



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Campo disciplinario: Epidemiología clínica

Campo de conocimiento: Ciencias de la Salud

Título de trabajo

“Diferencias en la composición de la microbiota intestinal de escolares alérgicos y no alérgicos de la Ciudad de México”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Nayely Reyes Noriega

Tutor principal:

Dra. Blanca Estela del Río Navarro
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Comité tutorial:

Dra. Elsy Maureen Navarrete Rodríguez
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dra. Sofía Morán Ramos
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad Universitaria, CD. MX., octubre 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres, quienes me han impulsado con amor, paciencia y cariño a lograr mis metas y seguir adelante.

A mis hermanas y sobrinos Emiliano y Frida, quienes son una motivación para mi y me llenan de amor.

A mis tutoras, la Dra Blanca Estela del Río Navarro, Dra Elsy Maureen Navarrete Rodríguez y la Dra Sofía Morán Ramos, quienes son un ejemplo de profesionales comprometidas con la ciencia y han sido mi guía en este proceso de aprendizaje.

A mis maestros de la maestría, quienes siempre mostraron disposición y compromiso para enseñar.

A Manuel, quien siempre me apoya e inspira a seguir mis sueños. Gracias por ser mi equipo y caminar conmigo.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para la realización de este proyecto.

Índice

Resumen.....	1
Antecedentes.....	2
Epidemiología de las enfermedades alérgicas.....	2
Generalidades de las enfermedades alérgicas.....	3
Relación de la microbiota intestinal con el sistema inmunológico.....	5
Factores relacionados con la microbiota intestinal y alergia.....	7
Tabla de evidencia.....	12
Planteamiento del problema.....	14
Justificación.....	15
Pregunta de investigación.....	15
Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	16
Objetivo secundario.....	16
Hipótesis.....	16
Metodología.....	16
Análisis estadístico.....	30
Resultados.....	31
Discusión.....	34
Conclusiones.....	37
Limitaciones.....	38
Anexos.....	39
Referencias bibliográficas.....	46

Resumen

~ Antecedentes: Las enfermedades alérgicas son las condiciones crónicas más frecuentes en la infancia, causadas por respuestas aberrantes del sistema inmunológico contra antígenos ambientales “inocuos” (alérgenos) en individuos susceptibles y de origen multifactorial. México reportó en 2019, un incremento significativo en la prevalencia de estas enfermedades alérgicas en escolares de 6-7 años de acuerdo al estudio Global Asthma Network, representando una carga económica en salud pública. (Del-Rio-Navarro et al., 2020) (Ellwood et al., 2017). Recientemente, se ha descrito la importancia de la microbiota intestinal en la modulación y maduración del sistema inmunológico como factor que pudiera predisponer a la presencia de dichas enfermedades en edad escolar. Sin embargo, no hay estudios hasta el momento que describa los perfiles bacterianos asociados con estas enfermedades en escolares mexicanos.

~ Objetivo general: Describir y comparar la composición de la microbiota intestinal de escolares alérgicos y no alérgicos de 6 a 10 años de la Ciudad de México.

~ Metodología y análisis estadístico: Se trata de un estudio transversal anidado a una cohorte llamada “Red Global de Asma Fase II”, que tiene como objetivo la detección de síntomas de alergia en escolares de 6 a 10 años del área norte de la Ciudad de México. Se les realizaron pruebas auxiliares de diagnóstico para alergia y se realizó el análisis de la composición de microbiota intestinal en muestras fecales a través de la secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal, región V3-V4. Se obtuvieron las medianas de la abundancia relativa bacteriana del grupo de alérgicos y no alérgicos y se compararon dichos resultados con la prueba U de Mann-Whitney. Finalmente se realizó una correlación de Spearman en busca de asociaciones entre la abundancia bacteriana y covariables, además de los niveles séricos de inmunoglobulina E, considerando un valor de $p < 0.05$ como significativo.

~ Resultados: Se analizaron los datos de un total de 21 pacientes, de los cuales 12 fueron alérgicos (57.1%) y 9 controles. A nivel de familia, hubo diferencias significativas entre los grupos, donde los alérgicos presentaron mayor cantidad (abundancia relativa) de *Paraprevotellaceae* ($p=0.047$), *Planococcaceae* ($p=0.043$), *Staphylococcaceae* ($p=0.032$), *Turcibacteraceae* ($p=0.033$), *Peptostreptococcaceae* ($p=0.028$) y *Burkholderiaceae* ($p=0.003$). La familia *Staphylococcaceae* y el género *Staphylococcus* mostraron una asociación negativa moderada con la duración de la lactancia materna ($p=0.025$). El género *Ruminococcus* mostró una asociación negativa moderada con la edad ($p=0.042$) y una asociación negativa fuerte con el índice de masa corporal ($p=0.001$). En cuanto a la correlación de la abundancia relativa bacteriana y los niveles de IgE séricos, ninguna bacteria mostró una asociación significativa; sin embargo, *Planococcaceae* y *Faecalibacterium* mostraron una tendencia positiva moderada.

~ Conclusión: Esta investigación nos permitió estudiar e identificar diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes alérgicos y no alérgicos, como potenciales contribuyentes al estado inflamatorio. Si bien, los efectos inmunomoduladores o exacerbadores de la respuesta inflamatoria aún se encuentran en estudio, consideramos que las asociaciones reportadas en esta investigación son de gran valor para comprender la fisiopatología de la enfermedad a nivel microbiológico y su potencial aplicación a nivel clínico.

~Antecedentes

Epidemiología de las enfermedades alérgicas

Las enfermedades alérgicas son las condiciones crónicas más frecuentes en la infancia, de etiología multifactorial, las cuales incluyen asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica. Dichas enfermedades pediátricas han incrementado su prevalencia en países industrializados en la última década, afectando el 20% de la población mundial. (www. ginasthma.org) (Downs et al., 2001) (Anandan et al., 2010)

En México, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el 7% de la población padece asma (aproximadamente 8.5 millones de mexicanos) y en las últimas cuatro décadas, la prevalencia ha ido en incremento de forma importante, principalmente en las ciudades industrializadas. (Vázquez García & Salas Hernández, 2017)

En 2010, el Estudio de la carga mundial de la enfermedad (Global Burden Disease) reportó que el número de infecciones en escolares ha ido en descenso; sin embargo, la discapacidad por enfermedades crónicas, como son las enfermedades alérgicas, se ha convertido en un importante problema para el sistema de salud. (The Global Burden of Disease: Generating Evidence, Guiding Policy. Seattle, WA: IHME, 2013).

El Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Infancia (ISAAC), el cual inició en 1991, fue el primer estudio epidemiológico, internacional y multicéntrico en estudiar la prevalencia de enfermedades alérgicas en diferentes países del mundo. Se llevó a cabo de 1992 al 2003, periodo durante el cual se aplicó un cuestionario validado en múltiples países (incluido México), traducido a 53 idiomas y estandarizado, con el propósito de evaluar la reproducibilidad de las preguntas a dos grupos de edad: escolares de 6-7 años y adolescentes de 13-14 años. Los participantes fue elegidos de forma aleatoria en un área geográfica determinada.

Dicho proyecto abarcó tres fases, donde la Ciudad de México participó en la última fase. Los objetivos principales incluyeron analizar las tendencias actuales de la prevalencia de síntomas de asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica en los centros que habían participado en la fase I e incluir países que no participaron en las fases previas. El estudio de prevalencia global y gravedad de síntomas de asma en la fase tres de ISAAC incluyó a 388 811 escolares de 6 a 7 años en 144 centros de 61 países. Esta fase reportó un incremento importante en la prevalencia de síntomas del asma y la gravedad de los mismos, especialmente en los de bajos y medianos ingresos. En México, se reportaron prevalencias similares a las reportadas internacionalmente, con una amplia variabilidad en centros en la misma ciudad o estado y mayor prevalencia de síntomas alérgicos en regiones tropicales. Con respecto a la Ciudad de México área norte (con más de 6000 niños y adolescentes de cuatro delegaciones), se reportó una prevalencia de síntomas de asma en adolescentes de 9.9% y en escolares 6.8%, semejante a las delegaciones del centro de la Ciudad de México. En cuanto a la mortalidad por asma, se ha observado que es más frecuente en invierno, con predominio discreto en las mujeres, y México es uno de los países con tasas más elevadas. (B. Del-Rio-Navarro et al., 2006) Cabe recalcar que la gravedad de síntomas de asma (valorada por el número de crisis (>4 en un año), la presencia de tos con disturbios del sueño, o la incapacidad para hablar durante las exacerbaciones) en Latinoamérica fue cercana al 50%. (Lai et al., 2009)

Dichos resultados publicados por ISSAC permitieron exponer, a través de evidencia médica-científica, el aumento en la prevalencia de asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica a nivel mundial,

emitiendo una serie de recomendaciones para mejorar el costo-efectividad en salud y la importancia de dar prioridad a las enfermedades respiratorias crónicas de la infancia.

Global Asthma Network

Debido a la alta prevalencia de síntomas relacionados con enfermedades alérgicas en ambos grupos de estudio a nivel internacional y en países en desarrollo como México, en 2012 se dio continuidad al estudio ISAAC, a través de Global Asthma Network o Red Global de Asma (GAN, por sus siglas en inglés). Este estudio epidemiológico internacional, incorporó la metodología de ISAAC, adaptando el cuestionario de síntomas de alergia. (Asher et al., 2017)

México integró a este proyecto, registrando 18 centros en el país (Ciudad de México área norte, Guadalajara, Ciudad Victoria, Mexicali, San Luis Potosí, Tijuana, Toluca área urbana, Toluca área rural, Chihuahua, Ciudad Juárez, Michoacán, Xalapa, Córdoba, Puerto Vallarta, Mérida, Aguascalientes y Matamoros).

En agosto de 2015, se inició a Fase I del estudio, el cual fue sometido y aprobado por el Comité de Investigación, Ética y Bioseguridad del Hospital Infantil de México Federico Gómez con el nombre "Red Global de Asma Fase I Encuesta global: Prevalencia, gravedad, manejo y factores de riesgo" el día 15 de diciembre de 2016, con el número de protocolo HIM 2016-065.

México obtuvo datos de 14 centros participantes y finalizó en 2019. De acuerdo a los resultados obtenidos en la fase uno de dicho estudio, México tuvo un incremento significativo en la prevalencia de síntomas de asma (10.2%) y rinitis alérgica (17.9%) en el grupo de escolares. (Del-Rio-Navarro et al., 2020) Por dicha razón, en la Ciudad de México inició la fase II del estudio Global Asthma Network, el cual tiene como objetivo estimar a través de pruebas objetivas la prevalencia de asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica y la gravedad de los síntomas.

Generalidades de enfermedades alérgicas

El concepto de atopia se refiere a la susceptibilidad personal o familiar a producir anticuerpos denominados inmunoglobulina E (IgE) y sensibilización en respuesta a desencadenantes ambientales, y que esta fuertemente influenciado por factores genéticos. (Johansson et al., 2004) Por otro lado, alergia es la reacción de hipersensibilidad estimulada por mecanismos inmunológicos específicos. La alergia puede ser mediada por anticuerpos o bien por células. En la mayoría de los pacientes con síntomas de alergia en las mucosas de la vía aérea o gastrointestinal, presentan anticuerpos del isotipo IgE específicos para un alérgeno, por lo que se denomina alergia mediada por IgE. Debido a la hiperreactividad inducida por la inflamación, los síntomas de alergia pueden ser exacerbados por factores no inmunológicos como infecciones, irritantes, ejercicio, etc. (Johansson et al., 2004)

Dichas enfermedades inflamatorias crónicas son causadas por respuestas aberrantes del sistema inmunológico contra antígenos ambientales "inocuos" (alérgenos) en individuos susceptibles. La respuesta inmune por las células T cooperadoras tipo 2 (Th2) y la secreción de citocinas como la interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13) y la interleucina 5 (IL-5) contribuyen a la inducción y mantenimiento de estas enfermedades. El infiltrado inflamatorio que acompaña a las respuestas de los linfocitos Th2, está compuesto principalmente por eosinófilos, y otras células como mastocitos, basófilos, neutrófilos, monocitos y macrófagos. La activación celular y la liberación de mediadores inflamatorios se evidencia por la degranulación de los mastocitos y la migración de eosinófilos. (Djukanović et al., 1990)

La sensibilización alérgica también requiere una interacción entre las células dendríticas (DC) presentadoras de antígeno tanto en vía aérea como en piel, y de las células T especializadas. Este mecanismo implica el procesamiento del alérgeno en péptidos pequeños y la selectiva presentación del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II de estos péptidos procesados a los receptores de células T vírgenes, lo que resulta en la diferenciación de las células T en células T de tipo TH2. (Holgate, 2012) Estas células T de tipo TH2 secretan las citocinas pro-alérgicas, IL-3, IL 4, IL-5, IL-9, IL-13 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que a su vez conduce a las respuestas de IgE, de mastocitos y de eosinófilos, responsables de los síntomas de asma. (Kay, 2006)

Este proceso inflamatorio tiene implicaciones fisiológicas y clínicas heterogéneas, dependiendo el órgano afectado. En el caso de asma, la pared de la vía aérea se hipertrofia en proporción a la gravedad y la duración de la inflamación. Esta remodelación implica la hipertrofia del músculo liso de la vía aérea, engrosamiento de la lámina reticular subepitelial, deposición de matriz a lo largo de la pared de la vía aérea, angiogénesis, proliferación neuronal y metaplasia epitelial de la mucosa; un proceso que implica la aparición de células mucosas en nuevas áreas de la vía aérea y aumento de la producción de moco. (Bjerner, 2014) Por lo tanto, la definición de asma en mayores de 6 años requiere una combinación de dos o más síntomas clínicos (sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho, tos) con una limitación reversible documentada del flujo aéreo y/o hipersensibilidad de las vías respiratorias (espirometría: FEV1 aumenta en más del 12% y 200 ml (en niños > 12% del valor previsto) después de inhalar un broncodilatador) (Holgate et al., 2015) (Vázquez García & Salas Hernández, 2017)

La rinitis alérgica se debe a una reacción alérgica que inicia a partir de la inhalación de un alérgeno, que al ponerse en contacto con la mucosa nasal, es fagocitado y procesado por las células dendríticas, presentándolo mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II a las células T cooperadoras. El viraje a un linfocito Th2, por medio de las interleucinas IL-4 e IL-13, estimula la secreción de IgE. En la fase temprana, la liberación de histamina y otros mediadores provocan los síntomas principales: estornudo, prurito nasal y rinorrea. Las fibras nerviosas del sistema parasimpático secretan acetilcolina, estimulando la actividad glandular y la liberación de cininas (péptidos activos con efectos vasodilatadores y liberación de óxido nítrico) los cuales producen edema y dolor local. (Duncan et al., 2000) También se liberan otros mediadores inflamatorios como leucotrienos y prostaglandinas produciendo aumento de la permeabilidad capilar, edema y secreción de las glándulas mucosas. La infiltración de diferentes células (principalmente eosinófilos), provoca la obstrucción nasal. El diagnóstico se basa en la concordancia entre una historia típica de síntomas nasales (rinorrea, estornudos, obstrucción nasal y prurito) y pruebas de diagnóstico, que se basan en la demostración de una reacción inflamatoria a un alérgeno específico en la piel (pruebas cutáneas) o en la sangre (IgE específica) (Larenas-Linnemann et al., 2014)

Finalmente, la dermatitis atópica es una enfermedad heterogénea, que se desencadena por factores ambientales en individuos con susceptibilidad genética. (Weidinger et al., 2018) El antecedente familiar de atopia predispone a presentar manifestaciones clínicas de dermatitis atópica en edad pediátrica. A pesar de que múltiples genes se han visto asociados con las vías de señalización del sistema inmune innato, la activación de células T y su diferenciación a células Th2, poco se conoce al respecto. La mutación más estudiada es la relacionada con el gen FLG (exón 3), el cual da lugar a la proteína filagrina. (Irvine et al., 2011) Esta mutación causa alteraciones en la diferenciación de los queratinocitos, lo cual da como consecuencia xerosis, descamación, hiperlinealidad y engrosamiento de la piel, lesiones características de dermatitis atópica. (Jungersted et al., 2010)

La barrera epidérmica juega un papel importante en la dermatitis atópica. La disrupción de esta barrera causa inflamación, debido a desregulación de las proteínas inmunomoduladoras, incluyendo la liberación de interleucinas (IL-1 β , IL-25, IL-33) y lipoproteína tímica estromal (TSLP, por sus siglas en inglés). Lo anterior, da como consecuencia aumento de pH, retención disminuida de agua, irritabilidad, aumento en la permeabilidad sobre moléculas de bajo peso molecular y aumento de la susceptibilidad a infecciones (Weidinger et al., 2018) La mayoría de los pacientes con dermatitis atópica manifiestan hipersensibilidad mediada IgE hacia aeroalérgenos, proteínas alimentarias, antígenos antimicrobianos y autoantígenos derivados de los queratinocitos. (Gittler et al., 2012a)

En escolares y adolescentes (2 a 16 años), las lesiones de dermatitis atópica se caracterizan por exudado y placas de liquenificación en zonas de flexión, especialmente en región antecubital y fosa poplítea, muñecas, tobillos, cuello y párpados. A los lados del cuello puede existir pigmentación reticular y signos de rascado, por lo que el diagnóstico de esta enfermedad es clínico. (Wolter & Price, 2014)

Relación de la microbiota intestinal con el sistema inmunológico

Se ha estimado que el cuerpo humano se compone de 3×10^{13} células eucariontes y 4×10^{13} bacterias colonizadoras, las cuales ejecutan acciones coordinadas que tienen impacto no solo en la digestión de alimentos a través del cual otorga sustratos a las células epiteliales intestinales, también en el metabolismo hepático y en la modulación de diversas respuestas inmunológicas necesarias para sobrevivir. (Sender et al., 2016) (Milani et al., 2017), (Ley et al., 2008)

El establecimiento temprano de la microbiota intestinal y su interacción con el huésped a través de múltiples estímulos antigénicos, constituyen un evento clave para que se logre la maduración y equilibrio apropiado de la microbiota intestinal, del sistema inmunológico y otros órganos distales, necesarios para la supervivencia del ser humano y así, evitar enfermedades a corto y largo plazo. (Gensollen et al., 2016) (Clarke et al., 2014) (Heijtz et al., 2011) (Neuman et al., 2015) Por otro lado, la microbiota intestinal juega un papel fundamental en la inducción a la tolerancia inmunológica, ya que cepas específicas han demostrado estimular la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , los cuales contrarrestan el fenotipo Th2, responsable de causar atopia y síntomas de alergia. (Hansen et al., 2000) (Sanfilippo et al., 2000) Al no ejercer estas funciones la microbiota intestinal, se produce una respuesta Th2 constante, promoviendo la producción de células B secretoras de IgE. (Sanfilippo et al., 2000)

La inestabilidad de la microbiota durante la infancia hace que la estructura de la comunidad microbiana sea más susceptible a los factores ambientales. El hecho de que la colonización microbiana coincida con el periodo limitado de maduración del sistema inmunológico, sugiere que el sistema inmune es receptivo a los estímulos y señalizaciones emitidas por las bacterias colonizadoras y que ésta influencia pudiera ser duradera, creando una ventana de oportunidad para la maduración, expansión y tolerabilidad del sistema inmune en respuesta a antígenos externos por parte de las células T. (Koenig et al., 2011) (Ridge et al., 1996)

Estudios experimentales en animales ha permitido estudiar la relación entre el sistema inmunológico y la microbiota intestinal, así como los mecanismos por los cuales se desarrollan diferentes enfermedades. Ensayos comparativos entre roedores gnotobióticos y roedores colonizados, han permitido identificar diferencias entre ambos grupos, como el aumento en tamaño del ciego por la acumulación de moco no degradado, motilidad intestinal reducida, alteraciones morfológicas del epitelio intestinal donde se observan vellosidades largas con criptas pequeñas y la reducción de

péptidos antimicrobianos. (Loesche, 1969) (Abrams & Bishop, 1967) (Abrams et al., 1963) (Salzman et al., 2003) (Vaishnava et al., 2008)

Por otro lado, la ausencia de bacterias comensales tienen efectos negativos en el desarrollo de órganos del sistema inmune, incluyendo el desarrollo del tejido linfoide del bazo, timo, nodos linfáticos mesentéricos y placas de Peyer. (Macpherson & Harris, 2004) A su vez, alteraciones estructurales próximas a la mucosa sugiere que existe interacción del intestino con comunidades específicas de microbios, los cuales modulan el desarrollo de tejidos linfoide asociado al intestino (GALT). (Bauer et al., 1963) Esto trae como consecuencia una disminución en los niveles de células T CD4+ y CD8+ intestinales así como una reducción en el número de linfocitos intraepiteliales que expresan receptores $\alpha\beta$ de células T. (Umesaki et al., 1993)

Las células T reguladoras son una fuente importante de interleucina 10 (IL-10) y son capaces de reconocer antígenos derivados de bacterias comensales, lo cual permite el mantenimiento de homeostasis. (Lathrop et al., 2011) (Cebula et al., 2013) De forma interesante, se ha documentado un balance sistémico entre las células TH₁ y TH₂ al colonizar un ratón gnotobiótico con *Bacteroides fragilis*, gracias a una molécula microbiana llamada polisacárido A (PSA), la cual estimula la expresión de interferón γ (IFN γ), citocina relacionada con expresión del subtipo TH₁ de T CD4+ e induce la producción de IL-10 a través de su unión con receptor tipo Toll-2 (TLR2), lo cual mejora la capacidad supresora de las células T reguladoras. (Mazmanian et al., 2005) (Round et al., 2011)

Por otro lado, cepas de Clostridium de los grupo IV y XIVa inducen la expresión de TGF- β de las células epiteliales intestinales, lo cual contribuye a la diferenciación de las células T reguladoras. (Atarashi et al., 2011) Similar a lo anterior, la presencia de las bacterias filamentosas segmentadas han sido relacionadas con el desarrollo de células TH17, las cuales estimulan la secreción de interleucina 17 (IL-17) importante para el mantenimiento integro de la mucosa y en el aclaramiento de patógenos en el tejido intestinal. (Ivanov et al., 2009)

Las superficies mucosas son la primera línea de defensa contra patógenos a nivel intestinal. Las células B son esenciales para llevar a cabo este mecanismo de protección, ya que son responsables de cinco isotipos diferentes de anticuerpos: IgA, IgE, IgG, IgD e IgM. Específicamente, la IgA constituye más del 80% de los isotipos producidos en los tejidos asociados a mucosa en humanos y su inducción, transporte y regulación depende de las células T CD4+ y de la estimulación por parte de las placas de Peyer (PP), sitio de mayor estimulación de la respuesta IgA específica en el intestino. (McGhee & Fujihashi, 2012) (Craig & Cebra, 1971)

Las presencia de las bacterias filamentosas segmentadas, las cuales son comensales, juegan un papel importante en la respuesta de las células T cooperadoras y en la inducción de la inmunoglobulina A secretora (IgA). (Gaboriau-Routhiau et al., 2009) (Klaasen et al., 1993)

De forma contraria, Moon et al., reportó una asociación entre la presencia del anaerobio Gram negativo *Sutterella* y niveles bajos de IgA en ratones. (Moon et al., 2015) Dicho microorganismo se ha relacionado como enfermedades como enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad celiaca y asma; sin embargo, el mecanismo por el cual dichas especies interactúan con el sistema inmunológico se encuentran en estudio, aunque se ha propuesto que estimula la respuesta inflamatoria a través de la IL-8 a nivel sistémico. (Hiippala et al., 2016) (Wang et al., 2018)

Las células epiteliales son la interfase entre la microbiota luminal y el sistema inmunológico en la mucosa del intestino y juegan un papel importante en el reconocimiento de microorganismos y estimulación del sistema inmune. (Peterson & Artis, 2014) Una de sus funciones es el producir péptidos antimicrobianos, como el caso de una lectina tipo C llamada RegIII γ , la cual regula la interacción entre la microbiota y el huésped a través de su actividad antimicrobiana hacia Gram positivos y se expresa principalmente en las células de Paneth en la base de las criptas de

Lieberkuhn en el intestino delgado. La expresión de esta lectina también está regulada por la interleucina 22 (IL-22) y la presencia de *Bacteroides thetaiotaomicron* en el intestino delgado y colon. (Cash et al., 2006)

Otra proteína intestinal importante es la resistina llamada RELM β , la cual se expresa en las células de Goblet, principalmente. Esta proteína regula la expresión de citocinas inflamatorias a través de los macrófagos intestinales, evitando la presencia de colitis. (Natividad et al., 2013)

Diversos estudios han reportado una disminución en la expresión de RegIII γ , RELM β y del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHC) en las células epiteliales de ratones gnotobióticos. Sin embargo, al ser colonizados se restaura la expresión de dichas proteínas. Además, se ha reportado que el acetato de *Bifidobacterium longum* podría reforzar la función de protección de las células epiteliales en respuesta a procesos infecciosos. (He et al., 2003) (Fukuda et al., 2011)

Las células T natural killer invariantes (iNKT) expresan una cadena invariante TCR- α y una cadena TCR- β , las cuales reconocen antígenos lipídicos endógenos y exógenos al ser presentados a través de una molécula llamada CD1d. (Van Dieren et al., 2007) En ratones gnotobióticos, las células iNKT se encuentran disminuidas en tejidos periféricos como en bazo e hígado y responden de forma exacerbada a la estimulación de antígenos lipídicos. (Wingender et al., 2012)

En contraste, la mucosa pulmonar e intestinal presentan altas cantidades de células iNKT en comparación de los ratones colonizados, por lo que se ha argumentado una asociación entre los altos niveles de estas células y la presencia de colitis e hiperreactividad bronquial. (Olszak et al., 2012) (An et al., 2014)

Esta acumulación exagerada de células iNKT (asociado con altos niveles del ligando CXCL16) y la respuesta exagerada de estas al ambiente, induce colitis en ratones gnotobióticos, lo cual puede ser controlado al colonizar al ratón con la *Bacteroides fragilis* o esfingolípidos de dicha bacteria en las primeras dos semanas de vida únicamente. Sin embargo, en el caso de hiperreactividad bronquial, esta respuesta inflamatoria disminuye al colonizar al ratón con microbiota estándar y no solo con *Bacteroides fragilis* durante las primeras dos semanas de vida. (Olszak et al., 2012) (An et al., 2014) Estos estudios revelan dos mecanismos diferentes por los cuales la microbiota puede modular la expresión de las células iNKT. En este contexto, la bacteria comensal *Bacteroides fragilis*, inhibe la proliferación y expresión de las células iNKT durante la primera etapa de la vida y los esfingolípidos derivados dicha bacteria tienen un efecto inhibitor en colon. (An et al., 2014)

Los anticuerpos IgE producidos por las células B juegan un papel clave en la respuesta ante alérgenos e inmunidad hacia patógenos, por lo que se relaciona con enfermedades alérgicas y parasitarias. Mientras que los niveles de IgA e IgG1 se encuentran disminuidos en los ratones gnotobióticos, los niveles de IgE en suero se encuentran elevados después del destete (aproximadamente 30 días) debido al cambio de clase hacia IgE de las células B en las placas de Peyer (PP) y en los nodos linfáticos mesentéricos (NLM). Estos niveles elevados de IgE se asociaron con anafilaxia y con altos niveles de IL-4, producidos en las PP y NLM dependiente de células T CD4+. Al colonizar a los ratones con microbiota estándar desde el nacimiento hasta las 4 semanas de edad, los niveles séricos de IgE alcanzaban los niveles esperados para un ratón adulto, lo cual sugiere que se requiere de niveles críticos de microbiota intestinal durante la infancia para inhibir la inducción exacerbada de IgE. (Cahenzli et al., 2013)

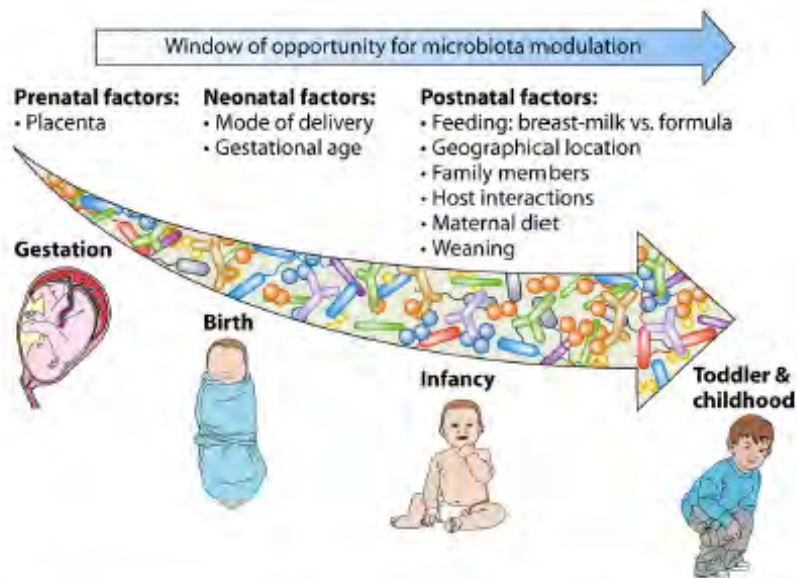
Factores relacionados con la microbiota intestinal y alergia

La composición de la microbiota intestinal puede verse afectada por múltiples factores intrínsecos como el pH, el nivel de oxígeno (por el proceso oxido-reducción), la viabilidad de nutrientes, la

temperatura así como el intercambio hídrico y iónico intestinal, por mencionar algunos y por factores extrínsecos, como resultado de la interacción con el huésped con su entorno desde el nacimiento. (Ursell et al., 2012) Diversos análisis han relacionado ciertas alteraciones en la microbiota/microbioma intestinal, como la disminución de la diversidad o una composición aberrante, con una serie de enfermedades que se manifiestan desde edad escolar hasta la edad adulta como asma, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer, trastornos neurológicos y diversas patologías de índole metabólico como la diabetes y la obesidad. (Milani et al., 2017) (Turnbaugh et al., 2009) (Larsen et al., 2010). Lo anterior se debe a un proceso llamado disbiosis, el cual hace referencia a la disrupción del balance normal entre la microbiota intestinal y el huésped, por un cambio en la composición de las comunidades comensales residentes en individuos sanos. (Lozupone et al., 2012) (Petersen & Round, 2014)

La microbiota intestinal es muy variable de persona a persona y es diferente de acuerdo a la localización en el cuerpo humano, sin embargo, miembros de la misma familia pueden albergar las mismas cepas bacterianas en comparación de individuos no relacionados genéticamente y no compartan el mismo ambiente. (Turnbaugh et al., 2009). La teoría de que la colonización del intestino daba inicio después del nacimiento debido al ambiente estéril “in útero” de la madre ha sido contradicha por múltiples estudios, los cuales han reportado presencia de bacterias en la placenta, en el cordón umbilical y en el líquido amniótico en embarazos a término en adecuado estado de salud. (Jiménez et al., 2005) (DiGiulio et al., 2008) (Aagaard et al., 2014) Estos estudios sugieren que el feto podría estar expuesto a diferentes microorganismos que derivan de la microbiota materna, así como a metabolitos y componentes derivados de dichos microorganismos (incluyendo DNA) antes del parto, es decir, que se existe una transmisión vertical y horizontal y estos tienen un gran impacto al término del embarazo y en el desarrollo del infante hasta la edad escolar. (Perez-Muñoz et al., 2017) (Romano-Keeler & Weitkamp, 2015) (Gray et al., 2017)

Fuente: (Milani et al., 2017)



A continuación, se abordarán los factores más estudiados en el desarrollo de la microbiota intestinal y alergia:

- Tipo de nacimiento

Estudios han reportado que el nacimiento vía vaginal permite que el neonato entre en contacto a través de secreciones y superficie de contacto con la microbiota vaginal y fecal materna, lo que resulta en la colonización intestinal del neonato por bacterias asociadas a la vagina como *Lactobacillus* y *Prevotella*. (Dominguez-Bello et al., 2010) (Biasucci et al., 2010) En contraste, los neonatos nacidos por cesárea, son colonizados por microorganismos de la piel de la madre o del ambiente hospitalario. (Biasucci et al., 2010) (Rodríguez et al., 2015). Dichos infantes también mostraron una reducida complejidad en la microbiota intestinal, menor colonización de *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, así como mayor colonización de miembros de *Clostridium sensu stricto* (cluster I) y *Clostridium difficile*. (Dominguez-Bello et al., 2010) (Biasucci et al., 2010) (Del Chierico et al., 2015) (Adlerberth et al., 2007) (Jakobsson et al., 2014) (Neu & Rushing, 2011) (Hill et al., 2017) Los infantes nacidos por cesárea mantienen su heterogeneidad microbiana en comparación con los infantes nacidos por vía vaginal hasta los 7 años de edad. (Neu & Rushing, 2011) (Salminen, 2004). Esto tiene una repercusión importante a nivel inmunológico, con la disminución en algunas citocinas antiinflamatorias como la IL-2, responsables de la activación de células T contra antígenos y activación de monocitos (Robb et al., 1981), niveles elevados de IL-4 implicada en la respuesta humoral de tipo Th2 y la producción de inmunoglobulina E (IgE) (Jutel et al., 1995) (Ryan, 1997) (Bjorksten et al., 1995). También se ha reportado que el nacimiento por cesárea interfiere con otros factores fisiológicos e inmunológicos como el establecimiento tardío de la microbiota intestinal (Bennel & Nord, 1987), un decreciente número de neutrófilos fetales y células natural killer (Thilaganathan et al., 1994) (Kinoshita et al., 1991), así como un incremento en la actividad fagocitaria. (Grönlund et al., 1999) Debido a lo anterior, el nacimiento por cesárea se ha asociado como un factor que condiciona mayor riesgo para el desarrollo de enfermedades alérgicas como asma [OR 2.22 (IC 95% 1.06– 4.64)], $p < 0.01$. (Kero et al., 2002) (Jakobsson et al., 2014)

- Edad gestacional

La edad gestacional es un factor a considerar en el establecimiento de la microbiota intestinal durante la infancia. Se considera como neonatos pretérmino a aquellos que nacieron antes de las 37 semanas de gestación, los cuales presentan un sistema digestivo, respiratorio e inmunológico inmaduro, así como mayor exposición a medicamentos, a una larga estancia intrahospitalaria, alimentación parenteral y ventiladores. (Milani et al., 2017) (Ruiz et al., 2016)

Dichos factores repercuten de forma importante el desarrollo y composición de la microbiota intestinal, los cuales presentan una colonización tardía de anaerobios comensales como *Bifidobacterium* o *Bacteroides*, y presentan mayor cantidad de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* y otros patógenos oportunistas en comparación de los neonatos con edad gestacional a término. (Hill et al., 2017) (Rougé et al., 2010) (Jacquot et al., 2011) (Arboleya et al., 2012)

En neonatos prematuros y con bajo peso al nacimiento, se ha reportado el dominio de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus*, *Enterococcus* y clostridia, durante el primer mes de vida. (Castro-Delgado et al., 2016) (Aujoulat et al., 2014)

Estos alteraciones en la microbiota intestinal han sido asociadas con una transición tardía en el establecimiento de la microbiota intestinal en edad adulta, así como una disminución en la producción de ácidos grasos de cadena corta, mayor frecuencia en la expresión de genes relacionados con la degradación xenobiótica y menor frecuencia en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y biosíntesis de vitaminas. (Arboleya et al., 2012) (Arboleya et al., 2016)

- Lactancia materna

Otro factor determinante para la composición de la microbiota intestinal y la función gastrointestinal es el tipo de alimentación. Durante el periodo de lactancia materna, la microbiota de los infantes pasa por un proceso continuo y diverso hasta el destete, donde cambia la una microbiota compleja y estable, similar a la del adulto. (Fallani et al., 2011) (Koenig et al., 2011)

Los infantes alimentados con leche materna presentan mayores niveles de Bifidobacterias y Lactobacilli en comparación de los alimentados por fórmula. (Yatsuneneko et al., 2012) (O'Sullivan et al., 2015) Por otra parte, la lactancia materna provee de oligosacáridos (HMOs) e inmunoglobulina A (IgA), la cual promueve un sistema inmunológico tolerogénico. (Maynard et al., 2012) La microbiota intestinal de los infantes lactados presenta una menor diversidad bacteriana y una expresión elevada de genes asociados a actividades metabólicas e inmunológicas. (Praveen et al., 2015) *Bifidobacterium* ha sido considerado el género dominante en la microbiota intestinal de neonatos lactados, el cual perdura hasta los 6 meses de edad. (Hill et al., 2017) Sin embargo, también se encuentran presentes en gran número, miembros de la phyla *Firmicutes* y las familias *Staphylococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* y *Veillonellaceae*. (Fan et al., 2013)

Por otro lado, los infantes alimentados con fórmula están expuestos a diferentes carbohidratos, bacterias y micronutrientes, causando patrones de colonización microbiana distintas. Dichos pacientes presentan altos niveles de staphylococci, *Bacteroides*, clostridia, enterococci, enterobacteria y el género *Atopobium*, así como altos niveles de ácidos grasos de cadena corta en la materia fecal como propionato y butirato, los cuales tienen efectos importantes en la modulación de la respuesta de las células T reguladoras. (Martin et al., 2016) (Bezirtzoglou et al., 2011) (Guaraldi & Salvatori, 2012) (Gritz & Bhandari, 2015) (Le Hurou-Luron et al., 2010).

- Dieta y localización geográfica

La localización geográfica también tiene un impacto de la microbiota, el cual parece estar asociado a la dieta regional, cultura y estilo de vida de un área en específico. (Rodríguez et al., 2015) (Arrieta et al., 2014) Por ejemplo, los escolares de una zona rural en África presentan una composición y diversidad microbiana diferente a la los escolares que viven en una región urbana en Italia; donde la proporción de Actinobacteria y Bacteroidetes fue mayor en los escolares africanos (10.1% vs 6.7% y 57.7% vs 22.4%, respectivamente), contrario a lo observado en escolares europeos donde Firmicutes y Proteobacteria fueron más abundantes (63.7% vs 27.3% y 6.7% vs 0.8%, respectivamente). (De Filippo et al., 2010) (Fallani et al., 2011) (Grzeskowiak et al., 2012) (Lin et al., 2013) Otro estudio comparó infantes pertenecientes al sureste de África e infantes residentes del noroeste de Europa, donde se observó una composición microbiana diferente entre los grupos, específicamente en el género *Bifidobacterium* y del grupo *Bacteroides-Prevotella* los cuales se encontraban en altas cantidades en las muestras fecales de los escolares africanos (70.8% vs 46.8%, $p < 0.001$; 17.2% vs 4,7%, $p < 0.001$; 4.4% vs 2.8%, $p < 0.01$, respectivamente) . (Grzeskowiak et al., 2012)

De forma similar, un estudio controlado en individuos demostró que la composición de la microbiota puede cambiar en 24 horas de acuerdo a la dieta y reportó una asociación del enterotipo *Bacteroides* con un alto consumo de proteínas de origen animal, una variedad de aminoácidos y grasas saturadas, característicos de la dieta Occidental. En contraste, el enterotipo *Prevotella* se asoció con un alto consumo de carbohidratos y azúcares simples, típicos de una dieta vegetariana o de áreas rurales. (Wu et al., 2011)

- Genética del huésped

Recientemente, múltiples estudios han indicado que la composición de microbiota intestinal tiene relación con la genética del huésped (Benson et al., 2010) (Grzeskowiak et al., 2012) (Turpin et al., 2016) Tal es el caso del gen OB (también conocido como LEP), el cual codifica una hormona llamada leptina. La leptina es clave en la regulación del apetito, el gasto energético y es considerada una citocina, por lo que interactúa con células del sistema inmune. (Kelesidis et al., 2011) (Sánchez-Margalet et al., 2010) Polimorfismos en el gen del receptor de leptina (OBR o LEPR) se ha asociado con la presencia de obesidad, diabetes tipo 2, alteraciones en la microbiota intestinal (con una disminución de *Bifidobacterium spp* y elevación de *Halomonas spp*), así como alteraciones en los niveles de mucina en el epitelio intestinal. (WalDRAM et al., 2009) (El Homsí et al., 2007) (Plaisancie et al., 2006)

Otros estudios experimentales han demostrado que la delección de los genes que codifican al receptor tipo Toll 5 (TLR-5), responsable del reconocimiento de proteínas flagelares, el factor de transcripción T-bet o el receptor de reconocimiento de patrones NLRP6, causan alteraciones en la microbiota intestinal que son transmisibles. (Hooper et al., 2012) Esto sugiere que las alteraciones genéticas del huésped y alteraciones en la microbiota intestinal comensal, en conjunto podrían regular la expresión de ciertas enfermedades. (Zeissig & Blumberg, 2014)

- Teoría de higiene y exposición a animales

En 1989, Strachan reportó una relación inversa entre el tamaño de las viviendas y la prevalencia de rinitis alérgica y eccema en escolares británicos de 11 años de edad. El sugirió inicialmente que el incremento en las enfermedades atópicas podría ser resultado de la baja prevalencia de enfermedades infecciosas. Esta teoría fue llamada posteriormente “la hipótesis de la higiene”. (Strachan, 1989) Una década después, múltiples estudios propusieron que los altos estándares de higiene y baja tolerabilidad inmunológica son precursores de enfermedades alérgicas y autoinmunes en países desarrollados. (Von Mutius & Vercelli, 2010)

La hipótesis original de la higiene ha sido extendida a la “hipótesis de la microbiota”, con el propósito de reconocer la importancia de la microbiota intestinal en el desarrollo de enfermedades alérgicas y atopia. (Rautava et al., 2004) Por ejemplo, Kalliomäki et al. reportó diferencias en la microbiota intestinal de neonatos con atopia, los cuales presentaron una disminución en la cantidad de bifidobacteria en comparación de neonatos no atópicos. (Kalliomäki et al., 2001)

De igual forma, se ha demostrado que la exposición relacionada con la agricultura, como la exposición a cobertizos de animales o el consumo de leche cruda, protegen contra el desarrollo de asma, posiblemente por un mecanismo que involucra a la enzima modificadora de ubiquitina A20. (Von Mutius & Vercelli, 2010) (Riedler et al., 2001) (Schuijs et al., 2015) (Ege et al., 2011)

Además, la exposición al ambiente de granja durante el embarazo, modula la respuesta inmune de la madre y el feto, disminuyendo el riesgo de asma. Este efecto protector ha sido asociado con el incremento en la actividad de células T reguladoras en la infancia y al tipo de microbiota que presentan dichos infantes, la cual es diferente a la microbiota de infantes con diferentes estilos de vida. (Schaub et al., 2009) (Dicksved et al., 2007)

También se ha demostrado que las comunidades microbianas en el hogar y en la microbiota intestinal de los habitantes se ven significativamente afectadas por la presencia de mascotas en interiores. (Maier et al., 2010) (Fujimura et al., 2010) Múltiples investigaciones desde 1980, han demostrado que las mascotas y sus dueños comparten bacterias intestinales en común y que los escolares con exposición temprana a mascotas con pelo, incrementan la riqueza y diversidad de la microbiota

intestinal en humanos, con efecto protector contra enfermedades alérgicas. (Caugant et al., 1984) (Azad et al., 2013) Un estudio comparativo realizado en adultos jóvenes, reportó diferencias en la alfa y beta diversidad entre el grupo con y sin mascotas, donde el primer grupo presentó cuatro OTUs: *Lactobacillus gasseri* (OTU 65), *Clostridium oroticum* (OTU 1089), *Bacteroides cellulosilyticus* (OTU 120), y *Akkermansia muciniphila* (OTU 784), los cuales se ha reconocido por tener efectos antiinflamatorios. (Kates et al., 2020)

- Uso de antibióticos

Actualmente, los antibióticos son los medicamentos que con mayor frecuencia son prescritos en edad pediátrica y se estima que el 50% de dichas prescripciones no son necesarias o bien, no se da un uso adecuado. Por lo tanto, no es sorpresivo que la resistencia a antibióticos sea un problema de salud pública a nivel mundial. (Goossens et al., 2005) (Ternhag & Hellman, 2013)

Múltiples estudios han reportado una asociación entre la exposición a antibióticos y el cambio persistente de la microbiota intestinal el cual, a su vez, causa alteraciones en la mucosa intestinal en todas las etapas de la vida (**Anexo 3**). (Antonopoulos et al., 2009) (Dethlefsen & Relman, 2011) (Zeissig & Blumberg, 2014) (Willing et al., 2011)

La alteración de la microbiota intestinal a través del uso de antibióticos puede modificar la inmunidad del huésped e incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades alérgicas. Estudios experimentales en ratones gnotobióticos han reportado un incremento de la respuesta inmune TH₂, eosinofilia en la vía aérea y un aumento en la producción de IgE. Si bien, al ser colonizados estos ratones, dicha respuesta disminuye, se requiere que la exposición microbiana sea durante la edad neonatal ya que no es efectivo en ratones adultos. (Sudo et al., 1997) De forma notable, cuando se somete a los ratones a un ciclo de antibióticos durante la edad posnatal, existe un incremento en la producción de IL-4 e IgE de forma considerable, una disminución de células T reguladoras e infiltración de células iNkT en el colon. (Olszak et al., 2012) (An et al., 2014) (Oyama et al., 2001) (Russell et al., 2012) (Noverr et al., 2005) (Atarashi et al., 2011)

Diversos estudios han demostrado a través de estudios experimentales, la importancia de la colonización de bacterias específicas durante la etapa posnatal. Por ejemplo, Furusawa y colaboradores reportaron que ratones expuestos a *Helicobacter pylori* o bien, a ácidos grasos de cadena corta (butirato y propionato) durante el periodo neonatal, no presentan hiperreactividad bronquial debido a que expansión de células T reguladoras y el al subconjunto de células iNkT. (Atarashi et al., 2011) (Furusawa et al., 2013) (Arpaia et al., 2013b)

En complemento con lo anterior, se ha asociado la exposición a antibióticos durante los primeros seis meses de vida con el desarrollo de asma y otras enfermedades alérgicas a los 6 años de edad. (Risnes et al., 2011) Otros estudios han reportado la presencia de sibilancias y eccema a los 8 años edad en escolares que estuvieron expuestos a antibióticos durante el primer año de vida, a pesar de haber presentado o no infecciones de vías respiratorias en la infancia. (Mai et al., 2010)

Tabla de evidencia

Con el propósito de obtener sustento teórico en cuanto a las diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes pediátricos alérgicos/atópicos y sanos, se realizó una búsqueda en las bibliotecas electrónicas como PubMed y Scopus, con los términos ((gut microbiome) AND (allergy)) OR (atopic) y los filtros “Preschool Child: 2-5 years” y “Child: 6-12 years”, de acuerdo a la plataforma utilizada.

Tabla 1. Diferencias en la composición de microbiota intestinal en presencia de alergia o atopia:

Referencia	Población	Definición de alergia	Análisis de la microbiota	Resultados en el grupo de alérgicos	Observaciones
(Štšepetova et al., 2007) Estonia	Se incluyeron 40 preescolares de 5 años (17 H/ 23 M) seleccionados aleatoriamente de un estudio de cohorte. Criterios de inclusión: nacimiento por vía vaginal, lactancia materna 20 preescolares con alergia 20 preescolares controles	Diagnóstico de alergia por criterio clínico, pruebas cutáneas positivas e IgE específica por quimioluminiscencia a caseína, huevo, gato, perro, ácaro de polvo, abedul y pasto timothy (ALK): -5 preescolares con diagnóstico de A -9 preescolares con diagnóstico de DA -2 preescolares con RA -1 preescolares con A+ RA -2 preescolares con DA + RA -1 preescolar con DA + A	Para la extracción de DNA se utilizó QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemania) 16S RNA primers T7 y SP6 en busca de <i>Bifidobacterium</i> por DGGE.	-↑ en la prevalencia de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (70% vs 25%, p=0.01) -↓ en la prevalencia de <i>Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum</i> -↓ baja diversidad en la microbiota intestinal (p=0.005)	→ <i>B. adolescentis</i> es capaz de estimular citocinas proinflamatorias como TNF, IL-6 e IL-12. (Kramer et al., 1995; He et al., 2002) → <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> y <i>B. catenulatum/pseudocatenulatum</i> indican la producción de IL-10 (Young et al., 2004) →El enfoque basado en DGGE, solo permite identificar la fracción dominante de la microbiota intestinal y no toda la complejidad filogenética del ecosistema.
(Candela et al., 2012) Italia	Se incluyeron 19 pacientes alérgicos y 12 controles de 4-14 años Criterios de inclusión: nacimiento por vía vaginal, lactancia materna por 3 meses, sin infecciones en las últimas 2 semanas, no toma de antibiótico en los últimos 3 meses	Diagnóstico de alergia por criterio clínico, pruebas cutáneas positivas a huevo, soja, cacahuete, trigo, pescado, pollenes, <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>D. Farinae</i> , gato e IgE total por ELISA (solo en 10 pacientes): -6 niños con DA + RA -6 niños con DA + RA+A -4 niño con A+ RA -1 niño con DA -1 niño con A -1 niño con RA	Cuantificación del gen16S RNA en busca de <i>A. muciniphila</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Clostridium cluster IV</i> , <i>Bifidobacterium</i> and <i>Lactobacillus</i> por qPCR	-↓ en la prevalencia de <i>Akkermansia muciniphila</i> (p=0.009), <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (p=0.001) y <i>Ruminococcus bromii</i> (<i>Clostridium cluster IV</i>), <i>Clostridium cluster XIVa</i> , (p=0.0035) -↑ en la prevalencia de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacillus clausii</i> and <i>Veillonella parvula</i>	→ <i>Clostridium cluster IV</i> , <i>F. prausnitzii</i> y <i>A. muciniphila</i> son clave para la homeostasis inmunológica por su interacción con las células T y la producción de IL-10 (Atarashi et al., 2011) (Sokol et al., 2008) → <i>Enterobacteriaceae</i> e se ha relacionado con la inducción a un estado proinflamatorio crónico a nivel intestinal y sistémico. (Lupp et al., 2007)
(Van Nimwegen et al., 2011) Países Bajos	Se incluyeron 1776 escolares de 6-7 años de la cohorte KOALA con A y DA	Utilizaron el cuestionario de ISAAC para obtener información respecto a la presencia de sibilancias en el último año; el diagnóstico de asma fue clínico (1 episodio de sibilancias o disnea o el uso de broncodilatador o corticoesteroides inhalados por lo menos 2 meses en el último año). También se obtuvo información respecto a la presencia de eccema en los últimos 12 meses y la localización. IgE específica para leche, huevo, cacahuete, gato, perro, ácaro de polvo y algunos pastos. (Positivo >0.35 IU/mL)	Las muestras de materia fecal fueron procesadas por PRC en tiempo real para la detección de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>C. difficile</i> , el grupo <i>Bacteroides fragilis</i> , y especies de <i>Lactobacillus</i> .	-↑ colonización de <i>Clostridium difficile</i> al mes de edad se asoció con mayor riesgo de presentar sibilancias (OR 1.38; 1.16-3.64), eccema (OR 1.43; 1.09-1.88) y asma (OR 2.06; 1.16-3.64) a los 6-7 años de edad.	→Los factores como tipo de nacimiento, el lugar de nacimiento (hogar u hospital) y alta presencia de <i>Clostridium difficile</i> pudieran influir en el riesgo de presentar síntomas de alergia de forma importante, al presentarse en conjunto.
(Johansson et al., 2011) Suecia	Se incluyeron 58 preescolares de 5 años de edad, los cuales formaron parte de un estudio	Antecedente materno de alergia: -35 pacientes con madre alérgica -23 preescolares sin antecedente familiar	Para la extracción de DNA se utilizó QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemania) PRC en tiempo real para la detección de <i>C.</i>	-↓ en la prevalencia de <i>Lactobacilli</i> , <i>B. bifidum</i> en preescolares alérgicos (mediados por IgE) con y sin	→ Esta diferencia entre grupos fue notoria a los dos meses de vida →Este estudio sugiere que la

	de cohorte al nacimiento. Criterios de inclusión: embarazo a término, con peso medio de 3.7 kg (2.7-4.6), nacimiento por vía vaginal, lactancia materna exclusiva por >3 meses y sin uso de antibiótico en los primeros 3 meses de vida.	Se les realizaron pruebas cutáneas a: huevo, cacahuete, leche, soya, gato, perro, <i>Dermatophagoides farinae</i> , pastos y malezas (ALK) e IgE específica a un alérgeno (positivo >0.35 IU/mL): -20 pacientes alérgicos -19 no alérgicos -11 no sensibilizados pero con síntomas de DA* -4 no sensibilizados pero con síntomas de A* -4 pérdida de seguimiento	<i>difficile</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , a group of <i>Lactobacilli</i> (<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>) y <i>S. aureus</i> . <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. Rhamnosus</i> (en conjunto, "Lactobacilli")	antecedente materno de alergia.	colonización por <i>Lactobacilli</i> protege contra el desarrollo de enfermedades alérgicas, independientemente de el antecedente hereditario. → Se ha asociado la reducción de los niveles de IgE específica y aumento de IgE tras la administración de <i>Lactobacilli</i> en pacientes con RA comparado con placebo. (Ivory et al., 2008)
(Drell et al., 2015) Estonia	Se incluyeron 7 escolares atópicos y 15 escolares sanos, seleccionados de un estudio de cohorte.	Se definió como atópico los escolares con sensibilización a un alérgeno en la prueba de pruebas cutáneas a gato, perro, ácaro de polvo, pasto timothy (ALK) y con IgE total específica positiva a cualquier alérgeno previamente escrito, por quimioluminiscencia. El grupo control fue definido como la ausencia de síntomas de alergia y pruebas cutáneas negativas.	Las muestras de materia fecal fueron recolectadas a los 5 y 12 años de edad. Para la extracción de DNA se utilizó QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, N.V.) con algunas modificaciones. Se realizó la amplificación del gen 16S RNA región hipervariable V1-V2 y PCR.	-↓ en la prevalencia de <i>Akkermansia</i> a los 5 y 12 años en atópicos (29 vs. 93 y 17 vs 67 %, respectivamente; p = 0.004 y p = 0.02) -Correlación negativa entre la abundancia de <i>Prevotella</i> y la abundancia de <i>Bacteroides</i> , <i>Dialister</i> (p<0.001 y p=0.004, respectivamente)	→ <i>Akkermansia</i> spp., tiene a habilidad de degradar mucina, lo cual es una función reguladora importante de la mucosa intestinal. (Belzer & De Vos, 2012) → Modula la señalización de las células B, IL-4, complemento, coagulación y el receptor de células T en el colon, en la extravasación de leucocitos, en la presentación de antígenos en el ciego. (Derrien et al., 2011) (Everard et al., 2013)

A: asma, DA: dermatitis atópica, RA: rinitis alérgica, DGGE: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización, qPCR: PCR cuantitativo, *Excluidos del análisis

Planteamiento del problema

Las enfermedades alérgicas son las condiciones crónicas más frecuentes en la infancia, las cuales incluyen asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica. (www. ginasthma.org) (Downs et al., 2001) (Anandan et al., 2010) La prevalencia de dichas enfermedades han incrementado en países industrializados en la última década, afectando el 20% de la población mundial. (Vázquez García & Salas Hernández, 2017) México reportó en 2019, un incremento significativo en la prevalencia de estas enfermedades alérgicas en escolares de 6-7 años (mayor de 5 puntos porcentuales de acuerdo al estudio GAN), lo cual representa una carga económica en salud pública. (Del-Rio-Navarro et al., 2020) (Ellwood et al., 2017).

Si bien, se han reportado factores genéticos y ambientales involucrados en el desarrollo de las enfermedades alérgicas, diversas disciplinas han realizado esfuerzos por identificar otros factores importantes en la fisiopatología de las enfermedades alérgicas que pudieran asociarse con el incremento en la prevalencia de estas enfermedades. (Koenig et al., 2011) (Costello et al., 2009) Por lo anterior, en la última década se ha reconocido la importancia de la microbiota intestinal en el desarrollo de enfermedades alérgicas, gracias a su interacción con la maduración del sistema inmunológico en la infancia y el impacto de algunas cepas bacterianas en la modulación de la respuesta inmunológica Th2, responsable de las manifestaciones clínicas de asma, rinitis alérgica y

dermatitis atópica. (Johansson et al., 2004) Sin embargo, la microbiota intestinal se ve influenciada a su vez por factores como la dieta, la localización geográfica y la edad, por lo que es un área de conocimiento que requiere ser explorado. (Rodríguez et al., 2015)

Justificación

Actualmente, no hay estudios en escolares mexicanos que describan la comunidad bacteriana de la microbiota intestinal en presencia y ausencia de enfermedades alérgicas. Por lo anterior, este proyecto propone la descripción de la comunidad bacteriana intestinal en ambos grupos, con el propósito de identificar los géneros y familias prevalentes tanto en pacientes alérgicos como sanos, para generar una base de conocimiento en nuestra población y diseñar protocolos a futuro potencialmente útiles para el estudio de perfiles bacterianos con mecanismos inmunológicos regulatorios e inflamatorios, de que pudieran condicionar mayor riesgo para el desarrollo de enfermedades alérgicas en población pediátrica.

Pregunta de investigación

¿Existe diferencia en la composición de la microbiota intestinal de escolares alérgicos y no alérgicos de 6 a 10 años de la Ciudad de México?

Objetivo general

Describir y comparar la composición de la microbiota intestinal de escolares alérgicos y no alérgicos de 6 a 10 años de la Ciudad de México.

Objetivos específicos

- Describir las características demográficas y clínicas de los escolares alérgicos y no alérgicos.
- Conocer el efecto del peso al nacimiento, el antecedente de alergia familiar, lactancia materna y convivencia con animales en la composición de la microbiota intestinal de escolares alérgicos y no alérgicos
- Comparar la composición de la microbiota intestinal de escolares alérgicos y no alérgicos

Objetivo secundario:

- Correlacionar la abundancia relativa bacteriana del grupo alérgico con los niveles séricos de IgE total.

Planteamiento de hipótesis

H₀: No hay diferencia en la composición de la microbiota intestinal de escolares alérgicos y no alérgicos de 6 a 10 años de la Ciudad de México

H_a: Hay diferencia en la composición de la microbiota intestinal de escolares alérgicos y no alérgicos de 6 a 10 años de la Ciudad de México.

- Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal anidado a una cohorte llamada “Red Global de Asma Fase II”, (HIM/2018/093) la cual da continuidad al estudio Global Asthma Network (GAN). A través de juntas informativas programadas con la cooperación de los directivos 58 escuelas del área norte de la Ciudad de México (alcaldías Miguel Hidalgo, Azcapotzalco, Gustavo A. Madero y Venustiano Carranza), se les entregó a los padres o tutores una invitación formal para agendar una cita y asistir al Servicio de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), para la aplicación del cuestionario de síntomas de alergia y realización de pruebas auxiliares de diagnóstico. Por lo anterior, se consideró un método no probabilístico a conveniencia y se incluyeron los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética, Investigación y Bioseguridad con el número (HIM/2018-034)

- Tamaño de la muestra

El número de niños a incluir en cada grupo se calculó considerando la abundancia del género *Akkermansia* en el grupo con atopia con respecto a un grupo control de escolares sin atopia. (Drell et al., 2015) Este cálculo se realizó con base a diferencia de medias para poder observar un efecto similar al previamente reportado y con un poder estadístico de 0.8. Se obtuvo un tamaño de 143 casos y 143 controles (atópicos y no atópicos).

Casos: 143 niños con diagnóstico de alergia (rinitis alérgica, dermatitis atópica y/o asma) e IgE total e IgE específica elevada.

Controles: 143 niños que no presenten síntomas de alergia e IgE total sérica normal.

- Criterios de selección

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
-Escolares de 6 a 10 años. -Formar parte de las escuelas seleccionadas en la Fase I del estudio GAN y a la cohorte HIM-2016-065 con asma, rinitis y/o dermatitis atópica y pacientes sanos. -Consentimiento y asentimiento informado firmado por los padres o tutores. -Pacientes que hayan entregado muestra de materia fecal.	- Uso de antibióticos en los 3 meses previos al estudio o probióticos en los 6 meses previos - Presencia de patologías crónicas o congénitas como diabetes tipo 1, hipertiroidismo o hipotiroidismo, hipertensión arterial sistémica, hepatopatías congénitas o adquiridas, cardiopatías congénitas, enfermedad celiaca y diarrea crónica en estudio. -Pacientes con cuestionario de síntomas incompleto >10% o sin consentimiento informado. -Escolares que no hayan continuado en la cohorte original o se nieguen a participar en este estudio.

- Descripción de procedimientos:

~Invitación y consentimiento informado

El día de la cita, se explicó a los tutores y escolares los procedimientos a realizar, dando lectura conjunta (médico y tutor) al consentimiento y asentimiento informado del HIMFG y del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) (Anexo 2). En dicho documento, se especificó cada uno de los procedimientos a realizar (entrega de muestras de materia fecal, cuestionario de síntomas de alergia, toma de muestra sanguínea, espirometría con broncodilatador y pruebas cutáneas) así como los riesgos y efectos adversos de cada procedimiento. Únicamente se incluyeron escolares con consentimiento informado firmado por padre o tutor.

~Recolección de muestra de materia fecal

Se les solicitó una muestra de materia fecal (del día previo a la cita en el HIMFG), la cual se almacenó a -70°C para el posterior análisis de la microbiota intestinal en el INMEGEN.

~Cuestionario de síntomas y factores de riesgo:

Personal capacitado del servicio de Alergia e Inmunología Clínica del HIMFG, aplicaron a los tutores de los escolares un cuestionario de síntomas y factores de riesgo, con el propósito de evitar sesgo de información por falta de respuesta o mal planteamiento de la pregunta.

(<http://isaac.auckland.ac.nz/phases/phasetwo/phasetwomodules.pdf>)

Dicho cuestionario consta de 100 preguntas, que hacen referencia a síntomas sugestivos de asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica, el manejo farmacológico que ha requerido dichos síntomas, la frecuencia con la que han acudido a servicios de salud por dichos síntomas y los factores ambientales y genéticos asociados:

Demográfico: lugar y características del entorno de la residencia, lugar donde acude a la escuela, edad, sexo, fecha de aplicación de cuestionario, lugar y fecha de nacimiento, así como la escolaridad de los padres o tutores.

Estilo de vida: realización de actividad física y frecuencia en consumo de alimentos (carne, pescado, verduras crudas, verduras cocidas, alimentos altos en carbohidratos y sodio como hamburguesas, jugo de frutas y refresco)

Antecedentes heredofamiliares: presencia de asma, rinitis alérgica y/o dermatitis atópica en madre y padre del escolar.

Antecedentes patológicos y no patológicos: peso al nacer, lactancia materna durante los primeros años de vida y la duración de la misma, ablactación, esquema de vacunación, número de hospitalizaciones, antecedente de tos ferina, tuberculosis, enfermedad por parásitos o sarampión.

Ambiental: combustible para cocinar, exposición a humo de tabaco, exposición a animales con abundante pelo (gato, perro, conejo, etc.), hacinamiento, características del suelo de habitación, ventana, recubrimiento de la cama, almohada y la presencia de manchas de humedad o moho en las paredes de la casa donde habita el escolar.

~Evaluación de la composición de la dieta habitual.

La ingesta alimentaria habitual se evaluará por medio de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos validado para la población mexicana por el INSP (SNUT) y dirigido a los padres. Este incluye 104 alimentos elegidos con base a los patrones de consumo de alimentos para la población mexicana. Se preguntará por la cantidad y frecuencia de consumo de 12 grupos de alimentos: productos lácteos, frutas, verduras, carnes, huevo y embutidos, pescados y mariscos, leguminosas, cereales y tubérculos (incluyendo productos de maíz), tortillas, bebidas, grasas, azúcares, frituras y otros. El instrumento mencionado será aplicado por personal capacitado del INMEGEN para su correcta evaluación.

~Toma de muestra sanguínea venosa:

La toma de muestras de sangre se realizó en el Laboratorio de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica del HIMFG, a cargo de personal debidamente capacitado en aspectos técnicos de venopunción. Se tomó una muestra sanguínea venosa (con 8 horas de ayuno) para la determinación de IgE sérica total y específica a *Flexinus excelsior*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lolium perenne* y epitelio de gato (marca PHADIA). Dichos reactivos fueron elegidos por alta prevalencia de hipersensibilidad en población pediátrica mexicana, de acuerdo a la Guía Mexicana de Práctica clínica en Inmunoterapia 2011. (Larenas-Linnemann et al., 2011)

Se extrajeron 6 ml de sangre en tubo rojo para obtención de IgE sérica y específica (sensibilidad 93% y especificidad 89%)

La determinación de IgE se midió en el laboratorio de Alergia del HIMFG con el equipo INMUNOCAP Phadia 100. Los niveles de IgE sérica total que se consideran normales son:

Escolares de 3-9 años de edad: <52 IU/mL

Escolares de 10-18 años de edad: <177 IU/mL

El nivel de IgE específica normal para aeroalergenos y alimentos en pacientes pediátricos es <0.35 IU/mL. A partir de 0.35-0.70 IU/mL se considera una respuesta alérgica baja a moléculas exógenas (sensibilización baja); 0.71-3.5 IU/mL sensibilización moderada; 3.6-17.5 IU/mL sensibilización alta y >17.5 IU/mL sensibilización muy alta. (Larenas-Linnemann et al., 2011) (van Ree et al., 2014)

Una vez extraída la muestra de sangre, se centrifugó la muestra por 10 minutos para la obtención del suero y se colocó en un tubo Falcon, el cual se rotuló con un código de identificación único para cada uno de los participantes y se almacenó temporalmente en un área reservada a -70°C hasta su procesamiento.

~Espirometría con broncodilatador:

La espirometría con broncodilatador es una prueba utilizada para la valoración objetiva de la función pulmonar y permite el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades respiratorias en edad pediátrica, como asma. (Vázquez García & Salas Hernández, 2017)

Mediante esta prueba, se miden los volúmenes y flujos pulmonares que se general durante una maniobra de espiración máxima voluntaria desde una posición de inspiración máxima. Es la prueba diagnóstica de primera elección, ya que es posible determinar la capacidad vital forzada (FVC) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1), por lo cual permite conocer la limitación variable del flujo de aire espiratorio en escolares con antecedentes de síntomas como sibancias, dificultad respiratoria, opresión torácica y tos. (Vázquez García & Salas Hernández, 2017) (Centros

para el control y la prevención de Enfermedades & Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 2007)

Durante dicha prueba se realizó en el Laboratorio de Fisiología Pulmonar del HIMFG por personal calificado. Antes de realizar la prueba, se tomaron los signos vitales (presión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, porcentaje de saturación en sangre a través de un dispositivo digital y temperatura) y medidas antropométricas (peso, talla, perímetro de cintura y cadera) de cada escolar en presencia del tutor.

Posteriormente, se explicó al escolar y al tutor la técnica de inspiración y espiración para la realización de esta prueba y el profesional de salud simuló una demostración de la maniobra para que el escolar visualizara la maniobra. La maniobra comienza con dos o tres respiraciones normales a través de la boquilla hasta lograr un volumen constante. A continuación, se le indica que inspire tan profundamente como pueda y seguidamente que expulse el aire de forma forzada y brusca alargando esta espiración al máximo durante 3-4 segundos mínimo y máximo 6 segundos.

Durante esta prueba, se aplicaron 4 inhalaciones sucesivas de 100 µg de un broncodilatador (salbutamol), mediante cámara espaciadora adecuada para la edad del escolar y repetir la espirometría 15 minutos después para obtención de los valores pre y postbroncodilatador. Posteriormente, se valoró de la calidad de la espirometría y fue interpretada por un alergólogo.

Existe evidencia de limitación del flujo aéreo por espirometría cuando: (<https://ginasthma.org/>)

- Se reporta un aumento del FEV1 en más de un 12% y 200 ml (en niños, > 12% del valor teórico) después la inhalación de un broncodilatador. Es lo que se denomina 'reversibilidad con broncodilatador.
- Variabilidad diurna media diaria del PEF > 10% (en los niños, > 13%).
- Aumento del FEV1 en más de un 12% y 200 ml con respecto al valor basal (en los niños, >12% del valor teórico) después de 4 semanas de tratamiento antiinflamatorio (al margen de infecciones respiratorias).

En caso de que los pacientes no pudieran realizar la espirometría en el primer intento por técnica inadecuada o alguna otra circunstancia médica, se reprogramó dicho estudio 3-6 meses después.

~Pruebas cutáneas:

Con el propósito de identificar los alérgenos causantes de síntomas respiratorios y valorar el nivel de atopia o reactividad de la piel a uno o múltiples alérgenos, se realizan las pruebas cutáneas por punción. Esta herramienta diagnóstica complementa el diagnóstico de rinitis alérgica, basándose previamente en la historia clínica y la presencia de inmunoglobulina E (IgE). (Larenas-Linnemann et al., 2011)

Los alérgenos que serán evaluados en las pruebas cutáneas son los siguientes:

- Hongos: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum*.
- Epitelios: caballo, perro, gato y pollo.
- Intradomiciliarios: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blatelia Germanica*, *Periplaneta americana* y *Blomia tropicalis*.

- Pólenes: *Ambrosia trifida*, *Artemisa vulgaris*, *Chenopodium album*, *Chynodon dactylon*, *Flexinus excelsior*, *Helianthus annuus*, *Ligustrum vulgare*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Plantago lanceolata*, *Quercus robur*, *Rumex spp*, *Salsola kali* y *Schinus molle*.
- Alimentos: cacahuate, cacao, clara de huevo, maíz, nuez, soya, trigo, caseína, camarón y yema de huevo.

Durante dicha prueba se realizó en el Laboratorio de Alergia del HIMFG por personal calificado. Antes de la realización de la prueba, se tomarán los signos vitales a los escolares (presión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, porcentaje de saturación en sangre a través de un dispositivo digital y temperatura) y se le explicará al escolar y tutor el procedimiento. La prueba se realizó aplicando una pequeña cantidad de extracto alergénico glicerinado sobre la piel. Mediante una pequeña punción con una aguja fina que atraviesa la gota hasta la parte superficial de la piel, se logra la penetración de pequeñas cantidades de extracto alergénico justo debajo de la epidermis. Si existen células cebadas sensibilizadas con IgE específica en el tejido del paciente, la penetración del alérgeno provocará la liberación de histamina, resultando en una respuesta de roncha y eritema. Para considerar un resultado como positivo, la pápula resultante de la punción del extracto alergénico debe ser por lo menos 3 mm superior al diámetro mayor del control negativo. (Larenas-Linnemann et al., 2011)

~Evaluación clínica del paciente

Los pacientes fueron valorados clínicamente por un médico alergólogo del servicio de Alergia de HIMFG, con el propósito de diagnosticar adecuadamente a los escolares con alguna enfermedad alérgica como asma, rinitis alérgica o dermatitis atópica y complementar dicho diagnóstico con los resultados de los estudios previamente realizados. Durante la consulta médica, se les realizó una historia clínica completa, exploración por aparatos y sistemas (incluyendo toma de medidas antropométricas), la explicación de los resultados de cada uno de sus estudios (previamente escrito) y, en caso de requerir tratamiento farmacológico, se les entregó por escrito el tratamiento a seguir con las instrucciones y la fecha programada para su próxima valoración clínica tres meses después.

~Procesamiento de la materia fecal

- Caracterización de la microbiota intestinal

Los participantes del estudio proporcionaron una muestra fresca de materia fecal, la cual se transportó en un tubo de plástico estéril. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en el área de Genómica del Poblaciones en Instituto Nacional de Medicina Genómica a -70°C hasta su procesamiento.

- Extracción de ADN de muestras fecales

El ADN total bacteriano fue extraído de la muestra fecal con el kit comercial (QIAamp PowerFecal DNA Kit). A continuación se describe el procedimiento llevado a cabo: (QIAamp PowerFecal DNA Kit Handbook)

- Se añadió de 0.18-0.22 gramos de muestra con una punta en el tubo de perlas
- agregaron 750 µL de buffer Powerbead Solution al tubo original de la muestra, se homogeneizó la muestra y se agregó al tubo con perlas.

- Después de agregar 60 μ L de la solución C1 al tubo con perlas, se incubó a 65°C por 10 minutos y se colocó en el Fastprep-24 a una velocidad de 4.0 m/sec por 45 segundos en un ciclo.
 - Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 11,900 rpm por un minuto.
 - Se obtuvo 400-500 μ L de sobrenadante, se agregó 250 μ L de la solución C2 al tubo nuevo con el sobrenadante y se agitó brevemente el vórtex (5 segundos)
 - A 600 μ L de sobrenadante transferida a un tubo nuevo, se añadió 200 μ L de la solución C3, se agitó brevemente el vórtex (5 segundos) y se incubó en hielo por 5 minutos.
 - A 600 μ L de sobrenadante transferida a un tubo nuevo, se añadió 200 μ L de la solución C3, se agitó brevemente el vórtex (5 segundos), se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 11,900 rpm por un minuto.
 - Se transfirió 750 μ L de sobrenadante a un tubo nuevo y se le agregó 1200 μ L de la solución C4.
 - A continuación, se agregó 650 μ L de sobrenadante en la columna MB Spin Column y se centrifugó a 11,900 rpm por un minuto.
 - Después de desechar el líquido, al sobrenadante se le agregaron 500 μ L de solución C5 y se centrifugó a 11,900 rpm por un minuto.
 - Se desechó el líquido y se centrifugó nuevamente a 11,900 rpm por un minuto.
 - Se colocó la columna MB Spin Column en el tubo de recolección de 2 ml y se agregó la solución C6 al centro de la membrana del filtro blanco, para después centrifugarlo a 11,900 rpm por un minuto.
 - Finalmente, para determinar la concentración y pureza del DNA se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop 2000c.
- Preparación de librerías y secuenciación de gen 16S del ARNr

Para realizar en análisis de la microbiota intestinal a nivel de composición, una vez verificada la concentración y pureza del ADN, se prepararon las librerías del gen 16S del ARNr con el kit de QIAseq Library Quant Array Kit, la cuales permiten la identificación taxonómica comúnmente hasta nivel de género. Brevemente y conforme al Earth Microbiome Project, se realizó la amplificación de la región V4 del gen 16S del ARNr usando oligonucleótidos específicos (515F y 806R), en donde además se incluyeron secuencias código de barra para diferenciar las secuencias por muestra. La PCR se realizó en 100 ng de ADN y los productos se purificaron usando perlas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Las proporciones equimolares de amplicones de las muestras individuales se combinaron y secuenciaron utilizando una plataforma Illumina MiSeq 2 x 250 de la Unidad de Secuenciación del INMEGEN. El tamaño y la concentración de cada grupo de secuenciación se determinaron mediante un ScreenTape Agilent D1000 para el sistema TapeStation 4200 (Agilent Technologies) y un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen), respectivamente. Las secuencias fueron analizadas con QIIME 1.8.0.

Se usaron filtros de calidad para eliminar secuencias que contenían desajustes de códigos de barras, bases ambiguas o lecturas de baja calidad (puntuaciones de calidad Phred <30). Después de recortar los códigos de barras, la selección de unidades taxonómicas operativas (OTU) de referencia abierta se realizó con una identidad del 97% frente a la base de datos de Greengenes de mayo de 2013. Se detectaron quimeras potenciales con USearch61 y se excluyeron de un análisis adicional. Todos los análisis se limitaron a las OTU que comprenden $\geq 0,1\%$ de las lecturas y están presentes en $\geq 10\%$ de los escolares. La riqueza y el índice de Shannon se calcularon después de filtrar la abundancia de OTU utilizando scripts QIIME, como se describió anteriormente. Las diferencias en la abundancia bacterianas funcionales de nivel 3 entre escolares alérgicos y no alérgicos se exploraron con STAMP. El gen funcional predicho fue anotado por la vía KEGG. Las diferencias en la abundancia de vías bacterianas funcionales de nivel 3 entre escolares alérgicos y no alérgicos se

exploraron con STAMP. Los recuentos de funciones KEGG obtenidos por PICRUST se transformaron en abundancias relativas. (López-Contreras et al., 2018)

- **Descripción de variables**

Variable dependiente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medición	Escala de medición
Microbiota intestinal	<p>Todos los organismos microbianos que existen naturalmente dentro del TRACTO GASTRO INTESTINAL.</p> <p>[MeSH Term]</p>	<p>Diversidad alfa</p> <p>Diversidad beta</p> <p>Composición: Abundancia relativa de diferentes taxones en unidades funcionales taxonómicas</p>	<p>Riqueza: Índice de Chao (abundancia relativa de microorganismos que pertenecen a una clase determinada) Número de especies en una sola muestra²/ número de especies en dos muestras</p> <p>Diversidad específica: Índice de Shannon (contempla la cantidad de especies presentes en un área determinada y la cantidad relativa de esas especies)</p> <p>Distancia de Bray-Curtis (diferencia entre especies), Unifrac ponderado y no Ponderado (medida de diferencia de la taxonomía a nivel filogenético) Medida: Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs)</p>	Cuantitativa Continua

Variable independiente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medición	Escala de medición
Alergia	<p>Hipersensibilidad del individuo a sustancias extrañas y protección contra la infección o trastorno resultante.</p> <p>[MeSH Term]</p>	<p>Diagnóstico de asma/rinitis alérgica/dermatitis atópica</p> <p>+</p> <p>IgE Niveles séricos de IgE total y específica a 5 alérgenos: <i>Dermatophagoides farinae</i> <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> <i>Flexinus excelsior</i> <i>Phleum pratense</i> Epitelio de gato</p>	<p>1=Si 2=No</p> <p>Unidades internacionales/ mililitros (U/ml) 3-9 años de edad: <52 IU/mL 10-18 años de edad: <177 IU/mL</p> <p>IgE específica en parámetros normales: Normal: <0.35 U/ml</p>	<p>Cualitativa Nominal Dicotómica</p> <p>Cuantitativa Continua De razón</p>

			<p>Sensibilización baja: 0.35-0.70 IU/mL</p> <p>Sensibilización moderada: 0.71-3.5 IU/mL</p> <p>Sensibilización muy alta: >17.5 IU/mL</p>	
--	--	--	--	--

Covariables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medición	Escala de medición
Edad	Tiempo que ha vivido o una persona o ciertos animales o vegetales [MeSH Term]	Tiempo que ha vivido el paciente, representado en años y meses	Años y meses cumplidos	Cuantitativa Continua
Sexo	Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas [MeSH Term]	Condición orgánica (hombre o mujer) de los pacientes	Hombre=1 Mujer= 2	Cualitativa Nominal Dicotómica
Peso	Fuerza de gravitación universal que ejerce un cuerpo celeste sobre una masa. (Montesinos-Correa, 2014)	Valora la masa del organismo y es el resultado de los cambios producidos en sus diversos componentes: la masa magra o muscular, la masa grasa o adiposa, la masa esquelética, la masa visceral y el agua corporal total.	Medido en kilogramos	Cuantitativa Continua De razón
Talla	Representa la suma de longitud de los segmentos y subsegmentos corporales, puede utilizarse como punto de referencia al analizar la proporcionalidad del cuerpo. (Montesinos-Correa, 2014)	Evalúa la estatura del niño en relación con la estatura esperada para niños de la misma edad, expresa las consecuencias de una desnutrición crónica con alteración en el crecimiento lineal o la existencia de una enfermedad a estudiar	Medido en metros	Cuantitativa Continua De razón
Índice de masa corporal	Muestra la masa en función de la estatura y es una herramienta de tamizado usada para identificar diferentes grados de nutrición. (Montesinos-Correa, 2014)	(IMC) se determina dividiendo el peso en kilogramos de la persona por su talla en metros al cuadrado: $IMC = \text{peso (kg)} / [\text{talla (m)}]^2$	Kilogramos/talla (m) ² Percentiles Bajo peso, <5 Eutróficos, 5-85 Sobrepeso, 85-<95 Obesidad ≥95	Cuantitativa Continua De razón Cualitativa Ordinal
Asma	Trastorno bronquial con tres componentes	Respuesta positiva a una o más de las siguientes preguntas:	1=Si 2=No	Cualitativa Nominal Dicotómica

	<p>distintos: hipersensibilidad de las vías respiratorias, inflamación de la vía respiratoria y obstrucción intermitente de vía aérea. Se caracteriza por la contracción espasmódica del músculo liso de la vía aérea, sibilancias y disnea. [MeSH Term]</p>	<p>-Sibilancias alguna vez (WHEZEV) -Sibilancias en los últimos 12 meses (WHEZ12) --Dificultad para hablar por tos y sibilancias (SPEECH12) -Tos y sibilancias con el ejercicio (EXWHEZ12)</p> <p>Nota: estas variables solo se utilizarán para la tabla descriptiva, con el propósito de evitar colinealidad.</p>		
Rinitis alérgica	<p>Se produce al mismo tiempo cada año. Se caracteriza por una conjuntivitis aguda con lagrimeo y prurito nasal y se considera influenciada por alérgenos ambientales. [MeSH Term]</p>	<p>Respuesta positiva a una o más de las siguientes preguntas:</p> <p>-Estornudos, rinorrea, obstrucción nasal alguna vez (PNOSEEV) -Estornudos, rinorrea, obstrucción nasal en los últimos 12 meses (PNOSE12) -Ardor de ojo y lagrimeo con molestias nasales en los últimos 12 meses (EYES12)</p> <p>Nota: estas variables solo se utilizarán para la tabla descriptiva, con el propósito de evitar colinealidad.</p>	<p>1=Si 2=No</p>	<p>Cualitativa Nominal Dicotómica</p>
Dermatitis atópica	<p>Enfermedad inflamatoria crónica determinada genéticamente de la piel marcada por una mayor capacidad para formar IgE, con mayor susceptibilidad a la rinitis alérgica y asma, y la disposición hereditaria a un umbral más bajo de prurito. [MeSH Term]</p>	<p>Respuesta positiva a una o más de las siguientes preguntas:</p> <p>-Exantema pruriginoso recurrente por 6 meses alguna vez (RASHEV) -Exantema pruriginoso recurrente en los últimos 12 meses (RASH12) -Exantema pruriginoso en pliegues en los brazos, detrás de las rodillas, enfrente de los tobillos, entre los glúteos o alrededor del cuello, orejas u ojos? (SITEEV)</p> <p>Nota: estas variables solo se utilizarán para la tabla descriptiva, con el propósito de evitar colinealidad.</p>	<p>1=Si 2=No</p>	<p>Cualitativa Nominal Dicotómica</p>

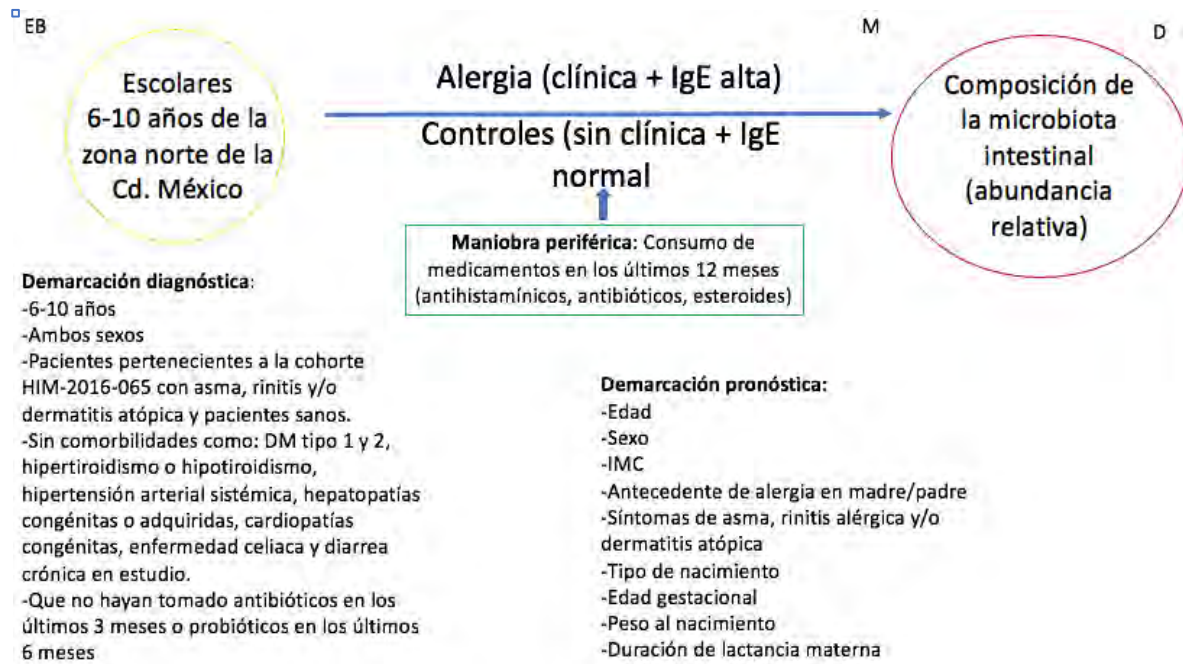
<p>Edad gestacional</p>	<p>Duración del embarazo calculada desde el primer día de la última menstruación normal hasta el nacimiento o hasta el evento gestacional en estudio. La edad gestacional se expresa en semanas y días completos.</p> <p>Recién nacido prematuro: Producto de la concepción de 28 semanas a 37 semanas de gestación, que equivale a un producto de 1,000 gramos a menos de 2,500 gramos</p> <p>Recién nacido a término: Producto de la concepción de 37 semanas a 41 semanas de gestación, equivalente a un producto de 2,500 gramos o más</p> <p>Recién nacido postérmino: Producto de la concepción de 42 semanas o más de gestación</p> <p>NOM-007-SSA2-1993</p>	<p>Respuesta positiva a una siguientes opciones:</p> <p>¿En qué semana del embarazo nació su hijo?</p>	<p>Número de semanas de gestación</p> <p>1= Recién nacido prematuro</p> <p>2= Recién nacido de término</p> <p>3=Recién nacido postérmino</p>	<p>Cuantitativa Continua De razón</p> <p>Cualitativa Ordinal</p>
<p>Lactancia materna</p>	<p>La alimentación del niño con leche de la madre.</p> <p>NOM-007-SSA2-1993</p>	<p>Respuesta positiva a una siguientes opciones:</p> <p>¿Su hijo recibió lactancia materna en algún momento? (BRSTFED)</p> <p>¿Durante cuántos meses? (NBRSFED)</p>	<p>1=Si 2=No</p> <p>1=Menos de 6 meses 2=6 meses o más</p>	<p>Cualitativa Nominal</p> <p>Cualitativa Ordinal</p>
<p>Peso al nacimiento</p>	<p>Es la primera medida del peso del feto o del recién nacido hecha después del nacimiento</p> <p>Recién nacido con bajo peso: Producto de la concepción con peso corporal al nacimiento menor</p>	<p>Respuesta positiva a una siguientes opciones:</p> <p>¿Cuánto peso su hijo al nacimiento? (BWEIGHT)</p>	<p>Peso en kilogramos (kg)</p> <p>1=Peso bajo (<2.500 kg) 2=Peso esperado para la edad gestacional</p>	<p>Cuantitativa Continua De razón</p> <p>Cualitativa Nominal</p>

	de 2,500 gramos, independientemente de su edad gestacional NOM-007-SSA2-1993			
Vía de nacimiento	<p>Nacimiento: Expulsión completa o extracción del organismo materno del producto de la concepción. Término empleado tanto para nacidos vivos o defunciones fetales.</p> <p>Parto: conjunto de fenómenos activos y pasivos que permiten la expulsión del feto de 22 semanas o más por vía vaginal, incluyendo la placenta y sus anexos.</p> <p>Cesárea: intervención quirúrgica que tiene por objeto, extraer el feto, vivo o muerto, de 22 semanas cumplidas o más, así como la placenta y sus anexos, a través de una incisión en la pared abdominal y uterina.</p> <p>NOM-007-SSA2-2016</p>	<p>Respuesta positiva a una siguientes opciones:</p> <p>El nacimiento fue por:</p> <p>() Parto</p> <p>() Cesárea</p>	<p>1=Parto</p> <p>2=Cesárea</p>	Cualitativa Nominal
Atopia familiar	<p>Atopia es la tendencia personal y/o familiar, generalmente en la niñez o adolescencia, a sensibilizarse y producir anticuerpos IgE en respuesta a alergenos comunes, generalmente proteínas.</p> <p>(Johansson et al., 2004)</p>	<p>Respuesta positiva a una siguientes opciones:</p> <p>¿La madre del niño tuvo/tiene alguna de las siguientes enfermedades?</p> <p>Asma (MOMASTH) Rinitis alérgica (MOMFEV) Dermatitis atópica (MOMECEZE)</p> <p>¿El padre del niño tuvo/tiene alguna de las siguientes enfermedades?</p> <p>Asma (FATHASTH) Rinitis alérgica (FATHFEV) Dermatitis atópica (FATHECZE)</p>	<p>1=Si</p> <p>2=No</p>	Cualitativa Nominal
Convivencia con hermanos o hermanas	Persona o animal que tiene en común con otra el mismo padre y la misma	Respuesta positiva a una siguientes opciones:	<p>1=Si</p> <p>2=No</p>	Cualitativa Nominal

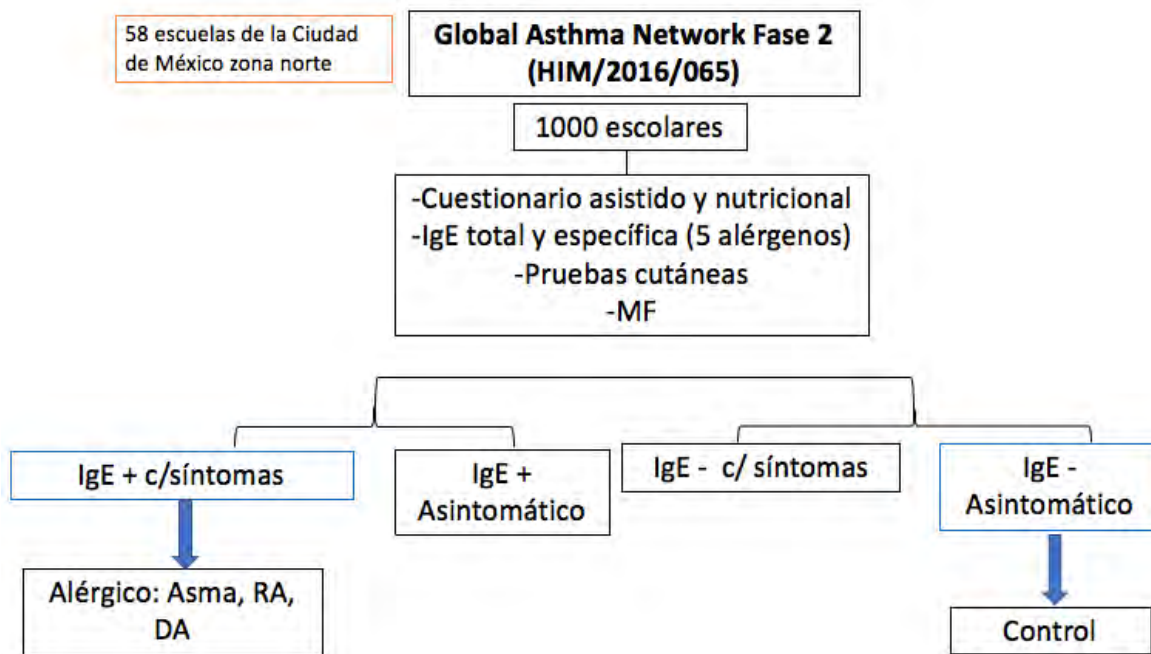
	madre, o solo uno de ellos. Real Academia Española, 2020	¿Su hijo tiene hermanos mayores? ¿Su hijo tiene hermanos menores?		
Convivencia con animales	Animal de compañía Real Academia Española, 2020	<p>Respuesta positiva a una siguientes opciones:</p> <p>Actualmente, ¿Cuál de las siguientes mascotas tuvo o tiene dentro de la casa donde habita su hijo? Perro (DOGPRESNT) Gato (CATPRESENT) Otros animales con abundante pelo (FURRYPRESENT) Pájaros (BIRDPRES) Otros (OTHERS)</p> <p>Durante el primer año de vida de su hijo, ¿Cuál de las siguientes mascotas tuvo dentro de la casa? Perro (DOGYNG) Gato (CATYNG) Otros animales con abundante pelo (FURRYNG) Pájaros (BIRDYNG) Otros (OTHERYNG)</p> <p>Actualmente, ¿su hijo tuvo o tiene contacto por lo menos un día de semana y fuera de casa con alguno de los siguientes animales? Perro (OUTDOGPRESNT) Gato (OUTCATPRESENT) Animales de granja (ANYPRESENT) Otros (OUTOTHERPRESENT)</p> <p>Durante el primer año de vida, ¿su hijo tuvo o tiene contacto por lo menos un día de semana y fuera de casa con alguno de los siguientes animales? Perro (OUTDOGYNG) Gato (OUTCATYNG) Animales de granja (ANYNG) Otros (OUTOTHERYNG)</p>	1=Si 2=No	Cualitativa Nominal

<p>Consumo de tabaco por miembros de la familia</p>	<p>Se denominan productos del tabaco los que están hechos total o parcialmente con tabaco, sean para fumar, chupar, masticar o esnifar. Todos contienen nicotina, un ingrediente psicoactivo muy adictivo</p> <p>(https://www.who.int/topics/tobacco/es/)</p>	<p>Respuesta positiva a una siguientes opciones:</p> <p>¿La madre del niño fuma o fumó?</p> <p>Actualmente (MOMFUM) Durante el primer año de vida de su hijo (MOMFUMYNG) Durante el embarazo (MOMFUMPREG)</p> <p>Actualmente, ¿Alguien fuma dentro de la casa donde vive su hijo? (FUMCASA)</p>	<p>1=Si 2=No</p>	<p>Cualitativa Nominal</p>
<p>Consumo de medicamentos por presencia de síntomas de alergia</p>	<p>Medicamento: Toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra"</p> <p>(OMS en las Américas, https://www.paho.org/arg/)</p>	<p>Respuesta positiva a una siguientes opciones:</p> <p>En los últimos 12 meses, ¿Su hijo ha utilizado algún medicamento (spray nasal, pastillas, otros) para ayudar en caso de estornudos frecuentes, escurrimiento nasal, nariz tapada o rinitis alérgica? (MEDPILLFEVER)</p> <p>En los últimos 12 meses, ¿Su hijo ha utilizado algún medicamento, cremas, ungüentos, pastillas u otros para ayudar en caso de erupción en la piel con comezón que aparece y desaparece o dermatitis atópica? (MEDPILLECZE)</p> <p>Antihistamínicos orales o tópicos (H1,H2) Esteroides tópicos Antibióticos tópicos</p>	<p>1=Si 2=No</p>	<p>Cualitativa Nominal</p>

Diseño de investigación:



Obtención de los grupos de comparación:



- **Análisis estadístico**

~ Captura y calidad de la información:

Una vez contestados los cuestionarios, no fueron modificados bajo ninguna circunstancia. Los datos fueron ingresados a la computadora exactamente como se registraron en el cuestionario completo. No se podrá hacer cambios a los cuestionarios por razón explícita y documentada. La captura de datos se realizó en el programa Microsoft Excel 2016 v16.0.6568.2036 (Microsoft Corporation) y el análisis estadístico en el software SPSS package V25 (SPSS Inc. IBM Company).

Se realizó un análisis exploratorio para identificar datos faltantes o aberrantes. Para cada paciente se calculó la variable IMC (índice de masa corporal) y se calculó su percentil, tomando como puntos de referencia lo establecido por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Se realizó la captura total de 21 pacientes, de los cuales se tiene los datos completos de las preguntas del cuestionario, niveles séricos de IgE total y específica y la abundancia relativa de la microbiota intestinal, por lo fueron incluidos dichos pacientes al análisis.

~ Análisis descriptivo

Inicialmente, se analizó la distribución de las variables usando métodos mentales (curva simétrica, asintótica, media y mediana iguales) y prueba de Shapiro-Wilk, considerando como normal la significancia de la prueba mayor de 0.05.

Las variables cuantitativas fueron representadas con mediana como medida de tendencia central y rango intercuartilar (25%-75%) como medida de dispersión. Para las variables categóricas se obtuvieron frecuencias y porcentajes.

Ambos grupos fueron comparados de acuerdo a la maniobra principal (alérgicos y controles) de acuerdo a sus características basales (sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y clínicas), con el propósito de demostrar su homogeneidad, a través de las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney, prueba de χ^2 de Pearson y prueba exacta de Fisher. Las variables correspondientes a la presencia de síntomas de asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica así como los niveles de IgE total y específico se describieron únicamente en este apartado, con el propósito de evitar colinealidad al ser parte de la definición de la maniobra.

~ Análisis bivariado

Se evaluó el efecto de las covariables en presencia y ausencia de alergia con el propósito de demostrar que ninguna de ellas modifica el efecto. Para dicho análisis se utilizaron las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney (para las variables cuantitativas como edad, peso, talla, índice de masa corporal, IgE total, IgE específica por alérgeno y peso al nacimiento), prueba de χ^2 de Pearson y prueba exacta de Fisher (para variables categóricas como el antecedente de lactancia materna y atopia familiar, por mencionar algunas). Para todas las variables, el valor de p considerado como significativo fue <0.05 .

Posteriormente, se analizó la relación entre la presencia de alergia y el consumo de medicamentos en los últimos 12 meses, considerada como maniobra periférica, con el propósito de conocer si identificar su efecto sobre la maniobra.

Con el propósito de identificar las diferencias en la composición de la microbiota intestinal de acuerdo a su abundancia relativa, se obtuvieron la mediana y rango intercuartilar (25%-75%) de los datos

crudos por phyla, familia y género y se compararon por grupo de estudio (alérgicos vs controles). Dicho análisis se realizó con la prueba U de Mann-Whitney, considerando como significativas aquellas con valor de $p < 0.05$. Adicionalmente, debido a que para escenarios de análisis genómico de *large-scale multiple testing* se realizan miles de tests de forma simultánea, el resultado de estos métodos es demasiado conservativo e impide que se detecten diferencias reales. Debido a lo anterior, se realizó el análisis de *false discovery rate*, con el propósito de conocer la probabilidad de que una hipótesis nula sea cierta habiendo sido rechazada por el test estadístico. (Martínez Cambor, 2012)

~ Análisis de correlación bivariada

Se realizó una correlación de Spearman con el propósito de examinar la dirección y magnitud de la asociación entre la abundancia relativa de las bacterias (estadísticamente significativas y/o con valor teórico) y las maniobras periféricas con mayor valor teórico para el desenlace como edad, índice de masa corporal, duración de la lactancia materna (semanas) y peso al nacimiento (kg). Se consideró una asociación débil cuando el coeficiente de correlación (r) obtuvo un valor < 0.30 ; una asociación moderada con valor de (r) > 0.30 y < 0.70 y una asociación fuerte con valor de (r) > 0.70 . El valor de p considerado como significativo fue < 0.05 y se obtuvieron intervalos de confianza al 95%.

Finalmente, como parte del objetivo secundario, se calculó a través de la correlación de Spearman, la asociación entre la abundancia relativa de las bacterias (estadísticamente significativas y/o con valor teórico) y los niveles séricos de IgE total en pacientes alérgicos.

~ Cálculo post hoc del estudio

Para el cálculo del poder del estudio ($1 - \beta$), se seleccionó la bacteria con una diferencia significativa entre los grupos, un valor de $\alpha = 0.05$, una n total del 21 escolares (12 alérgicos y 9 controles), a dos colas y con datos de libre distribución con el programa G*Power 3.1

- **Resultados**

~ Características basales de la muestra

Se analizaron los datos de un total de 21 pacientes, de los cuales 12 conformaron el grupo de alérgicos (57.1%) y 9 el grupo control (Tabla 1). La mediana de edad para la muestra total fue de 8.2 años, con un rango intercuartilar (RI) de 7.7-8.8 años. La mediana de peso y talla fue de 27.5 kg y 1.28 metros, respectivamente. Respecto al estado nutricional, el 66.7% de los pacientes fueron eutróficos (percentil 5-85), 14.3% presentaron sobrepeso y 14.3% obesidad.

Los escolares alérgicos reportaron una mediana de edad de 8.1 años (RI 7.8-9.1), similar al grupo control con 8.2 años (RI 7.7-8.4) ($p > 0.749$). Más del 55% de los pacientes en ambos grupos fueron mujeres. La mediana del peso, talla e índice de masa corporal fue similar entre los grupos, donde el 25% de los pacientes alérgicos presentaron sobrepeso y el 8.3% obesidad ($p = 0.594$).

Respecto a la presencia de síntomas de asma, el 25% de los escolares diagnosticados con alergia reportaron sibilancias en los últimos 12 meses, 33.3% sibilancias alguna vez y el 16% tos con el ejercicio, sin diferencias significativas entre los grupos.

Por otro lado, el 75.0% de los alérgicos reportaron estornudos, rinorrea, obstrucción nasal alguna vez y en los últimos 12 meses. Dichos síntomas se acompañaron de lagrimeo o ardor en ojos en el 41.7% de los escolares y 50% reportó prurito nasal; contrario al grupo control, en el cual menos del 25% presentó síntomas ($p < 0.03$).

De forma similar, el 75% de los escolares alérgicos refirieron exantema pruriginoso recurrente alguna vez, con localización en pliegues de los brazos, detrás de las rodillas, enfrente de los tobillos, entre los glúteos o en cara y el 58.3% lo refirió en los últimos 12 meses; mientras que el 22.2% de escolares del grupo control presentó dichos síntomas alguna vez ($p < 0.05$).

Respecto a los niveles de IgE total, el grupo de alérgicos reportó una mediana de 368 IU/ml, con un RI de 236.75-956.5 IU/ml, por encima de lo observado en el grupo control (24.50 IU/ml, RI de 9.05-47.10 IU/ml) siendo estadísticamente significativa esta diferencia ($p = 0.000$). Los niveles séricos de IgE específica para *Dermatophagoides farina*, epitelio de gato, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Flexinus excelsior* y *Phleum pratense* no reportaron diferencias significativas entre los grupos.

En cuanto a los antecedentes posnatales, el 91.7% de los pacientes alérgicos nació por vía cesárea, de los cuales, 25% fueron prematuros, 16.7% nacieron con bajo peso (< 2.500 kg) y 41.7% fueron lactados con una duración menor 6 meses; contrario al grupo control, donde el 77.8% reportó una duración de lactancia materna mayor de 6 meses ($p > 0.642$)

Por otro lado, el 47.6% de los pacientes alérgicos reportaron la presencia de alergia en alguno de los padres. El 25% de los pacientes tenían antecedente de rinitis alérgica por parte de la madre, 8.3% el antecedente de asma y 8.3% el antecedente de dermatitis atópica. En el grupo control, el 22.2% de los escolares reportaron rinitis alérgica y 11.1% de dermatitis atópica en la madre, sin diferencias estadísticamente significativas.

En referencia a los factores ambientales, la convivencia con animales en los últimos 12 meses fue mayor en el grupo control, donde el 77.8% convivió con perro y el 11.1% convivió con gato. Contrario a lo anterior, el 33.3% del grupo de escolares alérgicos convivió con perro, el 8.3% con gato y el 8.3% con animales de granja durante el primer año de vida ($p > 0.05$).

En cuanto a la exposición al humo de tabaco, el 16.7% de los pacientes alérgicos reportaron tabaquismo materno en los últimos 12 meses y el 8.3% durante el primer año de vida, contrario al grupo control, donde el 22% reportó tabaquismo materno en los últimos 12 meses únicamente ($p > 0.05$).

Al evaluar el consumo de medicamentos en los últimos 12 meses, el 50% de los pacientes alérgicos utilizaron antihistamínicos (familia H1 y H2) por vía oral o tópica, el 16.7% esteroides tópicos y el 8.3% antibióticos tópicos. Por otro lado, el 22.2% grupo control utilizó antihistamínicos y/o esteroides tópicos. A pesar de lo anterior, no hubo diferencia significativa entre los grupos o efecto sobre la maniobra principal ($p > 0.05$). (Tabla 2)

~ Diferencias en la composición de la microbiota intestinal por grupo

Se obtuvieron las cantidades de abundancia relativa (datos crudos) de 17 phylas, 88 familias y 206 géneros los cuales fueron comparadas ente los grupos alérgicos y controles. (Tabla 3)

No se obtuvieron diferencias significativas entre grupos a nivel de phyla ($p > 0.05$). Sin embargo, a nivel de familia, hubo diferencias significativas en *Paraprevotellaceae* ($p = 0.047$), *Planococcaceae* ($p = 0.043$), *Staphylococcaceae* ($p = 0.032$), *Turicibacteraceae* ($p = 0.033$), *Peptostreptococcaceae* ($p = 0.028$) y *Burkholderiaceae* ($p = 0.003$). De forma similar, a nivel de género se reportaron diferencias en la abundancia elativa de *Staphylococcus* ($p = 0.032$), *Turicibacter* ($p = 0.033$), *Clostridium* ($p = 0.047$), *Coprococcus* ($p = 0.011$), *Sporobacterium* (WAL_1855D) ($p = 0.042$), *Coprobacillus* ($p = 0.017$), *Burkholderiaceae* ($p = 0.003$), *Lautropia* ($p = 0.008$) y *Sneathia* ($p = 0.003$), siendo todas ellas más abundantes en el grupo de alérgicos. Cabe mencionar que después del

análisis de FDR, la familia *Burkholderiaceae* y el género *Sneathia* fueron estadísticamente significativas.

Los géneros *Akkermansia*, *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* tuvieron una diferencia mínima entre los grupos de (0.00398194), (0.00052438) y (-0.0059236) con una $p > 0.05$.

De acuerdo al análisis de correlación de Spearman en el grupo de alérgicos, la familia *Staphylococcaceae* y el género *Staphylococcus* mostraron una asociación negativa moderada con el tiempo de duración de la lactancia materna medido en semanas ($p = 0.025$). Por otro lado, el género *Ruminococcus* mostró una asociación negativa moderada con la edad ($p = 0.042$) y una asociación negativa fuerte con el índice de masa corporal ($p = 0.001$).

En el grupo control, el género *Akkermansia* reportó una asociación negativa fuerte con el índice de masa corporal ($p = 0.020$) y *Faecalibacterium* mostró una tendencia negativa moderada con el peso al nacimiento con una $p > 0.05$. (Tabla 4)

En cuanto a la correlación de la abundancia relativa bacteriana y los niveles de IgE séricos ninguna bacteria mostró una asociación significativa; sin embargo, *Planococcaceae* y *Faecalibacterium* mostraron una tendencia positiva moderada (Tabla 5).

~ Cálculo post hoc del estudio

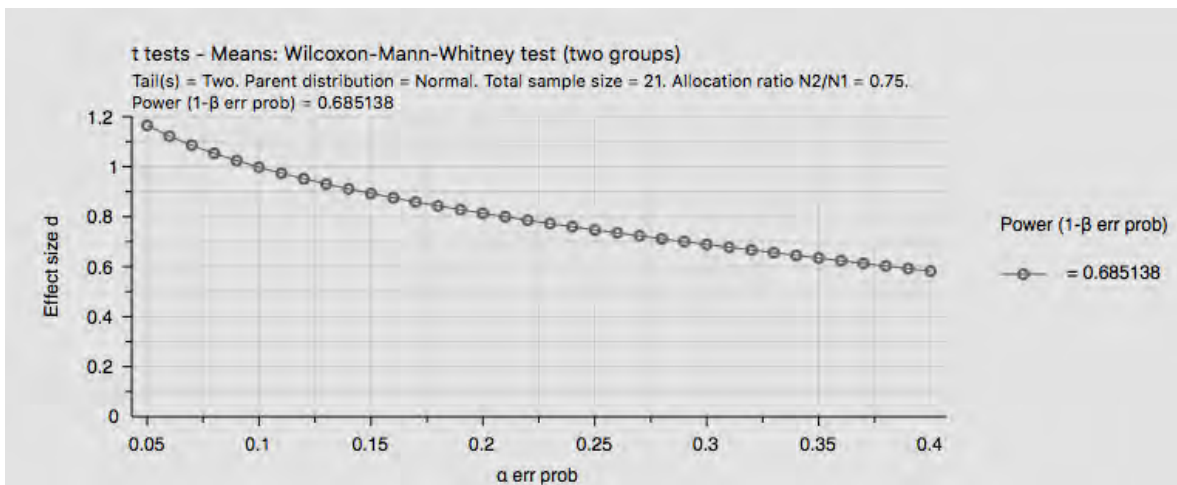
Se cálculo post hoc del estudio con base a la diferencia encontrada el género *Coprococcus* entre los grupos ($p = 0.011$), un valor de $\alpha = 0.05$, una n total del 21 escolares (12 alérgicos y 9 controles), a dos colas y con datos de libre distribución con el programa G*Power 3.1.

Se obtuvo un tamaño del efecto de 1.164705 y poder ($1 - \beta$) de 0.6852382.

Options: A.R.E. method

Analysis: Post hoc: Compute achieved power

Input:	Tail(s)	=	Two
	Parent distribution	=	Normal
	Effect size d	=	1.164705
	α err prob	=	0.05
	Sample size group 1	=	12
	Sample size group 2	=	9
Output:	Noncentrality parameter δ	=	2.5810942
	Critical t	=	2.1004757
	Df	=	18.0535228
	Power ($1 - \beta$ err prob)	=	0.6851382



- **Discusión**

En este estudio transversal anidado a una cohorte se investigó las diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes escolares alérgicos y no alérgicos del área norte de Ciudad de México, participantes de la cohorte “Global Asthma Network Fase II” del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Se observó que el grupo de alérgicos presentó mayor abundancia relativa en las familias *Planococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Burkholderiaceae*, los cuales se han relacionado con factores que predisponen al desarrollo de enfermedades metabólicas (como obesidad) y enfermedades alérgicas, las cuales abordaremos a continuación.

Como se describió anteriormente, la edad gestacional, el tipo de nacimiento, el antecedente de lactancia materna y la duración de la misma, son factores que impactan el desarrollo de la microbiota intestinal y su composición durante la infancia.

De acuerdo a nuestros resultados, se observó una abundancia relativa mayor del género *Sneathia* en el grupo de alérgicos (en su mayoría nacidos por cesárea) en comparación del grupo control. Lo anterior no concuerda con lo reportado por Domínguez y colaboradores, quienes reportaron el género *Sneathia* en piel y el tracto gastrointestinal de infantes nacidos por vía vaginal, al igual que por especies de *Lactobacillus*, los cuales son miembros representativos de la microbiota vaginal. Si bien, también se ha relacionado este género con el antecedente de procesos inflamatorios como corioamniotitis, preeclampsia y vaginosis durante el término del embarazo, dichas patologías no fueron analizadas en el presente estudio, lo cual pudiera explicar este hallazgo.

Por otro lado, los infantes nacidos por cesárea exhiben una composición bacteriana intestinal distinta, la cual está dominado por las especies *Staphylococcus* y *Streptococcus*, la cual coincide con la microbiota de la piel materna. (Dominguez-Bello et al., 2010) *Staphylococcus* y *Streptococcus*, al igual que otros anaerobios facultativos, también son los mayores colonizadores de la leche humana, con alto predominio en la microbiota oral e intestinal de infantes que han sido lactados. (Biagi et al., 2017) Si bien, pocos estudios de cohorte han reportado alguna asociación entre la duración de la lactancia materna y composición de la microbiota intestinal en escolares, de acuerdo con nuestros resultados, se obtuvo una asociación negativa entre la duración de la lactancia materna (en semanas) con la abundancia relativa de la familia *Staphylococcaceae* y el género *Staphylococcus* en el grupo de pacientes alérgicos, lo que podría sugerir que la duración de la lactancia materna también tiene efecto en la composición bacteriana intestinal y a su vez, con la interacción de dichas bacterias con la maduración del sistema inmunológico. (Milani et al., 2017)

De forma interesante y en relación con los antecedentes prenatales, se ha reportado el género *Sporobacterium* en muestras de placenta en embarazos pretérmino (definido como el nacimiento antes de las 37 semanas de gestación) en comparación a las muestras en embarazos de término. (Leon et al., 2018) En el presente estudio, en el grupo de alérgicos una cuarta parte de los pacientes tuvo antecedente de nacimiento prematuro y presentó mayor abundancia relativa de *Sporobacterium* en comparación del grupo control. Cabe señalar que el estudio de Leon et al. no reportó si la abundancia de este género se encontró presente a pesar de factores como infecciones o comorbilidades maternas, lo cual pudiera tener un efecto sobre la microbiota intestinal a largo plazo del infante y predisponer a una enfermedad respiratoria crónica como asma por falta de maduración pulmonar. Además, la relación de este género y la IL-22 se encuentra aún en estudio, ya que pudiera estar relacionada con la expresión de genes involucrados con el mantenimiento intacto del epitelio intestinal y el proceso de intercambio hídrico a nivel epitelial. (Keely et al., 2012)

Si bien, la respuesta inmunológica Th2 se ha documentado en la fisiopatología de las enfermedades alérgicas, recientemente se ha reportado la coexpresión de las células Th17/TH2 o la sobreexpresión de las células TH17, las cuales son capaces de estimular una respuesta proinflamatoria que puede manifestarse como síntomas de alergia. (Cosmi et al., 2014)

Esta respuesta dual de las células Th17/TH2 se ha relacionado con la familia *Planococcaceae*, la cual es una familia de gram positivos del orden Bacillales y que en su mayoría son aerobios estrictos. Estudios han relacionado a esta familia con enfermedades inflamatorias crónicas. Por ejemplo, sujetos con diabetes mellitus tipo 2, presentan baja abundancia relativa de esta familia en comparación de sujetos con niveles de glucosa séricos normales. (Y. Wang et al., 2017) Por otro lado, Wu y colaboradores, reportaron dicha familia en pacientes con apnea severa obstructiva de sueño y rinitis. Observaron que la mucosa nasal de dichos pacientes presentaban alta cantidad de eosinófilos e IL-8 y se correlacionó con una elevada la abundancia relativa de *Staphylococcus*, *Lactococcus* y *Planococcaceae* en la microbiota nasal. (B. G. Wu et al., 2019) Cabe mencionar que la IL-8 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) tienen una participación importante en la fisiopatología de rinitis alérgica, ya que al ser estimulados por la IL-33, se induce la liberación de histamina mediada por IgE, la cual puede ser inmediata (5-30 minutos) o tardía (6-24 horas), con la migración de eosinófilos mediada por citocinas Th2, resultando en daño tisular y remodelación. (Ding et al., 2018) (Reh et al., 2010) (Kamekura et al., 2012) De acuerdo a nuestros resultados, el grupo de alérgicos reportó mayor abundancia relativa de la familia *Planococcaceae*, donde más de la mitad de los pacientes refirió síntomas nasales y oculares en el último año y fueron diagnosticados clínicamente con rinitis alérgica. Además, dicha familia tuvo una tendencia directa moderada con los niveles de IgE total sérico, lo que sugiere que esta familia pudiera asociarse con la respuesta proinflamatoria a nivel local y sistémico de tipo Th2.

Otra familia que se ha reportado en presencia de enfermedades alérgicas es la familia *Burkholderiaceae*, el cual pertenece al phylum *Proteobacteria*. Huang et al., en el 2015 reportó en muestras de microbiota bronquial de pacientes adultos con asma grave, un incremento en la abundancia relativa de las familias *Pasteurellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Burkholderiaceae* y *Pseudomonadaceae*, las cuales se correlacionaron positivamente con la severidad de sus síntomas de acuerdo al score ACQ ($p < 0.05$). Dicho score permite medir el control de la enfermedad a través de 7 ítems que hacen referencia a los síntomas y uso de broncodilatador de rescate. (Juniper et al., 2006) De forma interesante, las familias antes mencionadas, se han asociado con genes relacionados con la respuesta Th17 (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL8*, *CSF3*), el cual es un fenotipo específico de asma. (Huang et al., 2015) En relación con nuestra investigación, la familia *Burkholderiaceae* reportó mayor abundancia relativa en el grupo de pacientes alérgicos, donde una cuarta parte refirió sibilancias en el último año y menos del 20% tos con sibilancias durante el ejercicio. Lo anterior, nos permite contemplar la posibilidad de que esta familia no se encuentre elevada solo en pacientes con asma, también en otras enfermedades alérgicas (como rinitis alérgica y dermatitis atópica) que estén mediadas por la respuesta inmunológica TH2 o TH17.

En relación a la regulación de la respuesta Th17 y Th2, se ha reportado que la administración oral de ácidos grasos de cadena corta y de bacterias productoras de butirato, especialmente *Faecalibacterium prausnitzii* o géneros del orden Clostridiales, incrementan la diferenciación de las células T a reguladoras hacia un estado no inflamatorio. (Tanaka et al., 2016) (Atarashi et al., 2013) (Qiu et al., 2013) De acuerdo a lo observado en nuestra investigación y con sustento en lo anterior, el grupo control presentó mayor abundancia relativa del género *Coprococcus*, *Clostridium* y *Ruminococcus* (los cuales pertenecen al grupo de Clostridiales) en comparación del grupo alérgico,

donde solo un tercio de los pacientes reportaron sibilancias alguna vez, sin embargo, no fueron diagnosticados con alergia.

Existe controversia respecto al efecto antiinflamatorio de *Ruminococcus*, ya que algunos estudios en humanos, han reportado elevada abundancia de especies de *Ruminococcus* (como *Ruminococcus bromii* and *Ruminococcus obeum*) en sujetos obesos y se han correlacionado positivamente con el IMC. (Kasai et al., 2015) Sin embargo, otras bacterias de la familia *Ruminococcaceae* como *Dialister*, *Methanobrevibacter*, and *Oscillospira*, se han asociado con un índice de masa corporal bajo. (Goodrich et al., 2014) (Jumpertz et al., 2011) De acuerdo a nuestros datos, el género *Ruminococcus* se asoció de forma negativa con el índice de masa corporal del grupo de alérgicos, donde la mayoría se encontraron en el percentil 5-85. Si bien, es verdad que diversos factores pudieran afectar el efecto antiinflamatorio de esta género como la dieta habitual, la cual no fueron analizada en esta investigación, se requiere más estudios para identificar las especies bacterianas específicas involucradas en el aumento de peso y los factores que pudieran relacionarse con procesos inflamatorios crónicos. (Gao et al., 2019)

Por otro lado, *Turicibacter* es una bacteria Gram positiva, cuya presencia elevada a nivel intestinal se ha asociado con el aumento de ácido butírico y ácidos grasos de cadena corta con potencial efecto probiótico y antiinflamatorio. (Zhong et al., 2015) (Presley et al., 2010) Por lo tanto, este género se ha correlacionado negativamente con el peso corporal, con el consumo de una dieta elevada en grasas, y en enfermedades inflamatorias como enfermedad inflamatoria intestinal, se encuentra disminuida. (Jones-Hall et al., 2015) (Hoepli et al., 2015) El grupo control de nuestro estudio, reportó mayor abundancia de este género y en su familia *Turicibacteraceae*, lo cual va acorde con lo descrito previamente. Sin embargo, no se observó una asociación negativa con el índice de masa corporal o con los niveles séricos de IgE total.

Los géneros *Akkermansia* y *Faecalibacterium*, se han relacionado con la prevención y control de enfermedades alérgicas y metabólicas en pacientes tanto pediátricos como adultos, debido a sus efectos antiinflamatorios.

Similar a lo antes descrito en el género *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* ha mostrado que su efecto antiinflamatorio se debe a la secreción de butirato y ácidos grasos de cadena corta. (Lukovac et al., 2014) Es conocido que el butirato ejerce un efecto importante en la regulación de la inflamación entérica, ya que previene el incremento de la permeabilidad intestinal, inhibe la producción de IL-8 al bloquear la activación del factor nuclear NF-KB y estimula la producción de IL-10; por lo tanto, es de esperarse que un nivel reducido de butirato contribuya a la inflamación crónica de bajo grado como la obesidad (Borgo et al., 2018). Además del papel de *Faecalibacterium* a nivel metabólico, también se ha asociado con la presencia de enfermedades alérgicas. Por ejemplo, Demerci y colaboradores, reportaron una disminución significativa en la abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* y *Akkermansia muciniphila* en muestras fecales de preescolares con asma y niveles séricos de IgE muy elevados en comparación con preescolares sanos ($p < 0,001$). Si bien, en nuestro estudio se observó una diferencia importante entre grupos en los niveles de IgE total sérico y se observó una tendencia indirecta moderada entre la IgE y la presencia de *Akkermansia*, la cantidad de abundancia relativa fue similar entre los grupos. Es posible que no se haya observado esta diferencia por el número total de pacientes incluidos en este estudio, el cual fue menor en comparación del estudio de Demerci et al. (92 asmáticos y 88 controles), a pesar de que la metodología de dicho estudio fue similar a la planteada en esta investigación. (Demirci et al., 2019)

Se conoce a través de estudios experimentales, que *Akkermansia muciniphila* tiene este efecto antiinflamatorio sistémico a través de sus metabolitos y proteínas de membrana (Amuc_1100), los cuales tienen efecto sobre los genes que regulan la función intestinal, específicamente en las células epiteliales al degradar mucina a través de enzimas mucolíticas. (Ottman et al., 2017)

También se han demostrado que *Akkermansia* reduce la ganancia de masa grasa e infiltración de macrófagos al tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés). También mejora la función de la barrera intestinal y metabolismo de la glucosa en ratones obesos. (Everard et al., 2014) Por otro lado, Caesar y colaboradores, asociaron el enriquecimiento de *Akkermansia* con una protección parcial contra la adiposidad y la inflamación en ratones, así como protección contra la obesidad inducida por la dieta. (Caesar et al., 2015) (Shin et al., 2014)

Lo anterior coincide con nuestros resultados, donde se observó una asociación inversa entre la abundancia relativa de *Akkermansia* y el índice de masa corporal en el grupo control (donde la mayoría de los pacientes estudiados fueron eutróficos). Si bien, los estudios previamente descritos han sido en su mayoría experimentales o han utilizado un método de secuenciación diferente a la propuesta en este estudio, lo anterior sugiere que la presencia de este género pudiera relacionarse con la ausencia de procesos inflamatorios crónicos como la obesidad o alergia y se requieren más estudios en humanos.

Otro aspecto importante que se ha estudiado en la última década, es el uso de medicamentos, los cuales han demostrado tener un impacto en la microbiota intestinal. En el 2018, Jackson et al. reportó asociaciones entre el uso de diferentes medicamentos y la composición de la microbiota intestinal de individuos de la cohorte TwinsUK. En dicho estudio reportó que el uso de medicamentos anticolinérgicos inhalados (como el ipratropio o tiotropio, utilizados para el tratamiento de asma) se asociaron negativamente con la abundancia de *Peptococcaceae*, proponiendo que no solo los medicamentos por vía oral pudieran impactar la microbiota intestinal. (Jackson et al., 2018) Por otro lado, esta familia también se ha relacionado con la exposición a mascotas en edad temprana, el cual pareciera tener un efecto protector contra las enfermedades alérgicas. Un estudio piloto de 24 infantes reportó un aumento en la riqueza y diversidad en la microbiota intestinal en presencia de mascotas a los tres meses de edad con baja representación de *Bifidobacteriaceae* y alta cantidad de *Peptostreptococcaceae*. (Meghan B Azad et al., 2013) Sin embargo, nuestro estudio reportó una elevada abundancia relativa de la familia *Peptostreptococcaceae* en el grupo de alérgicos, donde 3 de cada 10 escolares reportaron haber convivido con perro o gato durante el primer año de vida y el uso de medicamentos antihistamínicos, esteroideos o antibióticos (orales o tópicos) en el último año. Si bien, ninguno de los pacientes tuvo antecedente de utilizar anticolinérgicos, resulta importante conocer si el efecto de otros medicamentos utilizados para el tratamiento de enfermedades alérgicas como antihistamínicos, broncodilatadores o antileucotrienos, pudieran causar disbiosis y un estado inflamatorio.

- **Conclusiones**

Las enfermedades alérgicas son enfermedades crónicas que con frecuencia, se manifiestan en edad pediátrica y que han ido incrementando en México desde hace una década. Si bien, se han identificado múltiples factores ambientales que pudieran contribuir con estas enfermedades, aún se desconoce la totalidad de estos factores. A pesar de que estos son datos preliminares, esta investigación nos permitió estudiar e identificar diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes alérgicos y no alérgicos, como potenciales contribuyentes al estado inflamatorio. Estos microorganismos tienen gran una importancia desde el nacimiento hasta la edad adulta, ya que gracias a su interacción con el sistema inmune, nos permiten ser tolerantes al ambiente y adaptarnos al mismo. Estos microorganismos interactúan con gran número de factores

(desde el tipo de nacimiento hasta el índice de masa corporal), los cuales no pueden ser controlados en su mayoría y que predisponen la manifestación de síntomas de alergia. Si bien, los efectos inmunomoduladores o exacerbadores de la respuesta inflamatoria aún se encuentran en estudio, consideramos que las asociaciones reportadas en esta investigación son de gran valor para identificar y continuar con el estudio de microorganismos que se encuentran relacionados con la respuesta inmunológica Th2 y Th17 e identificar el efecto que tienen estos microorganismos en la gravedad de los síntomas, así como su relación con los medicamentos utilizados de forma frecuente para el manejo médico de estas enfermedades, con el propósito de comprender la fisiopatología de la enfermedad a nivel microbiológico y su potencial aplicación a nivel clínico.

- Limitaciones

Una de las principales limitaciones del presente estudio fue el tamaño de muestra obtenido por grupo, el cual alcanzó un poder ($1-\beta$) de 68%. Sin embargo, a pesar de que solo se obtuvo la abundancia relativa de 21 muestras de materia fecal, consideramos que el análisis nos permitió identificar diferencias y asociaciones relevantes con marcadores clínicos y biológicos de alergia entre los grupos estudiados. Si bien, de acuerdo al tamaño de muestra de nuestro estudio era factible realizar un análisis multivariado (2 eventos por variable), no se cumplieron con los supuestos de normalidad en las variables de estudio para realizar un análisis de regresión lineal. (Austin & Steyerberg, 2015) La variable dependiente no pudo ser transformada de forma logarítmica o exponencial (con el propósito de obtener una distribución normal), al presentar valores en cero en la abundancia relativa de algunos pacientes (tanto en familia como género). Cabe mencionar que el análisis logarítmico y exponencial bacteriano fueron explorados, sin embargo los datos de abundancia relativa bacteriana no cumplieron con los criterios de normalidad.

Debido a lo anterior, se espera que al obtener un mayor tamaño de muestra, se pueda realizar una corrección de pruebas múltiples, ya que al realizar múltiples comparaciones incrementa la probabilidad de falsos positivos por hipótesis (false positive rate, FPR) y, de esta forma identificar si las correlaciones reportadas en este estudio son correctas. (<https://www.publichealth.columbia.edu/research/population-health-methods/false-discovery-rate>) Finalmente, este estudio tampoco contempló el aspecto nutricional de los pacientes, el cual tiene un efecto importante en la composición de la microbiota intestinal y que requiere ser analizado más adelante.

Anexo 1

Tabla 1. Características basales del total de participantes y por maniobra.

	Muestra total (n=21)	Alérgicos (n=12)	Controles (n=9)	P
Edad (años), Me (RI₂₅₋₇₅)	8.2 (7.7-8.8)	8.1 (7.8-9.1)	8.2 (7.7-8.4)	0.749
Mujer n, (%)	12 (57.1)	7 (58.3)	5 (55.6)	1.00
Peso (kg), Me (RI₂₅₋₇₅)	27.5 (24.70-32.15)	28.7 (23.42-32.17)	27.10 (24.85-35.35)	0.972
Talla (metros), Me (RI₂₅₋₇₅)	1.28 (1.23-1.33)	1.28 (1.22-1.33)	1.27 (1.23-1.33)	0.887
IMC (kg/m²), Me (RI₂₅₋₇₅)	16.8 (15.78- 18.87)	17.89 (15.27-19.03)	16.73 (16.05-20.36)	0.594
Percentiles n, (%)				
Bajo peso, <5	1 (4.8)	1 (8.3)	0 (0.0)	0.263
Eutróficos, 5-85	14 (66.7)	7 (58.3)	7 (77.8)	
Sobrepeso, 85-<95	3 (14.3)	3 (25.0)	0 (0.0)	
Obesidad ≥95	3 (14.3)	1 (8.3)	2 (22.2)	
Síntomas de asma n, (%)				
-Sibilancias alguna vez	6 (28.6)	4 (33.3)	2 (22.2)	0.659
-Sibilancias en los últimos 12 meses	4 (19.0)	3 (25)	1 (11.1)	0.713
-Tos y sibilancias con el ejercicio	2 (9.5)	2 (16.7)	0 (0.0)	0.486
Síntomas de rinitis alérgica n, (%)				
-Estornudos, rinorrea, obstrucción nasal alguna vez	11 (52.4)	9 (75.0)	2 (22.2)	0.030 **
-Estornudos, rinorrea, obstrucción nasal en los últimos 12 meses	11 (52.4)	9 (75.0)	2 (22.2)	0.030 **
-Ardor de ojo y lagrimeo con molestias nasales en los últimos 12 meses	5 (23.8)	5 (41.7)	0 (0.0)	0.004 **
- Estornudos, rinorrea, obstrucción nasal y prurito nasal	6 (28.6)	6 (50.0)	0 (0.0)	0.003 **
Síntomas de dermatitis atópica n, (%)				
-Exantema pruriginoso recurrente por 6 meses alguna vez	11 (52.4)	9 (75.0)	2 (22.2)	0.030 **
-Exantema pruriginoso recurrente en los últimos 12 meses	7 (33.3)	7 (58.3)	0 (0.0)	0.003 **
-Exantema pruriginoso en pliegues en los brazos, detrás de las rodillas, enfrente de los tobillos, entre los glúteos o alrededor del cuello, orejas u ojos?	9 (42.9)	9 (75.0)	0 (0.0)	0.002 **
IgE total (IU/ml), Me (RI₂₅₋₇₅)	123.0 (29.20-515.00)	368.0 (236.75-956.50)	24.50 (9.05-47.10)	<0.001 ^{b*}
IgEe Epitelio de gato (IU/ml), Me (RI₂₅₋₇₅)	0.00 (0.00-3.24)	0.05 (0.00-15.97)	0.00 (0.00-0.01)	0.115

IgEe <i>Dermatophagoide farina</i> (IU/ml), Me (RI ₂₅₋₇₅)	0.02 (0.00-0.18)	0.10 (0.00-2.98)	0.02 (0.01-0.03)	0.449
IgEe <i>Dermatophagoide pteronyssinus</i> (IU/ml), Me (RI ₂₅₋₇₅)	0.06 (0.04-1.17)	0.75 (0.01-6.99)	0.05 (0.04-0.08)	0.115
IgEe <i>Flexinus excelsior</i> (IU/ml), Me (RI ₂₅₋₇₅)	0.03 (0.00-1.25)	0.01 (0.00-6.23)	0.04 (0.01-0.06)	0.800
IgE <i>Phleum pratense</i> (IU/ml), Me (RI ₂₅₋₇₅)	0.01 (0.00-0.035)	0.01 (0.00-0.20)	0.01 (0.01-0.02)	0.971
Edad gestacional (semanas), Me (RI ₂₅₋₇₅)	39.2 (38.0-40.0)	39.0 (36.50-40.0)	40.0 (38.0-40.0)	0.451
Nacimiento prematuro n, (%)	4 (19.0)	3 (25.0)	1 (11.1)	0.603
Nacimiento a término n, (%)	17 (81.0)	9 (75)	8 (88.9)	
Peso al nacer (kg) n, (%)	3.00 (2.59-3.32)	2.70 (2.54-3.20)	3.00 (2.60-3.42)	0.475
Peso bajo al nacimiento n, (%)	3 (14.3)	2 (16.7)	1 (11.1)	1.00
Nacimiento por cesárea n, (%)	19 (90.5)	11 (91.7)	8 (99.9)	1.00
Lactancia materna n, (%)	20 (95.2)	11 (91.7)	9 (100)	1.00
Duración de la lactancia materna n, (%)				
Menos de 6 meses	7 (33.3)	5 (41.7)	2 (22.2)	0.642
6 meses o más	14 (66.7)	7 (58.3)	7 (77.8)	
Antecedente familiar de alergia n, (%)				
Madre con asma	1 (4.8)	1 (8.3)	0 (0.0)	1.00
Padre con asma	1 (4.8)	1 (8.3)	0 (0.0)	1.00
Madre con rinitis alérgica	5 (23.8)	3 (25.0)	2 (22.2)	1.00
Padre con rinitis alérgica	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.00
Madre con dermatitis atópica	2 (9.5)	1 (8.3)	1 (11.1)	1.00
Padre con dermatitis atópica	1 (4.8)	1 (8.3)	0 (0.0)	1.00
Convivencia con animales intradomiciliarios n, (%)				
Actualmente:				
Perro	16 (76.2)	9 (75.0)	7 (77.8)	1.00
Gato	2 (9.5)	1 (8.3)	1 (11.1)	1.00
Durante el primer año de vida:				
Perro	5 (23.8)	4 (33.3)	1 (11.1)	0.338
Gato	1 (4.8)	1 (8.3)	0 (0.0)	1.00
Convivencia con animales de granja n, (%)				
Actualmente	1 (4.8)	1 (8.3)	0 (0.0)	1.00
Durante el primer año de vida	1 (4.8)	1 (8.3)	0 (0.0)	
Tabaquismo materno n, (%)				

Actualmente	4 (19.0)	2 (16.7)	2 (22.2)	0.658
Durante el primer año de vida de su hijo	1 (4.8)	1 (8.3)	0 (0.0)	0.667
Tabaquismo dentro del hogar actualmente n, (%)	5 (23.8)	4 (33.3)	1 (11.1)	0.338

*P<0.05, Prueba de exacta de Fisher ^a, Prueba de U Mann-Whitney ^b

Tabla 2. Relación entre la presencia de alergia y las maniobras periféricas

	Alérgicos (n=12)	Controles (n=9)	P
<i>Consumo de medicamentos en los últimos 12 meses n, (%)</i>			
<i>Antihistamínicos orales o tópicos (H1,H2)</i>			
<i>Esteroides tópicos</i>	6 (50.0)	2 (22.2)	0.367
<i>Antibióticos tópicos</i>	2 (16.7)	2 (22.2)	1.00
	1 (8.3)	0 (0.0)	1.00

Tabla 3. Diferencia en la abundancia relativa bacteriana (mediana y RI₂₅₋₇₅) entre los grupos por phyla, familia y género:

	Alérgicos (n=12)	Controles (n=9)	ΔMe Controles vs Alérgicos	p	PFDR
P: Actinobacteria	0.02212 (0.01323- 0.03553)	0.01336 (0.00727- 0.07134)	-0.0087672	0.831	0.867
G: Bifidobacterium	0.01509 (0.00807- 0.02554)	0.00917 (0.00374- 0.06524)	-0.0059236	0.831	0.867
P: Bacteroidetes	0.40115 (0.35483- 0.52885)	0.39203 (0.33970- 0.52885)	-0.0091198	0.522	0.626
<i>F: Paraprevotellaceae</i>	0.00278 (0.00003- 0.00808)	0.0229 (0.00019- 0.03729)	0.020134495	0.047*	0.080
P: Firmicutes	0.00010 (0.00003- 0.00072)	0.00006 (0.00003- 0.00022)	-0.000036	0.776	0.867
<i>F: Planococcaceae</i>	0.0000048 (0.00000- 0.0001)	0.00002 (0.00001- 0.00003)	0.000017	0.043*	0.080
<i>F: Staphylococcaceae</i>	0.0000 (0.0000-0.00012)	0.0000 (0.0000- 0.00000)	0	0.032*	0.079
<i>F: Turicibacteraceae</i>	0.00073 (0.0001-0.0015)	0.0001 (0.0001-0.0004)	-0.0006201	0.033*	0.079
<i>F: Peptostreptococcaceae</i>	0.00027 (0.00015- 0.00066)	0.00014 (0.00012- 0.00024)	-0.0001283	0.028*	0.079
<i>G: Staphylococcus</i>	0.00000 (0.0000- 0.00012)	0.0000 (0.0000- 0.00000)	0	0.032*	0.079
<i>G: Turicibacter</i>	0.0007 (0.0001-0.0015)	0.00011 (0.00003- 0.00046)	-0.0006201	0.033*	0.079
<i>G: Clostridium</i>	0.0018 (0.0006—0.0040)	0.0042 (0.0034-0.0063)	0.00238494	0.047*	0.080
<i>G: Coprococcus</i>	0.00316 (0.00249- 0.00849)	0.01172 (0.00555- 0.01786)	0.00856203	0.011*	0.066
G: Faecalibacterium	0.04238 (0.02465- 0.06470)	0.04290 (0.02196- 0.07093)	0.00052438	0.943	0.943
G: Ruminococcus	0.02177 (0.01184- 0.05066)	0.04303 (0.03226- 0.05155)	0.02126009	0.394	0.525
<i>G: Sporobacterium (WAL_1855D)</i>	0.000013 (0.000000- 0.000093)	0.0000 (0.0000- 0.00000)	-0.000013	0.042*	0.080
<i>G: Coprobacillus</i>	0.00000 (0.00000- 0.00002)	0.000080 (0.000004- 0.000353)	0.000080	0.017*	0.079
P: Proteobacteria	0.02525 (0.01316- 0.00072)	0.00995 (0.00628- 0.03390)	-0.0152998	0.118	0.188
<i>F: Burkholderiaceae</i>	0.00001 (0.00000- 0.00001)	0.0000 (0.0000- 0.00000)	0	0.003*	0.036**
<i>G: Lautropia</i>	0.000009 (0.000000- 0.000014)	0.0000 (0.0000- 0.00000)	0.0000097	0.008*	0.064
P: Verrucomicrobia	0.00039 (0.00003- 0.00543)	0.00437 (0.00004- 0.01078)	0.00398194	0.393	0.525
G: Akkermansia	0.00039 (0.00003- 0.00543)	0.00437 (0.00004- 0.01078)	0.00398194	0.393	0.525
P: Fusobacteria	0.00010 (0.00003- 0.00072)	0.00006 (0.00003- 0.00022)	-0.000036	0.477	0.602
<i>G: Sneathia</i>	0.00001 (0.00000- 0.00003)	0.0000 (0.0000- 0.00000)	0.0000107	0.003*	0.036**

Phylum (P:)/familia (F:)/género (G:),

*p<0.05 Prueba de U Mann-Whitney

**p<0.05 FDR False Discovery Rate

Tabla 4. Correlación de la abundancia relativa bacteriana con variables independientes

	Alérgicos (n=12)						Controles (n=9)			
	<i>F:Staphylococcaceae</i> (rho)	p	<i>G:Staphylococcus</i> (rho)	p	<i>G:Ruminococcus</i> (rho)	p	<i>G:Akkermansia</i> (rho)	p	<i>G:Faecalibacterium</i> (rho)	p
Edad (años y meses)	NS	NS	NS	NS	-0.594 [-0.87- (-0.03)]	0.042*	NS	NS	NS	NS
IMC (kg/m ²)	NS	NS	NS	NS	-0.846 [-0.96- (-0.53)]	0.001*	-0.750 [-0.94- (-0.17)]	0.020*	NS	NS
Peso al nacimiento (kg)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.586 (-0.90- 0.13)	0.097
Duración de lactancia materna (semanas)	-0.639 [-0.89- (-0.10)]	0.025*	-0.639 [-0.89- (-0.10)]	0.025*	NS	NS	NS	NS	NS	NS

*P<0.05 Correlación de Spearman

Tabla 5. Correlación simple de la abundancia relativa bacteriana con los niveles séricos de IgE total (IU/ml) en pacientes alérgicos.

	rho	p
<i>F: Paraprevotellaceae</i>	0.133 (-0.048-0.66)	0.681
<i>F: Planococcaceae</i>	0.511 (-0.09-0.84)	0.089
<i>F: Staphylococcaceae</i>	0.062 (-0.61-0.54)	0.847
<i>F: Turicibacteraceae</i>	-0.056 (-0.61-0.54)	0.863
<i>F: Peptostreptococcaceae</i>	-0.168 (-0.53-0.61)	0.602
<i>G: Staphylococcus</i>	0.062 (-0.53-0.61)	0.847
<i>G: Turicibacter</i>	-0.056 (-0.61-0.54)	0.863
<i>G: Clostridium</i>	-0.042 (-0.60-0.55)	0.897
<i>G: Coprococcus</i>	0.112 (-0.49-0.64)	0.729
<i>G: Faecalibacterium</i>	0.490 (-0.12-0.83)	0.106
<i>G: Ruminococcus</i>	-0.056 (-0.61-0.54)	0.863
<i>G: Sporobacterium (WAL_1855D)</i>	0.022 (-0.56-0.59)	0.946
<i>G: Coprobacillus</i>	-0.199 (-0.69-0.42)	0.712
<i>F: Burkholderiaceae</i>	0.267 (-0.36-0.73)	0.402
<i>G: Lautropia</i>	0.261 (-0.37-0.73)	0.412
<i>G: Akkermansia</i>	-0.273 (-0.73-0.36)	0.390
<i>G: Sneathia</i>	0.153 (-0.46-0.67)	0.635

*P<0.05 Correlación de Spearman

Anexo 3. Tabla de alteraciones en la microbiota intestinal por exposición a antibióticos:

Antibiótico		Alteraciones en la microbiota		
	Actividad/espectro	Diversidad reducida	Comunidades perdidas	Comunidades en expansión
Amoxicilina	Inhíbe β lactámicos: inhibe la síntesis de peptidoglicanos Amplio espectro	<i>Bifidobacterium</i> (Clínica, a)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> spp. (ratones neonatales, b)	
Vancomicina	Glucopéptido Inhíbe síntesis de pared celular	Generalizada (ratas y ratones neonatales, d)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., Grupo D <i>Streptococcus</i> (ratas, c) • <i>Bacteroidales</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Clostridiales</i> (ratas, ratones neonatales, d) • <i>Tenericutes</i> , <i>Turicibacteria</i> (ratones neonatales, d) • <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Eubacterium hallii</i> , <i>Clostridium</i> cluster IV and XIVa, <i>Escherichia coli</i> , <i>Haemophilus</i> spp., <i>Serratia</i> (Clínica, e)	<i>Enterobacteriaceae</i> (ratas, c) • <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Verrucomicrobiaceae</i> (ratones neonatales, d) • <i>Paenibacillaceae</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Anaeroplasmataceae</i> (ratas, d)
Ciprofloxacino	Quinolona: Inhíbe la replicación de DNA	Generalizada (Clínica, g)	• <i>Clostridiales</i> , <i>Faecalibacterium</i> spp. (Clínica, g)	
Cefalosporinas	Inhíbe β lactámicos: inhibe la síntesis de peptidoglicanos	<i>Firmicutes</i> (Clínica, f)	Actinobacteria (<i>Slackia</i> and <i>Bifidobacterium</i>), <i>Betaproteobacteria</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Roseburia</i> , <i>Eubacterium</i> (Clínica, f)	
Estreptomicina	Aminoglucósido: Inhíbe la síntesis peptídica		<i>Lactobacillus</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp., Group D <i>Streptococcus</i> (ratas, c)	<i>Enterobacteriaceae</i> (ratas, c)

a. (Mangin et al., 2010), b. (Schumann et al., 2005), c. (Sekirov et al., 2008), d. (Russell et al., 2012), e. (Vrieze et al., 2013), f. (Pérez-Cobas et al., 2013), g. (Dethlefsen et al., 2008)

- Referencias bibliográficas

- Abrams, G. D. (1963). Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 12, 355–364. https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/14010768/Influence_of_the_normal_flora_on_mucosal_morphology_and_cellular_renewal_in_the_ileum__A_comparison_of_germ_free_and_conventional_mice_
- Abrams, G. D., & Bishop, J. E. (1967). Effect of the Normal Microbial Flora on Gastrointestinal Motility. *Experimental Biology and Medicine*, 126(1), 301–304. <https://doi.org/10.3181/00379727-126-32430>
- Adlerberth, I., Strachan, D. P., Matricardi, P. M., Ahrné, S., Orfei, L., Åberg, N., Perkin, M. R., Tripodi, S., Hesselmar, B., Saalman, R., Coates, A. R., Bonanno, C. L., Panetta, V., & Wold, A. E. (2007). Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(2), 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.05.018>
- An, D., Oh, S. F., Olszak, T., Neves, J. F., Avci, F. Y., Erturk-Hasdemir, D., Lu, X., Zeissig, S., Blumberg, R. S., & Kasper, D. L. (2014). Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell*, 156(1–2), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.042>
- Anandan, C., Nurmatov, U., Van Schayck, O. C. P., & Sheikh, A. (2010). Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 65(2), 152–167. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02244.x>
- Antonopoulos, D. A., Huse, S. M., Morrison, H. G., Schmidt, T. M., Sogin, M. L., & Young, V. B. (2009). Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infection and Immunity*, 77(6), 2367–2375. <https://doi.org/10.1128/IAI.01520-08>
- Arboleya, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Gueimonde, M. (2012). Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(3), 763–772. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x>
- Arboleya, S., Sánchez, B., Solís, G., Fernández, N., Suárez, M., Hernández-Barranco, A. M., Milani, C., Margolles, A., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Ventura, M., & Gueimonde, M. (2016). Impact of prematurity and perinatal antibiotics on the developing intestinal microbiota: A functional inference study. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms17050649>
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., DeRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013a). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., DeRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013b). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>
- Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E., & Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: Health and disease. *Frontiers in Immunology*, 5(AUG), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00427>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Batto, J., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Costea, P. I., Hildebrand, F., Manimozhayan, A., Bäckhed, F., Blaser, M. J., Bushman, F. D., De Vos, W. M., Ehrlich, S. D., Fraser, C. M., Hattori, M., Huttenhower, C., ... Huse, S. M. (2013). Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/nature09944>. Enterotypes
- Asher, I., Haahtela, T., Selroos, O., Ellwood, P., Ellwood, E., Billo, N. E., Bissell, K., Chiang, C. Y., El Sony, A., García-Marcos, L., Mallol, J., Marks, G. B., Pearce, N., Strachan, D., Priftanji, A., Benhabylès, B., Boukari, R., Castracane, F. A., Gómez, M., ... Manangazira, P. (2017). Global Asthma Network survey suggests more national asthma strategies could reduce burden of asthma. *Allergologia et Immunopathologia*, 45(2), 105–114.

<https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.10.013>

- Asher, I., & Pearce, N. (2014). Global burden of asthma among children. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 18(11), 1269–1278. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0170>
- Asher, Innes, Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C. K., Strachan, D. P., Weiland, S. K., & Williams, H. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, 368(9537), 733–743. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69283-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69283-0)
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Ollé, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., ... Honda, K. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 500(7461), 232–236. <https://doi.org/10.1038/nature12331>
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K., & Honda, K. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*, 331(6015), 337–341. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>
- Ajoulat, F., Roudière, L., Picaud, J. C., Jacquot, A., Filleron, A., Neveu, D., Baum, T. P., Marchandin, H., & Jumas-Bilak, E. (2014). Temporal dynamics of the very premature infant gut dominant microbiota. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0325-0>
- Austin, P. C., & Steyerberg, E. W. (2015). The number of subjects per variable required in linear regression analyses. *Journal of Clinical Epidemiology*, 68(6), 627–636. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2014.12.014>
- Avershina, E., Lundgård, K., Sekelja, M., Dotterud, C., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., & Rudi, K. (2016). Transition from infant- to adult-like gut microbiota. *Environmental Microbiology*, 18(7), 2226–2236. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13248>
- Azad, M. B., Bridgman, S. L., Becker, A. B., & Kozyrskyj, A. L. (2014). Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *International Journal of Obesity*, 38(10), 1290–1298. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.119>
- Azad, Meghan B, Konya, T., Maughan, H., Guttman, D. S., Field, C. J., Sears, M. R., Becker, A. B., Scott, J. A., & Kozyrskyj, A. L. (2013). Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 9(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-9-15>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Gou, Y. K., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowski, D., Colding, C., ... Wang, J. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*, 17(6), 852. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.012>
- BAUER, H., HOROWITZ, R. E., LEVENSON, S. M., & POPPER, H. (1963). The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *The American Journal of Pathology*, 42, 471–483. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13966929>
- Belzer, C., & De Vos, W. M. (2012). Microbes inside from diversity to function: The case of Akkermansia. *ISME Journal*, 6(8), 1449–1458. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.6>
- Bennel, R., & Nord, C. E. (1987). Development of the faecal anaerobic microflora after Caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. *Infection*, 15(5), 332–336. <https://doi.org/10.1007/BF01647733>
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., Zhang, M., Oh, P. L., Nehrenberg, D., Hua, K., Kachman, S. D., Moriyama, E. N., Walter, J., Peterson, D. A., & Pomp, D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 18933–18938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107>
- Bergroth, E., Remes, S., Pekkanen, J., Kauppila, T., Büchele, G., & Keski-Nisula, L. (2012).

- Respiratory tract illnesses during the first year of life: Effect of dog and cat contacts. *Pediatrics*, 130(2), 211–220. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-2825>
- Bergström, A., Skov, T. H., Bahl, M. I., Roager, H. M., Christensen, L. B., Ejlerskov, K. T., Mølgaard, C., Michaelsen, K. F., & Licht, T. R. (2014). Establishment of intestinal microbiota during early life: A longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), 2889–2900. <https://doi.org/10.1128/AEM.00342-14>
- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A., & Welling, G. W. (2011). Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*, 17(6), 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.009>
- Biagi, E., Quercia, S., Aceti, A., Beghetti, I., Rampelli, S., Turrone, S., Faldella, G., Candela, M., Brigidi, P., & Corvaglia, L. (2017). The bacterial ecosystem of mother's milk and infant's mouth and gut. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01214>
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., & Retetangos, C. (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development*, 86(SUPPL. 1), 13–15. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004>
- Biteen, J. S., Blainey, P. C., Cardon, Z. G., Chun, M., Church, G. M., Dorrestein, P. C., Fraser, S. E., Gilbert, J. A., Jansson, J. K., Knight, R., Miller, J. F., Ozcan, A., Prather, K. A., Quake, S. R., Ruby, E. G., Silver, P. A., Taha, S., Van Den Engh, G., Weiss, P. S., ... Young, T. D. (2016). Tools for the microbiome: Nano and beyond. *ACS Nano*, 10(1), 6–37. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07826>
- Bjermer, L. (2014). The role of small airway disease in asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 20(1), 23–30. <https://doi.org/10.1097/MCP.000000000000018>
- Bjorksten, B., Borres, M. P., & Einarsson, R. (1995). Interleukin-4, soluble CD23 and interferon- γ levels in serum during the first 18 months of life. *International Archives of Allergy and Immunology*, 107(1–3), 34–36. <https://doi.org/10.1159/000236922>
- Bokulich, N. A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., D. Lieber, A., Wu, F., Perez-Perez, G. I., Chen, Y., Schweizer, W., Zheng, X., Contreras, M., Dominguez-Bello, M. G., & Blaser, M. J. (2016). Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Science Translational Medicine*, 8(343), 343ra82–343ra82. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7121>
- Bonder, M. J., Kurilshikov, A., Tigchelaar, E. F., Mujagic, Z., Imhann, F., Vila, A. V., Deelen, P., Vatanen, T., Schirmer, M., Smeekens, S. P., Zhernakova, D. V., Jankipersadsing, S. A., Jaeger, M., Oosting, M., Cenit, M. C., Masclee, A. A. M., Swertz, M. A., Li, Y., Kumar, V., ... Zhernakova, A. (2016). The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nature Genetics*, 48(11), 1407–1412. <https://doi.org/10.1038/ng.3663>
- Borgo, F., Garbossa, S., Riva, A., Severgnini, M., Luigiano, C., Benetti, A., Pontiroli, A. E., Morace, G., & Borghi, E. (2018). Body mass index and sex affect diverse microbial niches within the gut. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00213>
- Boursi, B., Mamtani, R., Haynes, K., & Yang, Y.-X. (2015). The effect of past antibiotic exposure on diabetes risk. *European Journal of Endocrinology*, 172(6), 639–648. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-1163>
- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P. D., & Bäckhed, F. (2015). Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. *Cell Metabolism*, 22(4), 658–668. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.026>
- Cahenzli, J., Köller, Y., Wyss, M., Geuking, M. B., & McCoy, K. D. (2013). Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host and Microbe*, 14(5), 559–570. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.10.004>
- Candela, M., Rampelli, S., Turrone, S., Severgnini, M., Consolandi, C., De Bellis, G., Masetti, R., Ricci, G., Pession, A., & Brigidi, P. (2012). Unbalance of intestinal microbiota in atopic children. *BMC Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-95>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Costello, E. K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., Knights, D., Gajer, P., Ravel, J., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2011). Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology*, 12(5). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

- of America, 108(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., & Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 313(5790), 1126–1130. <https://doi.org/10.1126/science.1127119>
- Castro-Delgado, Ó. E., Salas-Delgado, Á., Acosta-Argoty, F. A., Delgado-Noguera, M., & Calvache, J. A. (2016). Muy bajo y extremo bajo peso al nacer. *Pediatría*, 49(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.rcpe.2016.02.002>
- Cebula, A., Seweryn, M., Rempala, G. A., Pabla, S. S., McIndoe, R. A., Denning, T. L., Bry, L., Kraj, P., Kisielow, P., & Ignatowicz, L. (2013). Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature*, 497(7448), 258–262. <https://doi.org/10.1038/nature12079>
- Centros para el control y la prevención de Enfermedades, & Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. (2007). Guía de Niosh sobre entrenamiento en espirometría. Order A Journal On The Theory Of Ordered Sets And Its Applications, 1991, 1–9.
- Cheng, J., Ringel-Kulka, T., Heikamp-De Jong, I., Ringel, Y., Carroll, I., De Vos, W. M., Salojärvi, J., & Satokari, R. (2016). Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME Journal*, 10(4), 1002–1014. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.177>
- Clarke, G., O'Mahony, S. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Priming for health: Gut microbiota acquired in early life regulates physiology, brain and behaviour. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 103(8), 812–819. <https://doi.org/10.1111/apa.12674>
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2014). Th17 and non-classic Th1 cells in chronic inflammatory disorders: Two sides of the same coin. In *International Archives of Allergy and Immunology* (Vol. 164, Issue 3, pp. 171–177). <https://doi.org/10.1159/000363502>
- Costello, E. K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B. J. M., & Relman, D. A. (2012). The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science*, 336(6086), 1255–1262. <https://doi.org/10.1126/science.1224203>
- Craig, S. W., & Cebra, J. J. (1971). PEYER'S PATCHES: AN ENRICHED SOURCE OF PRECURSORS FOR IGA-PRODUCING IMMUNOCYTES IN THE RABBIT. *The Journal of Experimental Medicine*, 134(1), 188–200. <https://doi.org/10.1084/jem.134.1.188>
- Davis, M. Y., Zhang, H., Brannan, L. E., Carman, R. J., & Boone, J. H. (2016). Rapid change of fecal microbiome and disappearance of *Clostridium difficile* in a colonized infant after transition from breast milk to cow milk. *Microbiome*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0198-6>
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- Del-Rio-Navarro, B., Del Rio-Chivardi, J. M., Berber, A., Sienna-Monge, J. J. L., Rosas-Vargas, M. A., & Baeza-Bacab, M. (2006). Asthma prevalence in children living in north Mexico City and a comparison with other Latin American cities and world regions. *Allergy and Asthma Proceedings*, 27(4), 334–340. <https://doi.org/10.2500/aap.2006.27.2880>
- Del-Rio-Navarro, B. E., Ito-Tsuchiya, F. M., Berber, A., Zepeda-Ortega, B., Sienna-Monge, J. J. L., Garcia-Almaraz, R., & Baeza-Bacab, M. (2008). Study of the relationship between acetaminophen and asthma in Mexican children aged 6 to 7 years in 3 Mexican cities using ISAAC methodology. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 18(3), 194–201.
- Del-Rio-Navarro, Blanca Estela, Navarrete-Rodríguez, E. M., Berber, A., Reyes-Noriega, N., García-Marcos Álvarez, L., García-Almaraz, R., Mérida-Palacio, J. V., Saucedo-Ramírez, O. J., Del-Rio-Chivardi, J. M., & Sienna-Monge, J. J. L. (2020). The burden of asthma in an inner-city area: A historical review 10 years after Isaac. *World Allergy Organization Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2019.100092>
- Del Chierico, F., Vernocchi, P., Petrucca, A., Paci, P., Fuentes, S., Praticò, G., Capuani, G., Masotti,

- A., Reddel, S., Russo, A., Vallone, C., Salvatori, G., Buffone, E., Signore, F., Rigon, G., Dotta, A., Miccheli, A., De Vos, W. M., Dallapiccola, B., & Putignani, L. (2015). Phylogenetic and metabolic tracking of gut microbiota during perinatal development. *PLoS ONE*, 10(9), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137347>
- Demirci, M., Tokman, H. B., Uysal, H. K., Demiryas, S., Karakullukcu, A., Saribas, S., Cokugras, H., & Kocazeybek, B. S. (2019). Reduced *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* levels in the gut microbiota of children with allergic asthma. *Allergologia et Immunopathologia*, 47(4), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.12.009>
- Derrien, M., Van Baarlen, P., Hooiveld, G., Norin, E., Müller, M., & de Vos, W. M. (2011). Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, 2(AUG), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00166>
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., & Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 449(7164), 811–818. <https://doi.org/10.1038/nature06245>
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>
- Dicksved, J., Flöistrup, H., Bergström, A., Rosenquist, M., Pershagen, G., Scheynius, A., Roos, S., Alm, J. S., Engstrand, L., Braun-Fahrlander, C., Von Mutius, E., & Jansson, J. K. (2007). Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2284–2289. <https://doi.org/10.1128/AEM.02223-06>
- DiGiulio, D. B., Romero, R., Amogan, H. P., Kusanovic, J. P., Bik, E. M., Gotsch, F., Kim, C. J., Erez, O., Edwin, S., & Relman, D. A. (2008). Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: A molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE*, 3(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003056>
- Ding, W., Zou, G. L., Zhang, W., Lai, X. N., Chen, H. W., & Xiong, L. X. (2018). Interleukin-33: Its emerging role in allergic diseases. *Molecules*, 23(7), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules23071665>
- Djukanović, R., Roche, W. R., Wilson, J. W., Beasley, C. R. W., Twentyman, O. P., Howarth, P. H., & Holgate, S. T. (1990). Mucosal Inflammation in Asthma. *American Review of Respiratory Disease*, 142(2), 434–457. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/142.2.434>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Downs, S. H., Marks, G. B., Sporik, R., Belosouva, E. G., Car, N. G., & Peat, J. K. (2001). Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. *Archives of Disease in Childhood*, 84(1), 20–23. <https://doi.org/10.1136/adc.84.1.20>
- Drell, T., Larionova, A., Voor, T., Simm, J., Julge, K., Heilman, K., Tillmann, V., Štšepetova, J., & Sepp, E. (2015). Differences in Gut Microbiota Between Atopic and Healthy Children. *Current Microbiology*, 71(2), 177–183. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0815-9>
- Duncan, A.-M., Kladis, A., Jennings, G. L., Dart, A. M., Esler, M., & Campbell, D. J. (2000). Kinins in humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(4), R897–R904. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.4.R897>
- Ege, M. J., Mayer, M., Normand, A.-C., Genuneit, J., Cookson, W. O. C. M., Braun-Fahrlander, C., Heederik, D., Piarroux, R., & von Mutius, E. (2011). Exposure to Environmental Microorganisms and Childhood Asthma. *New England Journal of Medicine*, 364(8), 701–709. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007302>
- Eid, H. M., Wright, M. L., Kumar, V. A., Qawasmeh, A., Hassan, S. T. S., Mocan, A., Nabavi, S. M., Rastrelli, L., Atanasov, A. G., & Haddad, P. S. (2017). Significance of microbiota in obesity and metabolic diseases and the modulatory potential by medicinal plant and food ingredients. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUN), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00387>

- El-Aidy, S., Hooiveld, G., Tremaroli, V., Bäckhed, F., & Kleerebezem, M. (2013). The gut microbiota and mucosal homeostasis: Colonized at birth or at adulthood, does it matter? *Gut Microbes*, 4(2), 118–124. <https://doi.org/10.4161/gmic.23362>
- El Homsy, M., Ducroc, R., Claustre, J., Jourdan, G., Gertler, A., Estienne, M., Bado, A., Scoazec, J. Y., & Plaisancié, P. (2007). Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(1), 365–373. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00091.2007>
- Ellwood, P., Asher, M. I., Billo, N. E., Bissell, K., Chiang, C.-Y., Ellwood, E. M., El-Sony, A., García-Marcos, L., Mallol, J., Marks, G. B., Pearce, N. E., & Strachan, D. P. (2017). The Global Asthma Network rationale and methods for Phase I global surveillance: prevalence, severity, management and risk factors. *European Respiratory Journal*, 49(1), 1601605. <https://doi.org/10.1183/13993003.01605-2016>
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., De Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9066–9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>
- Fallani, M., Amarri, S., Uusijarvi, A., Adam, R., Khanna, S., Aguilera, M., Gil, A., Vieites, J. M., Norin, E., Young, D., Scott, J. A., Doré, J., & Edwards, C. A. (2011). Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology*, 157(5), 1385–1392. <https://doi.org/10.1099/mic.0.042143-0>
- Fan, W., Huo, G., Li, X., Yang, L., Duan, C., Wang, T., & Chen, J. (2013). Diversity of the intestinal microbiota in different patterns of feeding infants by Illumina high-throughput sequencing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(12), 2365–2372. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1404-3>
- Flohr, C., Weiland, S. K., Weinmayr, G., Björkstén, B., Bråbäck, L., Brunekreef, B., Büchele, G., Clausen, M., Cookson, W. O. C., von Mutius, E., Strachan, D. P., & Williams, H. C. (2008). The role of atopic sensitization in flexural eczema: Findings from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase Two. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(1). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.08.066>
- Fujimura, K. E., Johnson, C. C., Ownby, D. R., Cox, M. J., Brodie, E. L., Havstad, S. L., Zoratti, E. M., Woodcroft, K. J., Bobbitt, K. R., Wegienka, G., Boushey, H. A., & Lynch, S. V. (2010). Man's best friend? the effect of pet ownership on house dust microbial communities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(2), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.05.042>
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., & Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543–549. <https://doi.org/10.1038/nature09646>
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., ... Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480), 446–450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D., & Cerf-Bensussan, N. (2009). The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity*, 31(4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.020>
- Gao, X., Wu, B., Pan, Y., Zhou, S., Zhang, M., Cai, Y., & Liang, Y. (2019). Gut Microbiome Biomarkers in Adolescent Obesity: a Regional Study. *BioRxiv*, 745489. <https://doi.org/10.1101/745489>
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., & Blumberg, R. S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, 352(6285), 539–544. <https://doi.org/10.1126/science.aad9378>
- Gilbert, J. A., & Dupont, C. L. (2011). Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Annual Review of Marine Science*, 3(1), 347–371. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811>

- Gilbert, S. F., Sapp, J., & Tauber, A. I. (2012). A Symbiotic View of Life : We Have Never Been Individuals Author (s):A SYMBIOTIC VIEW OF LIFE : WE HAVE NEVER BEEN INDIVIDUALS. *Q Rev Biol*, 87(4), 325–341.
- Gittler, J. K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K. J., Wang, C. Q. F., Mitsui, H., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2012). Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.012>
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., & Elseviers, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet*, 365(9459), 579–587. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)17907-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)17907-0)
- Gray, J., Oehrle, K., Worthen, G., Alenghat, T., Whitsett, J., & Deshmukh, H. (2017). Intestinal commensal bacteria mediate lung mucosal immunity and promote resistance of newborn mice to infection. *Science Translational Medicine*, 9(376), 1–14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9412>
- Gritz, E. C., & Bhandari, V. (2015). The Human Neonatal Gut Microbiome: A Brief Review. *Frontiers in Pediatrics*, 3(March). <https://doi.org/10.3389/fped.2015.00017>
- Grönlund, M. M., Nuutila, J., Pelto, L., Lilius, E. M., Isolauri, E., Salminen, S., Kero, P., & Lehtonen, O. P. (1999). Mode of delivery directs the phagocyte functions of infants for the first 6 months of life. *Clinical and Experimental Immunology*, 116(3), 521–526. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00902.x>
- Groosman, S. I. (2012). Álgebra lineal. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Grzeskowiak, L., Collado, M. C., Mangani, C., Maleta, K., Laitinen, K., Ashorn, P., Isolauri, E., & Salminen, S. (2012). Distinct Gut microbiota in southeastern African and northern European infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(6), 812–816. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318249039c>
- Guaraldi, F., & Salvatori, G. (2012). Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(October), 94. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00094>
- Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512–519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)
- Guisande, C. (2006). Tratamiento de Datos con R, STATISTICA y SPSS.
- Hamady, M., & Knight, R. (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Research*, 19(7), 1141–1152. <https://doi.org/10.1101/gr.085464.108>
- Hansen, G., McIntire, J. J., Yeung, V. P., Berry, G., Thorbecke, G. J., Chen, L., DeKruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (2000). CD4+ T helper cells engineered to produce latent TGF-β1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 105(1), 61–70. <https://doi.org/10.1172/JCI17589>
- He, W., Wang, M.-L., Jiang, H.-Q., Steppan, C. M., Shin, M. E., Thurnheer, M. C., Cebra, J. J., Lazar, M. a, & Wu, G. D. (2003). Bacterial colonization leads to the colonic secretion of RELMβ/FIZZ2, a novel goblet cell-specific protein. *Gastroenterology*, 125(5), 1388–1397. <https://doi.org/10.1016/j.gastro.2003.07.009>
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forssberg, H., & Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 3047–3052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
- Hiippala, K., Kainulainen, V., Kalliomäki, M., Arkkila, P., & Satokari, R. (2016). Mucosal prevalence and interactions with the epithelium indicate commensalism of *Sutterella* spp. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01706>
- Hill, C. J., Lynch, D. B., Murphy, K., Ulaszewska, M., Jeffery, I. B., O'Shea, C. A., Watkins, C.,

- Dempsey, E., Mattivi, F., Tuohy, K., Paul Ross, R., Anthony Ryan, C., O' Toole, P. W., & Stanton, C. (2017). Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome*, 5(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0213-y>
- Ho, S. M. (2010). Environmental epigenetics of asthma: An update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.07.030>
- Hoepli, R. E., Wu, D., Cook, L., & Levings, M. K. (2015). The environment of regulatory T cell biology: Cytokines, metabolites, and the microbiome. *Frontiers in Immunology*, 6(FEB), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00061>
- Holgate, S. T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine*, 18(5), 673–683. <https://doi.org/10.1038/nm.2731>
- Holgate, S. T., Wenzel, S., Postma, D. S., Weiss, S. T., Renz, H., & Sly, P. D. (2015). Asthma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(September), 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.25>
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Huang, Y. J., Nariya, S., Harris, J. M., Lynch, S. V., Choy, D. F., Arron, J. R., & Boushey, H. (2015). The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(4), 874–884. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.044>
- Irvine, A. D., McLean, W. H. I., & Leung, D. Y. M. (2011). Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *New England Journal of Medicine*, 365(14), 1315–1327. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011040>
- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., & Littman, D. R. (2009). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, 139(3), 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- Ivory, K., Chambers, S. J., Pin, C., Prieto, E., Arqués, J. L., & Nicoletti, C. (2008). Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(8), 1282–1289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03025.x>
- Jackson, M. A., Verdi, S., Maxan, M. E., Shin, C. M., Zierer, J., Bowyer, R. C. E., Martin, T., Williams, F. M. K., Menni, C., Bell, J. T., Spector, T. D., & Steves, C. J. (2018). Gut microbiota associations with common diseases and prescription medications in a population-based cohort. *Nature Communications*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05184-7>
- Jacquot, A., Neveu, D., Aujoulat, F., Mercier, G., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., & Picaud, J. C. (2011). Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *Journal of Pediatrics*, 158(3), 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.09.007>
- Jakobsson, H. E., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Björkstén, B., Engstrand, L., & Andersson, A. F. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut*, 63(4), 559–566. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303249>
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., & Jansson, J. K. (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, 156(11), 3216–3223. <https://doi.org/10.1099/mic.0.040618-0>
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., & Rodríguez, J. M. (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*, 51(4), 270–274. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0020-3>
- Johansson, M. A., Sjögren, Y. M., Persson, J. O., Nilsson, C., & Sverremark-Ekström, E. (2011). Early colonization with a group of Lactobacilli decreases the risk for allergy at five years of age despite allergic heredity. *PLoS ONE*, 6(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023031>
- Johansson, S. G. O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., Motala, C., Ortega Martell, J. A., Platts-Mills, T. A. E., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P., & Williams, H. C. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 832–836. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.591>
- Jones-Hall, Y. L., Kozik, A., & Nakatsu, C. (2015). Ablation of tumor necrosis factor is associated with

- decreased inflammation and alterations of the microbiota in a mouse model of inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 10(3), 125309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119441>
- Jumpertz, R., Le, D. S., Turnbaugh, P. J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon, J. I., & Krakoff, J. (2011). Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94(1), 58–65. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.010132>
- Jungersted, J. M., Scheer, H., Mempel, M., Baurecht, H., Cifuentes, L., Høgh, J. K., Hellgren, L. I., Jemec, G. B. E., Agner, T., & Weidinger, S. (2010). Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 65(7), 911–918. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x>
- Juniper, E. F., Bousquet, J., Abetz, L., & Bateman, E. D. (2006). Identifying “well-controlled” and “not well-controlled” asthma using the Asthma Control Questionnaire. *Respiratory Medicine*, 100(4), 616–621. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2005.08.012>
- Jutel, M., Pichler, W. J., Skrbic, D., Urwyler, A., Dahinden, C., & Müller, U. R. (1995). Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 154(8), 4187–4194. <http://europepmc.org/abstract/MED/7706753>
- Kalinin, Y. V., Jiang, L., Tu, Y., & Wu, M. (2009). Logarithmic sensing in *Escherichia coli* bacterial chemotaxis. *Biophysical Journal*, 96(6), 2439–2448. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.027>
- Kalliomäki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S., & Isolauri, E. (2001). Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(1), 129–134. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.111237>
- Kamekura, R., Kojima, T., Takano, K., Go, M., Sawada, N., & Himi, T. (2012). The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 42(2), 218–228. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03867.x>
- Kasai, C., Sugimoto, K., Moritani, I., Tanaka, J., Oya, Y., Inoue, H., Tameda, M., Shiraki, K., Ito, M., Takei, Y., & Takase, K. (2015). Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterology*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0330-2>
- Kates, A. E., Jarrett, O., Skarlupka, J. H., Sethi, A., Duster, M., Watson, L., Suen, G., Poulsen, K., & Safdar, N. (2020). Household Pet Ownership and the Microbial Diversity of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(February). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00073>
- Kay, A. B. (2006). The role of T lymphocytes in asthma. *Chemical Immunology and Allergy*, 91, 59–75. <https://doi.org/10.1159/000090230>
- Keely, S., Kelly, C. J., Weissmueller, T., Burgess, A., Wagner, B. D., Robertson, C. E., Harris, J. K., & Colgan, S. P. (2012a). Activated fluid transport regulates bacterial-epithelial interactions and significantly shifts the murine colonic microbiome. *Gut Microbes*, 3(3), 250–260. <https://doi.org/10.4161/gmic.20529>
- Keely, S., Kelly, C. J., Weissmueller, T., Burgess, A., Wagner, B. D., Robertson, C. E., Harris, J. K., & Colgan, S. P. (2012b). Activated fluid transport regulates bacterial-epithelial interactions and significantly shifts the murine colonic microbiome. *Gut Microbes*, 3(3), 250–260. <https://doi.org/10.4161/gmic.20529>
- Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S., & Mantzoros, C. S. (2011). The Role of Leptin in human Physiology NIH Public Access. *Ann Intern Med*, 152(2), 93–100. <https://doi.org/10.1059/0003-4819-152-2-201001190-00008.Narrative>
- Kero, J., Gissler, M., Grönlund, M. M., Kero, P., Koskinen, P., Hemminki, E., & Isolauri, E. (2002). Mode of delivery and asthma - Is there a connection? *Pediatric Research*, 52(1), 6–11. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000017262.01840.F0>
- Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock – paper – scissors. *2868(1998)*, 2865–2868.
- Kinoshita, Y., Masuda, K., & Kobayashi, Y. (1991). Adherence of cord blood neutrophils: Effect of mode of delivery. *The Journal of Pediatrics*, 118(1), 115–117. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)81861-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)81861-X)

- Klaasen, H. L. B. M., Van der Heijden, P. J., Stok, W., Poelma, F. G. J., Koopman, J. P., Van den Brink, M. E., Bakker, M. H., Eling, W. M. C., & Beynen, A. C. (1993). Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. *Infection and Immunity*, 61(1), 303–306. <https://doi.org/10.1128/iai.61.1.303-306.1993>
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4578–4585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>
- Lai, C. K. W., Beasley, R., Crane, J., Foliaki, S., Shah, J., & Weiland, S. (2009a). Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: Phase Three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*, 64(6), 476–483. <https://doi.org/10.1136/thx.2008.106609>
- Lai, C. K. W., Beasley, R., Crane, J., Foliaki, S., Shah, J., & Weiland, S. (2009b). Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: Phase Three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*, 64(6), 476–483. <https://doi.org/10.1136/thx.2008.106609>
- Lamendella, R., VerBerkmoes, N., & Jansson, J. K. (2012). “Omics” of the mammalian gut - new insights into function. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.01.016>
- Larenas-Linnemann, D., Ortega-Martell, J. A., Del Río-Navarro, B., Rodríguez-Pérez, N., Arias-Cruz, A., Estrada, A., Becerril-Ángeles, M., Pietropaolo-Cienfuegos, D. R., Ambriz-Moreno, M. de J., Báez-Loyola, C., Cossío-Ochoa, E., González-Díaz, S. N., Hidalgo-Castro, E. M., Huerta-Hernández, R. E., Macías-Weinmann, A., Oyoqui-Flores, J., Stone-Aguilar, H., Treviño-Salinas, M. B., & Zárate-Hernández, M. D. C. (2011). [Mexican clinical practice guidelines of immunotherapy 2011]. *Revista Alergia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico : 1993)*, 58(1), 3–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21967873>
- Larsen, N., Vogensen, F. K., Van Den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., Hansen, L. H., & Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>
- Lathrop, S. K., Bloom, S. M., Rao, S. M., Nutsch, K., Lio, C. W., Santacruz, N., Peterson, D. A., Stappenbeck, T. S., & Hsieh, C. S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 478(7368), 250–254. <https://doi.org/10.1038/nature10434>
- Laursen, M. F., Andersen, L. B. B., Michaelsen, K. F., Mølgaard, C., Trolle, E., Bahl, M. I., & Licht, T. R. (2016). Infant Gut Microbiota Development Is Driven by Transition to Family Foods Independent of Maternal Obesity. *MSphere*, 1(1), 1–16. <https://doi.org/10.1128/msphere.00069-15>
- Laursen, M. F., Zachariassen, G., Bahl, M. I., Bergström, A., Host, A., Michaelsen, K. F., & Licht, T. R. (2015). Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood. *BMC Microbiology*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0477-6>
- Le Hurou-Luron, I., Blat, S., & Boudry, G. (2010). Breast- v. formula-feeding: Impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 23–36. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000065>
- Leamy, L. J., Kelly, S. A., Nietfeldt, J., Legge, R. M., Ma, F., Hua, K., Sinha, R., Peterson, D. A., Walter, J., Benson, A. K., & Pomp, D. (2014). Host genetics and diet, but not immunoglobulin A expression, converge to shape compositional features of the gut microbiome in an advanced intercross population of mice. *Genome Biology*, 15(12), 552. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0552-6>
- Leon, L. J., Doyle, R., Diez-Benavente, E., Clark, T. G., Klein, N., Stanier, P., & Moore, G. E. (2018). Enrichment of clinically relevant organisms in spontaneous preterm-delivered placentas and reagent contamination across all clinical groups in a large pregnancy cohort in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(14). <https://doi.org/10.1128/AEM.00483-18>
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Evolution of Mammals

- and Their Gut Microbes. *Science*, 320(5883), 1647–1651. <https://doi.org/10.1126/science.1155725>
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
- Lim, E. S., Wang, D., & Holtz, L. R. (2016). The Bacterial Microbiome and Virome Milestones of Infant Development. *Trends in Microbiology*, 24(10), 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.001>
- Lin, A., Bik, E. M., Costello, E. K., Dethlefsen, L., Haque, R., Relman, D. A., & Singh, U. (2013). Distinct Distal Gut Microbiome Diversity and Composition in Healthy Children from Bangladesh and the United States. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053838>
- Loesche, W. J. (1969). Effect of bacterial contamination on cecal size and cecal contents of gnotobiotic rodents. *Journal of Bacteriology*, 99(2), 520–526. <https://doi.org/10.1128/jb.99.2.520-526.1969>
- López-Contreras, B. E., Morán-Ramos, S., Villarruel-Vázquez, R., Macías-Kauffer, L., Villamil-Ramírez, H., León-Mimila, P., Vega-Badillo, J., Sánchez-Muñoz, F., Llanos-Moreno, L. E., Canizalez-Román, A., del Río-Navarro, B., Ibarra-González, I., Vela-Amieva, M., Villarreal-Molina, T., Ochoa-Leyva, A., Aguilar-Salinas, C. A., & Canizales-Quinteros, S. (2018). Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatric Obesity*, 13(6), 381–388. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12262>
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. *ISME Journal*, 5(2), 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>
- Lukovac, S., Belzer, C., Pellis, L., Keijser, B. J., de Vos, W. M., Montijn, R. C., & Roeselers, G. (2014). Differential Modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids. *MBio*, 5(4), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01438-14>
- Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 478–485. <https://doi.org/10.1038/nri1373>
- Mai, X. M., Kull, I., Wickman, M., & Bergström, A. (2010). Antibiotic use in early life and development of allergic diseases: Respiratory infection as the explanation. *Clinical and Experimental Allergy*, 40(8), 1230–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03532.x>
- Maier, R. M. (2009). Bacterial Growth. *Environmental Microbiology*, 37–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>
- Maier, R. M., Palmer, M. W., Andersen, G. L., Halonen, M. J., Josephson, K. C., Maier, R. S., Martinez, F. D., Neilson, J. W., Stern, D. A., Vercelli, D., & Wright, A. L. (2010). Environmental determinants of and impact on childhood asthma by the bacterial community in household dust. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2663–2667. <https://doi.org/10.1128/AEM.01665-09>
- Mangin, I., Suau, A., Gotteland, M., Brunser, O., & Pochart, P. (2010). Amoxicillin treatment modifies the composition of *Bifidobacterium* species in infant intestinal microbiota. *Anaerobe*, 16(4), 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.005>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Martin, R., Makino, H., Yavuz, A. C., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., Kubota, H., Swinkels, S., Sakai, T., Oishi, K., Kushiro, A., & Knol, J. (2016). Early-Life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *PLoS ONE*, 11(6), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158498>
- Martínez Cambor, P. (2012). Ajuste del valor-p por contrastes múltiples. *Revista Chilena de Salud Pública*, 16(3), 225–232. <https://doi.org/10.5354/0717-3652.2012.23127>

- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nature11551>
- Mazmanian, S. K., Cui, H. L., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>
- McGhee, J. R., & Fujihashi, K. (2012). Inside the Mucosal Immune System. *PLoS Biology*, 10(9), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001397>
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4), 1–67. <https://doi.org/10.1128/mmb.00036-17>
- Montesinos-Correa, H. (2014). Crecimiento y antropometría: aplicación clínica. *Acta Pediatrica de Mexico*, 35(2), 159–165.
- Moon, C., Baldrige, M. T., Wallace, M. A., Burnham, C. A. D., Virgin, H. W., & Stappenbeck, T. S. (2015). Vertically transmitted faecal IgA levels determine extra-chromosomal phenotypic variation. *Nature*, 521(7550), 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature14139>
- Munyaka, P. M., Khafipour, E., & Ghia, J. E. (2014). External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Frontiers in Pediatrics*, 2(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00109>
- Natividad, J. M. M., Hayes, C. L., Motta, J. P., Jury, J., Galipeau, H. J., Philip, V., Garcia-Rodenas, C. L., Kiyama, H., Bercik, P., & Verdú, E. F. (2013). Differential induction of antimicrobial REGIII by the intestinal microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7745–7754. <https://doi.org/10.1128/AEM.02470-13>
- Neefs, J. marc, Van De Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., & de Wachter, R. (1993). Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research*, 21(13), 3025–3049. <https://doi.org/10.1093/nar/21.13.3025>
- Nermes, M., Niinivirta, K., Nylund, L., Laitinen, K., Matomäki, J., Salminen, S., & Isolauri, E. (2013). Perinatal Pet Exposure, Faecal Microbiota, and Wheezy Bronchitis: Is There a Connection? *ISRN Allergy*, 2013, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/827934>
- Neu, J., & Rushing, J. (2011). Cesarean Versus Vaginal Delivery: Long-term Infant Outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clinics in Perinatology*, 38(2), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2011.03.008>
- Neuman, H., Debelius, J. W., Knight, R., & Koren, O. (2015). Microbial endocrinology: The interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(4), 509–521. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu010>
- Nicholson, J. K., Holmes, E., & Wilson, I. D. (2005). Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), 431–438. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1152>
- Noverr, M. C., Falkowski, N. R., Mcdonald, R. A., Mckenzie, A. N., & Huffnagle, G. B. (2005). Development of Allergic Airway Disease in Mice following Antibiotic Therapy and Fungal Microbiota In.pdf. *Infection and Immunity*, 73(1), 30–38. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.30>
- O'Sullivan, A., Farver, M., & Smilowitz, J. T. (2015). The Influence of early infant-feeding practices on the intestinal microbiome and body composition in infants. *Nutrition and Metabolic Insights*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.4137/NMI.S29530>
- Oberle, D., Von Mutius, E., & Von Kries, R. (2003). Childhood asthma and continuous exposure to cats since the first year of life with cats allowed in the child's bedroom. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 58(10), 1033–1036. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00285.x>
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J. N., Siebert, R., Baron, R. M., Kasper, D. L., & Blumberg, R. S. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, 336(6080), 489–493. <https://doi.org/10.1126/science.1219328>
- Ortiz Pinilla, J., & Gil, D. (2014). Transformaciones logarítmicas en regresión simple. *Comunicaciones*

- En Estadística, 7(1), 80. <https://doi.org/10.15332/s2027-3355.2014.0001.06>
- Ottman, N., Reunanen, J., Meijerink, M., Pietila, T. E., Kainulainen, V., Klievink, J., Huuskonen, L., Aalvink, S., Skurnik, M., Boeren, S., Satokari, R., Mercenier, A., Palva, A., Smidt, H., De Vos, W. M., & Belzer, C. (2017). Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. *PLoS ONE*, 12(3), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173004>
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(August), 104. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00104>
- Parnell, L. A., Briggs, C. M., Cao, B., Delannoy-Bruno, O., Schrieffer, A. E., & Mysorekar, I. U. (2017). Microbial communities in placentas from term normal pregnancy exhibit spatially variable profiles. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11514-4>
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., Van Den Brandt, P. A., & Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511–521. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2824>
- Pérez-Cobas, A. E., Gosalbes, M. J., Friedrichs, A., Knecht, H., Artacho, A., Eismann, K., Otto, W., Rojo, D., Bargiela, R., Von Bergen, M., Neulinger, S. C., Däumer, C., Heinsen, F. A., Latorre, A., Barbas, C., Seifert, J., Dos Santos, V. M., Ott, S. J., Ferrer, M., & Moya, A. (2013). Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: A multi-omic approach. *Gut*, 62(11), 1591–1601. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303184>
- Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M. C., Ramer-Tait, A. E., & Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0268-4>
- Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*, 16(7), 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Plaisancie, P., Ducroc, R., El Homsy, M., Tsocas, A., Guilmeau, S., Zoghbi, S., Thibaudeau, O., & Bado, A. (2006). Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(4), 805–813. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00433.2005>
- Praveen, P., Jordan, F., Priami, C., & Morine, M. J. (2015). The role of breast-feeding in infant immune system: a systems perspective on the intestinal microbiome. *Microbiome*, 3, 41. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0104-7>
- Presley, L. L., Wei, B., Braun, J., & Borneman, J. (2010). Bacteria associated with immunoregulatory cells in mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 936–941. <https://doi.org/10.1128/AEM.01561-09>
- Qiu, X., Zhang, M., Yang, X., Hong, N., & Yu, C. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7(11), e558–e568. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.04.002>
- Rautava, S., Ruuskanen, O., Ouwehand, A., Salminen, S., & Isolauri, E. (2004). The hygiene hypothesis of atopic disease—An extended version. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 38(4), 378–388. <https://doi.org/10.1097/00005176-200404000-00004>
- Reh, D. D., Wang, Y., Ramanathan, M., & Lane, A. P. (2010). Treatment-Recalcitrant Chronic Rhinosinusitis with Polyps is Associated with Altered Epithelial Cell Expression of Interleukin-33. *American Journal of Rhinology & Allergy*, 24(2), 105–109. <https://doi.org/10.2500/ajra.2010.24.3446>
- Remes, S. T., Castro-Rodriguez, J. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D., Wright, A. L., & Remes, S. T. (2001). Dog exposure in infancy decreases the subsequent risk of frequent wheeze but not of atopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(4), 509–515. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.117797>
- Ridge, J. P., Fuchs, E. J., & Matzinger, P. (1996). Neonatal tolerance revisited: Turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science*, 271(5256), 1723–1726. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1723>
- Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl,

- R., Nowak, D., & Von Mutius, E. (2001). Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: A cross-sectional survey. *Lancet*, 358(9288), 1129–1133. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06252-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06252-3)
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J. F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., Gies, E. A., Dodsworth, J. A., Hedlund, B. P., Tsiamis, G., Sievert, S. M., Liu, W. T., Eisen, J. A., Hallam, S. J., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., ... Woyke, T. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499(7459), 431–437. <https://doi.org/10.1038/nature12352>
- Risnes, K. R., Belanger, K., Murk, W., & Bracken, M. B. (2011). Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: Findings in a cohort of 1,401 US children. *American Journal of Epidemiology*, 173(3), 310–318. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq400>
- Robb, R., Munck, A., & Smith, K. (1981). T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *The Journal of Experimental Medicine*, 154(5), 1455–1474. <https://doi.org/10.1084/jem.154.5.1455>
- Rodriguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(0), 1–17. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Romano-Keeler, J., & Weitkamp, J. H. (2015). Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development. *Pediatric Research*, 77, 189–195. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.163>
- Rougé, C., Goldenberg, O., Ferraris, L., Berger, B., Rochat, F., Legrand, A., Göbel, U. B., Vodovar, M., Voyer, M., Rozé, J. C., Darmaun, D., Piloquet, H., Butel, M. J., & de La Cochetière, M. F. (2010). Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe*, 16(4), 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.002>
- Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., A. Chatila, T., & Mazmanian, S. K. (2011). The Toll-like receptor pathway establishes commensal gut colonization. *Science*, 332(6032), 974–977. <https://doi.org/10.1126/science.1206095>
- Ruiz, L., Moles, L., Gueimonde, M., & Rodriguez, J. M. (2016). Perinatal Microbiomes' Influence on Preterm Birth and Preterms' Health. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 63(6), e193–e203. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001196>
- Russell, S. L., Gold, M. J., Hartmann, M., Willing, B. P., Thorson, L., Wlodarska, M., Gill, N., Blanchet, M. R., Mohn, W. W., McNagny, K. M., & Finlay, B. B. (2012). Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Reports*, 13(5), 440–447. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.32>
- Ryan, J. J. (1997). Interleukin-4 and its receptor: essential mediators of the allergic response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(1 Pt 1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(97\)81037-8](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(97)81037-8)
- Salminen, S. (2004a). Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*, 53(9), 1388–1389. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.041640>
- Salminen, S. (2004b). Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*, 53(9), 1388–1389. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.041640>
- Salzman, N. H., Ghosh, D., Huttner, K. M., Paterson, Y., & Bevins, C. L. (2003). Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*, 422(6931), 522–526. <https://doi.org/10.1038/nature01520>
- Sánchez-Margalet, V., Fernández-Riejos, P., Najib, S., Santos-Alvarez, J., Martín-Romero, C., Pérez-Pérez, A., & González-Yanes, C. (2010). Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators of Inflammation*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/568343>
- Sanfilippo, L., Li, C. K. F., Seth, R., Balwin, T. J., Menozzi, M. G., & Mahida, Y. R. (2000). *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGF-β) by human colonic epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 119(3), 456–463. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01155.x>
- Schaub, B., Liu, J., Höppler, S., Schleich, I., Huehn, J., Olek, S., Wiczorek, G., Illi, S., & von Mutius, E. (2009). Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(4). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.01.056>
- Schuijs, M. J., Willart, M. A., Vergote, K., Gras, D., Deswarte, K., Ege, M. J., Madeira, F. B., Beyaert,

- R., van Loo, G., Bracher, F., von Mutius, E., Chanez, P., Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2015). Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*, 349(6252), 1106–1110. <https://doi.org/10.1126/science.aac6623>
- Sekirov, I., Tam, N. M., Jogova, M., Robertson, M. L., Li, Y., Lupp, C., & Finlay, B. B. (2008). Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infection and Immunity*, 76(10), 4726–4736. <https://doi.org/10.1128/IAI.00319-08>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164(3), 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- Shin, N. R., Lee, J. C., Lee, H. Y., Kim, M. S., Whon, T. W., Lee, M. S., & Bae, J. W. (2014). An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, 63(5), 727–735. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303839>
- Shirakawa, T., Enomoto, T., Shimazu, S. I., & Hopkin, J. M. (1997). The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*, 275(5296), 77–79. <https://doi.org/10.1126/science.275.5296.77>
- Smillie, C. S., Smith, M. B., Friedman, J., Cordero, O. X., David, L. A., & Alm, E. J. (2011). Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*, 480(7376), 241–244. <https://doi.org/10.1038/nature10571>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H. M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C. H., Westover, B. P., Weatherford, J., Buhler, J. D., & Gordon, J. I. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*, 307(5717), 1955–1959. <https://doi.org/10.1126/science.1109051>
- Spor, A., Koren, O., & Ley, R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 279–290. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2540>
- Stewart, J. A., Chadwick, V. S., & Murray, A. (2005). Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *Journal of Medical Microbiology*, 54(12), 1239–1242. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46189-0>
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299(6710), 1259–1260. <https://doi.org/10.1136/bmj.299.6710.1259>
- Štšepetova, J., Sepp, E., Julge, K., Vaughan, E., Mikelsaar, M., & De Vos, W. M. (2007). Molecularly assessed shifts of *Bifidobacterium* spp. and less diverse microbial communities are characteristic of 5-year-old allergic children. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(2), 260–269. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00306.x>
- Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., & Koga, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *The Journal of Immunology*, 159(4), 1739 LP – 1745. <http://www.jimmunol.org/content/159/4/1739.abstract>
- Tanaka, S., Yamamoto, K., Yamada, K., Furuya, K., & Uyeno, Y. (2016). Relationship of enhanced butyrate production by colonic butyrate-producing bacteria to immunomodulatory effects in normal mice fed an insoluble fraction of *Brassica rapa* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9), 2693–2699. <https://doi.org/10.1128/AEM.03343-15>
- Ternhag, A., & Hellman, J. (2013). More on U.S. outpatient antibiotic prescribing, 2010. *New England Journal of Medicine*, 369(12), 1175–1176. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1306863>
- Thilaganathan, B., Meher-Homji, N., & Nicolaidis, K. H. (1994). Labor: An immunologically beneficial process for the neonate. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 171(5), 1271–1272. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(94\)90145-7](https://doi.org/10.1016/0002-9378(94)90145-7)
- Tun, H. M., Konya, T., Takaro, T. K., Brook, J. R., Chari, R., Field, C. J., Guttman, D. S., Becker, A. B., Mandhane, P. J., Turvey, S. E., Subbarao, P., Sears, M. R., Scott, J. A., Kozyskyj, A. L., Anand, S. S., Cyr, M., Denburg, J. A., Macri, J., Eiwegger, T., ... Takaro, T. (2017). Exposure

- to household furry pets influences the gut microbiota of infants at 3-4 months following various birth scenarios. *Microbiome*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0254-x>
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Turpin, W., Espin-Garcia, O., Xu, W., Silverberg, M. S., Kevans, D., Smith, M. I., Guttman, D. S., Griffiths, A., Panaccione, R., Otle, A., Xu, L., Shestopaloff, K., Moreno-Hagelsieb, G., Paterson, A. D., & Croitoru, K. (2016). Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nature Genetics*, 48(11), 1413–1417. <https://doi.org/10.1038/ng.3693>
- Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., & Okada, Y. (1993). Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology*, 79(1), 32–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8509140><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1422052>
- Ursell, L. K., Clemente, J. C., Rideout, J. R., Gevers, D., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2012). The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(5), 1204–1208. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.010>
- Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L., & Hooper, L. V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20858–20863. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808723105>
- van Ree, R., Hummelshøj, L., Plantinga, M., Poulsen, L. K., & Swindle, E. (2014). Allergic sensitization: host-immune factors. *Clinical and Translational Allergy*, 4(1), 12. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-4-12>
- Van Dieren, J. M., Van Der Woude, C. J., Kuipers, E. J., Escher, J. C., Samsom, J. N., Blumberg, R. S., & Nieuwenhuis, E. E. S. (2007). Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(9), 1146–1152. <https://doi.org/10.1002/ibd.20164>
- Van Nimwegen, F. A., Penders, J., Stobberingh, E. E., Postma, D. S., Koppelman, G. H., Kerkhof, M., Reijmerink, N. E., Dompeling, E., Van Den Brandt, P. A., Ferreira, I., Mommers, M., & Thijs, C. (2011). Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(5), 948-955.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.07.027>
- Vázquez García, J. C., & Salas Hernández, J. (2017). Guia Mexicana del Asma 2017. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 76(1), 137. <https://doi.org/ISSN 0028-3746>
- Ventura, M., O’Flaherty, S., Claesson, M. J., Turroni, F., Klaenhammer, T. R., van Sinderen, D., & O’Toole, P. W. (2009). Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: Probiogenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 61–71. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2047>
- Von Mutius, E., & Vercelli, D. (2010). Farm living: Effects on childhood asthma and allergy. *Nature Reviews Immunology*, 10(12), 861–868. <https://doi.org/10.1038/nri2871>
- Vrieze, A., Out, C., Fuentes, S., Jonker, L., Reuling, I., Kootte, R. S., Van Nood, E., Holleman, F., Knaapen, M., Romijn, J. A., Soeters, M. R., Blaak, E. E., Dallinga-Thie, G. M., Reijnders, D., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Knop, F. K., Holst, J. J., Van Der Ley, C., ... Nieuwdorp, M. (2014). Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *Journal of Hepatology*, 60(4), 824–831. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.034>
- Waldram, A., Holmes, E., Wang, Y., Rantalainen, M., Wilson, I. D., Tuohy, K. M., McCartney, A. L., Gibson, G. R., & Nicholson, J. K. (2009). Top-down systems biology modeling of host metabolite-microbiome associations in obese rodents. *Journal of Proteome Research*, 8(5), 2361–2375. <https://doi.org/10.1021/pr8009885>
- Wang, Q., Li, F., Liang, B., Liang, Y., Chen, S., Mo, X., Ju, Y., Zhao, H., Jia, H., Spector, T. D., Xie,

- H., & Guo, R. (2018). A metagenome-wide association study of gut microbiota in asthma in UK adults. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1257-x>
- Wang, Y., Luo, X., Mao, X., Tao, Y., Ran, X., Zhao, H., Xiong, J., & Li, L. (2017). Gut microbiome analysis of type 2 diabetic patients from the Chinese minority ethnic groups the Uygurs and Kazaks. *PLoS ONE*, 12(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172774>
- Weidinger, S., Beck, L. A., Bieber, T., Kabashima, K., & Irvine, A. D. (2018). Atopic dermatitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0001-z>
- Weinmayr, G., Forastiere, F., Weiland, S. K., Rzehak, P., Abramidze, T., Annesi-Maesano, I., Björkstén, B., Brunekreef, B., Büchele, G., Cookson, W. O. C., Von Mutius, E., Pistelli, R., & Strachan, D. P. (2008). International variation in prevalence of rhinitis and its relationship with sensitisation to perennial and seasonal allergens. *European Respiratory Journal*, 32(5), 1250–1261. <https://doi.org/10.1183/09031936.00157807>
- Willing, B. P., Russell, S. L., & Finlay, B. B. (2011). Shifting the balance: Antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 233–243. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2536>
- Wingender, G., Stepniak, D., Krebs, P., Lin, L., McBride, S., Wei, B., Braun, J., Mazmanian, S. K., & Kronenberg, M. (2012). Intestinal microbes affect phenotypes and functions of invariant natural killer T cells in mice. *Gastroenterology*, 143(2), 418–428. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.017>
- Wolter, S., & Price, H. N. (2014). Atopic Dermatitis. *Pediatric Clinics of North America*, 61(2), 241–260. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2013.11.002>
- Wu, B. G., Sulaiman, I., Wang, J., Shen, N., Clemente, J. C., Li, Y., Laumbach, R. J., Lu, S., Udasin, I., Le-Hoang, O., Perez, A., Alimokhtari, S., Black, K., Plietz, M., Twumasi, A., Sanders, H., Malecha, P., Kapoor, B., Scaglione, B. D., ... Segal, L. N. (2019). Severe Obstructive Sleep Apnea Is Associated with Alterations in the Nasal Microbiome and an Increase in Inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 199(1), 99–109. <https://doi.org/10.1164/rccm.201801-0119OC>
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>
- Yassour, M., Vatanen, T., Siljander, H., Hämäläinen, A., Hamalainen, A., & Al, E. (2016). Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatments on strain-level diversity and stability. *Sci Trans Med*, 8(343), 1173–1178. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad0917>
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2014). Life at the beginning: Perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nature Immunology*, 15(4), 307–310. <https://doi.org/10.1038/ni.2847>
- Zheng, T. (2014). The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 05(02), 707–708. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000202>
- Zheng, T., Yu, J., Oh, M. H., & Zhu, Z. (2011). The atopic march: Progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 3(2), 67–73. <https://doi.org/10.4168/aair.2011.3.2.67>
- Zhong, Y., Nyman, M., & Fåk, F. (2015). Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(10), 2066–2076. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500187>