

ARTÍCULO ORIGINAL

Microbiota intestinal y alergia a la proteína de leche de vaca: revisión y perspectivas futuras

*Gut microbiota and cow's milk allergy: review and future concerns*Keller, María Lorena ¹¹Área Microbioma Humano, Instituto de Análisis Fares Taie. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Keller, María Lorena. Instituto de Análisis Fares Taie, Rivadavia 3343 [C.P. 7600], Mar del Plata, Argentina; lkeller@farestaie.com.ar

Resumen

La microbiota es el conjunto de microorganismos que coloniza el cuerpo humano. La microbiota intestinal es la más diversa y abundante, ya que alberga más de 100 trillones de células microbianas y 1000 especies diferentes. Entre sus numerosas funciones, la microbiota intestinal contribuye a la modulación de la respuesta inmune y la tolerancia oral a los alimentos. La disbiosis intestinal (alteraciones o desequilibrios de la microbiota en su composición y/o función) se ha descrito en numerosos desórdenes incluyendo enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad celíaca, obesidad, asma y alergias. La alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV) es la alergia alimentaria más común en niños. Se sabe que la estructura de la microbiota en los primeros 6 meses de vida es relevante en el desarrollo de alergias, y que la disbiosis podría influenciar tanto la aparición como el curso de las mismas. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión bibliográfica de las características de la microbiota intestinal en pacientes con APLV, identificar los factores que influyen en su conformación en la edad temprana y analizar si ciertas alteraciones en la microbiota podrían asociarse con el desarrollo de APLV. Se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando las palabras clave indicadas; también se seleccionaron y analizaron estudios clínicos y revisiones de los últimos 15 años. La literatura consultada evidencia que, a pesar de los avances tecnológicos en secuenciación y análisis bioinformático, aún no se conoce con exactitud qué microorganismos influyen en el desarrollo de enfermedades alérgicas, e inclusive se han hallado resultados controvertidos. Esto revela la necesidad de seguir avanzando en el estudio de la microbiota de poblaciones pediátricas y, más específicamente, en el conocimiento de las alteraciones que se presentan en niños con APLV.

Palabras clave: microbiota intestinal, disbiosis, alergia alimentaria, alergia a la proteína de leche de vaca.

Abstract

The microbiota is the complex community of microorganisms that colonize the human body. The gut microbiota is the most diverse and abundant, hosting more than 100 trillion microbial cells and 1,000 different species. Among its several functions, the gut microbiota contributes to the modulation of the immune response and oral tolerance to foods. Gut dysbiosis, which refers to alterations or imbalances in the composition and/or function of the gut microbiota, has been described in several metabolic and immune disorders, including inflammatory bowel disease, celiac disease, obesity, asthma, and allergies. The structure of the microbiota in the first 6 months of life is relevant in the development of allergies, and gut dysbiosis could influence both their appearance and course. One of the most common food allergies is cow's milk allergy (CMA). This work aims to present a bibliographic overview of the characteristics of the gut microbiota in patients with CMA, identify the factors that influence its conformation at an early age, and analyze whether certain alterations in the microbiota could be associated with the development of CMA. For this purpose, a bibliographic search was performed in PubMed (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov), using the indicated keywords, and clinical studies and reviews from the last 15 years were selected and analyzed. The bibliography consulted shows that, despite technological advances in sequencing and bioinformatic analysis, the bacteria involved in the development of allergic diseases are not yet known in detail, and even controversial results have been found. This shows the need to continue advancing in the study of the microbiota of pediatric populations, and of the alterations that occur in children with CMA.

Keywords: gut microbiota, dysbiosis, food allergy, cow's milk allergy.

Introducción

La microbiota es una comunidad compleja de microorganismos que coloniza el organismo, principalmente conformada por bacterias, pero también por virus, hongos (en especial levaduras), protozoos y arqueas. Se define como microbioma todo el hábitat en que estos se encuentran, incluyendo los microorganismos, sus genomas y las condiciones ambientales circundantes (metabolitos, elementos genéticos móviles, estructuras microbianas, moléculas de señalización, etc.).^{1,2}

La microbiota intestinal, especialmente la localizada en el colon, llega a alcanzar densidades de 10^{11} - 10^{12} células/ml.^{3,4} Está compuesta principalmente por dos filos bacterianos, Firmicutes y Bacteroidetes (que suponen el 90 % de la microbiota intestinal) y, en menor medida, Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia.^{4,5} El filo Firmicutes incluye un gran número de géneros; algunos de los más importantes son *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Ruminococcus*. El filo Bacteroidetes incluye bacterias pertenecientes a los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*. El principal género perteneciente al filo Actinobacteria es *Bifidobacterium*. Las proteobacterias están representadas fundamentalmente por miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, mientras que el filo Verrucomicrobia tiene un único integrante, *Akkermansia muciniphila*.

Las bacterias de la microbiota intestinal ejercen numerosas funciones, tales como la metabolización de alimentos que el organismo no puede procesar, como la fibra dietética y los carbohidratos complejos; la protección contra patógenos; la síntesis de metabolitos esenciales, como algunas vitaminas y neurotransmisores; el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal y la modulación de la respuesta inmune, incluyendo la tolerancia oral a los alimentos.^{6,7}

La microbiota intestinal se establece, diversifica y madura desde el nacimiento hasta los 2 o 3 primeros años de vida.^{7,8} En su formación, intervienen componentes genéticos, epigenéticos y ambientales. El establecimiento de la microbiota intestinal comienza por la exposición a microorganismos a través del canal de parto y por el contacto con la piel materna y la microbiota del entorno.⁹ Los primeros colonizadores consisten en una mezcla de microorganismos cutáneos y entéricos, dominados por *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y estafilococos coagulasa negativa. A medida que estos consumen el oxígeno del medio intestinal, son reemplazados por anaerobios obligados, tales como *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *Escherichia coli*.

Existen evidencias de que la microbiota intestinal evoluciona en forma simultánea con el sistema inmunitario del bebé y con la programación metabólica y neurológica.⁸ En esta coevolución, las bacterias comensales juegan un papel fundamental en el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa, contribuyen a la integridad y función de la barrera intestinal, inhiben la colonización por patógenos e intervienen en las respuestas linfocitarias de tipo B y T regulatoria.⁶

Varios estudios han reportado una aparente estabilización de la microbiota intestinal, que se aproxima a una configuración de adulto dentro de los 3 primeros años de vida. Uno de los mayores estudios realizados incluyó 903 niños de 4 países (Alemania, Finlandia, Suecia y EEUU) seguidos durante 3 años, en el cual se observó que después de los 31 meses los filos dominantes y la diversidad permanecen estables con predominio del filo Firmicutes.⁸ En forma similar, un estudio en 2016 evaluó a 367 individuos japoneses sanos entre 0 y 104 años y reportó que la microbiota intestinal cambia con la edad. Firmicutes fue el filo predominante en la población adulta, mientras Actinobacteria fue el más hallado en menores de 1 año. La abundancia relativa de actinobacterias en niños fue disminuyendo después del destete, y la composición de la microbiota intestinal fue aproximándose a la de adulto cerca de los 3 años de edad.⁹

Numerosos estudios y revisiones han remarcado la importancia del desarrollo de la simbiosis entre microbiota y hospedador para la salud del bebé y sus consecuencias durante toda la vida.⁸ En los últimos años, la prevalencia de las alergias alimentarias ha mostrado un marcado crecimiento, principalmente en sociedades industrializadas en todo el mundo, y esto ha ocurrido paralelamente con los cambios de estilo de vida en esos países, que llamativamente son los mismos que afectan la conformación de la microbiota en la edad temprana, lo cual sugiere una posible intervención de la misma en el desarrollo de las alergias.

El objetivo de este estudio fue realizar una revisión bibliográfica exhaustiva acerca de las características de la microbiota intestinal en pacientes con APLV, identificar los factores más relevantes que influyen en el establecimiento de la microbiota en la edad temprana y analizar si ciertos taxones específicos o “firmas” microbianas podrían asociarse con el desarrollo de APLV.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando las palabras clave indicadas, y se seleccionaron estudios clínicos y revisiones de los últimos 15 años provenientes de revistas de alto impacto. Se analizaron en total 38 publicaciones relevantes para el objetivo propuesto.

Resultados

Microbiota intestinal: desarrollo, factores que influyen en su conformación y relación con la salud y la enfermedad. Factores que influyen en el desarrollo de la microbiota intestinal en la vida temprana

Se han descrito varios factores que modulan el establecimiento de la microbiota intestinal en la vida temprana y que son determinantes para la salud del individuo durante toda su vida. Entre estos, destacan dos factores clave que son: el tipo de parto -vaginal o por cesárea- y el tipo de lactancia -materna o artificial-. Dado que el establecimiento y la maduración de la microbiota intestinal ocurre en los llamados “1000 días”, que van desde la concepción hasta los primeros 2 años de vida del niño, este período se considera una

ventana crítica de oportunidad para realizar intervenciones que contribuyan a la conformación de una microbiota saludable⁸ (Figura 1).

El tipo de parto puede producir profundas diferencias en los patrones de colonización intestinal de los bebés. El parto vaginal permite el contacto del bebé con la microbiota vaginal y fecal, lo cual resulta en una colonización neonatal dominada por *Lactobacillus* y *Prevotella*.⁷ El parto por cesárea se ha asociado con menor abundancia y diversidad de los filos Actinobacteria y Bacteroidetes, y mayor abundancia y diversidad del filo Firmicutes en los primeros 3 meses de vida.⁴ Con respecto al género, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* son más abundantes en niños nacidos por parto vaginal, a diferencia de los niños nacidos por cesárea, que presentan mayor colonización por *Clostridium* y *Lactobacillus* hasta los 3 meses de vida. Otros trabajos evidencian menor abundancia de *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* en niños nacidos por cesárea, posiblemente por efecto del uso de antibióticos en esta práctica quirúrgica. Estos bebés presentan típicamente una microbiota enriquecida con *Staphylococcus* y *Streptococcus*, comparable con la microbiota de la piel materna.^{5,7} Asimismo, presentan mayor cantidad de patógenos oportunistas como *Enterococcus*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.¹⁰

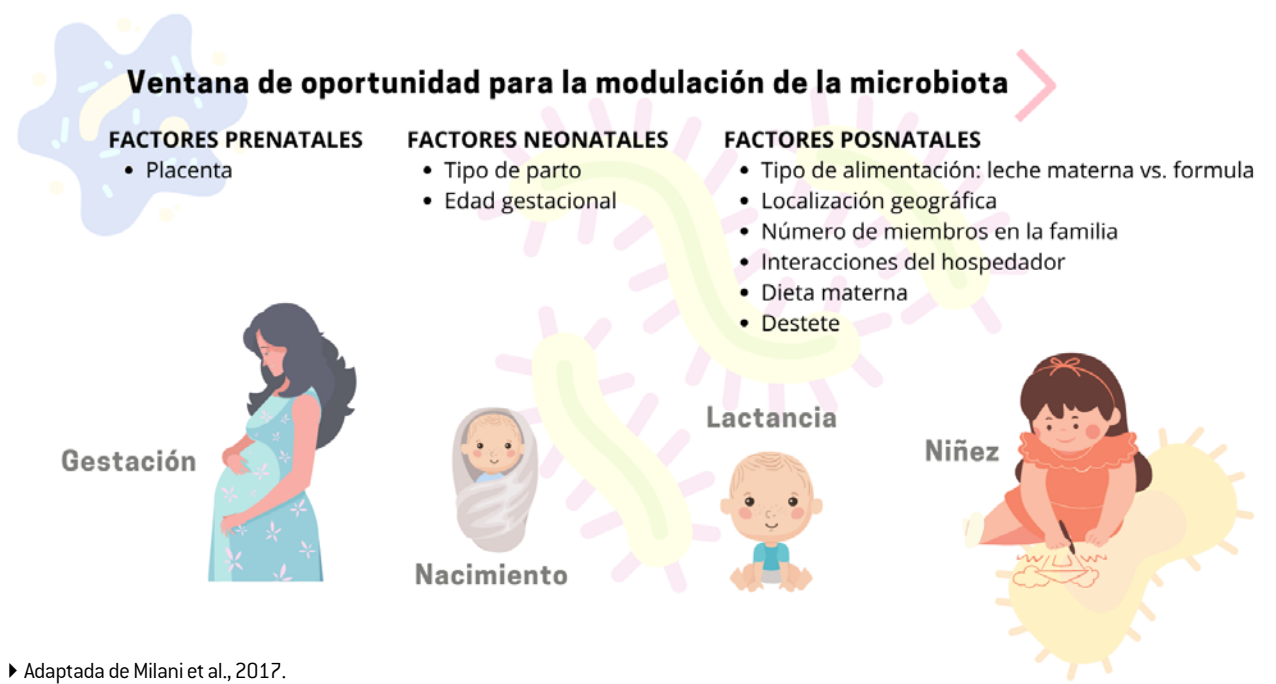
Con respecto a la lactancia, hay numerosas evidencias que muestran que la leche materna contribuye al desarrollo de un microbioma saludable, ya que aporta no solo micronutrientes y compuestos prebióticos que estimulan la colonización y el crecimiento de bacterias comensales, sino también factores inmunológicos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

Hace algunos años se pensaba que la leche materna era estéril. Sin embargo, fueron Jiménez *et al.* quienes demostraron por primera vez, en un experimento en ratones con *Enterococcus* marcados genéticamente, que las bacterias pueden transferirse a los hijos a través de la leche materna¹¹, resultados que fueron confirmados en ensayos posteriores en humanos.¹²

La microbiota intestinal de lactantes alimentados con leche materna es menos diversa, pero contiene altos niveles de especies del género *Bifidobacterium*, como *B. breve*, *B. bifidum* y *B. longum* capaces de metabolizar los oligosacáridos de la leche humana (HMO), así como también, menor presencia de patógenos potenciales que los niños alimentados con fórmula.⁷ Los HMO son polisacáridos complejos que alcanzan el colon sin ser digeridos y estimulan el crecimiento selectivo de ciertas bacterias comensales, como las bifidobacterias, actuando de esta manera como prebióticos. Han sido identificadas más de 200 estructuras de HMO diferentes que dan cuenta de un tercio de los componentes sólidos de la leche materna, que siguen en abundancia a la lactosa y los lípidos y que se hallan en mayor concentración (20 g/l) en el calostro humano.⁹ La suplementación de fórmulas infantiles con galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) en una proporción 9:1, parece simular en cierto grado el efecto de los HMO sobre la microbiota intestinal estimulando el desarrollo de bifidobacterias. La cesación de la lactancia materna, más que la introducción de alimentos sólidos, es el principal factor que produce un cambio de la microbiota de los lactantes.⁸

Es por las razones antes expuestas que los niños nacidos por parto vaginal y alimentados con leche materna en

Figura 1. Ventana crítica de oportunidad para realizar intervenciones que contribuyan a la conformación de una microbiota saludable.



► Adaptada de Milani *et al.*, 2017.

forma exclusiva presentan el microbioma más saludable y beneficioso, con altas concentraciones de *Bifidobacterium* y bajas cantidades de *Clostridioides difficile* y *E. coli*.¹⁰

La edad gestacional es otro factor que afecta el establecimiento de la microbiota, ya que los bebés nacidos antes de término (con menos de 37 semanas de gestación) tienen un sistema inmunitario inmaduro y, frecuentemente, afrontan largas estancias hospitalarias y alimentación artificial o parenteral, factores que interfieren con el establecimiento de una microbiota saludable.⁷

Otros factores relevantes que modulan la microbiota intestinal en la infancia temprana son: el uso de antibióticos prenatales o durante los primeros meses de la vida del bebé, la vida en ambientes rurales, el tamaño de la familia, el número de hermanos y la presencia de mascotas.⁷ Las alteraciones de la microbiota a causa del uso de antibióticos en niños han sido documentadas en varios estudios. Este fenómeno se observó incluso hasta 2 años después de su utilización, con disminución de bifidobacterias y aumento de enterobacterias, sumado a una disminución en la diversidad.⁸ También se ha reportado que los niños cuyas madres reciben profilaxis intraparto por colonización vaginal por estreptococos del grupo B, ruptura prematura de membranas o bien por cesárea exhiben alteraciones en la diversidad y riqueza de su microbiota intestinal.¹³

Técnicas de estudio de la microbiota intestinal

El estudio de la microbiota se realiza mediante técnicas de secuenciación de próxima generación -Next Generation Sequencing- (NGS), a través de dos abordajes: la técnica metataxonómica secuencia el ADN que codifica para el ARN ribosomal 16S y requiere la amplificación previa por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las regiones V3 - V4 de este gen. Los productos amplificados son secuenciados y dichas secuencias, comparadas con bases de datos de microorganismos ya conocidos para determinar las abundancias taxonómicas relativas de cada especie en la muestra. Esta técnica solo detecta células procariotas, porque se amplifica el gen que codifica para el ARN ribosomal 16S únicamente presente en bacterias. En la figura 2, se muestra esquemáticamente este procedimiento.

La metagenómica total (*"shotgun"*) permite secuenciar todo el ADN de una muestra, incluyendo bacterias, hongos, parásitos y arqueas. Implica una fragmentación al azar del ADN, la secuenciación de estos fragmentos y la superposición de los datos generados para obtener las secuencias completas de los microorganismos presentes. Esta técnica permite detectar nuevas especies microbianas y caracterizar grupos de genes funcionales.

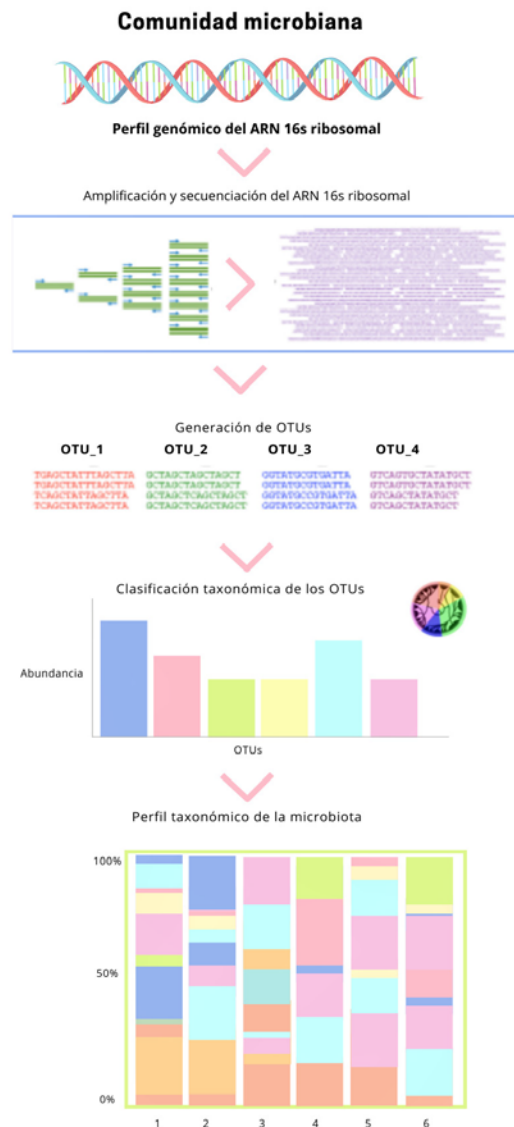
Relación entre disbiosis y enfermedad

Las alteraciones en la composición y abundancia de los componentes de la microbiota intestinal en la vida temprana, denominadas *disbiosis*, han sido asociadas con desórdenes en la salud en niños y adultos; entre ellos, se encuentran: sobrepeso, obesidad, manifestaciones atópicas,

asma, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, síndrome de intestino irritable, enfermedades crónicas inflamatorias y condiciones relacionadas con el neurodesarrollo.¹⁴⁻¹⁶

Muchas de estas enfermedades crónicas, propias de la "vida moderna", conocidas como enfermedades crónicas no transmisibles, están asociadas de forma similar con factores de riesgo medioambientales modernos y se han incrementado en las últimas décadas. En las enfermedades metabólicas como la diabetes, existe una inflamación crónica de bajo grado, que podría ser inducida y perpetuada por estados de disbiosis intestinal, a través de varios mecanismos. Por ejemplo, el pasaje del lipopolisacárido de bacterias patógenas al torrente sanguíneo causa una endotoxemia metabólica que contribuye al estado proinflamatorio. Las

Figura 2. Esquema del análisis de la microbiota intestinal por secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S.



► Adaptada de Milani et al., 2017.

dietas ricas en grasas y bajas en fibra, el sedentarismo y el consumo de azúcares refinados contribuyen a la disbiosis y al aumento de la permeabilidad intestinal que perpetúa este estado inflamatorio.¹⁷

En el caso de las enfermedades alérgicas, aunque factores genéticos pueden afectar la tendencia actual del desarrollo de las mismas, el rápido incremento observado en los últimos 20 años, especialmente en países industrializados, sugiere que deben existir factores ambientales y dietarios. Algunos de ellos han sido identificados: el incremento de los partos por cesárea, el uso de antibióticos y un alto consumo de dietas ricas en grasas y bajas en fibra. El hecho de que todos estos factores a su vez modulen la microbiota intestinal, sugiere un papel de la misma en el desarrollo de las alergias, sobre todo por su importante función en la regulación de la respuesta inmune y la tolerancia oral en la vida temprana.¹⁶

Microbiota intestinal y alergias alimentarias

La alergia es la enfermedad crónica no transmisible de inicio más temprano, que comienza a menudo en los primeros meses de vida. Las alergias alimentarias se presentan como parte de un conjunto de manifestaciones alérgicas, conocidas como “marcha atópica”, en la cual aparece en los primeros meses la dermatitis atópica, seguida por alergias a alimentos entre los 2 y 5 años. Asma y rinitis alérgicas suelen manifestarse en la edad escolar.^{10,14}

Notablemente, la evolución de la epidemia de alergias ha crecido paralelamente con los cambios de estilo de vida en los países industrializados, tales como una progresiva urbanización, programas de sanitización ambiental, uso desmedido de antibióticos, inactividad física y consumo de alimentos altamente procesados. Todos estos cambios han llevado a una reducción de la exposición a microorganismos en la vida temprana y a una pérdida de la diversidad microbiana intestinal.¹⁰

Se han postulado algunas teorías para explicar el gran incremento de las enfermedades alérgicas, especialmente en los países occidentalizados. Una de ellas denominada “Teoría de la Higiene”, propuesta por Strachan a fines de los ‘80, basada en la evidencia epidemiológica de que el contacto temprano con factores ambientales que incrementan una exposición natural a microorganismos (como el parto vaginal, la vida en ambientes rurales, familias numerosas, presencia de mascotas y ausencia de antibióticos) protege contra enfermedades alérgicas y autoinmunes y predispone menos al desarrollo de diabetes, obesidad y enfermedades inflamatorias. Un ambiente extremadamente aséptico aumenta la incidencia de estos trastornos.^{10,14} El hecho de que algunos investigadores hayan sugerido un papel crítico de las señales inmunorregulatorias por parte de las bacterias comensales en la regulación de la hiperreactividad alérgica ha llevado a la reformulación de la hipótesis de la higiene como la de los “viejos amigos”. Esta hipótesis propone que los cambios en el entorno, la dieta y el estilo de vida de los países industrializados, sumados a una alta exposición a antibióticos, un mayor consumo de grasas

saturadas y baja cantidad de fibra, han modificado la microbiota intestinal alterando de este modo el natural desarrollo de la tolerancia inmune, lo cual ha conducido al aumento de las enfermedades alérgicas.¹⁴

En la figura 3, se muestra cuáles son los factores que predisponen al desarrollo de alergias alimentarias en individuos genéticamente susceptibles. En relación con el mecanismo inmunológico de la enfermedad alérgica, se sabe que la dominancia de la respuesta tipo Th2 sobre Th1 es clave en el desarrollo de la misma. Los linfocitos Th2 producen interleucinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que están involucradas en el inicio y perpetuación del fenotipo alérgico. La IL-4 promueve la diferenciación de células T vírgenes a Th2 y el cambio de clase a IgE en los linfocitos B. La IL-5 actúa en la diferenciación y activación de los eosinófilos, y la IL-13 actúa también en el cambio de clase a IgE en los linfocitos B. Además, activa mastocitos y promueve la migración de eosinófilos hacia las mucosas. Por el contrario, una respuesta de tipo Th1 mediada por interferón gamma (IFN- γ) inhibe la respuesta Th2. Como consecuencia, un desbalance inmune entre estas respuestas dirigido hacia un incremento de la respuesta tipo Th2 aumentaría el riesgo de padecer enfermedades alérgicas. La diferenciación hacia Th1 y Th2, así como hacia otros tipos de respuestas T que son relevantes en la enfermedad alérgica, como T regulatoria, Th17 y Th9, está controlada estrictamente por mecanismos epigenéticos.¹⁸

Nagler y otros autores proponen que la tolerancia a antígenos dietarios y por lo tanto la prevención de la alergia alimentaria requieren de una respuesta inmune regulatoria específica de antígeno y una respuesta protectora de la barrera intestinal inducida por las bacterias comensales. La interrupción de la comunicación entre el epitelio intestinal y las células inmunes por alteraciones del microbioma, im-

Figura 3. Factores que predisponen al desarrollo de alergias alimentarias en individuos genéticamente susceptibles.

Factores asociados al estilo de vida moderno



► Adaptada de Iweala and Nagler, 2019.

pacta negativamente en la homeostasis inmune impidiendo el desarrollo de la tolerancia oral.¹⁴

El mecanismo primario de tolerancia oral a antígenos dietarios es la inducción de las células T regulatorias. La respuesta tolerogénica a antígenos lumenales depende de la translocación de estos a través de la barrera epitelial intestinal, en la que intervienen las células M presentes en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Allí son captados por las células presentadoras de antígenos, fundamentalmente las células dendríticas CD103+, las cuales migran hacia los nódulos linfáticos mesentéricos y presentan dichos antígenos a los linfocitos T vírgenes. Esta interacción en presencia de ácido retinoico (metabolito de la vitamina A) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) producidos por las células dendríticas CD103+ favorece la conversión a células T regulatorias foxP3+ específicas de antígeno, productoras de IL-10. Algunas T regulatorias migran hacia el torrente sanguíneo promoviendo tolerancia sistémica y vuelven a la lámina propia donde producen TGF- β , que promueve el cambio de clase a IgA en los linfocitos B. Si bien el papel de la microbiota en la regulación de la captación y la presentación de antígenos aún no ha sido completamente dilucidado, se sabe que en el intestino delgado, donde se absorben los antígenos alimentarios, los fagocitos mononucleares residentes en la lámina propia (MNP) expresan el receptor de quimioquinas CX3CR1. La estimulación microbiana de los *Toll-like receptors* (TLRs) y la señalización mediante la proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD88) inducen la generación de extensiones de las células dendríticas en el intestino delgado. Tanto la presentación de antígenos como la producción de IL-10 por parte de los MNP CX3CR1+ son requeridas para la tolerancia. Se ha observado que, en ratones tratados con antibióticos, los MNP CX3CR1+ pierden la capacidad de expresar IL-10, lo que sugiere un papel crítico de la microbiota en su función.^{13,14}

Los microorganismos comensales también influyen en el desarrollo de linfocitos T regulatorios en forma directa, a través de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que son los productos finales de la fermentación de la fibra dietética por las bacterias comensales, en especial los Firmicutes. Se ha demostrado una correlación positiva entre el número de T regulatorios y la concentración de AGCC. Uno de los mecanismos por los cuales los AGCC protegen contra enfermedades alérgicas es de tipo epigenético, mediante la inhibición directa de deacetilasas de histonas, que regulan la expresión de las células linfoides innatas para la protección de la barrera intestinal, a través de la producción de IL-22. Esta induce la producción de péptidos antimicrobianos por parte de las células de Paneth, y de mucus mediante las células Globet en un intestino con microbiota saludable.¹³ En particular, el acetato es capaz de incrementar el porcentaje y actividad de las células T regulatorias causando un aumento en el estado de acetilación del promotor de foxP3+ a través de la inhibición de la deacetilasa de histona HDAC9. El butirato inhibe estas enzimas afectando la activación, al menos

parcial, del factor de transcripción NF- κ B. La acetilación inducida por los AGCC producidos por *Clostridium*, *Anaerostipes* y *Eubacterium*, así como la metilación del ADN inducida por el folato sintetizado a partir de bacterias comensales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, estimulan el desarrollo y el balance inmune del intestino.¹⁸

Todos estos datos sugieren que las células T regulatorias foxP3+, inducidas en forma específica tanto por los antígenos alimentarios como por las bacterias comensales, cooperan para prevenir la respuesta alérgica a los alimentos.¹³

Alergia a la proteína de leche de vaca (APLV)

La APLV es la alergia alimentaria más común en niños. Se presenta generalmente antes de los 2 años de edad y es reconocida como un indicador de disregulación de la respuesta inmune en la edad pediátrica.^{10,19} De hecho, los niños afectados por APLV en el primer año de vida tienen un riesgo incrementado de desarrollar otras manifestaciones atópicas a lo largo de su vida, así como otros desórdenes crónicos inmunomediados.¹⁵ La incidencia mundial es de 2 a 3 % en el primer año de vida y, en la actualidad, el único tratamiento posible es retirar de la dieta todos los alimentos que contengan proteínas de leche de vaca.^{18,20}

En cuanto a la prevalencia en Argentina, un estudio retrospectivo que analizó casos confirmados de APLV durante 11 años en un hospital universitario detectó una prevalencia acumulada de 0,8 %, con un incremento porcentual de la misma desde 0,4 % en 2004 hasta 1,2 % en 2014, lo que representa un aumento de tres veces en la prevalencia de esta alergia.²¹ La APLV suele tener una evolución favorable con resolución espontánea hacia los 5 años de vida, y, en un 90 % de los casos, antes de los 2 años de vida.²²

Con base en la reacción inmune implicada, se distinguen tres tipos de APLV: mediada por IgE, no mediada por IgE (la mayoría debidas a reacciones de inmunidad celular) y trastornos mixtos.²³ Las primeras se caracterizan por la aparición de forma inmediata (menos de 2 horas desde el contacto) de sintomatología cutánea, como dermatitis atópica, o respiratoria, como rinitis o asma. En estos pacientes, es posible determinar la existencia de anticuerpos IgE específicos en sangre o de una prueba cutánea positiva (*Prick test*). La APLV mediada por IgE es la forma responsable de la expresión más extrema de APLV, que es la anafilaxia. Las formas no mediadas por IgE ocasionan una sintomatología predominantemente digestiva de aparición tardía, cuya forma más común de presentación es la proctocolitis alérgica, y, en la mayoría de los casos, no es posible confirmar la implicación de un mecanismo inmunológico mediante pruebas complementarias.²² Otras formas de presentación son la enteropatía o la enterocolitis inducida por proteína de leche de vaca.²⁴

El diagnóstico de APLV se realiza teniendo en cuenta criterios clínicos y de laboratorio establecidos en consensos nacionales e internacionales.²⁹

Para el diagnóstico de la variante mediada por IgE, se

requiere una historia clínica detallada y compatible, con la aparición de síntomas inmediatos (menos de 2 hs tras la ingesta), manifestaciones cutáneas y/o respiratorias y/o digestivas ligadas a mecanismos IgE: urticaria, angioedema, síndrome de alergia oral, rinoconjuntivitis, sibilancias, hipersensibilidad gastrointestinal inmediata o anafilaxia, más la determinación de sensibilización a proteínas de leche de vaca (mediante test cutáneos o IgE específicas) y mejoría absoluta de los síntomas al suprimir la alimentación a base de proteínas de leche de vaca y derivados.

- **Pruebas cutáneas (Prick test)**

Se coloca una gota de alérgeno (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, caseína, histamina como control positivo y suero salino como control negativo) en la cara anterior del antebrazo; se pincha con lanceta encima de cada gota para que la solución penetre en la piel y se mide el tamaño de la pápula a los 15 minutos. Se considera positivo un tamaño de pápula superior a 3 mm; una pápula superior a 10 mm se asocia con alergia persistente.

- **Determinación de IgE específica en suero**

Se determina la IgE específica para proteínas de la leche de vaca con un punto de corte de 0,35 kU/L. Valores superiores a 2,5 tienen un alto valor predictivo positivo.

- **Prueba de provocación oral**

Su realización puede omitirse si la probabilidad de APLV es alta, con base en los test cutáneos o las IgE específicas positivas, o si la misma tuviera un riesgo elevado de presentar síntomas severos (p. ej., antecedente de anafilaxia).

El diagnóstico de las variantes no mediadas por IgE requiere una historia clínica detallada y compatible, más la prueba de exclusión - provocación. La historia clínica debe evaluar antecedentes familiares y personales de atopía para establecer el riesgo, la asociación y tiempo transcurrido entre la exposición al alimento y la aparición de los síntomas, características y gravedad de los mismos, edad de comienzo, historia nutricional y dietética completa y factores asociados o desencadenantes.

- **Prueba de exclusión - provocación**

Es la prueba *gold standard* para confirmar el diagnóstico de APLV no mediada por IgE. Consiste en excluir la leche de vaca y derivados de la dieta por un período de 4 a 6 semanas, comprobar la resolución de los síntomas y posteriormente volver a introducirla de forma controlada, excepto en los casos de enterocolitis inducida por proteínas. Si el niño está alimentado con pecho exclusivamente, la madre debe reallizar la dieta de exclusión en forma estricta. Si se encuentra recibiendo fórmula artificial, se indica una fórmula extensamente hidrolizada.

Alteraciones de la microbiota intestinal en alergias alimentarias

En humanos, el primer estudio que exploró la hipótesis de que la enfermedad alérgica estaría asociada con una microbiota alterada en niños fue realizado en Suecia en los años 90 utilizando técnicas dependientes de cultivo. Hallaron que los niños alérgicos estaban menos colonizados con

lactobacilos y tenían mayor proporción de bacterias aeróbicas y menos Bacteroidetes que los niños sin alergias.⁶ Sin embargo, este tipo de estudios arrojaban resultados parciales, dado que la mayoría de las bacterias intestinales no pueden ser cultivadas. Desafortunadamente, no se han realizado trabajos en esta área utilizando metagenómica total, pero numerosos estudios basados en secuenciación del ARN ribosomal 16S han demostrado que los niños con alergias alimentarias exhiben una microbiota diferente a la de aquellos sin alergias.²⁶ En la Tabla I, se mencionan los estudios publicados hasta la fecha en alergias alimentarias mediadas por IgE. Los estudios muestran resultados dispares, si bien parecería existir un aumento de *Enterobacteriaceae* y *Bacteroides*, y disminución de bifidobacterias en varios de ellos.

Los estudios en alergia alimentaria no mediada por IgE son aún más escasos. Por ejemplo, Berni Canani *et al.* hallaron disbiosis intestinal caracterizada por enriquecimiento de *Bacteroides* y *Alistipes* en niños con APLV IgE no mediada, en comparación con el grupo control.¹⁵

Por otra parte, estudios en animales de experimentación revelan evidencias acerca del papel de la microbiota en el desarrollo de alergias. Ratones tratados con antibióticos han mostrado predisposición al desarrollo de enfermedad alérgica. Similarmente, ratones libres de microorganismos o *germ-free* (GF) no desarrollan tolerancia inmune y mantienen una respuesta Th2 a antígenos administrados oralmente. Este efecto puede revertirse mediante la reconstitución del microbioma a edad temprana, pero no más tarde en la vida.²⁶ Otra cuestión interesante es que la microbiota intestinal es capaz de transferir susceptibilidad a alergia alimentaria, lo cual fue probado en ratones GF a los cuales se les reconstituía la microbiota con otra proveniente de un modelo de ratones susceptibles a alergia alimentaria.²⁷ Un estudio del grupo de Cathryn Nagler demostró que ratones GF estaban protegidos de desarrollar anafilaxia a la leche de vaca si se colonizaban con microbiota de niños sanos, pero no, con microbiota proveniente de niños con APLV.²⁸

Aunque cada vez surgen más evidencias de asociaciones de la microbiota con enfermedades alérgicas, algunos estudios no han hallado diferencias en la microbiota de niños con estos cuadros o han encontrado asociación con ciertos fenotipos alérgicos, pero no con otros.⁶ Si bien sabemos que la estructura de la microbiota en los primeros 6 meses de vida es relevante en el desarrollo de alergias, y que la disbiosis intestinal podría influenciar tanto la aparición como el curso de las alergias alimentarias, aún no se han detectado taxones específicos asociados con estas patologías.²⁶ Esto puede deberse tanto a la heterogeneidad en los diseños experimentales como al momento de la toma de muestra, los métodos utilizados para la caracterización de la microbiota o los diferentes tipos de alergia estudiados, lo cual dificulta establecer una clara asociación entre taxones específicos y el desarrollo de alergias.

Algunos autores han hallado que una disminución de la

Tabla I. Estudios de microbiota intestinal en pacientes pediátricos con y sin alergia alimentaria mediada por IgE.

	Alergia alimentaria	Diversidad microbiana	Alteraciones en taxas
Ling <i>et al.</i> 2014 (n=34) ³¹	Leche de vaca, huevo, pescado, trigo, maní	Igual	Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria Firmicutes
Chen <i>et al.</i> 2015 (n=23) ³²	Huevo, leche de vaca, trigo, maní, soja	Disminuida	Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria <i>Veillonella</i>
Azad <i>et al.</i> 2015 (n=12) ³³	Leche de vaca, huevo, maní	Igual	<i>Bacteroidaceae</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i>
Berni Canani <i>et al.</i> 2016 (n=39) ³⁴	Leche de vaca	NR	<i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
Inoue <i>et al.</i> 2017 (n=4) ³⁵	Huevo, trigo, soja, leche de vaca, mani	NR	<i>Lachnospira</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Sutterella</i> <i>Dorea</i> , <i>Akkermansia</i>
Savage <i>et al.</i> 2018 (n=14) ³⁷	Leche de vaca, trigo, huevo, maní, soja	Igual	<i>Citrobacter</i> , <i>Oscillospira</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Dorea</i>
Bunyavanich <i>et al.</i> 2016 (n=226) ¹⁹	Leche de vaca	NR	Bacteroidetes, <i>Enterobacter</i>
Fazlollahi <i>et al.</i> 2018 (n=141) ³⁶	Huevo	NR	<i>Lachnospiraceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i>
Dong <i>et al.</i> 2018 (n=60) ²⁰	Leche de vaca	Disminuida	<i>Bacteroidaceae</i>
Thompson <i>et al.</i> 2010 (n=16) ³⁸	Leche de vaca	NR	<i>Lactobacillaceae</i> <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>

► NR, no reportada. Adaptada de Di Costanzo, 2020.

diversidad microbiana precede al desarrollo de eczema, sensibilización atópica, rinitis alérgica y asma, lo cual sugiere que esta pérdida de diversidad podría ser incluso más importante como factor predictivo que la presencia o ausencia de determinados taxones microbianos.⁶

Discusión y perspectivas futuras

La bibliografía consultada evidencia que, a pesar de los avances tecnológicos en secuenciación y análisis bioinformático, aún no se conoce con exactitud qué microorganismos son cruciales en el desarrollo de enfermedades alérgicas, y aunque las más estudiadas son la dermatitis atópica, el eczema, la rinitis alérgica y el asma, también se obtuvieron resultados controvertidos. Esto sugiere la necesidad de seguir avanzando en el estudio de la microbiota de poblaciones pediátricas y en el conocimiento de las alteraciones que se presentan en niños

con APLV teniendo en cuenta las particularidades etarias y regionales.

Por otra parte, es importante tener presente que la programación inmune inducida por la microbiota intestinal ocurre en los primeros años de vida. Este periodo constituye la ventana en la cual las intervenciones serían efectivas en la prevención de las alergias.

La evidencia acumulada sobre la influencia de la microbiota intestinal y sus metabolitos en el desarrollo de alergias provee una base científica para la creación de estrategias innovadoras para la prevención y el tratamiento de las mismas, como es el uso de ciertos probióticos. Sin embargo, debido a los factores ya mencionados que intervienen en la conformación de la microbiota, es importante tener en consideración los parámetros etarios, étnicos, geográficos, de estilo de vida y de alimentación para el estudio y caracterización de la microbiota

saludable en una determinada población, ya que su conocimiento será crítico para poder predecir alteraciones relacionadas con ciertas enfermedades.

Si bien algunos ensayos clínicos han demostrado que la manipulación de la microbiota intestinal con probióticos o prebióticos podría ser efectiva en la prevención primaria de la dermatitis atópica, aún no hay evidencias suficientes en otras condiciones alérgicas como las alergias alimentarias.

Por todo lo expuesto, existe un creciente interés en descubrir biomarcadores basados en el microbioma que sean capaces de predecir enfermedades y que puedan ser utilizados a futuro para proponer estrategias terapéuticas y preventivas.

Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer ningún conflicto de interés.

Referencias bibliográficas

- Berg G, Rybakova D, Fisher D, Cernava T, Champonier Verges M, Charles T et al. Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 2020, 8:103-125. DOI: 10.1186/s40168-020-00875-0
- Allaband C, McDonald D, Vázquez-Baeza Y, Minich J, Tripathi A, Brenner D et al. Studying, analyzing and interpreting gut microbiome data for clinicians. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019, 17(2): 218-230. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.09.017
- Ley R, Peterson D and Gordon J. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006, 124: 837-854. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.017
- Rutayisire E, Huang K, Liu Y and Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol* 2016, 16: 86-98. DOI: 10.1186/s12876-016-0498-0
- Pascal M, Pérez-Gordo M, Caballero T, Escribese M, López Longo MN, Luengo O et al. Microbiome and allergic diseases. *Front Immunol* 2018, Vol 9; 1584: 1-9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01584
- Bridgman S, Kozyskij A, Scott J, Becker A and Azad M. Gut microbiota and allergic disease in children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016, 116: 99-105. DOI: 10.1016/j.anaai.2015.10.001
- Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J et al. The first colonizers of the human gut: composition, activities and Health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol and Biol Molecular Rev* 2017; 81(4): 1-67. DOI: 10.1128/MMBR.00036-17
- Derrien M, Álvarez As and de Vos W. The gut microbiota in the first decade of life. *Trends in Microbiology* 2019, 27(12): 997-1008. DOI: 10.1016/j.tim.2019.08.001
- Akagawa S, Akagawa Y, Yamanouchi S, Kimata T, Tsuji S and Kaneko K. Development of the gut microbiota and disbiosis in children. *Bioscience of Microbiota* 2021, 40(1): 12-18. DOI: 10.12938/bmfh.2020-034
- Peroni D, Nuzzi G, Trambusti I, Di Cicco ME and Comberiati P. Microbiome composition and its impact on the development of allergic diseases. *Front Immunol* 2020, 11 [700]: 1-8. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00700
- Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 2008, 159: 270-274. DOI: 10.1016/j.resmic.2007.12.007
- Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, Rodríguez-Baños M, Del Campo R, Fernández L et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Human Lactation* 2012, 28(1): 36-44. DOI: 10.1177/0890334411424729
- Shu SA, Yuen A, Woo E, Chu K, Kwan H, Yang G et al. Microbiota and food allergy. *Clin Rev Allerg and Immunol* 2019, 57(1): 83-97. DOI: 10.1007/s12016-018-8723-y
- Iweala O and Nagler C. The microbiome and food allergy. *Annu Rev Immunol* 2019, 37: 377-403. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041621
- Berni Canani R, De Filippis F, Nocerino R, Paparo L, Di Scala C, Cosenza L et al. Gut microbiome composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Scientific reports* 2018, 8; 12500: 1-10. DOI: 10.1038/s41598-018-30428-3
- Sestito S, D'Auria E, Baldassarre ME, Salvatore S, Tallarico V, Stefanelli E et al. The role of prebiotics and probiotics in prevention of allergic diseases in infants. *Front Pediatr* 2020; 8 [583946]: 1-28. DOI: 10.3389/fped.2020.583946
- Noce A, Marrone G, Di Daniele F, Ottaviani E, Wilson Jones G, Bernini R et al. Impact of Gut microbiota on onset and progression of chronic non-communicable diseases. *Nutrients* 2019; 11(1073): 1-35. DOI: 10.3390/nu11051073
- Acevedo N, Alhamwe BA, Caraballo L, Ding M, Ferrante A, Gran H et al. Perinatal and Early-Life Nutrition, Epigenetics, and Allergy. *Nutrients* 2021, 13 [724]: 1-50. DOI: 10.3390/nu13030724
- Bunyanavich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P et al. Early-life gut microbiome and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol* 2016, 138(4): 1122-1130. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.03.041
- Dong P, Feng JJ, Yan DY, Lyu YJ and Xu X. Early-life gut microbiome and cow's milk allergy- a prospective case-control 6 month follow-up study. *Saudi J of Biol Sciences* 2018, 25:875-880. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.11.051
- Mehaudy R, Parisi C, Petriz N, Eymann A, Jauregu MB and Orsi M. Prevalencia de alergia a la proteína de leche de vaca en niños en un hospital universitario de la comunidad. *Arch Arg Ped* 2018, 3:216-233. DOI: 10.5546/aap.2018.eng.219
- Bozzola M, Marchetti P, Cosentino M, Corti M, Petriz N and Parisi C. Alergia a la proteína de la leche de vaca. Evaluación de su resolución espontánea por medio de desafíos doble ciego placebo controlados. *Arch Allerg e Immunol Clin* 2015, 46(2): 44-48. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-916286>
- Díaz M, Guadamuro L, Espinosa-Martos I, Mancabelli L, Jiménez S, Molinos-Norniella C et al. Microbiota and derived parameters in fecal samples of infants with non-IgE cow's milk protein allergy under a restricted diet. *Nutrients* 2018, 10 [1481]: 1-11. DOI: 10.3390/nu10101481
- Meninni M, Fierro V, Di Nardo G, Pecora V and Fiocchi A. Microbiota in non-IgE mediated food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2020, 20:323-328. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000644
- Rachid R and Chatila T. The role of the gut microbiota in food allergy. *Curr Opin Pediatr* 2016, 28: 748-753. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000427
- Di Costanzo M, Carucci L, Berni Canani R and Biasucci G. Gut Microbiome Modulation for Preventing and Treating Pediatric Food Allergies. *Int J Mol Sci* 2020; 21 [5275]: 1-17. DOI: 10.3390/ijms21155275
- Noval Rivas M, Burton O, Wise P, Zhang Y, Hobson S, García Lloret M et al. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2013, 131:201-212. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.10.026
- Feehley T, Plunkett C, Bao R, Hong SM, Culleen E, Belda-Ferre P et al. Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nature Medicine* 2019, 25: 448-453. DOI: 10.1038/s41591-018-0324-z
- Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna S, von Berg A, Beyer K et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 1-125. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2010.01068.x
- Mitselou N, Hallberg J, Stephansson O, Almqvist C, Melén E, Ludvigsson J et al. Cesarean delivery, preterm birth, and risk of food allergy: Nationwide Swedish Cohort study of more than 1 million children. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142(5): 1510-1516. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.06.044
- Ling Z, Li Z, Cheng Y, Luo Y, Tong X, Yuang L et al. Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl Environ Microbiol* 2014, 80(8): 2546-54. DOI: 10.1128/AEM.00003-14
- Chen CC, Chen KJ, Kong MS, Chang HJ and Huang JL. Alterations in the

- gut microbiota of children with food sensitization in early life. *Pediatr Allergy Immunol* 2016, 27:254-262. DOI: 10.1111/pai.12522
33. Azad MB, Konya T, Guttman DS, Field CJ, Sears MR, Hayglass KT et al. Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clin Exp Allergy* 2015, 45(3): 632-43. DOI: 10.1111/cea.12487
34. Berni Canani R, Sangwan N, Steffa A, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formulae expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J* 2016, 10:742-750. DOI: 10.1038/ismej.2015.151
35. Inoue R, Sawai T, Sawai C, Nakatani M, Romero-Pérez G, Ozeki M et al. A preliminary study of gut disbiosis in children with food allergy. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2017, 81(12): 2396-2399. DOI: 10.1080/09168451.2017.1383849
36. Fazlollahi M, Chun Y, Grishin A, Wood RA, Burks AW, Dawson P et al. Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy* 2018, 73:1515-24. DOI: 10.1111/all.13389
37. Savage et al. A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in childhood. *Allergy* 2018, 73:145-152. DOI: 10.1111/all.13232
38. Thompson-Chagoyan O, Vieites J, Maldonado J, Edwards C and Gil A. Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy – a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol* 2010, 21: 394-400. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2009.00961.x



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución-No Comercia- Compartir Igual 4.0 Internacional · Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que: se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.