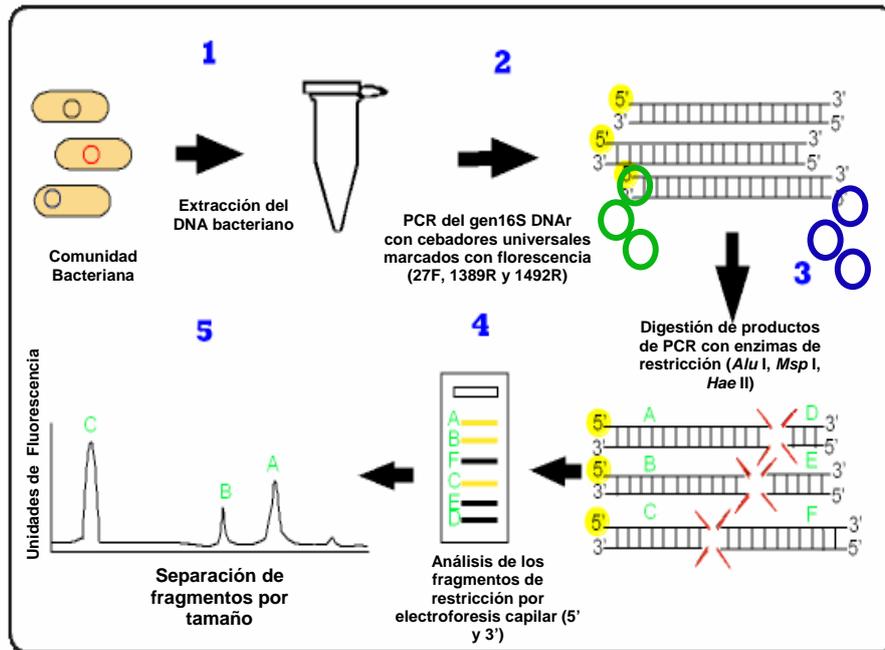


Figura 6. Identificación de microorganismos mediante la técnica de TRFLPs

El análisis obtenido con TRFLP puede ser comparado con clones o secuencias previamente caracterizadas (librerías) con lo que se puede saber a que tipo de bacterias corresponden. No obstante, la asociación de los resultados obtenidos mediante TRFLPs con clones o secuencias puede ser problemático debido a que varios organismos relacionados pueden producir los mismas longitudes de TFRs, lo que hace necesaria la utilización de varias enzimas de restricción para resolver este problema y poder identificar con mayor precisión a los integrantes de la comunidad en estudio. Aún con estos recursos aún se han encontrado diferencias entre las secuencias de TRF determinadas y las observadas que van desde un par de bases (1bp) hasta 7 pares de bases (7bp) en promedio (Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:4516-22; Osborn AM, Moore ER, Timmis KN. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol.* 2000;2:39-50,).

La principal limitación de este estudio basado en la PCR son los sesgos de esta última metodología (von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis.. FEMS Microbiol Rev. 1997;21:213-29), ya que en cada paso del análisis genético de las muestras existe una ruta de sesgo que potencialmente distorsiona el cuadro obtenido. Los grandes riesgos del estudio de mezclas de poblaciones incluyen la lisis insuficiente o preferencial, la inhibición de la PCR, la amplificación diferencial y la formación de productos quiméricos o artificiales (McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. Br J Nutr. 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37). No obstante, existe un número importante de estrategias para reducir o minimizar el sesgo como la incorporación de facilitadores de PCR en la reacción, la realización de múltiples reacciones con diferentes cebadores universales o el control de las condiciones de la PCR, así como el número de ciclos y el tiempo de elongación (alargamiento) (von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis.. FEMS Microbiol Rev. 1997;21:213-29)

Análisis metagenómico: con las técnicas basadas en el 16S DNA ribosomal ha sido posible el estudio de los genomas de comunidades enteras de microorganismos en el intestino distal del ser humano (Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS et al. Metagenomic análisis of the human distal gut microbiome. Science 2006;312:1355-59). Sin embargo, dado su alto costo solo ha sido posible realizarlo en un número limitado de sujetos.

Análisis genómicos de especies concretas.

Este es el último pasao, hasta ahora, en el cual una vez obtenidos los estudios genómicos de los microorganismos se busca la forma en la que se relacionan con el huésped, el ambiente y otros habitantes del nicho. Se ha encontrado que algunas

bacterias mediante genes específicos con los que cuenta pueden habilitarlos para utilizar algunos nutrientes en su crecimiento y desarrollo (Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. Science. 2003;299:2074-6, Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:14422-7) y como otros microorganismos pueden incluso influir sobre el metabolismo, la angiogénesis, la función mucosa de barrera y el desarrollo del sistema nervioso entérico del huésped (O'Hara AM, Sanan F. The gut flora as a forgotten organ. EMBO reports 2006;7:688-93).

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Se trata de un estudio observacional, prospectivo, abierto, comparativo y de casos y controles, pareado por edad y sexo, cuya finalidad fue la de evaluar los cambios en la microbiota intestinal que ocurren en el niño con alergia a las proteínas de la leche de vaca mediante técnicas de cultivo específicas y de biología molecular. El proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética de la Universidad de Granada y del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de la ciudad de Granada España.

El diseño se dividió en 3 partes:

Fase Clínica

Estudio de microbiología con métodos de cultivo clásicos.

Identificación de grupos bacterianos con técnicas de Biología Molecular

Para poder participar en el estudio los padres firmaron una carta de consentimiento informado. Este estudio forma parte de un proyecto internacional financiado por la UE QLRT 2002-02606, "Effects of diet and life style on risk gastrointestinal infections and allergy in early life; consumer knowledge attitudes and needs (INFABIO)

Fase clínica

Se estudiaron 92 lactantes (52 niñas y 40 niños), divididos en dos grupos de 46 cada uno (26 niñas y 20 niños). El Grupo 1 estuvo formado por niños con APLV mediada por IgE y el Grupo 2 por niños sanos.

Criterios de inclusión

Para el Grupo 1

- 1) Edad comprendida entre 1 mes y 1 año de edad
- 2) De uno u otro sexo
- 3) Signos y síntomas sugestivos de alergia a las proteínas de leche de vaca
- 4) APLV mediada por IgE, comprobada mediante niveles séricos $\geq 3,5$ kU/l de una o varias de las inmunoglobulinas específicas anti proteínas lácteas o prueba positiva de provocación doble ciego controlada por placebo.
- 5) Sin administración de antihistamínicos, esteroides o inmunomoduladores al menos 15 días antes del ingreso al estudio

Para el Grupo 2

Los mismos criterios que para los niños del Grupo 1 pero sin síntomas o diagnóstico de APLV. Estos niños fueron escogidos, de una cohorte de niños sanos en quienes se estudió la colonización microbiana intestinal durante el primer año de la vida. De este grupo se seleccionaron, a todos los niños con sexo y edad (± 15 días) iguales a las de cada uno de los casos y en caso de existir más de un niño candidato para un niño alérgico, se eligió aquel que presentó la edad más cercana a la del caso.

Criterios de eliminación

Para todos los niños:

- Muestras biológicas, cuestionarios o expedientes incompletos
- Deseo expreso de los padres de abandonar el estudio

Para los niños del Grupo 1

- APLV no mediada por IgE

Para los niños del Grupo 2

Desarrollo de signos y/o síntomas sugestivos de APLV durante el periodo de estudio

Diagnóstico de la APLV mediada por IgE

La selección de los candidatos a ingresar al Grupo 1 se llevó a cabo entre todos aquellos niños enviados al Departamento de Alergia Pediátrica del Hospital Clínico Universitario San Cecilio con la sospecha de padecer APLV. Para la realización del diagnóstico de certeza de que padecían alergia mediada por IgE, se le realizaron las siguientes pruebas.

Pruebas cutáneas

Material:

Regla milimetrada

Kit de antígenos de leche de vaca

Lancetas metálicas

Procedimiento

A todos los niños con sospecha de padecer APLV, y como parte del protocolo de estudio del Departamento de Alergología Pediátrica, se les realizó una prueba cutánea de lectura inmediata en la cara anterior del brazo (*skin prick test*) para lo cual se colocó una gota de cada uno de los alergenos específicos para proteínas de leche de vaca (α lactoalbúmina, β lactoglobulina y caseína), además de un control positivo (histamina al 1%) y uno negativo (agua estéril) sobre la superficie de la piel y su posterior introducción a la epidermis utilizando una lanceta metálica nueva para cada uno de los alergenos y controles (Bozzola CM. Pruebas cutáneas de lectura inmediata. Técnica, lectura e interpretación. Arch Aler Inmunol Clin 2002;33(Suppl 2): 51-7). La reacción se midió a los 15 minutos con una regla milimetrada de material no distensible y se

consideró como prueba positiva cuando el alérgeno estudiado produjo una reacción popular igual o mayor a 3 mm de diámetro y un eritema ≥ 10 mm en comparación con el control negativo (Sampson A. Update of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:805-19; Bozzola CM. Pruebas cutáneas de lectura inmediata. Técnica, lectura e interpretación. *Arch Aler Immunol Clin* 2002;33 (Suppl 2): 51-7).

Independientemente del resultado de la prueba cutánea, se procedió a la cuantificación de la concentración de IgE específicas para proteínas de leche de vaca, caseína, α lactoalbúmina y β lactoglobulina.

Medición de IgE específica en suero

Material

- Tubos de plástico separadores de suero (Vacutainer SST II Advance®, Becton, Dickinson, NJ, EEUU)
- Jeringas desechables de 5 y 10 ml
- Anti-IgE marcada con Beta-galactosidasa (anticuerpo monoclonal obtenido de conejo y ratón) (Becton-Dickinson, NJ, EEUU)
- Anticuerpo monoclonal IgG (inmunoglobulina G) anti-IgE humana obtenido de conejo y unido a la enzima galactosidasa. Becton-Dickinson, NJ, EEUU)
- Solución de revelado (4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido) (Becton-Dickinson, NJ, EEUU)
- Solución de parada (Becton, Dickinson, NJ, EEUU).
- Anti-IgE immunoCAP (antisuero obtenido en oveja). (Becton, Dickinson, NJ, EEUU)
- IgE humana obtenida de pacientes con mieloma IgE con concentraciones de 0,35; 0,7; 3,5; 17, 5; 50 y 100 kU/l. (Becton-Dickinson, NJ, EEUU)

- Kit ImmunoCAP® para proteínas de leche de vaca. (Becton-Dickinson, NJ,EEUU)
- Aparato para determinación de inmunoglobulinas específicas Immunocap 250® (Pharmacia, Suecia)

Procedimiento

A todos los niños con un ayuno mínimo de 4 horas, se les tomó una muestra de 3 ml de sangre de una vena del miembro superior, en tubos separadores de suero Vacutainer Advance II® y el suero fue enviado al Departamento de Inmunología y Alergia para la cuantificación de IgE específica a cada una de las proteínas de la leche de vaca mediante la técnica de fluoroenzimoimmunoensayo utilizando el aparato Immunocap (Becton-Dickinson, NJ, EEUU), realizando los siguientes pasos:

Paso 1: Se agregó en cada pocillo:

Suero del paciente.....	50 µl
Complejo enzima-antiIgE.....	50 µl
Solución de desarrollo.....	50 µl
Solución de parada.....	400 µl

Paso 2: Incubación : se realizaron 3 periodos de incubación

1ª incubación.....	30 ± 5 min.
2ª incubación.....	50 ± 10 min.
3ª incubación.....	10 ± 1 min.

Todas las incubaciones se realizaron a una temperatura que varió entre 18 y 32° C y los ensayos se realizaron por duplicado de acuerdo con las especificaciones del fabricante, siempre tomando en cuenta las siguientes características limitantes de la prueba:

Coefficiente de variación: < 10%.

Límite teórico de detección: 0,35 kU/l (kilounidades/litro)

Rango de referencia: < 0,7 kU/l.

Límite de detección práctico máximo: 100 kU/l.

De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, los resultados deben expresarse en kU/l y se debe considerar como positivos a todos los valores superiores a 0,35 kU/l de cualquiera de las proteínas medidas. No obstante, en este proyecto solo se aceptaron como positivos aquellos niños con valores iguales o superiores a 3,5 kU/l (clase 3 o mayor de la Tabla 2)

Tabla 2. Clasificación de los valores del IgE medidas por RAST

CLASE de RAST	Nivel de Ig E específica	Rango (kU/l)
Clase 0	Indetectable	(< 0,35)
Clase 1	Bajo	(0,35-0,70)
Clase 2	Moderado	(0,70-3,50)
Clase 3	Alto	(3,50-17,50)
Clase 4	Elevado	(17,50-50)
Clase 5	Muy elevado	(50-100)
Clase 6	Muy elevado	(>100)

En todos los casos en que los valores de las IgE específicas no permitieron realizar el diagnóstico de certeza de APLV mediada por IgE se les realizó una prueba de exposición a la leche de vaca doble ciego controlada por placebo

Prueba de exposición a la leche de vaca (Prueba de provocación doble ciego controlada por placebo)

Material

Cama en el Departamento de Lactantes del Hospital Clínico San Cecilio

Biberones de 120 y 240 mL

Fórmulas infantiles de inicio y de continuación a base de leche de vaca

Guantes de látex

Ampolletas de adrenalina, atropina, gluconato de calcio, bicarbonato de sodio

Equipo para administración de soluciones parenterales

Punzocats, endocats

Laringoscopio

Desfibrilador

Procedimiento

En aquellos niños en los que los valores séricos de IgE no fueron concluyentes para comprobar el diagnóstico de APLV se les realizó una prueba de provocación a los alimentos doble ciego controlado por placebo (DBCPC), que consistió en la administración por vía oral de cantidades crecientes de leche 20, 30, 40, 60, 90 y 120 ml, con intervalos de una hora entre cada una de ellas. La prueba se realizó en el Departamento de Lactantes del Hospital Clínico Universitario San Cecilio, donde se contó con personal médico y sanitario experimentado en el manejo de reacciones anafilácticas graves, además de los recursos suficientes para el tratamiento intensivo del paciente, como se recomienda para estas pruebas (Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity. *Allergy* 1990; 45:587-96; Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M, Bush RK, Metcalfe DD. Double-blind placebo controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82:986-97, Isolaure E, Sutas Y, Makinen-Kiljunen S, Oja SS, Isosomppi R,

Turjanmaa K. Efficacy and safety of hydrolyzed cow milk and amino acid-derived formulas in infants with cow milk allergy. *J Pediatr* 1995;127:550-7). Después de la toma de 120 ml se alimentó al niño a libre demanda (Järvinen K-M, Mäkinen-Kiljunen S, Suomalainen H. Cow's milk challenge via human milk evokes immune responses in suckling infants with cow's milk allergy. *J Pediatr* 1999; 135:506-12). La sintomatología puede desencadenarse con la ingestión de 5 mL de leche de vaca por la madre (Gerrard JW. Allergies in breast-fed babies to ingredients in breast milk. *Ann Allergy* 1979; 42:69-72).

En los primeros 20 minutos, posteriores a la primera cantidad de leche administrada, se buscaron en forma intencionada la aparición de signos específicos de alergia a las proteínas de la leche de vaca (*rash*, diarrea, edema angioneurótico, dificultad respiratoria, sibilancias o datos de choque) debido a que en este periodo de tiempo es en el que aparecen en la mayoría de los casos, los datos clínicos de alergia a la leche de vaca mediada por IgE (de Boissieu D, Matarazzo P, Rocchiccioli F, Dupont C. Multiple food allergy - a possible diagnosis in breastfed infants. *Acta Pediatr* 1997; 86:1042-6, Järvinen KM, Mäkinen-Kiljunen S, Suomalainen H. Cow's milk challenge via human milk evokes immune responses in suckling infants with cow's milk allergy. *J Pediatr* 1999; 135:506-12). No obstante, se vigiló a los niños en forma intensiva durante 6 horas dentro del hospital y después, fue vigilado por sus padres durante las 72 h posteriores, a quienes se les instruyó para que acudieran de inmediato al Hospital si aparecía cualquier signo o síntoma sospechoso de alergia después de cada toma. Este periodo tan largo de vigilancia se justificó ante la posibilidad de algún niño padeciera intolerancia no mediada por IgE en las que los síntomas suelen presentarse durante este periodo de tiempo (Järvinen KM, Mäkinen-Kiljunen S, Suomalainen H. Cow's milk challenge via human milk evokes immune responses in suckling infants with cow's milk allergy. *J Pediatr* 1999; 135:506-12).

Por razones éticas no fue posible realizar pruebas cutáneas ni toma de muestra sanguínea a los niños sanos.

Administración de cuestionarios

Una vez dentro del proyecto a todos se les aplicó un cuestionario, previamente validado, de estilos de vida (**Anexo 1**), donde se trataron de identificar los aspectos más relevantes sobre las intenciones de consumo de alimentos de la familia y solamente a los niños que integraron el Grupo 1 un cuestionario específico de alergia (**Anexo 2**).

Material

- Cuestionarios impresos de estilos de vida.
- Cuestionarios impresos de alergia
- Bolígrafos
- Consulta de pediatría
- Programa estadístico para análisis de datos

Procedimiento

En la oficina de consulta externa de Pediatría, a los padres de los niños de ambos grupos, se les realizaron entrevistas individuales utilizando cuestionarios estructurados, previamente validados en muestras de familias residentes en la ciudad de Granada.

Estudio de microbiología clásica

Para la caracterización de la microbiota fecal, al ingreso y seis meses, a todos los niños se les tomaron muestras de heces y se realizaron cultivos específicos con recuento de microorganismos aerobios, anaerobios, enterobacterias, lactobacilos, bifidobacterias, clostridios y levaduras.

Preparación de los medios de cultivo bacteriano

Materiales.

Medios de cultivo

Para aerobios totales: *Columbia Blood Agar*

Para enterobacterias: *MacConkey Agar*

Para anaerobios totales: *Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar*

Para lactobacilos: *Rogosa Agar*

Para bifidobacterias: Medio de Beerens

Para clostridios: *Reinforced Clostridia Agar*

Para levaduras: *Sabouraud Cloranphenicol Agar*.

Otros materiales

Placas de Petri

Matraces de Erlenmeyer de 1 litro

Mesas agitadoras con calefacción

Autoclave

Estufa

Procedimiento

Todos los medios de cultivo, salvo el medio de Beerens (Beerens, H, Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. Appl Environ Microbiol. 1991 57:2418-9), se prepararon siguiendo las especificaciones suministradas por las casas comerciales.

Preparación del medio de Beerens

Reactivos

Brain heart infusion Agar

D-(+)-Glucosa

Citrato de hierro III

L-Cisteína.

Ácido propiónico

Hidróxido de Sodio 2 Eq/l

Procedimiento

En un matraz de Erlenmeyer de 1 litro se mezclaron 47 g de *Brain Heart Infusión Agar*, 5 g de D-(+)-Glucosa, 0,5 g de citrato de hierro III, 0,5 g de L-cisteína y un litro de agua. Esta mezcla se puso a hervir, con agitación constante, sobre una placa agitadora con calefacción. Una vez alcanzada la ebullición, se dejó atemperar y antes del vertido del medio en las placas Petri, se añadieron 5 ml de ácido propiónico y 2,2 ml de hidróxido de sodio 2 Eq/l con la finalidad de acidificarla y ajustar el pH a 5.

Toma de muestras de heces fecales

Material

Jarras anaeróbicas (AnaeroJar®, Oxoid, Hampshire, Reino Unido)

Tubos de plástico estériles con rosca y cucharilla en la tapa

Pañales desechables

Sistemas generadores de atmósfera anaerobia (Anaerogen®, Oxoid Hampshire, Reino Unido)

Procedimiento

Se pidió a todos los padres que llevaran a sus hijos, a primera hora de la mañana, a la consulta externa de Pediatría del Hospital Clínico. Una vez en la oficina, se esperó a que evacuaran el intestino y al hacerlo, las heces se recogieron en el interior de un recipiente estéril que contiene una cucharilla de plástico adherida a su tapa. Una vez terminada la recolección, el tubo se introdujo en una jarra anaeróbica acompañada de un sobre generador de atmósfera anaeróbica, se procedió al cierre hermético de la jarra y a su transporte al laboratorio donde las muestras fueron procesadas en un tiempo no superior a dos horas.

Procesamiento y siembra de las muestras de heces

Una vez las muestras en el laboratorio, se procedió al reparto de las mismas siguiendo el criterio de prioridad acordado por todos los miembros del Proyecto INFABIO y que conllevaba como primer criterio de reparto la siembra de las muestras para la obtención de datos de microbiología clásica

Procesamiento de las muestras

Material

Pipetas de 20, 100, 200 y 1000 μ L

Puntas amarillas y azules para pipeta (Nirco, Barcelona España)

Hidrocloruro de L-cisteína (Scharlau Chemie, Barcelona, España)

Fosfato salino amortiguado (PBS, Sigma-Aldrich, Madrid, España)

Frascos de vidrio con tapón

Procedimiento

Una vez en el laboratorio, se pesó un gramo de heces, se adicionaron 9 ml de PBS al 1% + hidrocloruro de L-cisteína al 0,05% p/v, se homogenizaron y realizaron siete diluciones progresivas (-1 a -7), correspondiendo la primera al homogenizado original.

Siembra de las muestras

Material

Puntas para pipetas de amarillas y azules (Nirco, Barcelona, España)

Placas de Petri con los distintos medios de cultivo

Pipetas de 20, 100, 200 y 1000 μ L

Asas para siembra de cultivos

Sistemas generadores de atmósfera anaerobia (CO₂ gen® y Anaerogen®, Oxoid Hampshire, Reino Unido)

Procedimiento

Una vez realizadas las diluciones se procedió a sembrar por triplicado, cada una de ellas mediante el uso de asas de siembra calibradas, en las distintas placas de cultivo convenientemente rotuladas. Posteriormente todas las placas fueron introducidas para su incubación en una estufa con temperatura controlada de 37° C. Las placas correspondientes a los medios de cultivo de microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos fueron previamente introducidas en jarras de anaerobiosis a las que se les incorporaba un sobre de Anaerogen® en aquellas que contenían las placas de cultivo para bifidobacterias, clostridios y anaerobios totales y un sobre de CO₂ Gen® en aquellas que contenían las placas de cultivo para lactobacilos.

Para los clostridios antes de su siembra, debido a que únicamente se estudió al grupo de los esporulados, las diluciones fueron incubaron en un baño de agua a 80° C durante 10 minutos y una vez que las soluciones fueron atemperadas se procedió a su siembra con la misma técnica que para el resto de las bacterias.

Tiempo de incubación

El tiempo de incubación en la estufa a 37° C fue variable y dependió del tipo de microorganismo cultivado. Así:

- Los aerobios totales, enterobacterias, anaerobios totales y clostridios requirieron un tiempo de incubación que varió entre 16 y 24 h.
- Las bifidobacterias y los lactobacilos durante 72 h.
- Y el tiempo de incubación de las levaduras, debido a su velocidad lenta de crecimiento, fue de una semana.

Determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC)

Material

Lápiz contador de colonias (“Colony counter modelo 608702®”. Bio Co, Kobe Japón)

Procedimiento

Posterior a la incubación, se seleccionaron las diluciones que presentaron un crecimiento >10 unidades formadoras de colonias (UFC) y se procedió a realizar los recuentos de las UFC en cada uno de los medios, mediante el uso de un lápiz contador de colonias electrónico y, por último, se calculó el número total de UFC mediante la fórmula:

UFC= nº colonias * Factor de dilución * dilución (por ejemplo 10^6 si se realizó la determinación del número de colonias en la dilución -6)

Una vez realizados los cultivos, las muestras restantes de las heces se almacenaron a -80° C hasta la realización de los estudios de Biología Molecular

Identificación y cuantificación de grupos bacterianos mediante técnicas de biología molecular

TRFLP

Finalmente, se realizaron estudios con técnicas de biología molecular a cada una de las muestras de heces. Estas técnicas tienen como finalidad aislar, clonar y amplificar el DNA ribosomal del gen 16S, que como se sabe es común para todas las bacterias, pero su secuencia presenta zonas específicas para cada grupo de ellas. Una de las técnicas de biología molecular aplicada más utilizada es el Análisis de la Longitud de Polimorfismos totales en los Fragmentos de Restricción o por sus siglas T-RFLP. Los pasos de la técnica para la realización del aislamiento del 16S genómico fueron los siguientes y se resumen en la Figura 6

Aislamiento del DNA bacteriano de las muestras fecales.

Material

Hielo

Bolitas de zirconio/sílice de 0.1 mm (Biospec products, Oklahoma, EEUU)

Tris HCL (pH 8) 10 mol/l, NaCl 150 mmol/l (TN150)

Fenol equilibrado con pH de 8.0 (USB Corporation, Cleveland, EEUU)

Cloroformo (Sigma-Aldrich, Saint Louis MO, EEUU)

Alcohol isoamílico ultrapuro (Scharlau Chemie, Barcelona, España)

Cloroformo/alcohol isomílico (24:1) (Panreac Química, Barcelona, España)

Etanol absoluto (Panreac Química, Barcelona, España)

Acetato de sodio 3 mol/l (NaAc 3M)

Agua desionizada estéril

Tubos Eppendorff® de 1,5 mL (Eppendorf Ibérica, Madrid, España)

Tubos Eppendorff® de rosca de 2 mL (Eppendorf Ibérica, Madrid, España)

Geles de agarosa 0.8%. (Agararosa, Gibco-Invitrogen Co. California EEUU)

Puntas para pipetas blancas, amarillas y azules (Nirco, Barcelona, España)

Equipo inductor de ruptura de células bacterianas (Mini-BeadBeater-8®,

Biospec, Bartlesville, Oklahoma, EEUU)

Equipo de agitación intensa (Vortex Press-to-mix 34524® Snijders, Tilburg, Holanda)

Centrífuga Eppendorf 5415 D (Eppendorf Ibérica, Madrid, España)

Termobloque (Thermomixer 5436®, Eppendorf Ibérica, Madrid, España).

Procedimiento

Los distintos pasos para la obtención del DNA de los microorganismos presentes en las heces se indican a continuación:

- Primero se descongela la muestra de heces en agua helada (de hielo)
- Si la muestra es líquida, centrifugar a 10,000 g durante 5 min.
- Resuspender una punta de espátula de la muestra fecal en 1ml de TN150
- Vaciar la suspensión en un tubo que contenga 0.3 g de 0.1mm bolitas zirconio/sílice
- Agregar 150 µl de fenol tamponado (equilibrado)
- Introducir el tubo en el equipo inductor de la ruptura celular durante 180 segundos a 5000 g
- Extraer las muestras del aparato e introducirlas inmediatamente en hielo
- Adicionar 150 µl de cloroformo/alcohol isoamílico. Agitar en el vortex unos segundos
- Centrifugar los tubos por 5 min a 10,000 g
- Transferir la fase acuosa a un Eppendorf nuevo
- Adicionar 500 µl fenol, agitar y centrifugar a 10,000 g por un min.
- Transferir la fase acuosa y agregar 300 µl de cloroformo/alcohol isoamílico
- Una vez limpio adicionar 300 µl de cloroformo, centrifugar y extraer fase acuosa. Repetir los 3 últimos pasos las veces necesarias hasta que se considere la muestra limpia. Después,
- Agregar 150 µl de fenol tamponado y agitar suavemente
- Centrifugar por 1 min a máxima velocidad
- Repetir los dos pasos previos hasta que se obtenga una interface clara
- Adicionar 300 µl cloroformo/alcohol isoamílico a la fase acuosa.

- Agitar el vortex durante unos segundos
- Centrifugar durante 1 min, a 10,000 g
- En un Eppendorf nuevo. Agregar 150 µl fenol y 150 µl de cloroformo, agitar suavemente
- Centrifugar 2 min a máxima velocidad
- Tomar la fase acuosa y agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 mol/l y 2 volúmenes de etanol al 96%.
- Precipitar al menos 30 min. o durante toda la noche a -20° C.
- Centrifugar a 4° C por 20 min. a máxima velocidad.
- Desechar el sobrenadante
- Agregar 500 µl de etanol frío al 70% y agitar suavemente
- Centrifugar a máxima velocidad durante 5 min.
- Descartar el sobrenadante y secar el precipitado a 50-55° C por 5 min.
- Resuspender el precipitado en 25 µl de agua estéril.

Verificación del estado del ADN obtenido

El siguiente paso es verificar si se ha obtenido ADN y su estado. Para lo cual se realiza una electroforesis en gel de agarosa de una alícuota del ADN extraído.

Material

Pipetas

Soportes de metacrilato

Guantes de Nitrilo

Agarosa (Gibco-Invitrogen Co. California EEUU)

TAE 1X (2500 mL de agua destilada + 50ml de TAE 50X)

Tampón de carga

Agua bidestilada estéril

Bromuro de etidio (2 μ l/ml)

Cinta testigo para esterilizar (Masking tape)

Horno de microondas

Aparato horizontal para electroforesis en gel (Horizon58® Gibco Co, California EEUU)

Fuente de energía para electroforesis en gel (Fotoforce 250® Redoc, Málaga, España)

Transiluminador ultravioleta (New Brunswick Scientific, EEUU)

Ordenador personal

Cámara fotográfica (Kodak DC120®, Kodak, Madrid, España)

Software para análisis de electroforesis (*Electroforesis documentation and analysis system* 120® y Kodak Digital Science 1D 2.0.1®. Kodak, Madrid, España)

Procedimiento

Se prepara primero un gel de agarosa para ello se pesan 0,8 g. de agarosa y se mezclan con TAE 1X. A continuación se funde la agarosa en un horno de microondas. Se deja atemperar y se vierte en un soporte de metacrilato previamente preparado con cinta adhesiva para poder contener la agarosa en estado líquido, una vez vertida la agarosa, se introduce un “peine” de plástico con 8 “dientes” en uno de los extremos y una vez solidificada la agarosa se retira el peine quedando 8 pocillos en la superficie del gel. Se retiran las cintas adhesivas del soporte de metacrilato y se introduce en la cubeta de electroforesis previamente llena con TAE 1X. Se toma 1 μ l de la muestra de ADN obtenido, se mezcla con el buffer de carga y se deposita en uno de los pocillos del gel de agarosa, se repite el procedimiento siete veces más. Después de lo cual, se conecta la

cubeta a la fuente de electroforesis y se realiza la misma en las condiciones deseadas. En nuestro caso, la electroforesis se realizó con 60 voltios.

Una vez terminada la electroforesis se introduce el gel de agarosa en un recipiente con bromuro de etidio para la tinción del ADN y su posterior visualización en un transiluminador de luz ultravioleta. A continuación se realiza la fotografía del gel utilizando una cámara especial conectada a un programa informático.

Finalmente se determina la cantidad de ADN obtenido mediante cuantificación a 260 nanómetros en un espectrofotómetro y se almacena a -20° C hasta su utilización posterior.

Amplificación del ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La utilización de esta técnica permite obtener, en un tubo de PCR, los distintos fragmentos del 16 S bacteriano procedentes de una muestra.

Material

DNA bacteriano aislado de las heces

Agua desionizada

Tampón sin magnesio

Cloruro de magnesio 50 mmol/l

Desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) con una concentración 10 mmol/l de cada uno de ellos (Bioron, Ludwigshafen, Alemania)

Cebadores marcados con fluorescencia (27R, 1492F, 1389F) (Applied Biosystems, California, EEUU)

Agarosa (Gibco-Invitrogen Co, California, EEUU)

Pipetas 10 y 100 μ l

Puntas para pipeta blancas y amarillas (Nirco, Barcelona, España)

Tubos para PCR de 200 μ l (Nirco, Barcelona, España)

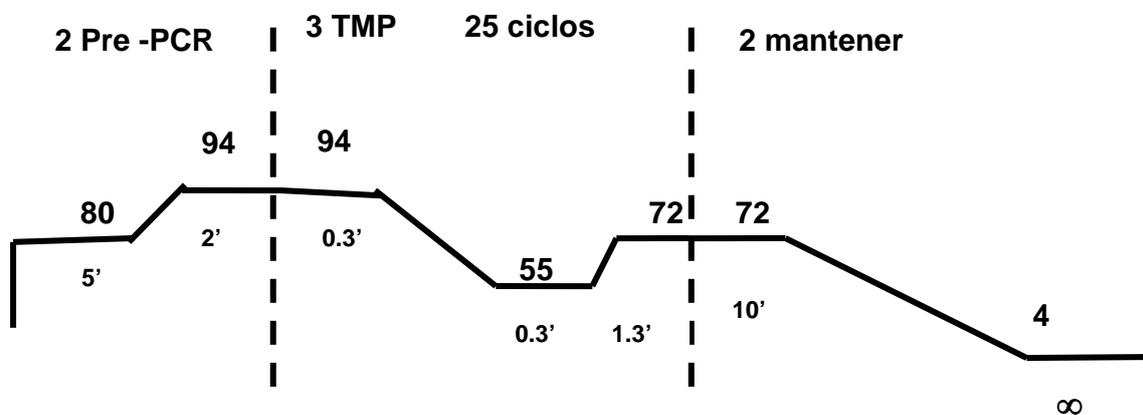
Centrífuga Eppendorf 5415 D (Eppendorf Ibérica, Madrid, España)

Termociclador (GeneAmp®PCR System 9600, Applied Biosystems, California, EEUU)

Procedimiento

Se toma 1 μ l de ADN previamente diluido a una concentración final de entre 20 y 40 ng/mL se deposita en el fondo de un tubo de PCR de 200 μ l. A continuación se añaden 5 μ l de buffer 10X, 1,5 μ l de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 1 μ l de dNTP (10 mM de cada uno de ellos), 1 μ l de cada uno de los cebadores correspondientes (sentido, antisentido), 1 μ l de la DNA polimerasa correspondiente y se completa con agua hasta un volumen final de 50 μ l.

La PCR se realizó, ejecutando el siguiente programa:



Una vez realizada la PCR, se procedió a verificar si ha tenido lugar de forma correcta mediante la visualización de una alícuota en un gel de agarosa, que en este caso es al 1,3%. En caso afirmativo se procede con el siguiente paso. En caso negativo, se revisan las condiciones de la PCR y se reajustan éstas antes de que sea realizada nuevamente.

Enzima de restricción (ALU, MSP, HHA)	0.75 μ L
Agua	hasta 20 μ L

En el caso de Hha I, debe de añadirse a la mezcla 1 μ l de BSA 10 X.

Una vez elaborada la mezcla se da un pulso en la microcentrífuga y se colocan las digestiones en una estufa con temperatura constante de 37° C durante toda la noche.. Al día siguiente, se procede a la inactivación de la enzima de restricción siguiendo las indicaciones del fabricante. Las tres enzimas utilizadas se inactivan por calor bajo las siguientes condiciones:

Alu I y Msp I	20 minutos a 65° C
Hha I	20 minutos a 60° C

Diálisis del DNA digerido.

El siguiente paso es la diálisis de los productos de la PCR. De esta forma se pretende eliminar la mayor cantidad posible de sales presentes en la muestra de forma que no interfieran posteriormente con la electroforesis capilar.

Material

Placas de Petri

Agua destilada

Filtros para diálisis de nitrocelulosa de 13 mm con poros de 0.025 μ m, (Millipore®, Massachusetts, EEUU)

Pipetas 20 y 100 μ l

Puntas para pipeta

Tubos Eppendorf de 1,5 ml

Procedimiento

Se pone un volumen de 20 ml de agua estéril en cada placa Petri y se coloca sobre el agua un filtro de nitrocelulosa con la cara más brillante hacia arriba y la opaca

en contacto con el agua. A continuación se deposita cada muestra sobre el filtro correspondiente. Se deja que el proceso de diálisis tenga lugar durante al menos 20 min y por último se recupera con mucho cuidado cada muestra y se coloca en un nuevo tubo Eppendorf.

Electroforesis capilar

Los productos de la digestión con las distintas enzimas de restricción fueron separados por electroforesis capilar en un analizador genético “Abi Prism 3100®” de Applied Biosystems. De esta forma se pudo determinar el tamaño de los fragmentos generados y el porcentaje de los mismos en el total de la muestra.

Material

Agua estéril desionizada

Formamida desionizada (HiDi® Applied Biosystems, California, EEUU)

Marcador de peso molecular (Rox 500® Applied Biosystems, California, EEUU)

Tampón con EDTA (pH , Applied Biosystems, California, EEUU)

Performance Optimizar Polymer 4 (POP-4®, Applied Biosystems, California, EEUU)

Capilar de sílice de 47 cm. de longitud 50 µm de diámetro, marcado en verde (Abi PrismGenetic Analyzer Capillary® Applied Biosystems, California, EEUU)

Jeringas de 1mL

Dos viales de 4 ml

Gradilla de 96 pocillos de 0,2 ml (Applied Biosystems, California, EEUU)

Alfombrilla de goma con tapones para la gradilla de 96 pocillos (Applied Biosystems, California, EEUU)

Centrífuga Eppendorf 5415 D (Eppendorf Ibérica, Madrid, España)

Termociclador (GeneAmp®PCR System 9600, Applied Biosystems, California, EEUU)

Secuenciador genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, California, EEUU)

Ordenador Personal

Programas informáticos para windows Data Collection® V 1.0 y Genscan® V 3,7 (Applied Biosystems, California, EEUU)

Preparación de las muestras

Se toma la gradilla de 96 pocillos y se mezclan en cada uno de ellos los siguientes reactivos: 1 µl de la muestra por estudiar, 18,5 µl de formamida desionizada y 0,5 µl de marcador de peso molecular ROX 500 marcado con el fluoróforo TAMRA. Dicho marcador de peso molecular contiene los siguientes fragmentos: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 y 500 pares de bases (pb). Cubrir la gradilla con la alfombrilla que contiene los tapones encajando cada uno en su pocillo correspondiente y con la ayuda de un termociclador desnaturalizamos las muestras calentando a 95° C durante 5 min. Por último enfriamos rápidamente las muestras para evitar su renaturalización.

Preparación del equipo

Antes de ubicar la gradilla con las muestras en el lugar adecuado del ABI PRISM 3100 para su posterior inyección en el capilar y su análisis es necesario realizar los siguientes pasos:

- Establecer comunicación entre el ordenador y el analizador
- Apertura del software de recogida de datos ABI PRISM 3100. Este programa recoge los datos crudos del análisis de los fragmentos de cada carrera; que son las

fluorescencias detectadas por la cámara CCD de los fragmentos marcados, separados por electroforesis capilar según su tamaño y excitados por el láser al pasar por la ventana de detección.

- Colocación de un bloque de metacrilato limpio y seco
- Colocación de los capilares. Primero limpiar las ventanas de los capilares con un papel embebido en etanol absoluto. Posteriormente introducimos los capilares en la válvula que conecta estos con el metacrilato hasta llegar a la primera intersección, sin rebasarla, y apretamos bien la válvula. A continuación situar la zona de lectura de los capilares en la ventana del láser, introduciendo el extremo en la parte que contiene el cátodo deslizándolo hasta que queden a la misma altura. Por último sujetamos los capilares con una cinta adhesiva a la placa térmica.
- Establecimiento de la posición de la jeringa y el autosampler.
- Calibración del autosampler
- Llenar los viales de ánodo y cátodo con buffer IX hasta la marca
- Llenado de los capilares y del bloque de metacrilato con el polímero POP-4, el cual debe estar almacenado entre 4 y 8° C antes de su uso. Antes de inyectarlo se debe atemperar y al llenar los conductos se debe asegurar que no queden burbujas.

Programación de las muestras

Hoja de muestras (“*sample sheet*”)

Una vez abierto el programa ABI PRISM 3100, se procede a la apertura de una nueva hoja de muestras donde se introducen los datos de cada una de ellas y su posición en la gradilla. Se indica al equipo que va a trabajar con cuatro colores (rojo, azul, verde y amarillo). Por último, se guarda la carpeta y se procede a la elaboración de la lista de inyección.

Lista de inyección

En esta lista se incorpora la hoja de muestras creada siendo posible modificar el orden de inyección y en caso necesario permite repetir alguna de las muestras cambiando uno o más de los parámetros. La primera columna de la lista indica los datos de las muestras. La segunda columna especifica el módulo de análisis, que contiene las funciones específicas ejecutadas en el proceso de análisis. En nuestro caso el módulo seleccionado fue el GS STR POP4 (1ml) que establece las siguientes condiciones para la electroforesis:

- Voltaje y tiempo de inyección. Ambos parámetros pueden modificarse con la finalidad de regular la cantidad de DNA que entra al capilar. Por ello, si se obtiene una señal débil es posible incrementar el tiempo de inyección, lo que permite una mayor entrada del producto al capilar con el consecuente incremento de la señal de fluorescencia. No obstante, un tiempo de inyección excesivamente largo puede originar la pérdida de resolución. En nuestro caso el tiempo de inyección utilizado fue de 30 segundos.

- Voltaje de electroforesis: el voltaje estándar es de 319V/cm para fragmentos analizados con el polímero POP-4. Para un capilar de 47 cm supone un voltaje total de 15 KV y una corriente de voltaje de 7-9 μ A. Bajo estas condiciones electroforéticas el tiempo para que cada fragmento de 400pb llegue a la ventana de detección es de aproximadamente 25 minutos.

- Temperatura de electroforesis: Debe ser de 60° C

- Tiempo de electroforesis: Debe ser un 10% mayor a la media del tiempo necesario para que migre el fragmento de mayor tamaño. En nuestro caso se estimó en 30 minutos.

Antes de comenzar la inyección se deben realizar dos procedimientos en el analizador:

1. Llenado del capilar (“*Seq fill capillary*”) y
2. Prueba de los cuatro colores (“*Test CCD 4 color*”), cuya función es comprobar que la ventana del capilar está limpia y colocada correctamente. Esta prueba dura cinco minutos y en ella se comprueba que la línea basal se encuentre entre 800 y 2500 en la escala vertical (intensidad de fluorescencia).

Una vez completada la lista de inyección y habiendo alcanzado la temperatura de electroforesis se inicia el análisis pulsando la tecla “*RUN*”

Análisis de los resultados obtenidos con la electroforesis.

Mediante el programa informático Genscan® se procede al análisis de los resultados obtenidos a partir de la electroforesis capilar que se encuentran guardados en la carpeta de inyección. El análisis de estos datos permite:

Por un lado, observar como ha transcurrido la electroforesis y de esta forma considerar si los datos suministrados son válidos o no, y por otro lado, obtener:

- Un electroferograma que muestra los picos correspondientes a los distintos fragmentos de la muestras ajustados al marcador de peso molecular (ROX 500).
- Una tabla de datos que incluye desde el tiempo de inyección, tamaño (bp) de los distintos fragmentos analizados hasta el área correspondiente a cada fragmento dentro del área total correspondiente a todos los fragmentos.

Identificación de los grupos bacterianos

Material

Ordenador personal

Tablas de fragmentos obtenidas con el Genscan®

Programa informático para computadora personal Microsoft Excel 2002
(Microsoft USA)

Programa informático para Windows T-Align® V-

Programa informático para Windows Past® (*PA*alentological *ST*atistics) V 1.29

Ordenador personal

Procedimiento

Una vez obtenidos los resultados de la electroforesis capilar, se elaboró una base de datos en MS Excel® conteniendo todos los tamaños de los fragmentos encontrados tanto en los casos como en los controles para cada una de las enzimas, tanto de la primera medición como de sus réplicas.

Con las bases de datos realizadas se revisó que en todas las cifras introducidas, los decimales estuvieran separados de las unidades por medio de una coma y de que todos los resultados se encontraran alineados a la derecha. Después de esta verificación, se procedió a la normalización de los resultados, procedimiento que consiste en dividir el valor del área de cada uno de los fragmentos entre la media de la suma de las áreas de todos los fragmentos.

Estos datos se introducen en el programa T-Align, el cual ordena por tamaño los fragmentos que se encuentran en cada muestra y en su réplica considerando como iguales aquellos fragmentos que difieren en $\pm 0,5$ pares de bases (pb), con esta tabla se eliminaron todos aquellos picos (fragmentos) que se encontraron fuera de ± 2 DE. Esta tabla se introdujo en el programa PAST el cual genera una matriz de incidencia (*occurrence matrix*) en donde los renglones representan las muestras y las columnas los taxos (fragmentos). La ocurrencia de los taxones en las diferentes muestras se representan en dos formas, como presencia-ausencia, convencionalmente codificados como 1-0 o en términos de abundancia. El uso de estas representaciones depende del

tipo de muestra y de los objetivos del estudio pero siempre es preferible, si ello es posible, intentar el análisis de los datos en la forma de abundancia ya que a partir de ésta forma puede ser fácilmente obtenible la matriz de presencia o ausencia pero lo inverso es imposible (Hammer O. Paleontological community and diversity análisis- brief notes. Paläontologisches Institut and Museum. Zurich. 2002)

El siguiente paso en la comparación de las muestras es la realización del análisis de similitud el cual puede llevarse a cabo utilizando las tablas de presencia-ausencia, con la medición de la distancia entre los picos o prueba de similitud de Jaccard, la cual cuenta todos los pares de taxones que se encuentran presentes en ambas muestras y representa como M al número de picos encontrados en ambas muestras (*matches*) y N para el número total de taxones que están presentes en una sola muestra. La fórmula para calcular el índice de similitud de Jaccard es $M/(M+N)$.

Para el análisis de similitud de la abundancia se pueden utilizar varios métodos, entre los más utilizados se encuentran la medición de la distancia euclidiana (distancia real) entre los picos y los índices de la distancia de Chord, que es muy sensible para medir las proporciones de especies pero no para la abundancia absoluta y el de similitud de Morisita, basado en la distancia mínima entre varianzas.

Estos análisis dan como resultado una medición apropiada de distancias entre los taxones por lo que el siguiente paso es el análisis del agrupamiento de los mismos (*clusters*), el cual produce un dendograma donde las muestras similares son agrupadas juntas.

Existen dos tipos de dendogramas, el resultante del análisis en modo Q que se centra en las muestras y el que resulta del análisis en modo R que se centra en los fragmentos o taxones. Estos dendogramas pueden ser analizados mediante tres tipos de algoritmos, el de unión por medias (*mean linkage*), también conocida como UPGMA

(*Unweighted Pair-Group Moving Average*) en donde los agrupamientos (*clusters*) se congregan en base al promedio de la distancia entre todos los miembros de los dos grupos; el de unión simple (*single linkage* o del vecino más próximo) en donde el agrupamiento de los taxones o de las muestras se basa en la distancia más pequeña entre cada dos grupos y el método de Wald donde los agrupamientos se hacen minimizando la variación dentro de cada dos grupos.

Por último, se llevó a cabo la identificación de aquellos fragmentos que se encontraron en al menos el 30% de las muestras, para ello se utilizó la base de datos de y cols considerando como identificado a todo aquel fragmento cuya longitud era igual a ± 2 pares de bases de la reportada en la base de datos..

Hibridación fluorescente in situ y citometría de flujo (FISH-FC)

En este método el 16sRNA bacteriano es localizado in situ mediante el uso de una sonda que unida a un marcador fluorescente de longitud de onda particular, como el TAMRA que es fluorescente a una longitud de onda de 575 nm. Esta sonda puede ser general como la sonda bacteriana universal EUB 338 o específica para familia, género o incluso especie dependiendo de los objetivos del estudio. Después de ser marcadas las bacterias se visualizan con un microscopio fluorescente u otro aparato más sofisticado como un citómetro de flujo, llegando incluso ser posible la obtención de imágenes en tercera dimensión que pueden ser examinadas con microscopía electrónica. En nuestro caso, la preparación de las muestras se realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y el análisis por el Dr Joel Doré y col. en la *Unité d'écologie et de Physiologie du Systeme Digestif, Intitut National de la Reserche Agronomique (INRA), Jouy-en-Josas cedex, France.*

Manejo de las muestras fecales y la fijación celular

Después de mantener en un medio anaerobio durante un mínimo de 4 horas (Rochet V, Rigottier-Gois L, Beguet F, Dore J. Composition of human intestinal flora analysed by fluorescent in situ hybridization using group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Genetics Select Evol* 2001;33(Suppl):339-52) las muestras de heces se homogenizaron en forma mecánica durante 3 min y se pesaron alícuotas de 1 g (peso seco) a las cuales se les agregaron 9 ml de PBS. La suspensión fue mezclada en un vaso de 50 ml con una barra magnética en su interior hasta su homogeneización completa y alícuotas de 0,2 ml de la suspensión fueron agregadas a 0,6 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Después de permanecer durante toda la noche a 4° C, las suspensiones fijadas fueron almacenadas a -70° C y enviadas en hielo seco para su análisis en un solo paquete al INRA.

Material

PBS

Tris-EDTA

Lisozima

Solución de hibridación (900 mmol de NaCl, 20mM de Tris-HCL pH 8,0, 0,01% de dodecilsulfato de sodio (DDS) con pH de 7,2.

Solución de lavado (64 mmol de NaCl, 20 mmol de Tris-HCl pH 8,0, 5 mmol de EDTA pH 8,0 y 0,01% de DDS con pH 7,2)

Aparato de citometría de flujo de cuatro colores (FACS Calibur®, Becton-Dickinson, NJ, EEUU)

Sondas de oligonucleótidos

Isothiocianato de fluoresceína (FITC) (Termo Electrón, Ulm, Alemania)

Indodicarbocianato (Cy5) (Termo Electrón, Ulm, Alemania).

Placas de microtitulación

Microcentrífuga

Procedimiento

De las muestras fijadas se obtuvieron 400 μl y se mezclaron con 600 μl de PBS (Rigottier-Gois L, Le Bourhis AG, Gramet G, Rochet V, Doré J. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. FEMS Microbiol Ecol 2003; 43:133-86; Rigottier-Gois L, Rochet V, Garrec N, Suau A, Dore J. Enumeration of Bacteroides species in human faeces by fluorescent in situ hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. Syst Appl Microbiol. 2003 Mar;26(1):110-8.); antes de la hibridación, las células fueron precipitadas a 8,000 g durante 3 min y resuspendidas en un volumen de 1 ml. Posteriormente, antes de lavarse con el amortiguador Tris-EDTA, los precipitados se lavaron en Tris-EDTA que contiene 1 mg/ml de lisozima (Serva, Heidelberg, Alemania) e incubadas durante 10 min a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas en PBS para remover la lisozima y equilibradas en la solución de hibridación (900 mmol de NaCl, 20 mmol de Tris-HCL pH 8.0, 0,01% de dodecilsulfato de sodio (DDS) a pH de 7,2 y 30% de formamida). Una alícuota de 50 μl de esta suspensión fue utilizada para realizar el FISH con sondas especie-específicas de control.

La hibridación fue realizada durante toda la noche a 35°C, en una placa de microtitulación de 96 pocillos, con una solución de hibridación que contenía las sondas marcadas en concentración de 50 ng μl (concentración final de 4 ng/ μl). Después de la hibridación, en un volumen de 150 μl en cada pocillo las células fueron precipitadas a 4,000 g durante 15 min. Se realizó un lavado para remover las uniones no específicas de las sondas incubando las células bacterianas a 37° C durante 20 min. en la solución de lavado (64 mmol de NaCl, 20 mmol de Tris-HCl pH 8,0, 5 mmol de EDTA pH 8,0 y 0,01% de DDS con pH 7,2).

Finalmente, las células fueron precipitadas a 4,000 g durante 15 min y resuspendidas en PBS. Una alícuota de 100 μl fue añadida a 0,4 ml de *FACS FLOW* para la detección por citometría de flujo

Obtención de los datos y citometría de flujo

La obtención de los datos se llevó a cabo con un aparato de citometría de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Erembodegem-Aalst, Bélgica) equipado con láser iónico de argón enfriado por aire que provee 15 mW a 488 nm combinado con un láser con diodo rojo de 635 nm. Todos los parámetros fueron obtenidas como señales logarítmicas. El láser de 488 nm fue usado para medir la difusión del ángulo de la luz hacia adelante (*forward angle light scatter*) (FSC, en el filtro de banda de 480 nm). La difusión del ángulo de luz (SSC en la banda de paso de 488 nm) y la intensidad de fluorescencia verde conferida por las sondas marcadas con FITC (FL1, en el filtro de banda de paso de 530 nm).

El láser con diodo rojo fue utilizado para detectar la fluorescencia roja conferida por las sondas marcadas con Cy5 (FL4, en un filtro de la banda de paso de 660 nm); el umbral de adquisición estuvo fijo en el canal de difusión del cauce. La tasa de eventos fue generalmente menor de 3,000 por segundo. Un total de 100,000 eventos fueron almacenados en las listas de los archivos. Los análisis subsiguientes fueron realizados con el programa informático CellQuest® (Becton-Dickinson, Erembodegem-Aalst, Bélgica). Los análisis fueron efectuados mediante la creación de conjuntos (*plots*) de densidad y regiones delineadas para abarcar las bacterias doblemente marcadas.

Sondas de oligonucleótidos

La sonda EUB 338, que se conserva dentro del dominio de las bacterias, fue utilizado como control positivo para la hibridación y la sonda NON 338 como control negativo. Esas sondas de oligonucleótidos fueron unidas en forma covalente a su extremo 5' con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con indodicarbocianato (Cy5) (Termo Electrón, Ulm, Alemania). Para evaluar la composición de la microbiota se utilizó un panel de 10 grupos y sondas especie específicas unidas covalentemente con

indodicarbocianina (Cy5) a su extremo terminal. La enumeración de los diferentes grupos o especies bacterianas se realizó mediante FISH-FC combinando en el mismo tubo una sonda específica marcada con Cy5 junto con una sonda EUB 338 FITC. Las secuencias, descripción y referencias de la pequeña subunidad de rRNA blanco de las sondas utilizadas en este estudio fueron: para las eubacterias (EUB FITC y EUB CY5), para el género *Bifidobacterium* (Bif164/EUB) para el grupo *C. coccoides* (Erec482/EUB), Clep866/cp/EUB para el grupo *C. leptum*, la Ato291/EUB para el cluster Atopobium; la Bac303/EUB para el grupo *Bacteroides*, la Enter1432/EUB para enterobacterias, la Lab158/EUB para el grupo de los lactobacilos, Strc493/cp//EUB para los estreptococos, para la combinación de *C. perfringens* + *C. difficile* se utilizó la sonda Cperf191+Cdif198/EUB, y para los clostridios *C. difficile* sp y *C. perfringens* sp.se usaron las sondas Cperf191/EUB y Cdif198/EUB respectivamente

Cuantificación de los productos del metabolismo bacteriano, agua y amonio

Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (C2-C8)

La cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta se realizó mediante cromatografía gas-líquido utilizando un cromatógrafo 5830® (Hewlett-Packard. Palo Alto California), equipado con un detector de ionización por llama. Se utilizó una columna de vidrio de 2 m de longitud y 6mm de diámetro rellena con SP 1200/H₃PO₄ al 1% sobre Chromosorb WAW 80/100. La columna de la temperatura fue programada de 80 a 150° C. a razón de 20°C por minuto.

A un gramo de homogenizado fecal se le adicionó 0,1 ml de H₃PO₄ al 85% y una cantidad conocida de ácido caprílico como estándar interno y se realizaron 3 extracciones con éter etilanhidro: Se centrifugó y la capa de eterea se transfirió a un tubo y se diluyó hasta la marca de 10 ml con éter. Posteriormente se inyectaron tres microlitros del extracto etereo directamente en la columna.

La calibración y el cálculo fueron hechos mediante el método de estándar interno. Se obtuvieron curvas de calibración para los ácidos acético, propionico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico mediante soluciones estándar de cromatografía. (Spiller GA, Chernoff MC, Hill RA, Gates JE, Nassar JJ, Shipley EA. Effect of purified cellulose, pectin, and a low-residue diet on fecal volatile fatty acids, transit time, and fecal weight in humans. *Am J Clin Nutr.* 1980; 33:754-9).

Las muestras fecales se prepararon por alcalinización con NaOH 2N en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y se enviaron para su análisis, por la Dra Christine Edwards y cols, al *Department of Human Nutrition, Glasgow University, Scotland.*

Análisis estadístico

De los cuestionarios

Una vez obtenidos todos los cuestionarios y elaborada la base de datos correspondiente, se realizó primero el análisis descriptivo de datos. Posteriormente, para poder identificar las variables asociadas a la APLV se efectuó un análisis bivariado, utilizando como medida de asociación la razón de probabilidades u OR (“*Odds ratio*”), fijando el intervalo de confianza en el 95% y el nivel mínimo de significación estadística en $\leq 0,05$. Estas variables fueron categorizadas y se trabajó con la regresión logística binaria con el método por pasos hacia atrás: razón de verosimilitud (*Step Backward: RV*).

De las características clínicas, microbiota fecal y sus productos metabólicos

A todas las variables en primera instancia se les analizó su tipo de distribución, mediante el cálculo de la asimetría y la curtosis y las pruebas de Kolmogorov-Smirnoff y Shapiro-Wilms.

Análisis descriptivo: debido que la distribución, calculada mediante las pruebas mencionadas en el punto anterior, no fue normal en la mayor parte de las variables

estudiadas, se calculó la mediana e intervalos de confianza al 95% y los datos clínicos se expresaron como mediana (IC 95%)

Análisis comparativo:

Análisis bivariado: debido a las variables no se distribuyeron normalmente, se intentó transformarlas en normales mediante el cálculo de logaritmos base 10, antes de efectuar la comparación de las medias entre grupos.

En aquellas en las que no fue posible la transformación logarítmica, el análisis se realizó mediante el cálculo de la U de Mann Witney. Para la evaluación de la comparación de medias en muestras relacionadas se utilizó la prueba de rangos con signos de Wilcoxon. Todos los datos analíticos se expresaron como mediana (IC 95%). En las variables nominales se utilizó la prueba de ji cuadrada o la prueba Exacta de Fisher según el caso.

Análisis multivariado: Para la elección del tipo de análisis multivariado a utilizar se tomaron en cuenta los criterios establecidos en la literatura (Catena A, Ramos MM, Trujillo HM eds. *Análisis multivariado. Un manual para investigadores.* Ed. Biblioteca Nueva. 2003. Madrid. España). y se aplicó la regresión logística binaria con el método por pasos hacia atrás, razón de verosimilitud (*Step Backward: RV*) eligiendo inicialmente todas las variables asociadas en forma independiente con una determinada variable dependiente. Se consideraron los OR con significación estadística, además del IC 95%, donde, tanto el valor menor como el mayor, fueran diferentes a la unidad. En todos los casos se consideró como significativo un valor de p inferior a 0.05.

Todos los cálculos se realizaron con los programas informáticos para Windows SPSS versión 13.0 (SPSS Inc. Chicago Ill. EEUU).

Los análisis estadísticos aplicados a los TRFLP se han descrito en el apartado de “Identificación de los grupos bacterianos”

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS Y ANTECEDENTES FAMILIARES Y PERSONALES ESTUDIADOS EN NIÑOS SANOS Y CON ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE DE VACA.

En los niños estudiados se encontró una relación de 1,3:1 a favor del sexo femenino. Las tablas 3 y 4 muestran la comparación de algunas de las características estudiadas en ambos grupos de niños. En la tabla 3 se aprecia que, en el análisis simple, hubo diferencia significativa entre ambos grupos al comparar: a) la edad ($P = 0,01$), la paridad ($P = 0,03$), el nivel educativo ($P = 0,04$) y el dejar de consumir algunos alimentos durante la gestación ($P = 0,001$); b) los antecedentes de alergia familiar ($P < 0,0001$), contar con más de un familiar alérgico ($P < 0,001$) y que la madre padeciera algún tipo de alergia ($P = 0,001$); c) la edad gestacional ($P = 0,01$); el tiempo transcurrido entre el nacimiento y la primera vez que el niño recibió leche materna ($P < 0,001$), el primer alimento lácteo que recibieron los niños después del nacimiento ($P = 0,001$) y el número de veces que recibieron fórmula láctea en el Hospital ($P < 0,001$). En la tabla 4 se observa que igualmente hubo diferencias estadísticas significativas en relación con el peso al nacer ($P = 0,01$), que la madre haya evitado algún alimento durante la lactancia ($P < 0,001$), y con que el niño haya padecido eczema antes de la primera consulta en la Unidad de Alergia Infantil ($P = 0,01$). En las tablas 5 y 6 se recogen las comparaciones entre las mismas variables analizadas en las tablas previas, pero referidas exclusivamente a los niños con alergia a proteínas de la leche de vaca

Tabla 3. Características de la familia, del embarazo y de la estancia hospitalaria en niños sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Estadígrafo	Casos	Controles	P
Edad de la madre ^a	29 (18-36) ^b	31 (22-40)	0,008
Nivel educativo de la madre ^a			
Primaria	6	1	0,04
Secundaria	24	15	
Bachillerato o carrera técnica	2	12	
Universitaria	12	13	
Paridad materna			0,03
Primípara	16	15	
Multípara	30	31	
Se evitaron alimentos durante el embarazo			0,001
Sí	10	2	
No	36	44	
Tabaquismo materno durante el embarazo ^a			NS
Sí	8	6	
No	38	37	
Familiares con alergia			<0,001
Sí	10	3	
No	36	43	
Más de un familiar padece alergia			<0,001
Sí	6	1	
No	40	46	
El padre padece algún tipo de alergia			NS
Sí	3	2	
No	43	44	
La madre padece algún tipo de alergia			0,001
Sí	6	1	
No	40	45	
Hermanos con alergia			NS
Sí	4	3	
No	42	43	
Alergia a proteínas de leche de vaca en la familia			NS
Sí	2	1	
No	44	45	
Alergia a alimentos diferentes a la leche de vaca en la familia			NS
Sí	3	3	
No	43	44	
Ruptura precoz de membranas			NS
Sí	9	10	
No	37	36	
Duración de la ruptura de membranas			NS
< 12 horas	6	7	
>12 horas	3	3	

Tabla 3 (continuación). Características de la familia, del embarazo y de la estancia hospitalaria en niños sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Estadígrafo	Casos	Controles	P
Tipo de parto			
Eutócico			NS
Fórceps	33	32	
Cesárea	8	8	
Vacuo	4	5	
	1	1	
Edad de gestación	39 (34-41) ^a	40 (36-42)	0,01
Peso al nacer			
< 2500 g			NS
2500 a 4000 g	5	1	
> 4000 g	40	44	
Requirió cuidados especiales después de nacer	1	1	
Si			NS
No	5	6	
	41	40	
Tiempo en cuidados especiales	3 (0,3-3) ^a	3 (0,2-3)	NS
Tiempo entre nacimiento y primera tetada ^a			
≤ 6 horas			<0,001
> 6 horas	33	41	
Primer alimento lácteo recibido después del nacimiento	6	1	<0,001
Leche materna			
Fórmula láctea	32	42	
	14	3	
Número de veces que recibieron fórmula láctea en el Hospital	0 (0-20)	0(0-10) ^b	<0,001

^a Algunas madres de los niños no contestaron esta pregunta en el cuestionario

^b Mediana (rango)

Tabla 4. Características de los niños, de la madre y del ambiente después de la estancia hospitalaria en niños sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Estadígrafo	Casos	Controles	P
Tipo de alimentación al salir del Hospital			NS
Leche materna	32	34	
Fórmula láctea	11	9	
Mixta	3	3	
El niño tomó leche materna alguna vez			NS
Sí	39	42	
No	7 ^a	4 ^a	
Duración de la lactancia materna			NS
≤ de tres meses	14	13	
> de tres meses	25	29	
La madre evitó alimentos durante la lactancia ^b			<0,001
Si	26	36	
No	18	10	
Inicio de la ingesta de alimentos sólidos (semanas)	17 (8-24)	16,7 (8-42) ^c	NS
Padeció el niño eczema antes de la primera consulta ^b			0,01
Si	6	0	
No	38	46	
Ha recibido antibióticos ^b			NS
Si	5	5	
No	38	39	
Asiste el niño a la guardería ^c			NS
Si	15	17	
No	22	25	
Lugar de residencia			NS
Ciudad	45	46	
Campo	1	0	
Tiene jardín donde vive el niño			NS
No	31	33	
Sí compartido	6	6	
Sí privado	9	7	
Tienen plantas donde vive el niño			NS
Si	5	4	
No	41	42	
Tiene animales con pelo en casa ^b			NS
Sí	9	10	
No	34	36	

^a No recibieron fórmula láctea desde su nacimiento

^b Algunas madres de los niños no contestaron esta pregunta en los cuestionarios

^c Mediana(rango)

Tabla 5. Características de la familia, del embarazo y de la estancia hospitalaria en niños con alergia a proteínas de la leche de vaca

Estadígrafo	N	%
Edad de la madre ^a	29 (18-36) ^b	
Nivel educativo de la madre ^a		
Primaria	6	14 ^c
Secundaria	24	55
Bachillerato o carrera técnica	2	4
Universitario	12	27
Paridad materna		
Primípara	16	35
Multípara	30	65
Se evitaron alimentos durante el embarazo		
Si	10	22
No	36	78
Tabaquismo materno durante el embarazo ^a		
Sí	8	17
No	38	83
Familiares con alergia		
Si	10	22
No	36	78
Más de un familiar padece alergia		
Si	6	13
No	40	87
El padre padece algún tipo de alergia		
Si	3	
No	43	
La madre padece algún tipo de alergia		
Si	6	13
No	40	87
Hermanos con alergia		
Si	4	9
No	42	91
Alergia a proteínas de leche de vaca en la familia		
Si	2	5
No	44	96
Alergia a alimentos diferentes a la leche de vaca en la familia		
Si	3	7
No	43	93
Ruptura precoz de membranas		
Si	9	20
No	37	80
Duración de la ruptura de membranas		
< 12 horas	6	67 ^c
>12 horas	3	

Tabla 5 (continuación). Características de la familia, del embarazo y de la estancia hospitalaria en niños con alergia a proteínas de la leche de vaca

Estadígrafo	N	%
Tipo de parto		
Eutócico	33	72
Fórceps	8	17
Cesárea	4	9
Vacuo	1	2
Edad de gestación	39 (34-41) ^a	
Peso al nacer		
< 2500 g	5	11
2500 a 4000 g	40	87
> 4000 g	1	2
Requirió cuidados especiales después de nacer		
Si	5	11
No	41	89
Tiempo en cuidados especiales	3 (0,3-3) ^a	
Tiempo entre nacimiento y primera tetada ^a		
≤ 6 horas	33	85 ^c
> 6 horas	6	15
Primer alimento lácteo recibido después del nacimiento		
Leche materna	32	70
Fórmula láctea	14	30
Número de veces que recibieron fórmula láctea en el Hospital	0 (0-20)	

^a Algunas madres de los niños no contestaron esta pregunta en el cuestionario

^b Mediana (rango)

^c Representa el porcentaje del número de lactantes en los cuales se cuentan con los datos

Tabla 6. Características de los niños, de a madre y del ambiente después de la estancia hospitalaria en niños con alergia a proteínas de la leche de vaca

Estadígrafo	N	%
Tipo de alimentación al salir del Hospital		
Lactancia materna	32	70
Fórmula láctea	11	24
Mixta	3	6
El niño tomó leche materna alguna vez		
Sí	39	85
No	7 ^a	15
Duración de la lactancia		
≤ de tres meses	14	36 ^d
> de tres meses	25	64
La madre evitó alimentos durante la lactancia ^b		
Si	26	59
No	18	41
Inicio de la ingesta de alimentos sólidos (semanas)	17 (8-24) ^c	
Padeció el niño eczema antes de la primera consulta ^b		
Si	6	14 ^d
No	38	86
Ha recibido antibióticos ^b		
Si	5	12 ^d
No	38	88
Asiste el niño a la guardería ^c		
Si	15	41 ^d
No	22	59
Lugar de residencia		
Ciudad	45	98
Campo	1	2
Tiene jardín donde vive el niño		
No	31	67
Sí compartido	6	13
Si privado	9	20
Tienen plantas donde vive el niño		
Si	5	11
No	41	89
Tiene animales con pelo en casa ^b		
Sí	9	21 ^d
No	34	79

^a No recibieron fórmula láctea desde su nacimiento

^b Algunas madres de los niños no contestaron esta pregunta en los cuestionarios

^c Mediana(rango)

^d Representa el porcentaje del número de lactantes en los cuales se cuentan con los datos

El análisis multivariado mostró que las variables con influencia independiente sobre el riesgo de padecer alergia a proteínas de la leche de vaca fueron: la edad de gestación, el peso al nacer, el primer alimento recibido por los niños, el antecedente de contar con familiares alérgicos y el que la madre haya limitado alimentos durante el embarazo, aunque sólo cuatro variables presentaron influencia significativa al contar con un intervalo de confianza (IC) diferente a la unidad y fueron: a) tener mayor peso al nacer (IC 95%, 0,985-0,997), mostrando que por cada 9g que se tengan más de peso disminuye el riesgo de padecer alergia en 0,99; b) que la madre haya limitado algún alimento durante la gestación (0,01-0,789) disminuye 3,4 veces el riesgo de padecer alergia; c) el antecedente de no tener familiares alérgicos (0-0,323) disminuye 4,38 veces el riesgo de padecer alergia; d) si el primer alimento lácteo recibido por el niño después de nacer ha sido leche materna (0-0,090) disminuye el riesgo de padecer alergia en 7,7 veces.

Los tipos de alergia encontrados con más frecuencia en los familiares fueron: dermatitis atópica (5 casos), alergia a las proteínas de la leche de vaca (2 casos), alergia a otros alimentos (3 casos); asma, rinitis y conjuntivitis alérgicas debidas a sensibilización a diferentes alérgenos: olivo (2 casos), gramíneas (2 casos), otros pólenes (2 casos), faneras animales (2 casos), y ácaros (2 casos); a metales (2 casos); medicamentos (1 caso). Cabe mencionar que varios familiares presentaron más de un tipo de alergia.

Alergia a proteínas de leche de vaca: La mediana para la edad en la que aparecieron los síntomas de alergia a las proteínas de la leche de vaca fue de 4,3 (1 a 10) meses. En la tabla 7 se presentan los órganos y sistemas afectados al inicio de la enfermedad.

Tabla 7. Aparatos y sistemas afectados en niños con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio la enfermedad

Grado de afectación	N=46	%
Única	17	37
Piel	11	
Aparato digestivo	6	
Doble	19	43
Piel + aparato digestivo	8	
Sistema nervioso + aparato digestivo	7	
Piel + aparato respiratorio	2	
Piel y crecimiento ponderal	1	
Piel y crecimiento ponderal repetido eliminar	1	
Aparato digestivo + crecimiento ponderal	1	
Triple	11	24
Piel + sistema nervioso + aparato digestivo	6	
Piel + aparato digestivo + fiebre	1	
Piel + sistema nervioso + crecimiento ponderal	1	
Piel + aparato digestivo + aparato respiratorio	1	
Aparato digestivo + crecimiento ponderal + aparato respiratorio	1	
Aparato digestivo + palidez + acidosis metabólica	1	
Cuádruple	1	2
Piel + sistema nervioso + aparato digestivo + fiebre	1	

La forma en que eran alimentados los niños hasta el inicio de los síntomas fue: mixta en el 46% de los casos (21 niños), fórmula láctea en el 44% (20 niños), y solamente el 10% (5 niños) tomaban exclusivamente leche materna. La fórmula láctea que recibían hasta antes del inicio de los síntomas fue de inicio en 38 de los niños (82%) y en 8 niños (18%) fórmula de continuación. Las madres refirieron una asociación clara entre el inicio de la toma de la fórmula láctea y la aparición de los síntomas de la APLV en el 26% de los casos (12 niños).

Al acudir por primera vez a la Consulta de Alergia Infantil, 32 niños (70% de los casos) ya recibían una fórmula láctea con alto grado de hidrólisis proteica y solamente en cuatro de ellos hubo necesidad de cambiarla (en tres casos por respuesta inadecuada y en uno por falta de existencia en el mercado de la fórmula inicial). En todos los casos la respuesta se consideró adecuada ya que hubo remisión de los síntomas poco tiempo

después de iniciado el tratamiento dietético con la fórmula hidrolizada y el crecimiento ponderal fue adecuado.

Somatometría: La mediana para el peso al acudir por primera vez a la consulta de Alergia Infantil fue de 6680 g (3670 a 9400 g) y para la talla de 61,7 cm. (50 – 73 cm.). Cuatro niños presentaron desnutrición de primer grado y el resto un estado nutricional normal.

Las medianas para el peso y la talla a los seis meses posteriores al ingreso al proyecto fueron de 9500 g (9000 a 11200g) y de 71 cm. (61 - 82 cm.) respectivamente.

Evolución de los exámenes clínicos y de laboratorio:

Pruebas cutáneas: Las pruebas cutáneas iniciales fueron positivas en el 85% de los casos (39 niños) y continuaron siendo positivas a los seis meses en el 25 niños (64%).

IgE: En la Tabla 8 se presentan los resultados y evolución de las inmunoglobulinas específicas en los lactantes afectados de alergia a proteínas de la leche de vaca. Se puede observar que, tanto al inicio del estudio como seis meses después, los valores de inmunoglobulinas específicas mostraron una gran dispersión. En 28 casos (61%) la reacción positiva se presentó a un solo alérgeno (10 a leche de vaca, 9 a caseína; 4 a β -lactoglobulina y 5 a α -lactoalbúmina), a 2 alérgenos en 11 casos (en 6 a las dos proteínas del suero, en 3 a leche de vaca y caseína, y a caseína y α -lactoalbúmina y a caseína y β -lactoglobulina en un caso, respectivamente); por último, en 4 casos la reacción fue positiva a todos los alérgenos probados. Cabe mencionar que varios niños presentaron cifras que cumplieron el criterio diagnóstico de APLV a más de un alérgeno

Tabla 8. Evolución de las inmunoglobulinas específicas en niños con alergia a proteínas de la leche de vaca

Tipo de IgE específica	Inicial (kU/l)	6 meses (kU/l)
Leche de vaca	7,1 (0-90) ^a	4,2 (0-78)
α -Lactoalbúmina	5,0 (0-70)	3,0 (0-0,42)
β -Lactoglobulina	2,3 (0-45)	1,8 (0-32)
Caseína	5,5 (0-88,5)	3,5 (0-65)

^a Mediana (rango)

Prueba de desafío: Al inicio del estudio, en 3 niños (7%) hubo necesidad de realizar DBPCFC por presentar cifras no concluyentes de IgE específicas ni pruebas cutáneas positivas; en todos los casos la prueba fue positiva, con lo que se realizó el diagnóstico de APLV. Los signos y síntomas desencadenados por la prueba de exposición a las proteínas de leche de vaca se presentan en la Tabla 9. Desde que se inició el estudio, en 44 de los 46 niños estudiados (96%) se ha realizado al menos una prueba de desafío con fórmula láctea, con la finalidad de evaluar la tolerancia a la leche de vaca. La mediana para la edad en que se realizaron las pruebas fue de 14,3 meses (9 a 24 meses). En 33 casos (75%) la prueba fue negativa, por lo que se pudo introducir en la alimentación la leche de vaca y los productos lácteos derivados de la misma sin que se presentase ningún tipo de problemas. En 11 niños la prueba de reto fue positiva (25%), y los órganos y sistemas afectados se presentan en la tabla 9. De estos 11 niños con prueba de desafío positiva, a 9 de ellos (82%) se les realizó un segundo desafío hasta el momento en que se dio por concluido el estudio, siendo la mediana para la edad en la que se realizó la prueba de 22 meses y en todos los casos la prueba fue negativa, con lo que también se pudo reiniciar la alimentación con la leche de vaca y sus derivados.

Así pues, al término del estudio el 96% de los niños afectados por la APLV toleraron la reintroducción de leche de vaca, 17 niños durante el primer año de observación, 26 niños durante el segundo año y uno durante el tercer año; dos pacientes

(4%) continuaron sin tolerar la leche de vaca al finalizar el período de observación durante el que se desarrolló el estudio.

Tabla 9. Aparatos y sistemas afectados en niños con alergia a proteínas de la leche de vaca al realizar la prueba de desafío

Grado de afectación	n	%
Primera prueba de desafío (diagnóstico)	3	7
Simple	3	
Piel	1	
Aparato digestivo	1	
Doble	1	
Piel + aparato digestivo	1	
Primera prueba de desafío para la reintroducción de la leche de vaca en la alimentación	44	96
Ninguno	33	
Simple	2	
Piel	1	
Aparato digestivo	1	
Doble	8	
Piel + aparato digestivo	6	
Aparato digestivo + fiebre	2	
Múltiple	1	
Estado de choque	1	
Segunda prueba de desafío para reinicio de productos lácteos	9	20
Ninguna	9	

RECUESTO DE MICROORGANISMOS EN HECES DE LACTANTES SANOS Y ALÉRGICOS A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA.

Las Figuras 7 a la 14 muestran los valores de los recuentos de UFC de bacterias totales, aerobios, anaerobios, enterobacterias, lactobacilos, bifidobacterias, clostridios y

levaduras, en las heces de niños sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca y en las Figuras 15 a 21 los porcentajes de los mismos recuentos.

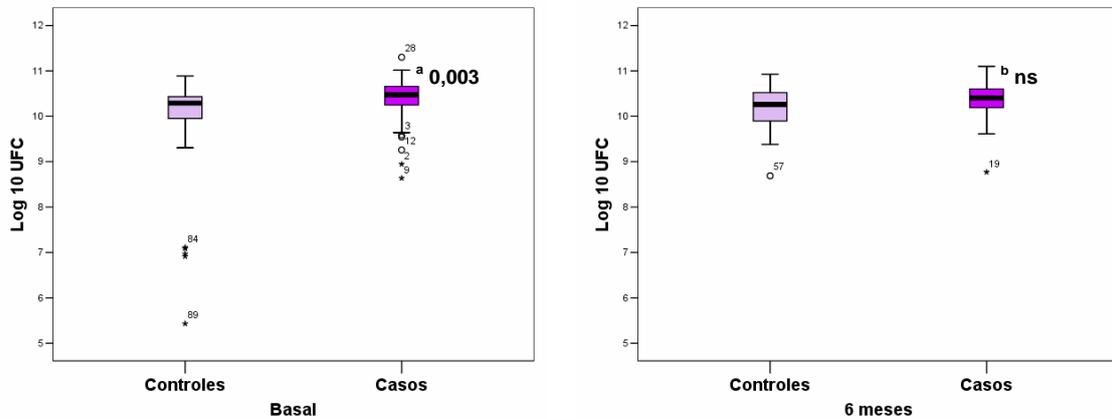


Figura 7. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) totales en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como la mediana del log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

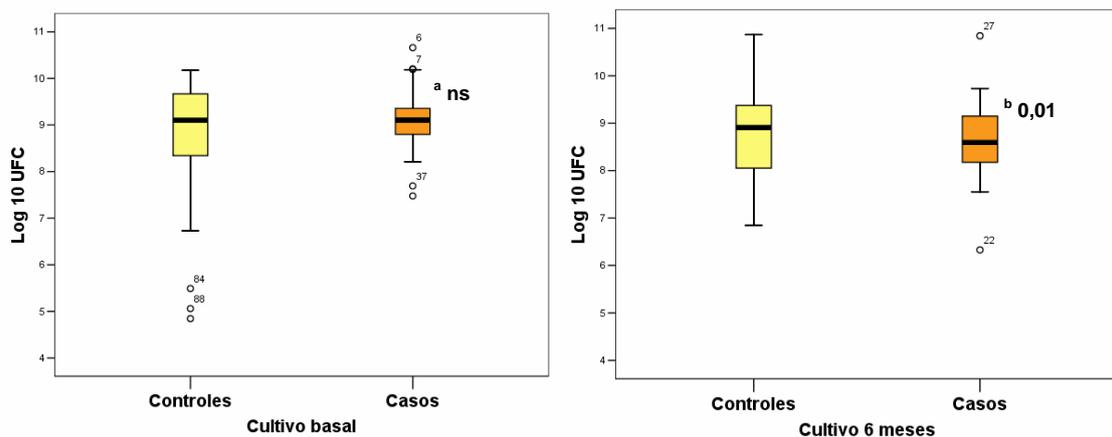


Figura 8. Recuento de aerobios en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

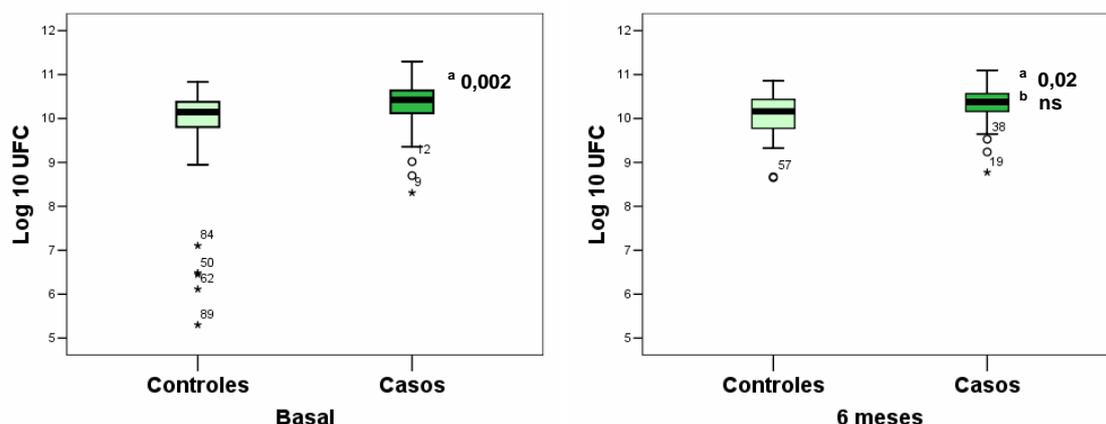


Figura 9. Recuento de anaerobios en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

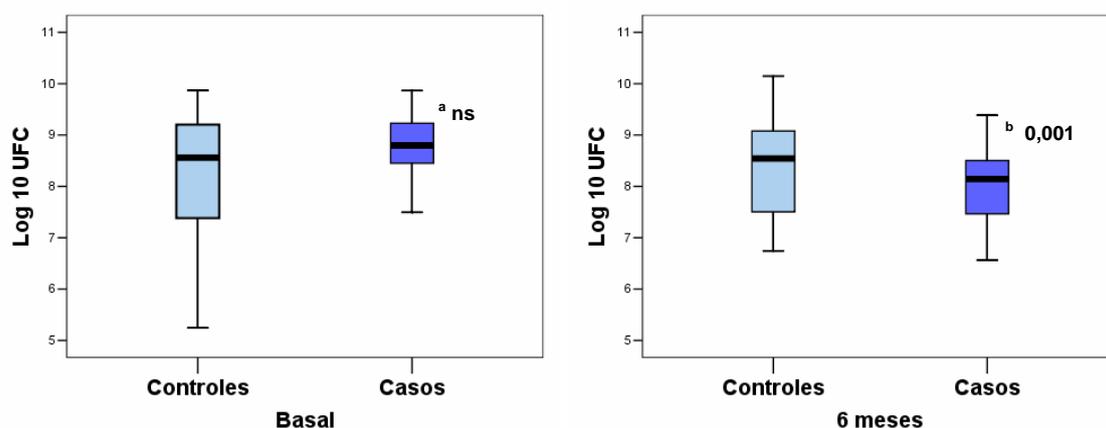


Figura 10. Recuento de enterobacterias en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

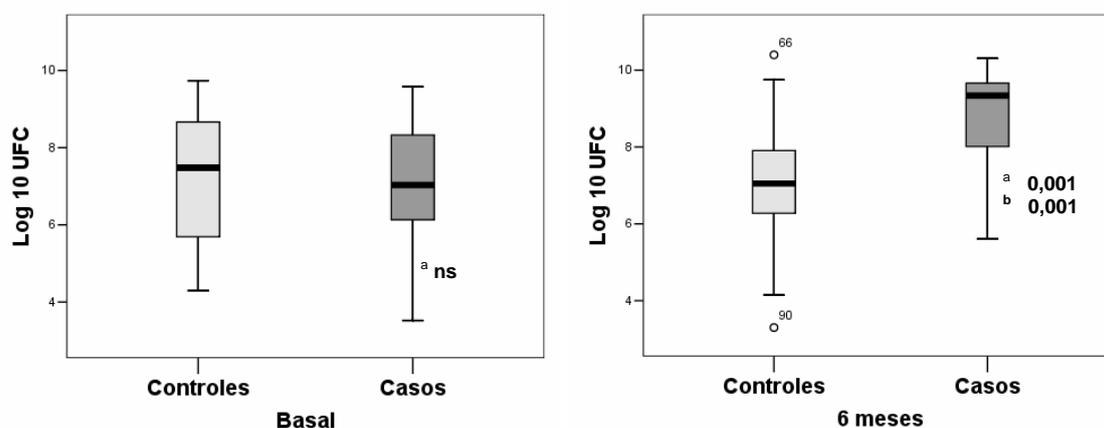


Figura 11. Recuento de lactobacilos en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

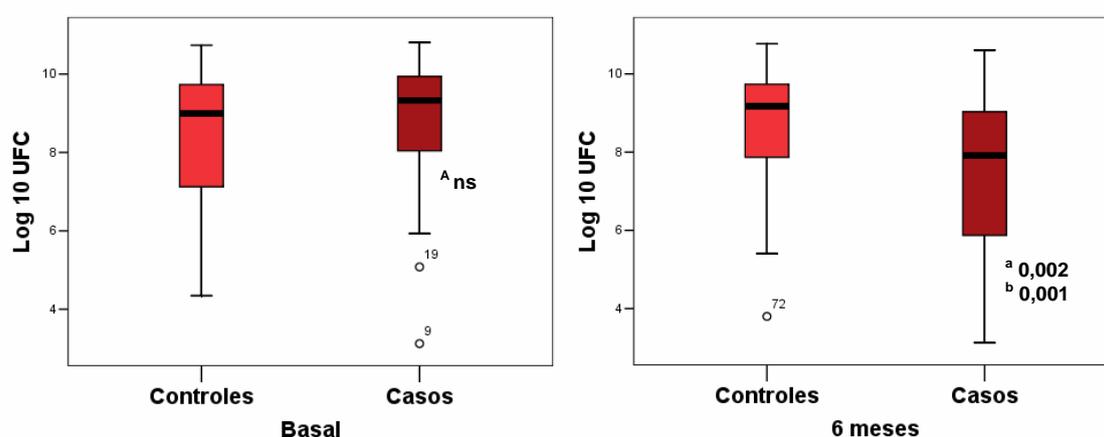


Figura 12. Recuento de bifidobacterias en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

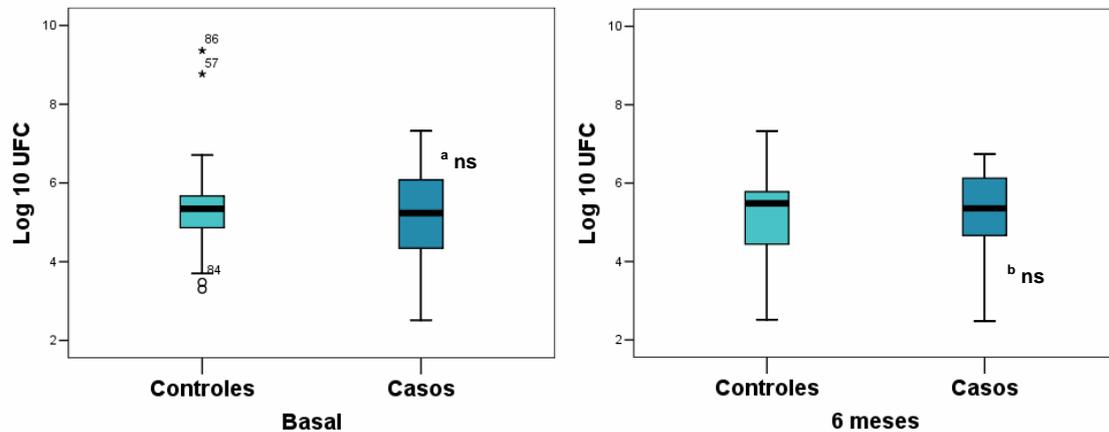


Figura 13. Recuento de clostridios en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

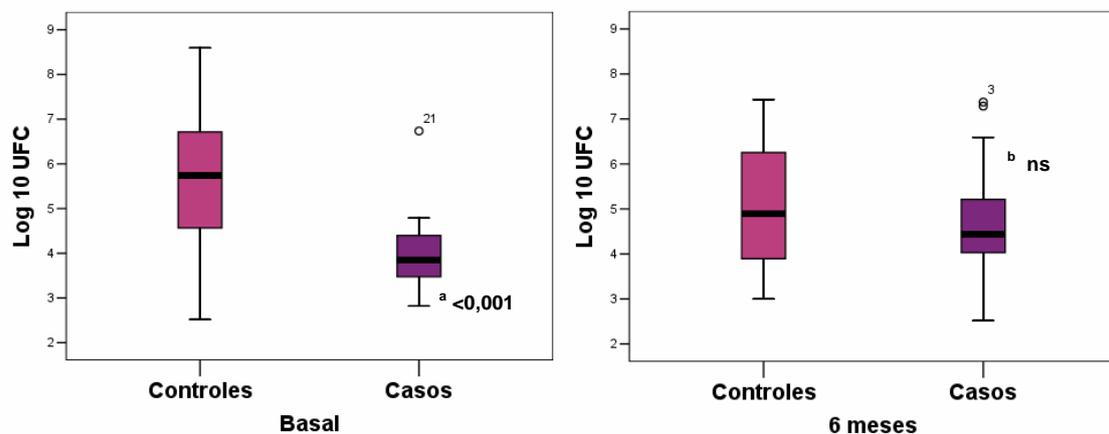


Figura 14. Recuento de levaduras en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

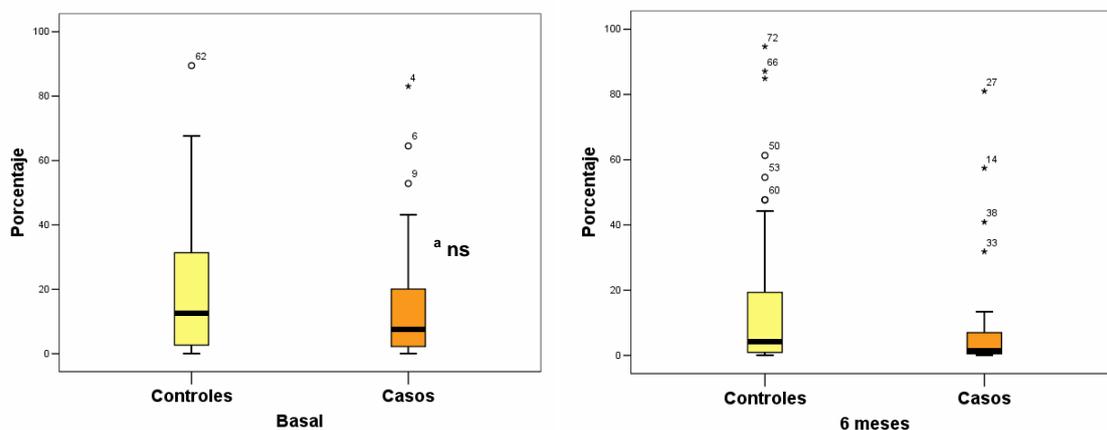


Figura 15. Porcentaje de aerobios en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

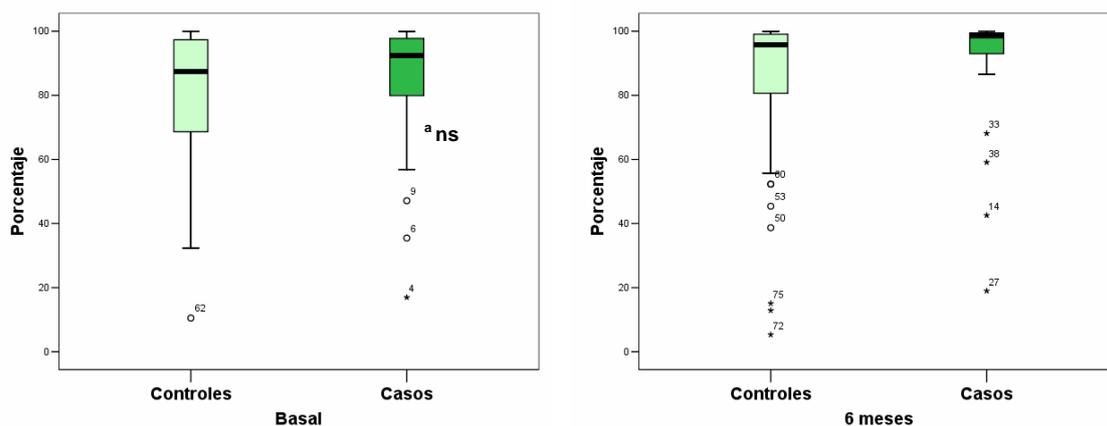


Figura 16. Porcentaje de anaerobios en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

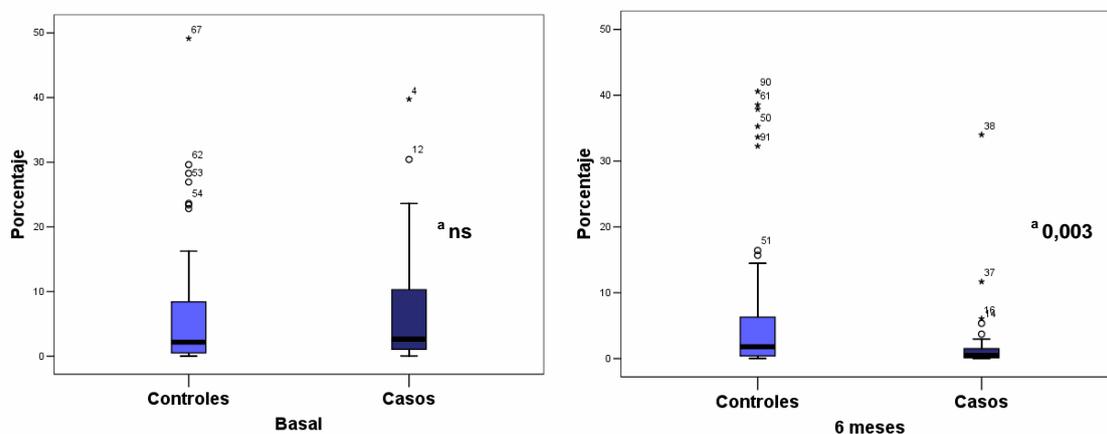


Figura 17. Porcentaje de enterobacterias en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

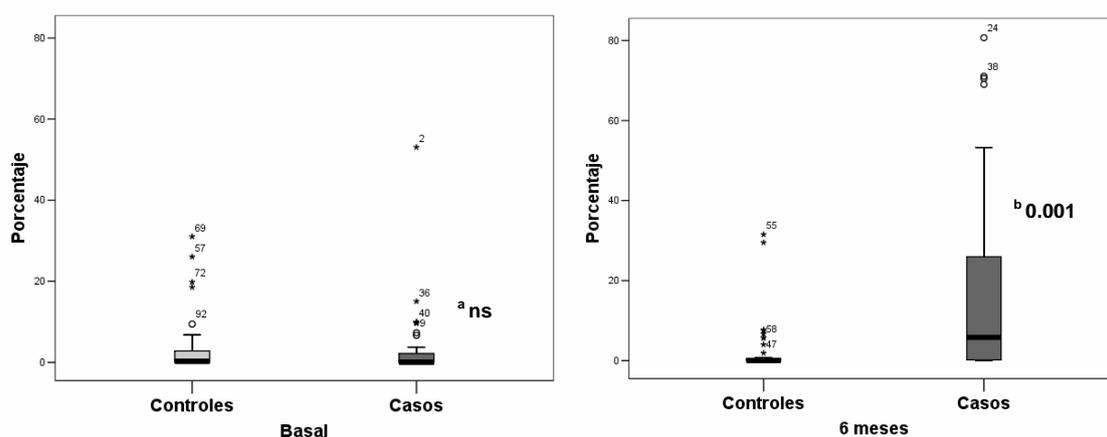


Figura 18. Porcentaje de lactobacilos en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

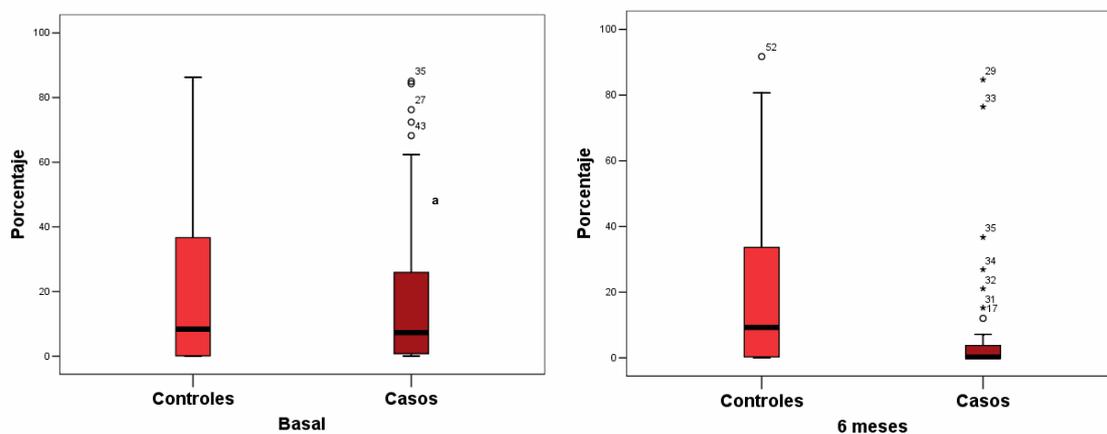


Figura 19. Porcentaje de bifidobacterias en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

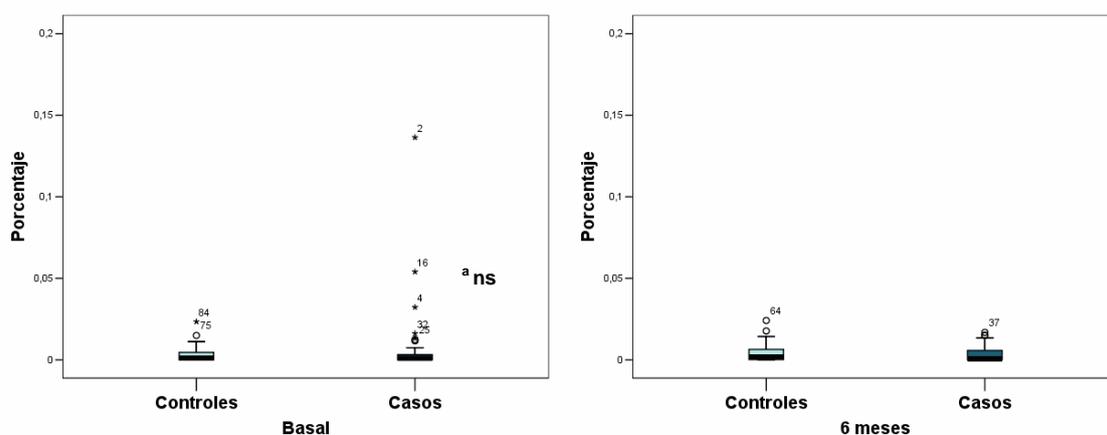


Figura 20. Porcentaje de clostridios en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los

resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

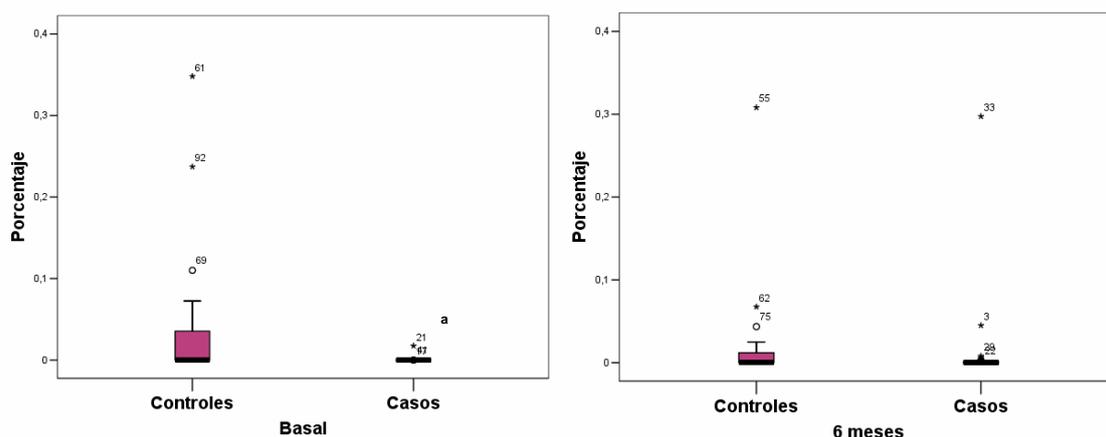


Figura 21. Porcentaje de levaduras en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca al inicio del estudio y tras 6 meses de observación. Los resultados se expresan como log 10 del número de UFC; los círculos numerados indican los valores que exceden 2 DS de la mediana.

Para la comparación entre los recuentos bacterianos de los lactantes sanos y los alérgicos se utilizó el test de la U de Mann-Whitney (^a significación estadística). Para la comparación entre la muestra basal y la tomada a los 6 meses se empleó el test de Wilcoxon (^b significación estadística)

Al inicio del estudio, los lactantes con alergia presentaron un mayor recuento de UFC totales (Figura 7) y de anaerobios (Figura 9) y un menor recuento de UFC de levaduras (Figura 14).

Después de seis meses de observación, los niños alérgicos presentaron una mayor cantidad de UFC de anaerobios (Figura 9) y recuentos significativamente menores de lactobacilos (Figura 11) y de bifidobacterias (Figura 12). Así mismo, presentaron un recuento tendencialmente menor de enterobacterias (P=0,07; Figura 10).

Cuando se compararon los porcentajes de cada uno de los grupos de bacterias estudiados, al inicio del estudio los niños alérgicos presentaron un porcentaje menor de levaduras (Figura 21) y de lactobacilos (Figura 18), aunque en el último caso la diferencia fue solo de tendencia estadística ($P = 0,06$).

A los 6 meses, los niños con alergia presentaron un mayor porcentaje de lactobacilos (Figura 18) y menor de enterobacterias (Figura 17); bifidobacterias (Figura 19); aerobios (Figura 15) y anaerobios (Figura 16), en estos dos últimos casos solo hubo tendencia estadística ($P = 0,07$ en ambos casos).

Cuando se comparó la evolución bacteriana dentro de cada grupo, los lactantes alérgicos, presentaron disminución en los recuentos de aerobios (Figura 8), enterobacterias (Figura 10) y bifidobacterias (Figura 12), así como incremento de los anaerobios (Figura 9), lactobacilos (Figura 11) y levaduras (Figura 14) a los 6 meses respecto a la situación basal. En los lactantes sanos, aunque también se presentaron variaciones en los recuentos bacterianos, en ninguno de los casos las discrepancias fueron significativas.

CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN HECES DE LACTANTES SANOS Y ALÉRGICOS A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA, MEDIANTE LA MEDICIÓN DE LOS TRFLPs.

La Figura 22 muestra dos de las múltiples imágenes de los fragmentos de 16S ribosómico obtenidos después de la electroforesis capilar, con la enzima de restricción Msp-1, en un niño con alergia y en uno sano..

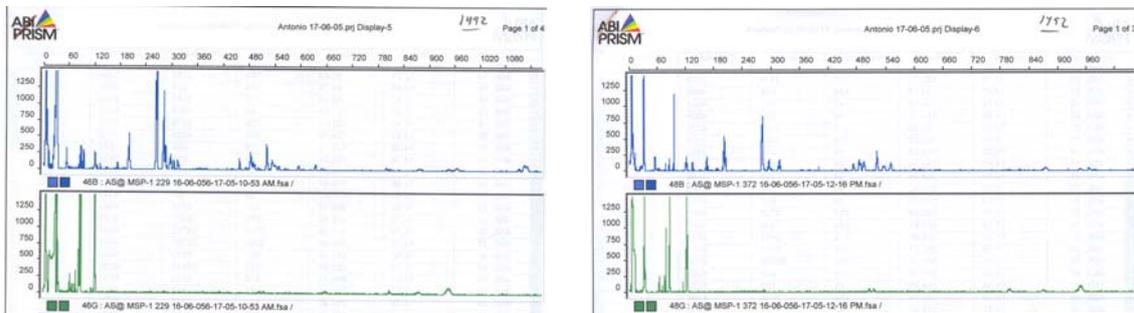


Figura 22. Representación gráfica de los fragmentos de restricción generados con la enzima Msp-1 obtenidos mediante la electroforesis capilar. Cada pico que se observa corresponde a un fragmento y su altura se relaciona con la mabundancia de éste fragmento en la muestra analizada..

En las Tablas 10 a 12. se muestran los fragmentos que se presentan en al menos el 30% de las muestras de las heces de niños con APLV, en los lactantes sanos y en ambos grupos.En la Tabla 10 se aprecian los fragmentos encontrados con la enzima de restricción Alu-1, en la Tabla 11 los encontrados con Msp-1 y en la Tabla 12 aquellos que aparecieron con Hha-1

Tabla 10. Fragmentos encontrados al digerir las muestras con la enzima de restricción Alu-1

Casos		%	Controles		%	Ambos		%
62,21 ^a	12/15 ^b	14,29	65,21	12/15	20,34	65,21	15/30 ^c	21,82
65,91	6/15	7,14	65,91	5/15	8,47	65,91	11/30	10,00
168,62	9/15	10,71	176,98	6/15	10,17	176,98	14/30	12,73
169,45	7/15	8,33	177,71	5/15	8,47	177,71	11/30	10,00
176,98	8/15	9,52	179,42	5/15	8,47	221	10/30	9,09
177,71	6/15	7,14	221	5/15	8,47	234,92	15/30	13,64
221	5/15	5,95	234,92	9/15	15,25	441,59	14/30	12,73
234,92	6/15	7,14	441,59	6/15	10,17	442,75	11/30	10,00
437,76	6/15	7,14	442,75	6/15	10,17			
441,59	8/15	9,52						
442,75	5/15	5,95						
443,63	6/15	7,14						

^a representa el número de bases del fragmento

^b número de muestras en las que se encontró el pico dividido entre el total de muestras del grupo

^c número de muestras en las que se encontró el pico dividido entre el total de muestras de ambos grupos

Tabla 11. Fragmentos encontrados al digerir las muestras con la enzima de restricción Msp-1

Casos		%	Controles	n/N	%	Ambos	n/N	%
65.29	5/15	6,02	65.95	5:15	18,52	78.13	10:30	28,57
68.37	9/15	10,84	78.13	5:15	18,52	123.95	15:30	42,86
70.72	5/15	6,02	123.95	7:15	25,93	125.68	10:30	28,57
71.63	5/15	6,02	125.68	5:15	18,52			
75.47	5/15	6,02	368.51	5:15	18,52			
78.13	5/15	6,02						
114.81	8/15	9,64						
116.28	6/15	7,23						
122.23	5/15	6,02						
123.95	8/15	9,64						
124.82	6/15	7,23						
125.68	5/15	6,02						
126.35	6/15	7,23						
127.59	5/15	6,02						

^a representa el número de bases del fragmento

^b número de muestras en las que se encontró el pico dividido entre el total de muestras del grupo

^c número de muestras en las que se encontró el pico dividido entre el total de muestras de ambos grupos

Tabla 12. Fragmentos encontrados al digerir las muestras con la enzima de restricción Hha-1

Casos		%	Controles	n/N	%	Ambos	n/N	%
50.18	5:15	7,04	65.21	7:15	16,67	65.21	15:30	20,00
51.75	5:15	7,04	134.08	9:15	21,43	134.08	17:30	22,67
65.21	8:15	11,27	268.77	8:15	19,05	268.77	18:30	24,00
68.67	5:15	7,04	402.34	7:15	16,67	402.34	10:30	13,33
81.65	8:15	11,27	403.6	5:15	11,90	405.79	15:30	20,00
134.08	8:15	11,27	405.79	6:15	14,29			
268.77	10:15	14,08						
403.6	5:15	7,04						
404.67	8:15	11,27						
405.79	9:15	12,68						

^a representa el número de bases del fragmento

^b número de muestras en las que se encontró el pico dividido entre el total de muestras del grupo

^c número de muestras en las que se encontró el pico dividido entre el total de muestras de ambos grupos

En las Figuras 23 a 25 se presentan las agrupaciones de muestras y fragmentos de acuerdo al análisis de similitud presencia ausencia y en las Figuras 26 a 28 de la abundancia mediante la agregación jerárquica de *clusters* de Morisita.

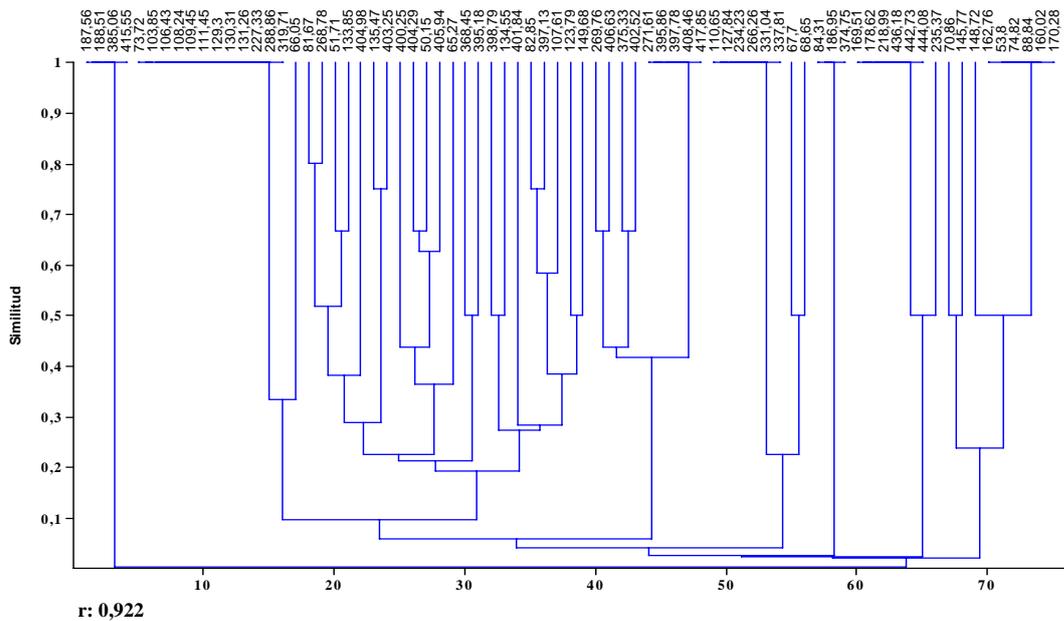


Figura 23. Agrupación de taxones en los niños alérgicos a las proteínas de la leche de vaca, mediante la medición de la distancia entre los picos o prueba de similitud de Jaccard.

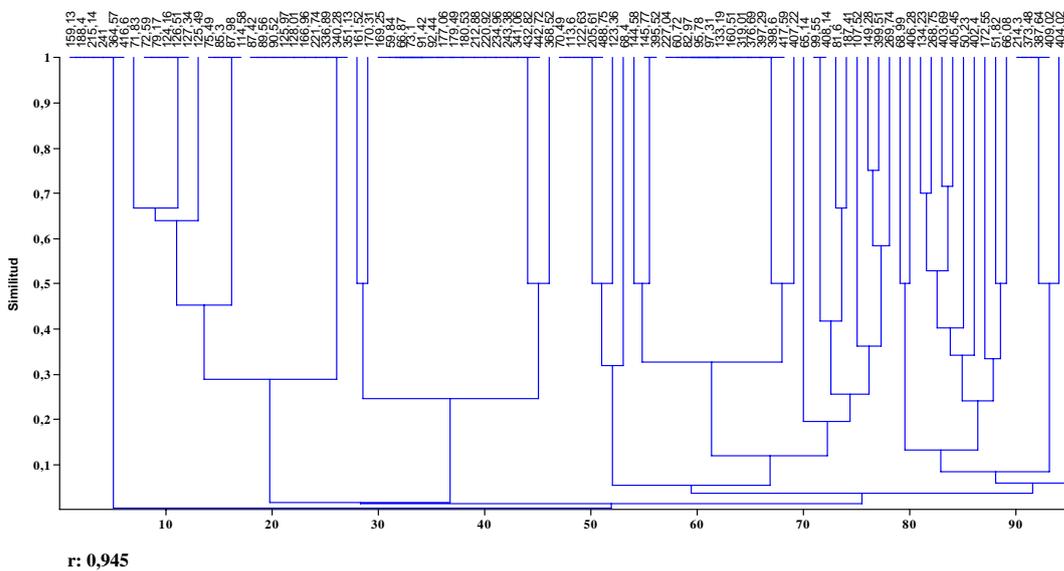


Figura 24. Agrupación de taxones en los niños del Grupo Control, mediante la medición de la distancia entre los picos o prueba de similitud de Jaccard.

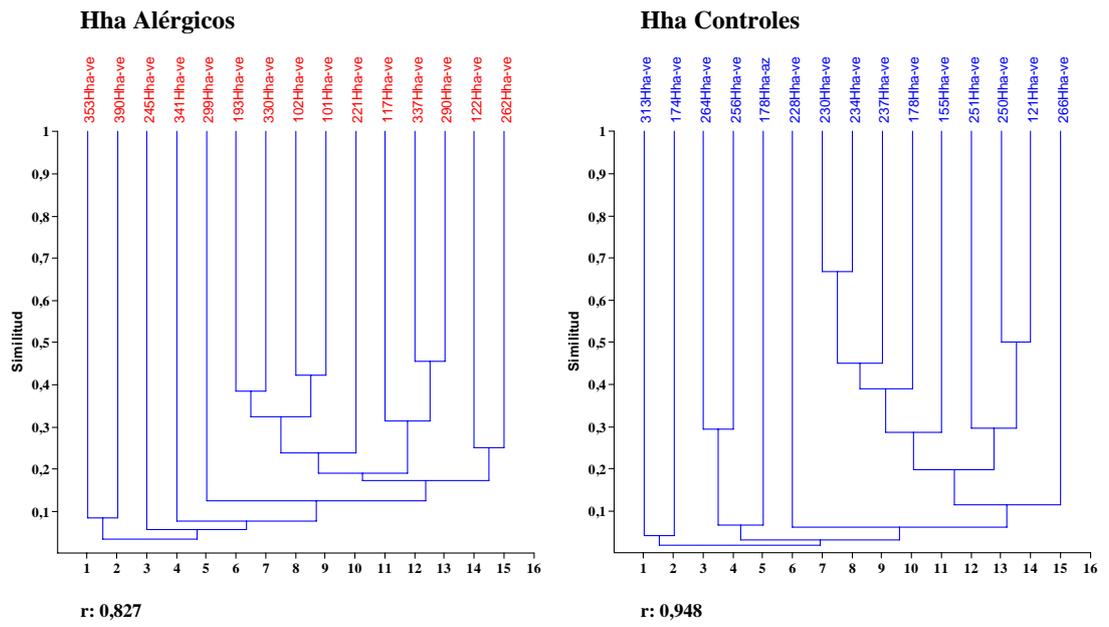


Figura 25. Agrupación de taxones en los niños con APLV y del Grupo Control, mediante la medición de la distancia entre los picos o prueba de similitud de Jaccard

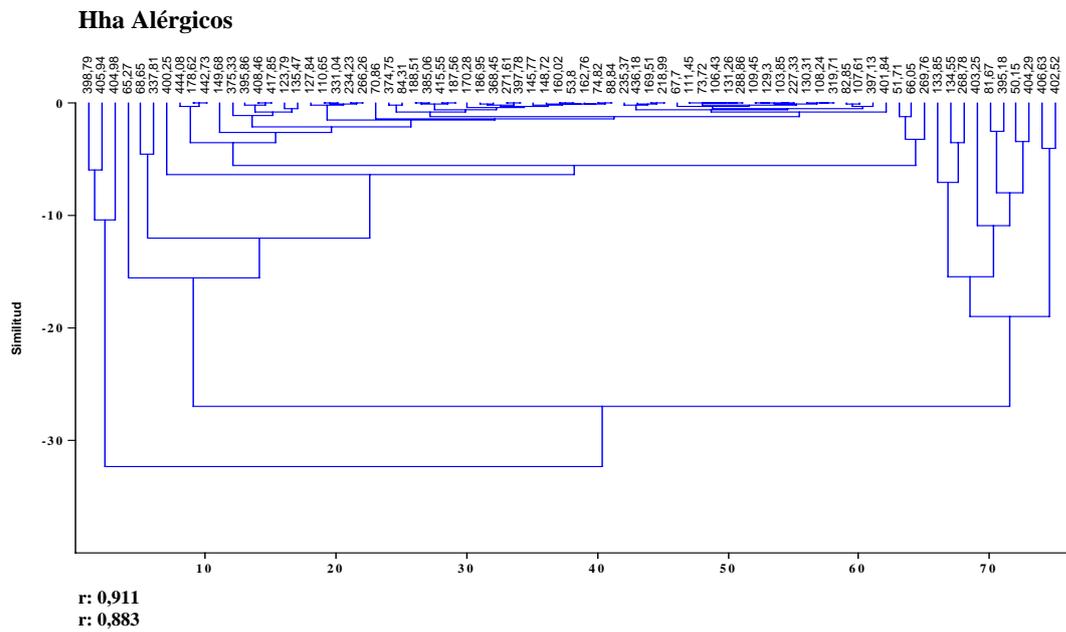


Figura 26. Análisis de la similitud de la abundancia con la distancia mínima entre varianzas o prueba de similitud de Morisita, en niños con APLV

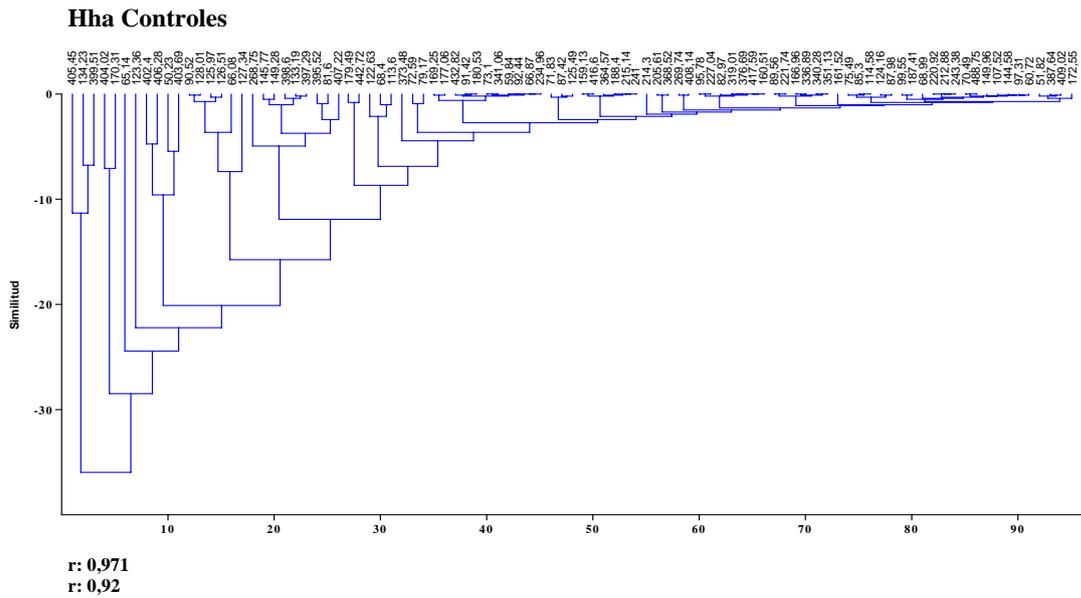


Figura 27. Análisis de la similitud de la abundancia con la distancia mínima entre varianzas o prueba de similitud de Morisita, en niños con APLV

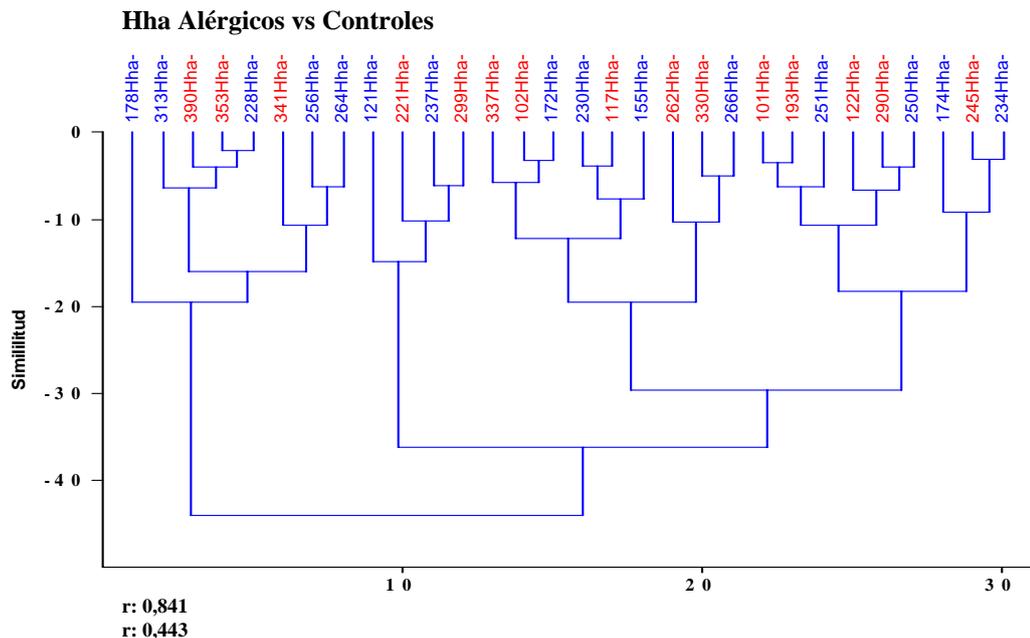


Figura 28. Comparación de la similitud de la abundancia con la distancia mínima entre varianzas o prueba de similitud de Morisita, entre los niños con APLV y los lactantes del Grupo Control

En relación a la identificación de los fragmentos y utilizando la base de datos de Matsumoto y colaboradores (Matsumoto et al 2005) se han identificado tentativamente

una parte de los fragmentos encontrados en niños sanos y con alergia. En los Anexos 3 a 5 se presentan los tamaños de pares de bases y el tipo de bacteria o género al que corresponden cada uno de ellos. Al mismo tiempo, se encontraron taxones que solamente estuvieron presentes en los niños sanos o en los alérgicos (Tabla 13)

Tabla 13 Muestra los taxones que solamente estuvieron presentes en los niños sanos o en los niños con APLV

Casos	Controles
<i>Clostridium sphenoides</i> <i>Collinselli aerofaciens</i> <i>Eubacteri halii</i> <i>Mesorhiz loti</i> <i>Bacteroide distasonis</i> <i>C. coccoides</i>	<i>Clostridium ghonii</i>

CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS EN HECES DE LACTANTES SANOS Y ALÉRGICOS A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISH-FC.

En la Tabla 14 se muestran los porcentajes de *Eubacterium*, del género *Bifidobacterium*, del cluster *Atopobium*, grupo *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, grupo Lactobacilos, grupo *Streptococacea*, grupo *C. coccoides*, grupo *C. leptum*, *C. difficile* sp, *C. perfringens* sp, *C. difficile* + *C. perfringens* sp y la suma de sus porcentajes.

En ella se puede apreciar que los porcentajes de bacterias estudiadas fueron mayores en los lactantes alérgicos en el grupo *C. coccoides*, en el porcentaje del cluster *Atopobium* y en la suma de porcentajes de las bacterias estudiadas.

Tabla 14 Comparación de los porcentajes de bacterias estudiadas mediante la técnica de FISH-FC en las heces de niños sanos y con alergia a proteína de la leche de vaca

	Controles	Casos
Eubacterias (EUBFICT)	46,9 (0,4 – 79,6) ¹	48,5 (4,7 – 78,1)
Eubacterias (EUBCY5)	48,6 (0,0 – 76,7)	53,4 (0,0 -82,0)
Género <i>Bifidobacterium</i>	3,0 (0,0 -70,6)	14,3 (0,0 – 85,8)
Género <i>C. coccoides</i>	1,1 (0,0 – 42,3)	19,3 (0,0 – 54,9) ²
Grupo <i>C leptum</i>	0,0 (0,0 – 24,3)	0,0 (0,0 – 39,6)
Cluster <i>Atopobium</i>	0,0 (0,0 – 11,1)	0,6 (0,0 – 45,3) ²
Grupo Bacteroides	13,0 (0,0 – 82,6)	15,7 (0,0 – 56,0)
Enterobacterias	1,0 (0,0 – 35,9)	1,1 (0,0 – 8,8)
Grupo Lactobacilos	0,24 (0,0 – 42,9)	0,1 (0,0 – 2,5)
Grupo estreptococos	0,37 (0,0 – 15,8)	0,2 (0,0 – 11,5)
<i>C perfringens</i> + <i>C difficile</i>	0,3 (0,0 – 16,3)	0,4 (0,0 8,9)
<i>C. perfringens</i> sp	9,7 (9,3 – 10,2)	0,0 (0 – 0,2)
<i>C. difficile</i> sp	0,65 (0,4 – 0,9)	2,9 (1,3 -3,0)
Suma de porcentajes	55,9 (8,6 – 133,9)	76,6 (39,6 – 104,2) ²

¹Mediana (rango); ² P ≤ 0,01 (test U de Mann Whitney)

CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL METABOLISMO BACTERIANO, AGUA y pH EN HECES DE LACTANTES SANOS Y ALÉRGICOS A PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

En la Tabla 15 se muestran las comparaciones del pH, cantidad de agua, amonio y de los productos metabólicos bacterianos medidos en las heces de los lactantes de ambos grupos.

En ella se observa que los niños con alergia presentaron mayores concentraciones y porcentajes de n-butilato y de otros ácidos grasos, así como una menor cantidad de ácido isocaproico y en los porcentajes de acetato y de ácido isocaproico, aunque en estos dos últimos promedios la diferencia fue solo una tendencia estadística (P =0,08 y P =0,06, respectivamente).

Tabla 15. Comparación de las características de las heces y de los productos del metabolismo bacteriano en heces de niños sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca.

	Controles	Casos
Ph	5,8 (4,5 – 7,1) ¹	6,0 (4,7 -7,9)
Porcentajes		
Agua	77,8 (70,7 – 86,1)	77,2 (51,7 – 89,5)
Acetato	80,2 (50,6 – 100,0)	76,2 (53,7 – 98,6)
Propionato	9,0 (0,0 – 4,8)	10,7 (1,1 – 21,9)
n-Butirato	1,8 (0,0 – 37,1)	6,7 (0,0 – 30,2) ²
Otros ácidosgrasos	1,2 (0,0 – 7,4)	3,1 (0,0 – 14,7) ³
Ácido isocaproico	0,0 (0,0 – 3,7)	0,0 (0,0 - 0,7)
Concentración (mmol/kg)		
Amonio	40,6 (0,85 – 124,1)	27,4 (13,6 – 76,6)
Acetato	318,9 (96,1 – 773,0)	317,1 (39,4 – 705,9)
Propionato	39,1 (0,0 – 132,8)	42,5 (2,2 –106,3)
n-Butirato	7,7(0,0 –148,1)	20,6 (0,0 – 204,4) ²
Otros ácidos grasos	5,5 (0,0 – 24,8)	11,4 (0,0 – 28,4) ³
Ácido isocaproico	0,0 (0,0 – 8,4)	0,0 (0,0 – 2,6) ²
SCFA⁴ sin lactato	409,7 (96,9 – 908,8)	409,8 (53,1 – 936,4)

¹ Mediana (rango)

² P ≤ 0,05 (Test U de Mann Whitney)

³ P ≤ 0,01 (Test U de Mann Whitney)

⁴ SCFA: ácidos grasos de cadena corta

ASOCIACION ENTRE LOS GRUPOS MICROBIANOS ESTUDIADOS MEDIANTE CULTIVOS ESPECIFICOS Y SUS PRODUCTOS METABÓLICOS, EN HECES DE LACTANTES SANOS Y CON ALERGIA A PROTEINAS DE LA LECHE DE VACA.

En las Tablas 16 y 17 se presentan las asociaciones entre los recuentos de UFC de los grupos bacterianos estudiados mediante cultivos de microbiología clásica y los productos del metabolismo microbiano en los lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca. En ellas se aprecia que en los lactantes alérgicos hubo correlación positiva entre acetato y bifidobacterias; propionato y levaduras; otros ácidos grasos y enterobacterias (Tabla 16); y ácido isocaproico con enterobacterias y levaduras y el pH con los aerobios, enterobacterias y levaduras (Tabla 17). De la misma manera, el ácido isocaproico se asoció en forma negativa (Tabla 17) con lactobacilos y bifidobacterias; y el amonio con los aerobios. Además, también se encontraron tendencias estadísticas negativas entre n-butilato y anaerobios ($P = 0,08$; Tabla 16).

Tabla 16. Correlaciones entre los recuentos de los microorganismos estudiados y las concentraciones de sus productos metabólicos en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Asociación	Casos	Controles
Acetato		
Bacterias totales	0,305	0,213
Aerobios	-0,209	-0,400²
Anaerobios	0,214	0,263
Enterobacterias	-0,128	0,020
Lactobacilos	-0,36	-0,572³
Bifidobacterias	0,438³	0,264
Clostridios	-0,014	-0,274
Levaduras	-0,068	-0,646³
Propionato		
Bacterias totales	0,139	0,338²
Aerobios	0,186	0,190
Anaerobios	0,171	0,338²
Enterobacterias	0,302	0,240
Lactobacilos	0,060	0,011
Bifidobacterias	-0,94	0,370²
Clostridios	-0,183	-0,206
Levaduras	0,547²	-0,248
n-Butirato		
Bacterias totales	-0,303	-0,060
Aerobios	-0,017	-0,075
Anaerobios	-0,319	-0,056
Enterobacterias	0,006	0,010
Lactobacilos	0,291	-0,191
Bifidobacterias	-0,184	0,078
Clostridios	0,210	0,189
Levaduras	-0,066	0,617
Otros ácidos grasos¹		
Bacterias totales	-0,105	0,083
Aerobios	0,276	-0,122
Anaerobios	-0,126	-0,076
Enterobacterias	0,356²	-0,159
Lactobacilos	-0,050	-0,211
Bifidobacterias	-0,292	0,013
Clostridios	0,199	0,054
Levaduras	0,375	-0,255

¹ Ácidos grasos de cadena ramificada

² $P \leq 0,05$ (Coeficiente de correlación de Spearman)

³ $P \leq 0,01$ (Coeficiente de correlación de Spearman)

Tabla 17. Correlaciones entre los recuentos de los microorganismos estudiados y las concentraciones de sus productos metabólicos en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Asociación	Casos	Controles
Ácido isocaproico		
Bacterias totales	0,041	-0,354²
Aerobios	0,240	-0,133
Anaerobios	0,128	-0,345²
Enterobacterias	0,385¹	-0,184
Lactobacilos	-0,389²	-0,153
Bifidobacterias	-0,478³	-0,351
Clostridios	0,128	-0,108
Levaduras	0,636³	0,196
SCFA totales sin lactato¹		
Bacterias totales	0,207	0,261
Aerobios	-0,114	-0,203
Anaerobios	0,140	0,306
Enterobacterias	-0,045	-0,029
Lactobacilos	-0,038	-0,350²
Bifidobacterias	0,299	0,416²
Clostridios	0,043	-0,110
Levaduras	0,093	-0,531³
Amonio		
Bacterias totales	-0,055	0,383
Aerobios	-0,353²	0,261
Anaerobios	-0,074	0,334
Enterobacterias	-0,293	0,239
Lactobacilos	0,014	-0,050
Bifidobacterias	-0,051	0,505³
Clostridios	-0,076	0,018
Levaduras	-0,210	-0,161
pH		
Bacterias totales	0,077	0,085
Aerobios	0,454²	0,061
Anaerobios	0,135	0,055
Enterobacterias	0,511 ²	0,075
Lactobacilos	-0,117	0,100
Bifidobacterias	-0,358	-0,022
Clostridios	0,160	-0,181
Levaduras	0,592²	0,300

¹ SCFA (Ácidos grasos de cadena corta)

² $P \leq 0,05$ (Coeficiente de correlación de Spearman)

³ $P \leq 0,01$ (Coeficiente de correlación de Spearman)

En cuanto a la asociación entre los porcentajes de bacterias y las concentraciones de sus productos metabólicos se encontraron correlaciones positivas (Tabla 18) entre el acetato y las bifidobacterias; entre otros ácidos grasos y los porcentajes de los aerobios y de las enterobacterias; y entre el pH y los porcentajes de aerobios y de enterobacterias (Tabla 19). Las correlaciones negativas encontradas fueron entre otros ácidos grasos y los anaerobios (Tabla 18); el ácido isocaproico y las bifidobacterias; y el pH con el porcentaje de bifidobacterias. Así mismo, hubo tendencias estadísticas positivas entre el n-Butirato, los lactobacilos ($P=0,07$) y los clostridios (Tabla 18); entre el ácido isocaproico y las enterobacterias ($P=0,07$); y entre ácidos grasos de cadena corta totales y las bifidobacterias ($P=0,06$). Por último se encontró una tendencia estadística negativa entre el ácido isocaproico y los lactobacilos.

Tabla 18. Correlaciones entre los porcentajes de microorganismos estudiados y las concentraciones de sus productos metabólicos en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Asociación	Coefficiente de correlación Casos	Coefficiente de correlación Controles
Acetato		
Aerobios	-0,307	-0,404²
Anaerobios	0,307	0,404²
Enterobacterias	-0,279	-0,054
Lactobacilos	0,66	-0,574³
Bifidobacterias	0,455²	0,391²
Clostridios	0,052	-0,223
Levaduras	0,238	-0,618³
Propionato		
Aerobios	0,005	-0,179
Anaerobios	0,137	0,179
Enterobacterias	0,122	0,092
Lactobacilos	0,043	-0,269
Bifidobacterias	-0,037	0,238
Clostridios	-0,188	-0,334
Levaduras	0,184	-0,632³
n-Butirato		
Aerobios	0,129	0,057
Anaerobios	0,059	-0,057
Enterobacterias	0,165	0,101
Lactobacilos	0,327	-0,180
Bifidobacterias	-0,227	-0,013
Clostridios	0,341	0,146
Levaduras	0,260	-0,485²
Cociente acetato/n-Butirato		
Aerobios	- 0,113	0,088
Anaerobios	0,113	-0,088
Enterobacterias	-0,158	-0,093
Lactobacilos	-0,281	0,301
Bifidobacterias	0,120	0,253
Clostridios	-0,292	-0,459²
Levaduras	-0,088	0,207
Otros ácidos grasos¹		
Aerobios	0,420²	0,161
Anaerobios	-0,420²	-0,192
Enterobacterias	0,447 ³	-0,138
Lactobacilos	-0,075	-0,006
Bifidobacterias	- 0,270	0,120
Clostridios	0,224	0,048
Levaduras	0,044	-0,098

¹ Ácidos grasos de cadena ramificada

² $P \leq 0,05$ (Coeficiente de correlación de Spearman)

³ $P \leq 0,01$ (Coeficiente de correlación de Spearman)

Tabla 19. Correlaciones entre los porcentajes de microorganismos estudiados y las concentraciones de sus productos metabólicos en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Asociación	Casos	Controles
Ácido isocaproico		
Aerobios	0,193	0,446³
Anaerobios	-0,193	-0,446³
Enterobacterias	0,337	0,080
Lactobacilos	-0,320	0,200
Bifidobacterias	-0,419 ²	-0,038
Clostridios	0,124	0,065
Levaduras	0,244	0,378
SCFA totales sin lactato¹		
Aerobios	-0,227	-0,432³
Anaerobios	0,227	-0,432³
Enterobacterias	-0,182	0,060
Lactobacilos	0,067	-0,577³
Bifidobacterias	0,346	0,380²
Clostridios	0,122	-0,205
Levaduras	-0,261	-0,684³
Amonio		
Aerobios	-0,203	-0,343²
Anaerobios	0,203	0,343²
Enterobacterias	-0,156	-0,173
Lactobacilos	0,195	-0,417²
Bifidobacterias	0,085	0,116
Clostridios	0,028	-0,326
Levaduras	-0,240	-0,539³
pH		
Aerobios	0,439	0,194
Anaerobios	0,439	-0,194
Enterobacterias	0,468²	-0,011
Lactobacilos	-0,225	0,243
Bifidobacterias	-0,464²	-0,076
Clostridios	0,088	-0,073
Levaduras	0,144	0,379

¹ SCFA (ácidos grasos de cadena corta)

² $P \leq 0,05$ (Coeficiente de correlación de Spearman)

³ $P \leq 0,01$ (Coeficiente de correlación de Spearman)

En relación a la correlación entre los porcentajes de bacterias y los porcentajes de metabolitos hubo asociaciones positivas (Tabla 20) entre los porcentajes de acetato y de bifidobacterias; entre el porcentaje de otros ácidos grasos con el de aerobios y el de las enterobacterias; y el del pH con las enterobacterias. De igual manera se encontró tendencia estadística entre el porcentaje de n-butirato y los lactobacilos ($P = 0,06$) y entre los porcentajes de ácido isocaproico y de enterobacterias ($P=0,07$).

Por último, se encontraron relaciones negativas entre los porcentajes de propionato y clostridios; otros ácidos grasos y el porcentaje de anaerobios; y entre el porcentaje del ácido isocaproico y las bifidobacterias y correlación negativa con tendencia estadística entre el porcentaje de ácido isocaproico y los lactobacilos ($0,08$).

Tabla 20. Correlaciones entre los porcentajes de microorganismos estudiados y los porcentajes de sus productos metabólicos en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Asociación	Casos	Controles
Acetato		
Aerobios	-0,178	-0,006
Anaerobios	0,178	0,006
Enterobacterias	-0,284	0,045
Lactobacilos	-0,013	0,017
Bifidobacterias	0,506³	0,055
Clostridios	-0,002	0,005
Levaduras	-0,111	0,309
Propionato		
Aerobios	0,035	-0,100
Anaerobios	-0,035	0,100
Enterobacterias	0,168	0,078
Lactobacilos	0,006	-0,041
Bifidobacterias	-0,243	0,069
Clostridios	-0,361²	0,297
Levaduras	0,158	-0,489²
n-Butirato		
Aerobios	0,260	0,081
Anaerobios	-0,260	-0,081
Enterobacterias	0,295	0,044
Lactobacilos	0,338	-0,076
Bifidobacterias	-0,302	-0,070
Clostridios	0,308	0,204
Levaduras	0,138	-0,037
Otros ácidos grasos¹		
Aerobios	0,455³	0,216
Anaerobios	-0,455³	-0,216
Enterobacterias	0,425²	-0,195
Lactobacilos	-0,194	0,126
Bifidobacterias	-0,406²	-0,032
Clostridios	0,117	0,052
Levaduras	-0,116	0,131
Ácido isocaproico		
Aerobios	0,180	0,455³
Anaerobios	-0,180	-0,455³
Enterobacterias	0,334	-0,083
Lactobacilos	-0,324	0,221
Bifidobacterias	-0,429²	-0,042
Clostridios	0,098	0,089
Levaduras	0,230	0,427²

¹ Ácidos grasos de cadena ramificada; ² $P \leq 0,05$; ³ $P \leq 0,01$ (Coeficiente de correlación de Spearman)

Por lo que se refiere a los niños del grupo control se encontraron asociaciones positivas (Tabla 17) entre el propionato y las bacterias totales, los anaerobios y las bifidobacterias; entre el n-butilato y las levaduras; y entre los ácidos grasos de cadena corta totales y las bifidobacterias. También se encontraron asociaciones positivas con tendencia estadística entre los anaerobios y los ácidos grasos de cadena corta totales ($P = 0,07$; Tabla 17)

En relación a las asociaciones negativas se presentaron entre el acetato y los aerobios, los lactobacilos y las levaduras (Tabla 16); entre el ácido isocaproico y las bacterias totales, los anaerobios y las bifidobacterias y los ácidos grasos de cadena corta totales con los lactobacilos y las levaduras (Tabla 17).

Cuando se compararon las concentraciones de los metabolitos microbianos con los porcentajes bacterianos se encontraron asociaciones negativas entre el acetato y los porcentajes de aerobios, lactobacilos y levaduras (Tabla 18); entre los ácidos grasos de cadena corta totales y los porcentajes de aerobios, lactobacilos y levaduras, y asociaciones con tendencia estadística entre el ácido isocaproico y los anaerobios ($P = 0,06$; Tabla 19)

Los porcentajes positivos los presentó el ácido isocaproico con los porcentajes de aerobios y de levaduras respectivamente y existió una asociación con tendencia estadística entre los ácidos grasos de cadena corta totales y el porcentaje de anaerobios ($P = 0,09$) (Tabla 19)

Por último, cuando se contrastaron los porcentajes de los microorganismos con los porcentajes de sus productos metabólicos se encontró que se presentaron asociaciones positivas entre los porcentajes de otros ácidos grasos y de las levaduras y el porcentaje del ácido isocaproico con los porcentajes de aerobios y levaduras, y negativa entre el porcentaje de ácido isocaproico y el de los anaerobios (Tabla 20).

ASOCIACION ENTRE AMONIO Y pH CON LOS GRUPOS MICROBIANOS ESTUDIADOS MEDIANTE CULTIVOS ESPECIFICOS EN HECES DE LACTANTES SANOS Y CON ALERGIA A PROTEINAS DE LA LECHE DE VACA.

En la Tabla 17 se presentan las asociaciones entre el amonio y el pH con los grupos microbianos estudiados con cultivos específicos de microbiología clásica, en niños sanos y con alergia a las proteínas de la leche de vaca.

En esta Tabla se observa que en los niños con alergia hubo una correlación negativas entre el amonio y los aerobios y asociaciones positivas entre el pH, los aerobios, las enterobacterias y las levaduras.

En cuanto a la asociación entre los porcentajes de bacterias y el pH, se encontró una asociación negativa con las bifidobacterias y una tendencia estadística con los aerobios ($P=0,07$) y las enterobacterias ($P=0,06$) (Tabla 19)

Cuando se compararon estos mismos parámetros en los niños del Grupo control se encontró que el amonio presentó asociaciones positivas con las bacterias totales y las bifidobacterias, así como asociación con tendencia estadística con los anaerobios ($P=0,06$) (Tabla 17).

Al comparar las concentraciones de los metabolitos microbianos con los porcentajes bacterianos se encontró asociación negativa del amonio con el porcentaje de levaduras y tendencias estadísticas, también negativas, con los porcentajes de aerobios ($P=0,06$) y de lactobacilos ($P=0,07$) (Tabla 19)

ASOCIACION ENTRE LOS GRUPOS MICROBIANOS SELECCIONADOS ESTUDIADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISH-FC Y LOS PRODUCTOS METABÓLICOS BACTERIANOS, EN HECES DE LACTANTES SANOS Y CON ALERGIA A PROTEINAS DE LA LECHE DE VACA.

Las asociaciones positivas encontradas (Tabla 20) en los niños alérgicos fueron: entre el acetato y el porcentaje de *C. perfringens*; el propionato con las eubacterias (EUBFITC), bifidobacterias, bacteroides y *C. perfringens* (Tabla 21); el n-butirato con eubacterias (EUBFITC), con los clostridios *C. coccoides* y *C. leptum*, *C. perfringens* + *C. difficile* y el *C. perfringens*; y con el grupo *Streptococcus*; y el grupo de otros ácidos grasos con los clostridios *C. coccoide* y *C. difficile* (Tabla 22). También se encontraron asociaciones positivas con tendencia estadística entre las eubacterias (EUBCY5) y el propionato (P =0,07) y el n-butirato (P =0,07) (Tabla 23).

Tabla 21. Correlaciones entre los porcentajes de microorganismos estudiados con la técnica de FISH-FC y las concentraciones de los productos del metabolismo bacteriano en heces de lactantes sanos y con alergia a las proteínas de la leche de vaca

Asociación	Casos	Controles
Acetato		
EUBFITC ¹	-0,089	0,129
EUBCY5 ¹	0,059	0,123
Genero <i>Bifidobacterium</i>	0,343	0,456³
Grupo <i>C. coccoides</i>	-0,201	0,136
Grupo <i>C.leptum</i>	0,078	-0,297
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,116	0,097
Grupo bacteroides	-0,270	-0,061
Enterobacterias	0,195	-0,268
Grupo lactobacilos	0,211	-0,337
Grupo estreptococos	0,163	0,033
<i>C.perfringens</i> + <i>C. difficile</i>	-0,174	-0,408²
<i>C.perfringens</i>	1³	
<i>C. difficile</i>	-1	
Propionato		
EUBFITC	0,513³	0,428²
EUBCY5	0,361	0,502³
Genero <i>Bifidobacterium</i>	0,390 ²	0,050
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,168	0,580³
Grupo <i>C.leptum</i>	0,305	0,222
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,162	0,111
Grupo bacteroides	0,573³	0,542³
Enterobacterias	0,001	0,262
Grupo lactobacilos	-0,036	0,008
Grupo estreptococos	0,274	0,055
<i>C.perfringens</i> + <i>C. difficile</i>	0,160	-0,086
<i>C.perfringens</i>	1³	
<i>C. difficile</i>	-1	
n-Butirato		
EUBFITC	0,410 ²	0,261
EUBCY5	0,360	0,397 ²
Genero <i>Bifidobacterium</i>	-0,322	0,048
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,583 ³	0,363 ²
Grupo <i>C.leptum</i>	0,559 ³	0,338
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,119	0,080
Grupo bacteroides	0,248	0,130
Enterobacterias	-0,313	0,360 ²
Grupo lactobacilos	0,024	0,305
Grupo estreptococos	0,395 ²	0,387 ²
<i>C.perfringens</i> + <i>C. difficile</i>	0,470 ²	0,371 ²
<i>C.perfringens</i>	1³	
<i>C. difficile</i>	-1	

¹ Sondas para eubacterias; ²P ≤0,05; ³P ≤0,01 (Coeficiente de correlación de Spearman)

Tabla 22. Correlaciones entre los porcentajes de microorganismos estudiados con la técnica de FISH-FC y las concentraciones de los productos del metabolismo bacteriano en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Asociación	Casos	Controles
Otros ácidos grasos (mol/kg)		
EUBFITC ¹	0,301	-0,140
EUBCY5 ¹	0,265	0,055
Genero Bifidobacterium	-0,482³	0,083
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,516³	0,212
Grupo <i>C.leptum</i>	0,262	0,075
Cluster <i>Atopobium</i>	0,010	-0,170
Grupo bacteroides	0,089	0,228
Enterobacterias	-0,039	-0,095
Grupo lactobacilos	-0,011	-0,115
Grupo estreptococos	0,029	0,084
<i>C.perfringens</i> + <i>C. difficile</i>	0,321	0,233
<i>C.perfringens</i>	-1	
<i>C. difficile</i>	1³	
Ácido isocaproico (mmol/kg)		
EUBFITC ¹	0,200	-0,300
EUBCY5 ¹	-0,012	-0,147
Genero Bifidobacterium	-0,449³	0,091
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,298	-0,100
Grupo <i>C.leptum</i>	-0,274	-0,064
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,252	-0,117
Grupo bacteroides	-0,023	-0,135
Enterobacterias	0,176	0,089
Grupo lactobacilos	-0,045	-0,070
Grupo estreptococos	-0,224	0,081
<i>C.perfringens</i> + <i>C. difficile</i>	-0,203	0,353²
<i>C.perfringens</i>		
<i>C. difficile</i>		
SCFA totales (mmol/kg)		
EUBFITC ¹	0,096	0,196
EUBCY5 ¹	0,178	0,231
Genero Bifidobacterium	0,170	0,432 ³
Grupo <i>C. coccoides</i>	-0,024	0,269
Grupo <i>C.leptum</i>	0,227	-0,121
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,110	0,118
Grupo bacteroides	-0,065	0,049
Enterobacterias	0,079	-0,121
Grupo lactobacilos	0,226	-0,195
Grupo estreptococos	0,303	0,123
<i>C.perfringens</i> + <i>C. difficile</i>	-0,065	-0,297 ²
<i>C.perfringens</i>		
<i>C. difficile</i>		

¹ Sondas para eubacterias; ²P ≤0,05; ³P ≤0,01 (Coeficiente de correlación de Spearman)

Tabla 23. Correlaciones entre los porcentajes de microorganismos estudiados con la técnica de FISH-FC y las concentraciones de los porcentajes de los productos del metabolismo bacteriano en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Asociación	Casos	Controles
Acetato		
EUBFITC	-0,464²	-0,300
EUBCY5	-0,285	-0,448³
Genero <i>Bifidobacterium</i>	0,650³	0,088
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,549³	-0,342
Grupo <i>C.leptum</i>	-0,241	-0,416²
Cluster <i>Atopobium</i>	0,009	0,097
Grupo bacteroides	-0,513³	-0,385²
Enterobacterias	0,453²	-0,322
Grupo lactobacilos	0,119	-0,326
Grupo estreptococos	-0,389²	-0,064
<i>C. perfringens</i> + <i>C. Difficile</i>	-0,571³	-0,217
<i>C. perfringens</i>	-1	
<i>C. Difficile</i>	1³	
Propionato		
EUBFITC	0,508³	0,382²
EUBCY5	0,295	0,406²
Genero <i>Bifidobacterium</i>	-0,545³	-0,107
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,188	0,463³
Grupo <i>C.leptum</i>	0,202	0,214
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,162	0,024
Grupo bacteroides	0,638³	0,593³
Enterobacterias	-0,011	0,280
Grupo lactobacilos	-0,118	0,069
Grupo estreptococos	0,171	-0,058
<i>C. perfringens</i> + <i>C. Difficile</i>	0,144	-0,090
<i>C. perfringens</i>	1³	
<i>C. Difficile</i>	-1	
n-Butirato		
EUBFITC	0,299	0,273
EUBCY5	0,244	0,415²
Genero <i>Bifidobacterium</i>	-0,297	0,019
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,582³	0,349
Grupo <i>C.leptum</i>	0,505³	0,387²
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,026	0,071
Grupo bacteroides	0,176	0,108
Enterobacterias	-0,398 ²	0,319
Grupo lactobacilos	0,002	0,414 ²
Grupo estreptococos	0,364	0,362 ²
<i>C. perfringens</i> + <i>C. Difficile</i>	0,613	0,394 ²
<i>C. perfringens</i>	1	
<i>C. Difficile</i>	-1	

¹ Sondas para eubacterias; ²P ≤0,05; ³P ≤0,01 (Coeficiente de correlación de Spearman)

Las asociaciones negativas encontradas fueron entre el grupo de las bifidobacterias con el grupo de otros ácidos grasos y con el ácido isocaproico (Tabla 22).

En relación a las asociaciones entre los porcentajes de los productos metabólicos y de las bacterias estudiadas por FISH-FC se encontraron correlaciones positivas (Tabla 23) entre el porcentaje de acetato y los porcentajes de bifidobacterias, enterobacterias y clostridios *C. coccooides* y *C. difficile*, entre porcentaje de propionato y porcentajes de eubacterias (EUBFITC), bacteroides y *C. perfringens*; n-butirato con todos los clostridios excepto *C. difficile*; el porcentaje de *C. coccooides* con el del grupo de otros ácidos grasos y una correlación con tendencia estadística entre el n-butirato y el grupo de estreptococos (Tabla 24).

Por último, se encontraron asociaciones negativas (Tabla 23) del acetato con las eubacterias (EUBFITC), los bacteroides, *C. perfringens* + *C. difficile* y con los estreptococos, el porcentaje del propionato con el de las bifidobacterias; n-butirato con enterobacterias; y los bacteroides con otros ácidos grasos y ácido isocaproico con bifidobacterias (Tabla 24).

Tabla 24. Correlaciones entre los porcentajes de microorganismos estudiados con la técnica de FISH-FC y las concentraciones de los porcentajes de los productos del metabolismo bacteriano en heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Asociación	Casos	Controles	
Otros ácidos grasos			
EUBFITC	0,162	-0,245	0,18
EUBCY5	0,091	-0,070	0,71
Genero <i>Bifidobacterium</i>	-0,432³	0,051	0,78
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,425³	0,107	0,57
Grupo <i>C.leptum</i>	0,051	0,065	0,73
Cluster <i>Atopobium</i>	0,121	-0,207	0,26
Grupo bacteroides	0,031	0,190	0,31
Enterobacterias	0,111	-0,075	0,69
Grupo lactobacilos	-0,145	-0,048	0,80
Grupo estreptococos	0,237	0,054	0,77
<i>C. perfringens</i> + <i>C. Difficile</i>	0,204	0,286	0,12
<i>C. perfringens</i>	-1,00		
<i>C. Difficile</i>	1,00		
Ácido isocaproico			
EUBFITC	0,219	-0,314	0,08
EUBCY5	-0,044	-0,165	0,37
Genero <i>Bifidobacterium</i>	-0,459²	0,069	0,71
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,319	-0,100	0,59
Grupo <i>C.leptum</i>	-0,274	-0,062	0,74
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,251	-0,135	0,47
Grupo bacteroides	0,004	-0,131	0,48
Enterobacterias	0,164	0,075	0,69
Grupo lactobacilos	-0,042	-0,066	0,72
Grupo estreptococos	-0,219	0,087	0,64
<i>C. perfringens</i> + <i>C. Difficile</i>	-0,194	0,378²	0,04
<i>C. perfringens</i>			
<i>C. Difficile</i>			

¹ Sondas para eubacterias; ²P ≤0,05; ³P ≤0,01 (Coeficiente de correlación de Spearman)

Por lo que se refiere a los lactantes del grupo control presentaron correlaciones positivas (Tabla 21) entre acetato y bifidobacterias; propionato y eubacterias (EUBFICT y EUBCY5), *C. coccoides* y bacteroides; el n-butilato con eubacterias (EUBCY5), con los clostridios *C. coccoides*, *C. perfringens*+ *C. Difícil* y *C. perfringens*; enterobacterias y estreptococos; el ácido isocaproico con *C. perfringens* + *C. difficile* y los SCFA totales con las bifidobacterias (Tabla 22) y tendencia estadística entre el n-butilato y el *C. leptum* (P =0,06; Tabla 21). También se encontraron asociaciones negativas entre *C. perfringens* + *C. difficile* con acetato y tendencia estadística entre acetato y lactobacilos (P=0,06; Tabla 21).

En lo referente a las asociaciones entre los porcentajes de metabolitos y bacterias estudiadas con FISH-FC en el grupo , el propionato presentó correlaciones positivas (Tabla 9) con eubacterias (EUBFITC y EUBCY5), *C. coccoides* y bacteroides; el n-butilato con eubacterias (EUBCY5), lactobacilos, *Streptococcus* y clostridios (*C. leptum* y *C. perfringens* + *C. difficile*) y asociaciones limítrofes del porcentaje de n-butilato con *C. coccoides* (P =0,06) y enterobacterias (P =0,08) (Tabla 22); así mismo, el ácido isocaproico presentó asociación con el porcentaje de *C. perfringens* + *C. difficile* (Tabla 24).

El acetato presentó correlaciones negativas con eubacterias (EUBCY5), *C. leptum* y bacteroides y negativas con tendencia estadística con el porcentaje de *C. coccoides* (P =0,06), enterobacterias (P =0,08) y lactobacilos (P =0,07) (Tabla 23) y el ácido isocaproico con el porcentaje de eubacterias (EUBFITC; P =0,08) (Tabla 24)

ASOCIACION ENTRE AMONIO Y pH CON LOS GRUPOS MICROBIANOS SELECCIONADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISH-FC EN HECES DE LACTANTES SANOS Y CON ALERGIA A PROTEINAS DE LA LECHE DE VACA.

Cuando se compararon los grupos microbianos seleccionados con la técnica de FISH-FC (Tabla 25), en los niños alérgicos se encontró asociación positiva del amonio con el *C. perfringens* y una correlación con tendencia estadística negativa con *C. perfringens* + *C. difficile* ($p=0,06$). En la misma Tabla se aprecia que el pH presentó asociación negativa con el género *Bifidobacterium*.

Tabla 25. Correlaciones entre el porcentaje de microorganismos estudiados con la técnica de FISH-FC y el porcentaje de amonio y el pH en las heces de lactantes sanos y con alergia a proteínas de la leche de vaca

Asociación	Casos	Controles
Amonio (mmol/kg)		
EUBFITC	0,004	0,291
EUBCY5	0,034	0,287
Genero <i>Bifidobacterium</i>	0,099	0,085
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,017	0,193
Grupo <i>C.leptum</i>	0,197	-0,104
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,016	-0,182
Grupo bacteroides	-0,125	0,048
Enterobacterias	0,090	-0,346
Grupo lactobacilos	-0,097	0,038
Grupo estreptococos	-0,206	-0,049
<i>C. perfringens</i> + <i>C. Difficile</i>	-0,377	-0,683³
<i>C. perfringens</i>	1,00³	
<i>C. Difficile</i>	-1,00	
pH		
EUBFITC	0,249	-0,214
EUBCY5	0,005	-0,213
Genero <i>Bifidobacterium</i>	-0,494³	-0,288
Grupo <i>C. coccoides</i>	0,359	-0,070
Grupo <i>C.leptum</i>	-0,261	0,095
Cluster <i>Atopobium</i>	-0,205	-0,059
Grupo bacteroides	0,146	-0,115
Enterobacterias	0,115	-0,057
Grupo lactobacilos	-0,172	-0,226
Grupo estreptococos	-0,226	-0,176
<i>C. perfringens</i> + <i>C. Difficile</i>	0,030	0,319
<i>C. perfringens</i>		
<i>C. Difficile</i>		

¹ Sondas para eubacterias; ²P ≤0,05; ³P ≤0,01 (Coeficiente de correlación de Spearman)

En lo referente al Grupo control, hubo asociaciones negativas entre el amonio y *C. perfringens* + *C. difficile* (Tabla 8) y tendencia estadística y entre amonio y enterobacterias (P =0,07;Tabla 8)

DISCUSIÓN

En los niños estudiados se encontró una predominancia de niñas en relación a los niños (1,3:1). El resto de los hallazgos en el presente estudio pueden dividirse en 2 grandes grupos

1) Las diferencias entre las características ambientales, familiares y personales de los niños sanos y con alergia a las proteínas de la leche de vaca e incluyen:

Diferencias obtenidas en el análisis simple

- a) En la edad materna, la paridad, el nivel educativo y el antecedente de haber dejado de consumir algunos alimentos durante el embarazo y durante el periodo de lactancia.
- b) Los antecedentes familiares de alergia, el contar con más de un familiar alérgico y que la madre fuera alérgica
- c) La edad gestacional, el tiempo transcurrido entre el nacimiento y la primera vez que recibió leche materna, el tipo de alimento lácteo que recibieron los niños después del nacimiento y el número de veces que recibieron fórmula en el Hospital y que los niños hayan padecido eczema antes de acudir por primera vez a la Unidad de Alergia Infantil.

Diferencias en el análisis multivariado

Al realizar el análisis multivariado las variables que mostraron una influencia independiente sobre el riesgo de padecer APLV solamente fueron 5; la edad de gestación, el primer alimento recibido por los niños, el antecedente de alergia en la familia y el que la madre haya limitado alimentos potencialmente alérgicos durante el embarazo.

2) Las diferencias en la microbiota intestinal entre los niños sanos y con APLV

a) Diferencias en los recuentos de microorganismos en los cultivos específicos

Al inicio, los niños alérgicos presentaron mayor número de UFC totales y menor cantidad de UFC de levaduras. Después de seis meses de observación éstos niños presentaron mayor cantidad de anaerobios y lactobacilos, y una menor cantidad de bifidobacterias y una tendencia estadística menor de enterobacterias.

En la comparación de los porcentajes de bacterias, los niños alérgicos presentaron porcentajes menores de levaduras y una tendencia estadística de menor cantidad de lactobacilos. A los 6 meses, presentaron un mayor porcentaje de enterobacterias y bifidobacterias; además de, tendencia estadística en los porcentajes de aerobios y anaerobios

Finalmente al comparar la evolución bacteriana dentro de cada grupo los niños alérgicos mostraron disminución en los porcentajes de UFC de aerobios, enterobacterias y bifidobacterias, así como un incremento en los anaerobios, lactobacilos y las levaduras, a los 6 meses respecto a la situación basal. En el Grupo Control también existieron variaciones pero no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

b) Diferencias encontradas con las técnicas de Biología Molecular

Hallazgos en la identificación bacteriana con el análisis de los TRFLPs

Se encontró una gran diversidad microorganismos tanto entre los grupos como entre los individuos, en ambos grupos.

Hallazgos en la identificación bacteriana con el análisis de los TRFLPs

Los niños alérgicos presentaron porcentajes mayores en el Grupo *C coccoides*, en el cluster *Atopobium* y en la suma de porcentajes

c) Diferencias en los productos del metabolismo microbiano.

Los niños alérgicos presentaron mayores concentraciones y porcentajes de n-Butirato y en los ácidos grasos diferentes a los tres SCFA principales y menores cantidades de ácido isocaproico; así como, tendencias estadísticas en los porcentajes de acetato y ácido isocaproico

d) Asociaciones entre las variables estudiadas.

Los niños con alergia mostraron asociaciones positivas entre acetato y bifidobacterias; propionato y levaduras; otros ácidos grasos y enterobacterias y ácido isocaproico con enterobacterias y levaduras.

Las asociaciones negativas fueron entre el ácido isocaproico con los lactobacilos y las bifidobacterias

En las correlaciones entre los porcentajes de bacterias y las concentraciones de los productos metabólicos de los microorganismos hubo asociaciones positivas entre acetato y bifidobacterias; entre los ácidos grasos y los anaerobios y enterobacterias. Las correlaciones negativas fueron entre otros ácidos grasos y los anaerobios y entre el ácido isocaproico y las bifidobacterias.

Entre la asociación de porcentajes de bacterias y de productos metabólicos hubo asociaciones positivas entre acetato y bifidobacterias y entre el porcentaje de otros ácidos grasos con los de aerobios y enterobacterias.

Por último las asociaciones negativas encontradas fueron entre los porcentajes de propionato y clostridios, entre el porcentaje de otros ácidos grasos y los porcentajes de anaerobios y bifidobacterias; y entre el porcentaje de ácido isocaproico y las bifidobacterias.

Los niños del grupo Control mostraron asociaciones positivas entre el propionato, el recuento total de UFC, anaerobios y bifidobacterias; y relaciones negativas entre el acetato y los aerobios, lactobacilos y levaduras; entre el ácido

isocaproico y las bacterias totales, los anaerobios y las bifidobacterias; y los ácidos grasos de cadena corta totales con los lactobacilos y las levaduras.

Cuando se compararon las concentraciones de metabolitos con los porcentajes bacterianos hubo asociaciones negativas entre el acetato y los porcentajes de aerobios, lactobacilos y levaduras; entre las levaduras y las concentraciones de propionato y n-Butirato, entre el cociente acetato/n-Butirato y el porcentaje de clostridios; ácido isocaproico y los anaerobios y entre los SCFA totales y los porcentajes de aerobios, lactobacilos y levaduras.

Las asociaciones positivas se presentaron entre acetato con los porcentajes de anaerobios y bifidobacterias; entre el ácido caproico y el porcentaje de aerobios y entre los SCFA totales y los porcentajes de anaerobios y bifidobacterias.

Las asociaciones positivas entre porcentajes de bacterias y productos metabólicos fueron entre el de ácido isocaproico y los porcentajes de aerobios, levaduras y asociaciones negativa entre el porcentaje de ácido isocaproico y el de los anaerobios.

Asociaciones entre grupos microbianos estudiados mediante cultivos, pH y amonio

Hubo asociaciones negativas entre el amonio y los aerobios; y correlación positiva entre el pH, los aerobios, enterobacterias y levaduras.

En cuanto a las asociaciones negativas entre los porcentajes de bacterias y el pH se encontraron entre el pH, los anaerobios y las bifidobacterias; y asociaciones positivas entre pH y los porcentajes de aerobios y enterobacterias..

En los niños del Grupo Control se encontró asociación positiva entre el amonio y las bifidobacterias y en los porcentajes hubo asociaciones negativas entre el amonio y el

porcentaje de aerobios y levaduras; y asociación positiva entre el amonio y el porcentaje de aerobios.

Asociación entre grupos microbianos estudiados con Fish-FC y los productos del metabolismo microbiano

Asociaciones positivas: entre acetato y porcentaje de *C. perfringens*, propionato con eubacterias (EUBFITC), con los clostridios *C. coccoides*, *C. leptum*, *C. perfringens* + *C. difficile*, *C. perfringens* y el grupo *Streptococcus*; y el grupo de ácidos grasos con los clostridios *C. coccoides* y *C. difficile*. Las asociaciones negativas fueron entre el grupo de las bifidobacterias con el grupo de otros ácidos grasos y con el ácido isocaproico.

En las asociaciones positivas entre los porcentajes de los productos metabólicos y las bacterias estudiadas con FISH-FC, se encontraron entre el acetato, las bifidobacterias, enterobacterias, *C. coccoides* y *C. difficile*, entre el porcentaje de propionato y porcentajes de eubacterias (EUBFITC), bacteroides y *C. perfringens*; n-Butirato con todos los clostridios excepto con *C. difficile*, *C. coccoides* con el grupo de otros ácidos grasos. Las asociaciones negativas fueron entre el acetato, las eubacterias (EUBFITC), los bacteroides, *C. perfringens* + *C. difficile* y los estreptococos; el porcentaje de propionato con las bifidobacterias; n-Butirato con enterobacterias y los porcentajes de bifidobacterias con otros ácidos grasos y el ácido isocaproico.

Por lo que se refiere a los lactantes del grupo control presentaron correlaciones positivas entre acetato y bifidobacterias; propionato y eubacterias (EUBFITC y EUBCY5), *C. coccoides* y bacteroides; el n-butirato con eubacterias (EUBCY5), con los clostridios *C. coccoides*, *C. perfringens* + *C. Diffícil* y *C. perfringens*; enterobacterias y estreptococos; el ácido isocaproico con *C. perfringens* + *C. difficile* y los SCFA totales

con las bifidiobacterias. También se encontraron asociaciones negativas entre *C. perfringens* + *C. difficile* con acetato y tendencia estadística entre acetato y lactobacilos.

En lo referente a las asociaciones entre los porcentajes de metabolitos y bacterias estudiadas con FISH-FC en el grupo , el propionato presentó correlaciones positivas (Tabla 9) con eubacterias (EUBFITC y EUBCY5), *C. coccoides* y bacteroides; el n-butirato con eubacterias (EUBCY5), lactobacilos, *Streptococcus* y clostridios (*C. leptum* y *C. perfringens* + *C. difficile*) y asociaciones limítrofes del porcentaje de n-butirato con *C. coccoides* (P =0,06) y enterobacterias; así mismo, el ácido isocaproico presentó asociación con el porcentaje de *C. perfringens* + *C. difficile*.

El acetato presentó correlaciones negativas con eubacterias (EUBCY5), *C. leptum*.

Asociación entre amonio y pH con los grupos microbianos seleccionados mediante la técnica de FISH-FC

En los niños alérgicos se encontró asociación positiva del amonio con el *C. perfringens* y una correlación con tendencia estadística negativa con *C. perfringens* + *C. difficile* (p=0,06). El pH presentó asociación negativa con el género *Bifidobacterium*. En lo referente al Grupo control, hubo asociaciones negativas entre el amonio y *C. perfringens* + *C. difficile*

Los hallazgos del presente estudio concuerdan con lo previamente reportado en la literatura en relación a todos los factores encontrados al final del análisis multivariado. Estos factores son que la madre haya limitado alimentos potencialmente alérgicos durante el embarazo la menor edad gestacional y peso del niño; el que el primer alimento recibido haya sido fórmula () y el antecedente de contar con familiares alérgicos ().

En cuanto a las variables que al final no resultaron asociadas en forma independiente al riesgo de padecer APLV hubo concordancia en el antecedente de que la madre sea

alérgica () y el de tener más de un familiar alérgico (); y el que el niño haya padecido de eczema antes de ser visto por primera vez. Las discrepancias encontradas y que al final tampoco mostraron estar relacionadas con el riesgo de padecer APLV, se encontró que hubo predominio del sexo femenino y lo previamente encontrado en la literatura se asocia al sexo masculino con un mayor riesgo de padecer enfermedades alérgicas (Tariq SM, Matthews SM, Hakim EA, Stevens M, Arshad SH, Hide DW. The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:587-93). Esto quizá se deba al pequeño número de niños estudiados. De igual manera, la menor edad de la madre se asoció a mayor riesgo de APLV cuando se ha encontrado que la edad mayor a 30 años es la que asocia a la alergia alimentaria (Dioun AF, Harris SK, Hibberd PL. Is maternal age at delivery related to childhood food allergy? *Pediatr Allergy Immunol* 2003;14:307-11). Esto quizá pueda ser ocasionado, además de la cantidad pequeña de la muestra a un hallazgo fortuito ya que en España en época reciente, los nacimientos cada vez ocurren a mayor edad y cuando suceden en edades más tempranas una pequeña cantidad de ellos puede ser significativa, como en este caso. Y finalmente, el menor nivel educativo de las madres para lo cual no contamos con una explicación definitiva ya que a pesar de que se preguntó el nivel educativo del padre, en pocos casos fue contestada esta pregunta por lo que no puede hacerse la comparación.

En lo que se refiere a la sintomatología presentada por los niños del presente estudio concuerda con lo descrito por otros autores (Host A. frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89(Suppl):33-7, Bock SA, Sampson HA. Food allergy in infancy. *Pediatr Clin North Am* 1994; 41:1047-67) tanto en que la `piel y el aparato digestivo fueron los órganos y sistemas más frecuentemente afectados como en que la mayoría de los niños con APLV presentan más de un síntoma (Host A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5:1-36) y en que los síntomas que involucran más de un órgano o sistema ocurren entre el 58 y el 92% de los

pacientes (Järvinen KM, Suomalainen H, Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. Clin Exp Allergy, 2001;31:978-87, Gerrard JW, MacKenzie JW, Goluboff N, Garson JZ, Maningas CS. Cow's milk allergy: prevalence and manifestations in an unselected series of newborns. Acta Paediatr Scand 1973;234:1-21).

Ha sido mencionado que, en los niños alimentados en forma exclusiva al pecho materno, el síntoma predominante es el eczema atópico severo (Host A. frequency of cow's milk allergy in childhood. Ann Allergy Asthma Immunol 2002;89(Suppl):33-7, Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. Pediatrics 1987;79:683-8), lo cual contrasta con los hallazgos del presente trabajo en donde el eczema fue un síntoma importante pero solamente el 10% de ellos recibía pecho materno poco antes del inicio de la sintomatología de APLV. Quizá la explicación para este hallazgo sea el que un tercio de estos niños hayan recibido fórmula láctea com o primer alimento después de nacer y un número considerable de tomas con fórmula durante su estancia en el Hospital, como lo han mencionado previamente otros autores (++).

En relación a los hallazgos de la composición de la microbiana intestinal identificada mediante medios de cultivo específicos, se encontraron diferencias importantes en la composición de la microbiota fecal entre los niños de ambos grupos++

CONCLUSIONES

1. Los factores asociados al riesgo de padecer APLV encontrados en este estudio fueron el que el niño tuviese un mayor peso al nacer, que la madre haya limitado algún alimento durante la gestación, el antecedente de familiares alérgicos y el que primer alimento lácteo recibido por el niño después de nacer haya sido fórmula

2. Existen diferencias marcadas entre la microbiota de los niños con APLV y los lactantes sanos cuando son cuantificadas con medios de cultivo específicos, encontrándose mayor número UFC totales a expensas deL incremento en la cantidad de anaerobios y un menor número de levaduras y de los lactobacilos,

3. Existen diferencias importantes en la composición de la microbiota fecal cuando la identificación de los microorganismos mediante medios de cultivo entre los niños con APLV y los sanos que desaparecen cuando la identificación bacteriana se realiza a través de la determinación de los TFRLPs.

4. La diversidad encontrada con las técnicas de microgenómica muestran una diversidad muy amplia tanto entre los individuos como entre los grupos. Sin embargo, existen algunos taxones que se encuentran en los niños con APLV y no en los niños sanos; y que corresponden a *Firmicutes* no cultivables, *Phascola faesium*, *C.sphenoides*), *Bacterium* no cultivable, *Collinselli aerofaciens*, *Eubacteri halii*, *Enterococcus* sp, *Mesorhiz loti*; *Bacteroides distasonis* y *C. coccoides*l.

5. Cuando se utiliza la técnica FISH-FC para la cuantificación de microorganismos seleccionados se encuentra que, al inicio del estudio, existe un incremento en la cantidad de anaerobios del género *C coccoides* y del cluster *Atopobium*.

6. En los niños con APLV, en la determinación basal, existe un incremento en la concentración de n-butirato asociada a una mayor cantidad de UFC de anaerobios lo que indica que la microbiota intestinal en estos niños madura hacia a la microbiota característica del adulto en etapas más tempranas de lo que ocurre en el niño sano.

BIBLIOGRAFÍA

Adlerberth I, Carlsson B, de Man P, Jalil F, Khan SR, Larsson P, et al. Intestinal colonization with Enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediatr Scand* 1991;80:602-10

Akata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term infants. *Eur J Pediatr* 1985;144:186-90

Ashad SH, Tariq SM, Matthews S, Hakim E. Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 years. A whole population birth cohort study. *Pediatrics* 2001;108:E33.

Baehler P, Chad Z, Gurbindo C, Bonin AP, Bouthillier L, Seidman EG. Distinct patterns of cow's milk allergy in infancy defined by prolonged, two-stage double-blind, placebo-controlled food challenges. *Clin Exp Allergy*. 1996;26:254-61.

Barone KS, Reilly MR, Flanagan MP, Michael JG Abrogation of oral tolerance by feeding encapsulated antigen. *Cell Immunol*. 2000;199:65-72

Bazaral M, Orgel HA, Hamburger RN. IgE levels in normal infants and mothers and an inheritance hypothesis. *J Immunol* 1971;107:794-801

Bellinghausen I, Brand U, Steinbrink K, Enk AH, Knop J, Saloga J Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:242-9.

Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterstrom R. Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. *Pediatr Infect Dis J* 1986;5:533-9

Bennet R, Eriksson M, Tafari N, Nord CE. Intestinal bacteria of newborn Ethiopian infants in relation to antibiotic treatment and colonisation by potentially pathogenic gram-negative bacteria. *Scand J Infect Dis* 1991;23:63-9.

Benot LS. Alergia a las proteínas de leche de vaca. Edad límite de uso apropiado. Informe de evaluación. Agencia de evaluación de tecnologías sanitarias de Andalucía. Sevilla 2001.

Bergmann RL, Schulz J, Günther S, Dudenhausen JW, Bergmann KE, Bauer CP, Dorsch W, Schmidt E, Luck W, Lau S, Gras T, Wahn U. Determinants of cord-blood IgE concentrations in 6401 German neonates. *Allergy* 1995;50:65-71

Bjerke T, Hedegaard M, Henriksen TB, Nielsen BW, Schiotz PO. Several genetic and environmental factors influence cord blood IgE concentration. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:88-94

Björkstén B Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases. *Allergy* 1994;49:400-7

Bock SA, Sampson HA. Food allergy in infancy. *Pediatr Clin North Am* 1994; 41:1047-67

Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987;79:683-8

Bodner C, Anderson WJ, Reid TS, Godden DJ. Whease Study Group: childhood exposure to infection and risk of adult onset of wheeze and atopy. *Thorax* 2000;55:383-7

Bone CJ. Manejo del niño con sospecha a alergia a los alimentos. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Pediatría. Sociedad Española de Pediatría. 2004*

Bouschet J, Ansotegui IJ, vanRee R, Burney PG, Zuberbier T, van Carwenberge P. European Union meet the challenge of the growing importance of allergy and asthma. *Allergy* 2004;59:1-4

Bresciani M, Parisi C, Manghi G, Bonini S. The hygiene hypothesis: does it function worldwide?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:147.51

Bresciani M, Parisi C, Manghi G, Bonini S. The hygiene hypothesis: does it function worldwide?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:147-51

Bresciani M, Parisi C, Manghi G, Bonini S. The hygiene hypothesis: does it function worldwide?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:147-51

Bruijnzeel-Koomen, C., Ortolani, C., Aas, K., Bindslev-Jensen, C., Bjorksten, B., Moneret-Vautrin, D, Wuthrich, B. Adverse reactions to food.:position paper. *Allergy* 1995;50:623-35

Caffarelli C, Petroccione T False-negative food challenges in children with suspected food allergy. *Lancet*. 2001 Dec 1;358(9296):1871-2.

Capron A, Dombrowicz D, Capron M. Helminth infections and allergic diseases: from the Th2 paradigm to regulatory networks. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26:25-34

Chaouat G. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. *Clin Exp Immunol*. 2003;131:393-5

Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989;1:1292-5

Cookson WO, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Julier C, Nakumuura Y, Nakumuura Y, Lathrop GM, Hopkin JM. Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 1992;340:381-4

Croner S, Kjellman NIM Development of atopic disease in relation to family history and cord blood IgE levels. *Pediatr Allergy Immunol* 1989;1:14 20

Croner S, Kjellman NIM, Eriksson B, Roth A. IgE screening in 1701 newborn infants and the development of atopic disease during infancy. *Arch Dis Child* 1982;57:364-368

de Boissieu D, Matarazzo P, Rocchiccioli F, Dupont C. Multiple food allergy. A possible diagnosis in breastfed infants. *Acta Pediatr* 1997; 86:1042-6

Eder W, von Mutius E Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004;4:113-7

Eggesbo M, Botten G, Halvorsen R, Magnus P. The prevalence of CMA/CMPI in young children: the validity of parentally perceived reactions in a population-based study. *Allergy*. 2001;56:393-402

Eggesbo M, Botten G, Stigum Hein, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy?. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112: 420-6

Eriksson TH, Sigurgeirsson B, Ardal B, Sigfusson A, Valdimarsson H. Cord blood IgE levels are influenced by gestational age but do not predict allergic manifestations in infants. *Pediatr Allergy Immunol* 1991;5:5-10

Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev* 1998; 62: 1157-70

Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microbiota in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 2003;Suppl 441:48-55

Fox FE, Ford HC, Douglas R, Cherian S, Nowell PC Evidence that TGF-beta can inhibit human T-lymphocyte proliferation through paracrine and autocrine mechanisms. *Cell Immunol*. 1993;150:45-58

Fuglsang G, Madsen C, Saval P, Osterballe O. Prevalence of intolerance to food additives among Danish school children. *Pediatr Allergy Immunol* 1993;4:123-9).

Fukaura H, Kent SC, Pietruszewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*. 1996;98:70-7

Garcia-Ara C, Boyano-Martinez T, Diaz-Pena JM, Martin-Munoz F, Reche-Frutos M, Martin-Esteban M. Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cows' milk protein in the infant. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107:185-90.

Garcide P, Mowat A MCI. Mechanisms of oral tolerance. *Crit Rev Immunol* 1996;17:119-37

Garside P, McI Mowat A, Khoruts A. Oral tolerance in disease. *Gut* 1999;44:137-42

Gerrard JW, MacKenzie JW, Goluboff N, Garson JZ, Maningas CS. Cow's milk allergy: prevalence and manifestations in an unselected series of newborns. *Acta Paediatr Scand* 1973;234:1-21.

Gerrard JW, Perelmutter L. IgE-mediated allergy to peanut, cow's milk, and egg in children with special reference to maternal diet. *Ann Allergy* 1986; 56:351-4.

Gil A. ¿Por que' la tolerancia oral? *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al dý 'a* 2004;3:66-70).

Goldman DA, Leclair J, Macone A. Bacterial colonisation of neonates admitted to an intensive care environment. *J Pediatr* 1978;93:288-93

Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000;83:186-92

Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:19-25).

Hall JG Genomic imprinting. *Arch Dis Child* 1990;65:1013-1016

Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 1990;65:185-8

Halonen M, Stern D, Lyle S, Wright A, Taussig L, Martinez FD. Relationship of total serum IgE levels in cord blood and 9-month sera of infants. *Clin Exp Allergy* 1991;21:235-41

Hansen LG, Host A, Halken S, Holmskov A, Husby S, Lassen LB, et al. Cord blood IgE. I. IgE screening in 2814 newborn children. *Allergy* 1992;47:391-6.

Hanson DG. Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. 1. Priming and tolerance in newborns. *J Immunol* 1981;127:1518-24

Hart AL, Stagg AJ, Frame M, et al. Review article: the role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1383-93

Hattevig G, Kjellman B, Johansson SGO, Björkstén B. Clinical symptoms and IgE responses to common food proteins in atopic and healthy children. *Clin Allergy* 1984;14:551-9

Heaton T, Mallon D, Venaille T, Holt P. Staphylococcal enterotoxin induced IL-5 stimulation as a cofactor in the pathogenesis of atopic disease: the hygiene hypothesis in reverse? *Allergy*. 2003; 58: 252-6

Hide DW, Arshad SH, Twiselton R, Stevens M. Cord serum IgE: an insensitive method for prediction of atopy. *Clin Exp Allergy* 1991;21:739-43

Hill DJ, Firer MA, Shelton MJ, Hosking CS. Manifestations of milk allergy in infancy: clinical and immunologic findings. *J Pediatr*. 1986;109:270-6

Hill DJ, Hosking CS, Reyes-Benito LV. Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of in vitro with in vivo tests. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:1031-5

Hill DJ, Hosking CS. Cow milk allergy in infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy*. 1996;26:243-6.

Holt PG, Batty JE, Turner KJ. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* 1981;42:409-17

Holt PG, Leivers. Tolerance induction via antigen inhalation: Isotype specificity, stability and involvement of suppressor T-cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1982;67:155-60

Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't, Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101

Hopkin JM. The use of atopy and links to infection. *Allergy* 2002;57(suppl) 72: 5-9

Host A, Halken S, Jacobsen HP, Eastmann A, Mortensen S, Mygil S. The natural course of cow's milk protein allergy/intolerance. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:S490

Host A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 1994; 5:1-36

Host A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89(Suppl):33-7

Hugh A. Sampson. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003: 111(2 Suppl): S540-7

Isolauri E, Salminen SJ, Mattila-Sandholm T. New functional foods in the treatment of food allergy. *An Med* 1999;31:299-302

Jakobsson I, Lindberg T. A prospective study of cow's milk protein intolerance in Swedish infants. *Acta Paediatr Scand* 1979; 68:853-9

Järvinen KM, Suomalainen H, Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. *Clin Exp Allergy*, 2001;31:978-87

Kalliomaki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:1251-7.

Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003;361:1869-71

Kaufman HS, Frick OL The development of allergy in infants of allergic parents: a prospective study concerning the role of heredity. *Ann Allergy* 1976; 37:410-5

Khoo UY, Proctor IE, Macpherson AJ. CD4⁺ T cell down-regulation in human intestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens. *J Immunol*. 1997;158:3626-34

Kilpi T, Kero J, Jokinen J, Syrjanen R, Takala AK, Hovi T, et al. Common respiratory infections early in life may reduce the risk of atopic dermatitis. *Clin Infect Dis*. 2002;34:620-6

Kimpen J, Callaert H, Embrechts P, Bosmans E Influence of sex and gestational age on cord blood IgE. *Acta Paediatr Scand* 1989;78:233-238,

Kjellman NIM, Croner S. Cord blood IgE determination for allergy prediction-a follow-up to seven years of age in 1651 children. *Ann Allergy* 1984;53:167-71

Kjellman NIM, Johansson SG. IgE and atopic allergy in newborns and infants with a family history of atopic disease. *Acta Paediatr Scand* 1976;65:601-7

Kjellman NIM. IgE in neonates is not suitable for general allergy risk screening. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:1-4

Koning, H, Baert MR, Oranje AP, Savelkoul HF, Neijens, HJ. Development of Immune Functions Related to Allergic Mechanisms in Young Children. *Pediatr Res* 1996;40:363-375

Lilja G, Johansson SGO, Kusoffsy E, Öman, H. IgE levels in cord blood and 4:5 days of age: relation to clinical symptoms of atopic disease up to 18 months of age. *Allergy* 1990;45:436-44

Lilja G, Oman H. Prediction of atopic disease in infancy by determination of immunological parameters: IgE, IgE-, and IgG-antibodies to food allergens, skin prick tests and T-lymphocyte subsets. *Pediatr Allergy Immunol* 1991;2:6-13

Linneberg A, Ostergaard C, Tvede M, Andersen LP, Nielsen NH, Madsen F, Frolund L, Dirksen A, Jorgensen T. IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:847-53

Liu AH, Murphy JR. Hygiene hypothesis: fact or fiction? *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:471-8).

Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:379-92

Liu AH. Something old, something new: indoor endotoxin, allergens and asthma. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5 (Suppl):65-71

Long SS, Swenson RM. Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *J Pediatr* 1977;91:298-301

Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur J Immunol*. 2000;30:2101-11

Mackowiak PA. The normal microbial flora *N Engl J Med* 1982;307:83-93

Magazzu G, Scoglio R. Gastrointestinal manifestations of cow's milk allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89(Suppl):65-8.

Magnusson CGM. Cord serum IgE in relation to family history and as a predictor of atopic disease in early infancy. *Allergy* 1988;43:241-51

Malling HJ, Popov T, Raz E, Renz H, Wold A; EAACI Task Force 7 . Microbial products in allergy prevention and therapy. *Allergy*. 2003;58:461-71

Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol.* 2004;173:6346-56

Marsh DG, Meyer SDA, Bias WB. The epidemiology and genesis of atopic allergy. *N Engl J Med* 1981;305:1551-9

Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, et al. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994;264:1152-56.

Martinez FD, Holt PG. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999;354(suppl 2):SII12-5

Matricardi PM, Bjorksten B, Bonini S, Bousquet J, Djukanovic R, Dreborg S, Gereda J, Malling HJ, Popov T, Raz E, Renz H, Wold A; EAACI Task Force 7 . Microbial products in allergy prevention and therapy. *Allergy.* 2003;58:461-71

Matricardi PM, Rosmini F, Panetta V, Ferrigno L, Bonini S. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 ;110:381-7

Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rappicetta M, Bonini S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Br Med J* 2000;320:412-7

Matsumoto M, Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y. Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J Microbiol Methods.* 2005;61:305-19

McIntire JJ, Umetsu SE, Macaubas C, Hoyte EG, Cinnioglu C, Cavalli-Sforza LL, et al. Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature.* 2003;425:576)

Merrett TG, Burr ML, Butland BK, Merrett J, Miskelly FG, Voughan-Williams E. Infant feeding and allergy: 12 month prospective study of 500 babies born into allergic families. *Ann Allergy* 1988;61:13-24

Michel FB, Bousquet J, Greiller P, Robinet-Levy M, Coulomb Y. Comparison of cord blood immunoglobulin E concentrations and maternal allergy for the prediction of atopic diseases in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 1980;65:422-30

Miller DL, Hirvonen T, Gitlin D. Synthesis of IgE by the human conceptus. *J Allergy Clin Immunol* 1973;52:182-188

Moffatt MF, Hill MR, Cornelis F, Schou C, Faux JA, Young RP, et al. Genetic linkage of T-cell receptor [alpha]/[delta] complex to specific IgE responses. *Lancet* 1994;343:1597-600

Nagler-Anderson C. Tolerance and immunity in the intestinal immune system. *Crit Rev Immunol*. 2000;20:103-20

Ndiaye M, Bousquet J. Allergies and parasitoses in sub-Saharan Africa. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26:105-13

Nelson D, McNenamin C, Wilkes L, Holt PG. Postnatal development of respiratory mucosal immune function in the rat: regulation of IgE responses to inhaled allergen. *Pediatr Allergy Immunol* 1990;4:170-7

Nickel R, Wahn U, Hizawa N, Maestri N, Duffy DL, Barnes KC, Beyer K, Forster J, Bergmann R, Zepp F, Wahn V, Marsh DG.. Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicenter Allergy Study. *Genomics*. 1997;46:159-62

Nielsen BW, Engberg TM, Herlin T, Bjerke T, Schiøtz PO. Histamine release in cord blood basophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;93:314-22

Novembre E, de Martino M, Vierucci A. Foods and respiratory allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:1059-65

Ownby DR, Johnson CC, Peterson EL. Maternal smoking does not influence cord blood serum IgE or IgE concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:555-560

Papageorgiou PS. Clinical aspects of food allergy. *Biochem Soc Transac* 2002;30:901-6.

Paunio M, Heinonen OP, Virtanen M, Leinikki P, Annamari P, Herkki P. Measles history and atopic diseases: a population-based cross-sectional study. *JAMA* 2000;283:343-6

Plaza MA. Alergia a proteínas de leche de vaca. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Pediatría. Sociedad Española de Pediatría. 2004

Plaza- Martín AM. Alergia a proteínas de leche de vaca. Protocolos de la Asociación Española de Pediatría. 2003

Postma DS, Bleeker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, XU J, Panhuysen CIM, Meyers DA, Levitt RC Genetic susceptibility to asthma: bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 1995;333:894-900

Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet*. 1999;353:196-200

Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38:378-88

Rautava S. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:119-21

Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. ALEX Study Team. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*. 2001;358:1129-33

Rivas MA, Bone J, Rituerto B, Alonso JP, Franco Y, Guallar A, Baldellou A Cord blood IgE *versus* family history as atopic predictors in the newborn. *Acta Paediatr* 1994;83:1308-9

Roes J, Choi BK, Cazac BB Redirection of B cell responsiveness by transforming growth factor beta receptor. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:7241-6

Ruiz RGG, Richards D, Kemeny DM, Price JF Neonatal IgE: a poor screen for atopic disease. *Clin Exp Allergy* 1991;21:467-72

Saarinen KM, Juntunen-Backman K, Järvenpää AL, Kuitunen P, Lope L, Renlund M, et al. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: a prospective study of 6209 infants. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:457-61

Sampson A. Update of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:805-19

Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(Suppl): 540-7

Sampson HA. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:717-28

Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:981-9.

Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, Daniels SE, Ra C, Faux JA, et al. Localisation of atopy and the [beta] subunit of the high affinity IgE receptor(Fc[epsilon]RI) on chromosome 11q. *Lancet* 1993;341:332-4

Schrander JJ, van den Bogart JP, Forget PP, Schrander-Stumpel CT, Kuijten RH, Kester AD. Cow's milk protein intolerance in infants Under 1 year of age; a prospective epidemiological study. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 640-4

Sedgwick JD, Holt PG. Induction of IgE-secreting cells and IgE-isotype-specific suppressor T-cells in respiratory tract lymph nodes of rats exposed to an antigen aerosol. *Cell Immunol* 1985;94:182-94

Sicherer SH. Clinical aspects of gastrointestinal food allergy in childhood. *Pediatrics* 2003;111:1609-16

Sicherer SH. Food allergy. *Lancet* 2002;360:710-10

Sicherer SH. Food allergy: when and how to perform oral food challenges. *Pediatr Allergy Immunol.* 1999;10:226-34.

Spiekermann GM, Walker WA. Oral tolerance and its role in clinical disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:237-255

Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood.* 2002;99:2468-76

Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997;159:4772-80

Strobel S, Ferguson A. Immune responses to fed protein antigens in mice. 3, Systemic tolerance or printing is related to age at which antigen is first encountered. *Pediatr Res* 1984;18:588-94

Strobel S, Mowat AM. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 1998;19:173-81, Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune disease. *Immunol Today* 1997;18:335

Takeuchi M, Alard P, Streilein JW TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1998;160:1589-97

The European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition Working Group for the Diagnostic Criteria for Food Allergy. Diagnostic criteria for food allergy with predominantly intestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14:108-12

Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response *Clin Nutr* 2005;24:339-52

Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. *Alim Nutr Salud* 2004;11:37-48.

Toms C, Powrie F Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2001;3:929-35.

van Strien RT, Koopman LP, Kerkhof M, Spithoven J, de Jongste JC, Gerritsen J, et al. Mite and pet allergen levels in homes of children born to allergic and nonallergic parents. The PIAMA study. *Environ Health Perspect* 2002;110:A693-8

Vandenplas Y. Clinical Overview: the changing pattern of clinical aspects of allergy diseases. *Nestlé Nutrition Workshop* 2004;53:1-25

Vlieg-Boerstra BJ, Bijleveld CM, van der Heide S, Beusekamp BJ, Wolt-Plompen SA, Kukler J, et al. Development and validation of challenge materials for double-blind, placebo-controlled food challenges in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:341-6

Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. *J Nutr Biochem* 1998; 9: 668-75

Weiner HL Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* 2001;3:947-54.

Wilson MS, Maizels RM. Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2004;26:35-50

Woods RK, Abramson M, Bailey M, Walters EH. International prevalences of reported food allergies and intolerances. Comparisons arising from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) 1991-1994. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:298-304

Woods RK, Stoney RM, Raven J, Walters EH, Abramson M, Thien FC. Reported adverse food reactions overestimate true food allergy in the community. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:31-6

Wütrich B, Baumann, Fries RA, Schnyder UW. Total and specific IgE (RAST) in atopic twins. *Clin Allergy* 1981;11:147-154

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002;296:490-4)

Yazdanbakhsh M, Matricardi PM. Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26:15-24

Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol*. 2001;22:372-7)

Yoshioka T, Morimoto Y, Iwagaki H, Itoh H, Saito S, Kobayashi N, Yagi T, Tanaka N. Bacterial lipopolysaccharide induces transforming growth factor beta and hepatocyte growth factor through toll-like receptor 2 in cultured human colon cancer cells. *J Int Med Res*. 2001;29:409-20

Young E, Stoneham MD, Petrukevitch A, Barton J, Rona R. A population study of food intolerance. *Lancet*. 1994;343:1127-30

Young RP, Lynch J, Sharp PA, Faux JA, Cookson WO, Hopkin JM. Confirmation of genetic linkage between atopic IgE responses and chromosome 11q13. *J Med Genet* 1992;29:236-8

Este estudio es parte de del Proyecto financiado por la Comisión de las Comunidades Europeas QLT-2002-02606 “Effects of diet and lifestyle on risk gastrointestinal infections and allergy in early life; consumer knowledge attitudes and needs (INFABIO).” No refleja necesariamente los puntos de vista de la Comisión y no anticipa la política de la Comisión en esta área