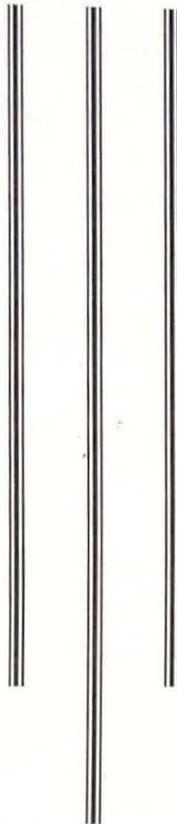




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ



Método de secuenciación y purificación de ADN de microbiota nasofaríngea en escolares mexicanos con rinitis alérgica en tratamiento a base de esteroides intranasales o solución salina.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN :

OTORRINOLARINGOLOGÍA
PEDIÁTRICA

P R E S E N T A :

Dra. Silvia Raquel Zavala Martínez



TUTOR:

Dr. Carlos De La Torre González



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



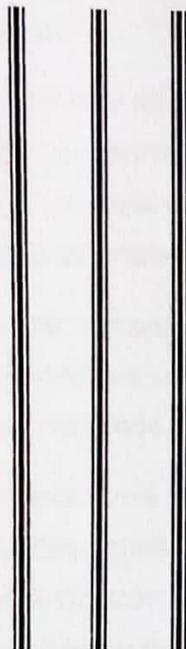
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

HOJA DE FIRMAS



Dr. Sarbelio Moreno Espinoza

Director de Enseñanza y Desarrollo Académico
Hospital Infantil de México Federico Gómez

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'S. Moreno'.

Dr. Carlos De La Torre Gonzáles

Jefe del Servicio de Otorrinolaringología Pediátrica
Hospital Infantil de México Federico Gómez



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'N. Reyes'.

Dra. Nayely Reyes Noriega

Médico Adscrita al Servicio de Alergología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo en primer lugar a mi familia, especialmente a mi mamá quien en paz descanse, gracias por ser el ángel en mi vida que me ha guiado a lo largo de todo mi camino.

A mi hermano Víctor a quien admiro demasiado, ya que sin su apoyo incondicional no hubiera sido posible realizar este sueño. Gracias por tu nobleza, tus consejos, por estar siempre que te he necesitado y por creer en mí. ¡Te quiero mucho!

También a mi prometido Christian José, muchas gracias por tu infinita paciencia, por apoyarme sin dudarle en cada proyecto que he realizado, y por tu amor incondicional que a pesar de las distancias ha permanecido cada día más fuerte. Eres la fortaleza que me ha mantenido en estos 2 años.

A mis compañeros Alejandro, Esmeralda, Luz y Perlita. Gracias por haber sido los mejores compañeros que pude tener en esta residencia y por la amistad que me han dado.

Y finalmente a mis maestros, Dr. De La Torre, Dr. Neri, Dra. Álvarez y Dra. Cortés. Infinitas gracias por todas sus enseñanzas, por brindarnos de su tiempo y dedicación para formar excelentes profesionales ya que nada de esto sería posible sin ustedes. Es un orgullo ser parte de esta familia.

INDICE

1. Portada	1
2. Hoja de firmas	2
3. Dedicatorias	3
4. Índice	4
5. Antecedentes	5
6. Marco Teórico	8
7. Planteamiento del Problema	22
8. Pregunta de Investigación	23
9. Justificación	24
10. Objetivos	25
11. Metodología	27
12. Plan de análisis estadístico	36
13. Variables	37
14. Resultados	40
15. Discusión	45
16. Conclusión	47
17. Cronograma de actividades	48
18. Referencias	49
19. Limitaciones del Estudio	55

ANTECEDENTES

La rinitis alérgica afecta del 10 – 30% de la población a nivel mundial dependiendo del área geográfica. Es una patología que tiene un impacto importante en niños debido a su alta incidencia lo que conlleva a una gran carga médica y económica, así como también alteración en el bienestar y calidad de vida de los pacientes¹. Específicamente a nivel nacional, en la Ciudad de México hay estudios que reportan incidencia del 4.5% de rinitis alérgica diagnosticada en población pediátrica, sin embargo, se ha encontrado que más del 50% de esta población presenta algún síntoma de rinitis².

Se trata de una condición inflamatoria de la cavidad nasal mediada por inmunoglobulina E, citocinas, interleucinas y células inflamatorias en donde varios factores se han investigado y se han visto implicados en su desarrollo como ser genéticos, ambientales, infecciones virales del tracto respiratorio, exposición a alérgenos desde edad temprana, uso de algunos medicamentos y recientemente se ha incluido el papel de la microbiota en el desarrollo de las enfermedades atópicas³.

La microbiota se define como el material genético de todos los microbios (bacterias, hongos, protozoos y virus) que viven en el cuerpo humano y constituye una parte esencial para el desarrollo del sistema inmune desde la infancia temprana ya que produce mecanismos de tolerancia inmunológica, e interviene además en la regulación de la inflamación mucosa⁴.

La estructura de la microbiota del tracto respiratorio superior es distinta a la de otros órganos y presenta patrones únicos de colonización y sucesión. En la infancia temprana, el tracto respiratorio superior se encuentra colonizada por diferentes patógenos, los cuales incluye *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*. A estas bacterias también se les identifica como “patobiontes”. Generalmente colonizan al hospedero sin causar síntomas clínicos, pero tienen el potencial de causar enfermedad si abundan fuera de la zona de colonización⁵. Se reconoce en la actualidad que la microbiota nasal juega un papel protector, ya que puede facilitar o proveer resistencia a la colonización de virus y bacterias, así como también proveer

protección en el desarrollo de enfermedades atópicas. La presencia excesiva de bacterias potencialmente patógenas como *Moraxella catarrhalis* en la vía aérea se ha visto asociada con el desarrollo de asma en escolares⁶.

En la vía aérea superior, la nasofaringe se coloniza tanto por bacterias comensales como patógenas, tal es el caso de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* y *Neisseria meningitidis*⁷. Diversos estudios han reportado cambios en estas bacterias por factores ambientales, uso de antibióticos sistémicos, vacunas, infecciones virales y actualmente se cree que el uso de medicamentos y sustancias de aplicación tópica son capaces de producir alteraciones⁸.

Varios estudios han tratado de definir la microbiota nasofaríngea en pacientes alérgicos e identificar las diferencias en relación con pacientes sanos. Chui y cols. reportaron disbiosis en la microbiota de vía aérea superior, al comparar escolares sanos con pacientes afectados de rinitis alérgica. La diferencia fue significativa al medir la abundancia de las diferentes phylas, siendo mayor la prevalencia de Proteobacteria, específicamente los géneros *Haemophilus*, *Neisseria* y *Moraxella* en el grupo atópico⁹.

Las técnicas para el estudio de la microbiota, como la secuenciación de nueva generación, han demostrado ser superiores a las técnicas convencionales de cultivos, ya que permiten conocer múltiples perfiles bacterianos con alta sensibilidad y especificidad. La mayoría de los estudios sobre microbiota se basan en la ampliación de la secuencia del gen 16s rRNA. Existen 9 regiones variables dentro de los procariotas (V1 – V9), cada uno con tramos de ácido desoxirribonucleico (ADN) altamente conservado y adecuado para su estudio¹⁰. Los métodos más utilizados para toma de muestras en la cavidad nasal son los hisopados vía transnasal y los lavados nasales. Los primeros son más abrasivos que los segundos; sin embargo han demostrado ser superiores, sobre todo cuando el objetivo son las regiones más posteriores de la cavidad nasal¹¹.

Debido al papel influyente de la microbiota nasofaríngea en la patogénesis de las infecciones del tracto respiratorio y enfermedades atópicas, resulta importante su identificación en pacientes con rinitis alérgica y la disbiosis que pueden provocar diversos factores como el uso de esteroides tópicos y solución salina en este padecimiento.

Para ello, es fundamental tener conocimiento profundo del método de secuenciación y purificación del ADN de la microbiota nasofaríngea en estos pacientes.

MARCO TEÓRICO

DEFINICIÓN:

La rinitis alérgica se define como una inflamación de la mucosa nasal que se caracteriza por síntomas como rinorrea anterior y/o posterior, obstrucción y prurito nasal. Frecuentemente estos síntomas se asocian con otros, especialmente oculares y se presentan durante dos o más días consecutivos, con duración mayor a una hora¹².

EPIDEMIOLOGÍA:

La rinitis alérgica afecta entre el 10 – 30% de la población a nivel mundial dependiendo de la ubicación geográfica. Esta enfermedad tiene una gran incidencia en niños y se asocia a un impacto económico significativo, disminución del bienestar, calidad de vida, productividad y aumento de costos hospitalarios¹³. En cuanto a la población pediátrica se han realizado investigaciones como el estudio internacional para el Asma y Alergias en la niñez (ISAAC por sus siglas en inglés) el cual ha proporcionado información valiosa sobre la prevalencia de estas enfermedades a nivel mundial, reportando una incidencia de rinitis alérgica del 1.4 – 28.9%. De igual manera, se ha aplicado este instrumento para investigar su incidencia en México, específicamente en la Ciudad de México en donde se encontró que el 4.5% de los niños tienen diagnóstico establecido de rinitis alérgica y 40.2 – 55% presentan síntomas de rinitis².

FISIOPATOLOGIA:

La rinitis alérgica es una condición inflamatoria de la cavidad nasal mediada por Inmunoglobulina E que resulta de la introducción de un alérgeno en un sujeto previamente sensibilizado. En 1929 se definió como un proceso que incluye 3 síntomas cardinales: estornudos, obstrucción nasal y rinorrea³. Cuando se presenta en niños, por lo general es secundaria al desarrollo acelerado de su sistema inmune dando como resultado una respuesta hiperreactiva de los linfocitos TH2¹⁴.

Estas enfermedades inflamatorias se caracterizan por la producción de interleucina – 4 (IL-4), IL -5, IL -9, e IL – 13 producidas por células CD4 - TH2,

producción de IgE y reclutamiento de células efectoras a los sitios de tejido inflamatorio¹⁵. La interleucina 4 es una citocina cardinal que conduce la sensibilización a los alérgenos, mientras que la interleucina 5 estimula la afluencia de los eosinófilos en la mucosa. Las células TH2 activan a los linfocitos B que al convertirse en células plasmáticas producen IgE específica de alérgenos. Estas moléculas IgE se liberan en el torrente sanguíneo y se unen a receptores de alta afinidad en la superficie de los mastocitos tisulares y basófilos circundantes¹⁶. Se ha encontrado que la ausencia de bacterias comensales en la microbiota nasal aumenta la proliferación de basófilos e incrementa la infiltración de linfocitos y eosinófilos¹⁵.

La rinitis es común en la niñez y la infancia, y aunque la mayoría de los niños no tienen sensibilización alérgica hay evidencia actual que apoya la teoría de interacción entre virus y bacterias como un factor importante para el desarrollo de infecciones del tracto respiratorio y consecuentemente a enfermedades atópicas¹⁷.

CLASIFICACIÓN DE RINITIS ALÉRGICA:

La rinitis alérgica y su impacto en el asma (ARIA) ha propuesto la clasificación de la rinitis alérgica según la causa presunta y su presentación: estacional vs perenne. Clásicamente, esto ha incluido rinitis alérgica estacional (fiebre del heno) y rinitis alérgica perenne la cual se desencadena por una gran variedad de alérgenos al aire libre, especialmente pólenes. Esta última es comúnmente provocado por alérgenos de interior que están presentes a lo largo del año, como los ácaros del polvo, los mohos, los insectos (cucarachas), y caspa de animales¹².

La clasificación de rinitis alérgica "estacional" y "perenne" a menudo presenta conflicto, ya que las manifestaciones de alergia perenne pueden no ocurrir durante todo el año. Debido a los problemas descritos anteriormente, ARIA propuso un nuevo método de clasificación basado en la duración y la recurrencia de las manifestaciones de síntomas. La rinitis alérgica intermitente se caracteriza por síntomas por menos de 4 días por semana o menos de 4 semanas consecutivas. La rinitis alérgica persistente se caracteriza por síntomas que ocurren más de 4 días por semana por al menos 4 semanas consecutivas; por

lo tanto, los pacientes con rinitis persistente son sintomático la mayor parte del tiempo¹⁸.

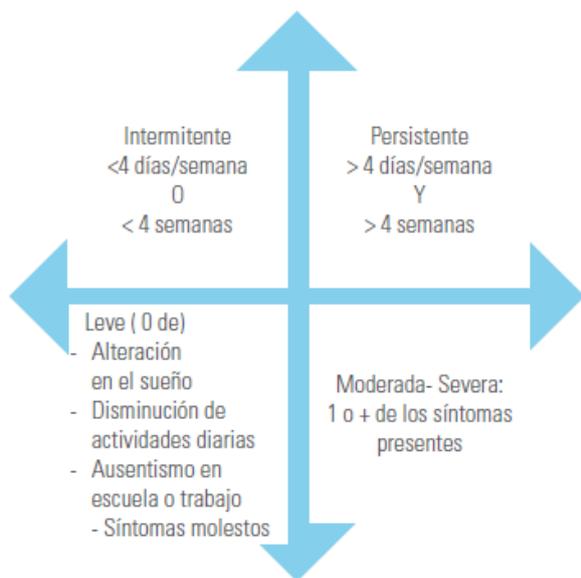


Figura 1. Clasificación ARIA de Rinitis Alérgica.

Fuente: PAC Otorrinolaringología Pediátrica Tomo 4 ¹⁶.

CUADRO CLÍNICO:

Los pacientes con rinitis alérgica presentan síntomas como congestión y obstrucción nasal, estornudos, prurito nasal, rinorrea hialina. Además, puede presentar síntomas oculares como secreción acuosa, hiperemia de conjuntiva, prurito, quemosis y en niños pequeños puede haber edema peri orbitario con oscurecimiento de los párpados inferiores debido a la congestión crónica. El “saludo alérgico” es un hallazgo frecuente en pacientes con síntomas crónicos, esto debido al frote prolongado de la nariz¹⁶.

DIAGNÓSTICO DE RINITIS ALÉRGICA:

La sospecha clínica de la rinitis es resaltada mediante la historia clínica y respaldada por el examen físico. El diagnóstico puede ser confirmado mediante varias pruebas objetivas³.

Historia clínica: tipo de síntomas, frecuencia y duración, exposición ambiental, uso de medicamentos, comorbilidades como síndrome de apnea/hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS), asma, obesidad, etc. Así como la detección de antecedentes familiares de atopia³.

Examen Físico: en la inspección general de estos pacientes se puede apreciar un pliegue nasal horizontal a través del dorso de la nariz, esto debido al

frotamiento crónico de la misma. Al realizar rinoscopia anterior es necesaria la evaluación de los cornetes, los cuales se encuentran aumentados de tamaño mientras que la mucosa se puede observar inflamada. También es importante evaluar la presencia o ausencia de secreciones, así como las características de estas¹⁶.

Endoscopia Nasal: aunque la asociación de los hallazgos endoscópicos con la rinitis alérgica parece no ser consistentes, esta puede ser de utilidad para la identificación o exclusión de otras patologías nasales como poliposis o rinosinusitis crónica³.

Estudios de Imagen: no están recomendados de rutina a menos que se indiquen para descartar otras patologías³.

Pruebas cutáneas: son un bioensayo realizado mediante la introducción de un alérgeno específico en la piel del paciente lo que permite la observación directa de la reacción a un antígeno específico el cual activa los mastocitos cutáneos que interactúan con la IgE. Esto conduce a la liberación de sustancias químicas como la histamina y da como resultado la formación de una roncha 15 a 20 minutos después. Las pruebas cutáneas han demostrado ser altamente sensibles y específicas con más del 80% y pueden utilizarse en pacientes de cualquier edad. Otras pruebas son las de dilución intradérmica, las cuales son de utilidad cuando la prueba cutánea es negativa y existe una alta sospecha de sensibilización alérgica a un alérgeno en particular¹⁶.

Pruebas en sangre: la IgE específica para alérgenos puede determinarse mediante la prueba de suero del paciente con una prueba in vitro utilizando un inmunoensayo⁷. Los niveles de IgE sérica que se consideran normales en escolares de 6 – 8 años es de 1 – 161 UI/ml, mientras que el nivel de IgE específica para Aero alérgenos y alimentos es de < 0.35 UI/ml⁴. La biometría hemática completa y recuento diferencial de glóbulos blancos y proteína C reactiva¹⁶.

Citología nasal: identifica la presencia de eosinófilos lo cual implica inflamación y puede ser útil para predecir la respuesta al tratamiento con corticosteroides¹⁶.

TRATAMIENTO:

La evitación de alérgenos y los controles ambientales son discutidos con frecuencia como parte de la estrategia de tratamiento para la rinitis alérgica en conjunto con el tratamiento farmacológico y la inmunoterapia. Existen numerosas opciones para uso oral o sistémico, aplicación intranasal tópica y terapias alternativas que pueden considerarse y se mencionan a continuación.

Antihistamínicos: La histamina es un importante mediador asociado con la sintomatología de la rinitis alérgica. Los antihistamínicos orales H1 bloquean la acción de la histamina al unirse al receptor de histamina H1, inhibiendo así los efectos proinflamatorios de la histamina.

Corticosteroides orales e inyectados: El efecto antiinflamatorio de los corticosteroides en el tratamiento de la rinitis alérgica es bien conocido. Sin embargo, dado los significativos efectos adversos sistémicos no son recomendados para el tratamiento de rutina. Un curso corto podría mejorar la congestión y facilitar el acceso y la eficacia del tópicos agentes.

Corticosteroides intranasales: son considerados como la 1er línea de tratamiento para la rinitis alérgica ya que producen una significativa disminución de los mediadores inflamatorios y la liberación de citoquinas, y además han mostrado ser seguros en niños. Sus principales efectos adversos son la irritación local, resequedad y epistaxis (incidencia 4 – 8% de los casos).

Descongestionantes orales: actúan en los receptores adrenérgicos y producen vasoconstricción con lo que alivian la obstrucción nasal por lo que pueden administrarse ciclos cortos.

Descongestionantes intranasales: actúan a nivel de los receptores alfa adrenérgicos por lo que producen vasoconstricción, siendo descongestionantes más potentes que los esteroides intranasales, sin embargo, no tienen efecto sobre los otros síntomas de la rinitis alérgica. La rinitis medicamentosa resulta de su uso prolongado por lo que se recomiendan ciclos cortos de 3 días para evitar este efecto adverso.

Antagonistas de receptores de leucotrienos: aprobado por la FDA para su uso en rinitis alérgica estacional en adultos y niños mayores de 2 años y rinitis perenne en mayores de 6 meses de edad. No se recomienda como monoterapia

ni terapia de inicio, pero pueden considerarse como 2da línea de tratamiento cuando los esteroides intranasales están contraindicados.

Cromolín: es un estabilizador de los mastocitos que previene la liberación de histamina, puede administrarse por vía oral o inhalado. Indicado en pacientes que no toleran los esteroides intranasales.

Anticolinérgicos intranasales: el bromuro de ipratropio intranasal actúa en el control de la rinorrea acuosa y es efectivo en rinitis alérgica perenne. Tiene un inicio de acción rápido y una vida media corta administrándose hasta 6 veces al día con absorción de menos del 10% teniendo mejor efecto cuando se combinan con esteroides intranasales.

Biológicos (Omalizumab): utilizado de manera individual o en conjunto con inmunoterapia. Es un anticuerpo humanizado que se une a la IgE. Actualmente no hay ningún biológico autorizado por la FDA para el tratamiento de rinitis alérgica. No se recomiendan como terapia de 1er línea en monoterapia, pero se puede utilizar en combinación con inmunoterapia en pacientes con riesgo incrementado de anafilaxia.

Inmunoterapia: implica la administración programada de extractos de alérgenos en dosis efectivas con el objetivo de instituir un cambio inmunológico sostenido.

Probióticos: dado el vínculo entre la flora intestinal y la atopia, la manipulación del microbioma a través de la administración de probióticos teóricamente podría conducir a una mejoría clínica de enfermedad alérgica³.

Aseos nasales: existe evidencia de que la solución salina también ha sido beneficiosa para el tratamiento de la rinitis ya que, además de ser bien tolerada, tiene muy pocos efectos adversos, y sirve como tratamiento adyuvante. Se ha visto que contribuye en la resolución de la inflamación y que produce alivio de síntomas (no solo por razones mecánicas) y esta terapia no se ha asociado con alteraciones de la microbiota nasal a diferencia de los esteroides intranasales. Incluye soluciones hipertónicas, isotónicas y agua de mar, siendo más beneficiosa la hipertónica en niños y la isotónica en adultos¹⁹.

MICROBIOTA EN ENFERMEDADES ALÉRGICAS:

Recientemente se han identificado diferencias significativas en la microbiota de niños con predisposición a las infecciones de tracto respiratorio superior. Sin embargo, existen escasas publicaciones del perfil taxonómico de la microbiota nasal en niños con enfermedades alérgicas, como rinitis y asma²⁰.

La microbiota se define como el material genético de todos los microbios (bacterias, hongos, protozoos y virus) que viven en el cuerpo humano. Los microbios sobrepasan las células humanas en una proporción de 10:1 y la mayor parte se encuentra en el intestino grueso⁴.

La interacción entre la microbiota de la mucosa y las células de la inmunidad es importante para el desarrollo del sistema inmune. La microbiota media mecanismos de tolerancia inmunológica y es esencial para la regulación de la inflamación mucosa. Varios estudios en humanos y modelos animales enfatizan que una microbiota alterada se relaciona con una alta prevalencia de enfermedades atópicas⁹.

El estudio de la microbiota comienza con el descubrimiento de Antoine Van Leeuwenhoek siglos atrás con la identificación de diferentes bacterias en una placa dental. Observaciones tempranas indicaron que las comunidades de microbiota tienen influencia en el desarrollo del tracto intestinal, incluyendo la estimulación para la producción de anticuerpos por bacterias potencialmente beneficiosas o probióticos. La emergencia en el campo de la investigación de la microbiota humana ha demostrado el papel clave que juegan las comunidades microbianas en una gran variedad de procesos que son críticos en los mamíferos como el metabolismo y modulación de la respuesta inmunológica, el desarrollo del sistema inmune asociado a mucosa y su función de barrera de protección, la secreción inicial de inmunoglobulinas, el desarrollo de poblaciones de células T y la estimulación de producción de péptidos antibacterianos. La microbiota respiratoria ha sido menos estudiada, sin embargo, se ha demostrado su contribución en la inmunidad local y al desarrollo de enfermedades como la alergia y asma²¹.

La composición de la microbiota puede ser afectada por varios factores como ejercicio, algunos medicamentos y enfermedades. Se ha visto que, en países

occidentales, la carga de enfermedades crónicas inflamatorias (incluyendo las alergias) se ha incrementado de manera importante en las últimas décadas debido a que los humanos permanecen el 92% de su tiempo en ambientes interiores²².

La presencia o ausencia de especies específicas de bacterias puede alterar de manera dramática la inmunidad adaptativa al ambiente. Estudios longitudinales revelan que durante el desarrollo de la microbiota se producen cambios durante el primer año de vida influenciados tanto por el individuo como por factores ambientales. El patrón de la colonización bacteriana durante los primeros meses de vida juega un papel en la estabilidad de la microbiota nasal²³.

La colonización del tracto respiratorio superior se inicia desde el nacimiento. Se ha observado desde hace varias décadas la existencia de una correlación entre el método de nacimiento (parto o cesárea), la forma de alimentación (lactancia materna) y la susceptibilidad a infecciones respiratorias, asma o alergia. Un estudio reciente demostró que los niños nacidos por cesárea presentaban niveles reducidos de colonización por bacterias protectoras, incluyendo especies de *Corynebacterium* y *Dolosigranulum*. También es sabido que la lactancia materna es benéfica para la salud por la transferencia de anticuerpos, y se ha encontrado que los niños que son alimentados por este método presentan niveles mayores de *Corynebacterium* y *Dolosigranulum*²⁴.

También se ha demostrado que la microbiota nasal de los lactantes se caracteriza por abundancia de los géneros *Moraxella* (*Moraxellaceae*, *Proteobacteria*), *Streptococcus* (*Streptococcaceae*, *Firmicutes*), *Haemophilus* (*Pasteurellaceae*, *Proteobacteria*), *Staphylococcus* (*Staphylococcaceae*, *Firmicutes*) y *Corynebacterium* (*Corynebacteriaceae*, *Actinobacteria*), mientras que otros estudios reportan *Dolosigranulum* (*Carnobacteriaceae*, *Firmicutes*) y algunos otros géneros. Además, es reconocido que la microbiota nasal juega un papel protector que puede facilitar o proveer resistencia a la colonización de virus respiratorios. La presencia excesiva de bacterias potencialmente patógenas como *Moraxella catarrhalis* en la vía aérea se ha asociado al desarrollo de asma²⁵, por lo que una nueva medida que podría reducir el riesgo de enfermedades respiratorias es la modulación de la microbiota, favoreciendo la

colonización del tracto respiratorio por bacterias comensales beneficiosas capaces de interferir con la proliferación de patógenos²⁶.

La vía respiratoria humana se caracteriza por interconexiones entre nichos altamente compartimentadas. En algunos estudios se ha encontrado que la microbiota nasal demuestra una comunidad polimicrobiana, mientras que en otras áreas de la vía respiratoria esta comunidad es menos diversa, probablemente debido a que la cavidad nasal es el primer contacto con el ambiente exterior. Cuando ocurren cambios en una comunidad polimicrobiana debido a la diversidad de las bacterias, se produce disbiosis, misma que se relaciona con el desarrollo de enfermedades; este fenómeno se ha visto tanto en el intestino como en la cavidad oral²⁷.

Otras investigaciones demuestran que bacterias del ambiente, potencialmente patógenas en la vía respiratoria como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria meningitidis* residen en la cavidad nasal, lo cual sugiere que este nicho puede ser un reservorio para infecciones de la vía respiratoria inferior. Así mismo, estas bacterias pueden producir re – colonización después de la administración de antibióticos, dando lugar a enfermedades crónicas²⁸.

Estos conceptos han motivado que múltiples estudios hayan tratado de definir la microbiota nasofaríngea de pacientes alérgicos e identificar las diferencias que existen en la microbiota nasal de pacientes sanos. Chui y cols. reportaron disbiosis en la microbiota de vía aérea superior, al comparar escolares sanos y escolares con rinitis alérgica. La diferencia fue significativa al medir la abundancia de las diferentes phylas siendo mayor la prevalencia de Proteobacteria, específicamente los géneros *Haemophilus*, *Neisseria* y *Moraxella* en el grupo atópico⁹.

ANÁLISIS DE MICROBIOTA:

Cuando se realiza el análisis de microbiota, una observación general es la poca concordancia entre los métodos utilizados, sobre todo cuando son a través de tomas de cultivo *versus* secuenciación de nueva generación. Las limitaciones en el manejo y el procesamiento de las muestras son una causa importante de resultados controvertidos; sin embargo, se ha reportado superioridad en aquellas que son analizadas por medio de secuenciación de nueva generación²⁷.

Este método se ha utilizado para describir la microbiota nasofaríngea tanto en individuos sanos como enfermos. Sin embargo, la mayoría de los estudios se basan en la cavidad nasal como un todo, por lo que se sabe muy poco sobre la variación biogeográfica de los microambientes nasales y de cómo las técnicas para tomar las muestras pueden captar esta diversidad microbiana. Los métodos más utilizados para toma de muestras son los hisopados vía transnasal y los lavados nasales, siendo el primero más abrasivo que el segundo, sin embargo, ha demostrado ser superior sobre todo cuando el objetivo son las regiones más posteriores de la cavidad nasal, ya que con los lavados se obtienen muestras menos específicas al abarcar diferentes poblaciones microbianas¹¹.

Muy pocos estudios se han centrado en la variación biogeográfica de la cavidad nasal. En un estudio, se utilizó la secuenciación 16S rRNA para comparar la microbiota de 3 sitios diferentes en la nariz en sujetos adultos sanos: vestíbulo nasal, meato medio y receso eseno etmoidal, encontrando que el 96.2% de las secuencias obtenidas correspondieron a 3 phylum principales: *Actinobacteria* (50.7%), *Firmicutes* (24.7%) y *Proteobacteria* (20.7%), revelando además diferencias significativas en la diversidad microbiana entre las regiones anteriores y posteriores de la nariz (en el vestíbulo nasal hubo predominio de *Actinobacteria* y *Firmicutes* mientras que en el meato medio y receso eseno etmoidal fue *Actinobacteria* y *Proteobacteria*²⁹).

En los últimos años se ha incrementado el uso de secuenciación de nueva generación para el análisis de comunidades microbianas complejas debido a que se requiere menor inversión a largo plazo en comparación con otras técnicas, permitiendo además conocer múltiples perfiles bacterianos con alta sensibilidad y especificidad en comparación con los métodos tradicionales de cultivo. La secuenciación de nueva generación ha sido de utilidad para determinar el papel de la disbiosis microbiana en enfermedades como síndrome de intestino irritable, diabetes y obesidad. La mayoría de los estudios sobre microbiota se basan en la ampliación de la secuencia del gen 16s rRNA. Existen 9 regiones variables dentro de los procariotas (V1 – V9), cada uno con tramos de ADN altamente conservado y adecuado para la unión con los *primers*. Una de las primeras consideraciones antes de realizar un proyecto sobre microbiota es la selección

de la técnica más adecuada para la secuenciación. Las tecnologías Illumina MiSeq, HiSeq y el Ion PGM han mostrado ser prometedoras en cuanto a costo – efectividad y tener buena resolución para la percepción de microbiomas en diversos ambientes¹⁰.

La caracterización de microbiota por medio de secuenciación de nueva generación requiere extracción de ADN microbiano. Diversos estudios han utilizado los kits comerciales Qiagen y Norgen. Estos son de uso sencillo y se han utilizado en estudios de microbiota de vía aérea³⁰.

DISBIOSIS DE LA MICROBIOTA EN ENFERMEDADES ALÉRGICAS:

La composición de la microbiota cambia rápidamente durante la infancia por el proceso llamado “sucesión ecológica”, el cual describe las modificaciones dentro de la comunidad microbiana en el paso del tiempo, y que se encuentra bajo la influencia de los cambios en el ambiente, exposición a nuevos virus y bacterias y factores como cambios hormonales, dieta, estrés y antibióticos³¹.

La mayoría de los niños presentan una infección por virus sincitial respiratorio (VSR) antes de los 2 años de vida, aunque solo el 2 – 3% requiere de hospitalización. La presencia de comorbilidades y edades tempranas de la vida incrementan el riesgo de infección severa por VSR, aunque la mayoría de los niños que son hospitalizados son previamente sanos y sin factores de riesgo³².

Así como la microbiota intestinal puede modificarse debido a diversos factores, también se ha propuesto que a nivel nasal el uso de ciertos medicamentos y sustancias, especialmente de manera tópica, pueden producir alteraciones en la microbiota nasal. Los tratamientos con lavados nasales y esteroides tópicos son ampliamente utilizados en el tratamiento de la rinitis alérgica, sin embargo, el impacto de estas terapias sobre la microbiota nasal no está bien estudiada³³.

Se han propuesto diversos mecanismos por los cuales los esteroides tópicos nasales modulan la inflamación. Se ha señalado que actúan tanto a nivel de las células epiteliales como de las células inflamatorias, lo cual incluye la modulación de los mastocitos, células TH2, eosinófilos y la vía del ácido araquidónico. El uso de esteroides tópicos nasales y otros medicamentos puede estimular cambios temporales en la comunidad bacteriana e incluso permanentes con alteración en la composición y función de la microbiota condicionando numerosos efectos

patogénicos. Al considerarse como tratamiento de primera línea para la rinitis alérgica, el mecanismo de acción de estos medicamentos debería ser mayormente entendido³⁴.

La vía tópica es mayormente utilizada en comparación a la vía oral, ya que puede ser administrada por largos periodos de tiempo sin efectos adversos significativos. Diversos factores pueden alterar la efectividad de estos medicamentos como el tipo de esteroide, la dosis y método de aplicación; por otra parte, existe controversia si las características del paciente como el perfil taxonómico de microbiota nasal y faríngea puedan afectar su efectividad³⁵.

Los antibióticos y corticosteroides sistémicos han sido de utilidad como tratamiento para pacientes con rinosinusitis aguda y crónica al reducir la carga bacteriana y la inflamación de la mucosa. Desafortunadamente, la mejoría clínica es de corta duración y los síntomas se repiten con frecuencia luego del cese del tratamiento. El impacto de estas terapias sistémicas en la microbiota no está bien definido. Un mejor conocimiento de cómo las terapias médicas influyen en el ecosistema intranasal puede permitir una prescripción más efectiva y el desarrollo de tratamientos más específicos. Existe poca evidencia sobre resultados favorables en con el uso de antibióticos a largo plazo y estudios recientes han sugerido que la exposición frecuente a antibióticos (especialmente macrólidos) podría estar implicada en el desarrollo de alergias e inflamación crónica de la cavidad nasal³⁶. Incluso los esquemas cortos de tratamiento pueden producir cambios a largo plazo, especialmente en los 2 primeros años durante la infancia³⁷.

De igual manera se ha estudiado los cambios en la microbiota bronquial y su impacto en el asma, en donde se ha demostrado un aumento en la diversidad microbiana en la vía aérea de estos pacientes. Así mismo se han realizado comparaciones con sujetos sanos y se ha encontrado una mayor expansión de bacterias patógenas en sujetos asmáticos, sobre todo *Haemophilus parainfluenzae*, que a su vez reducen la respuesta celular de los corticosteroides y su eficacia para el tratamiento del asma³⁸.

Actualmente se sabe que los pulmones son colonizados por bacterias desde muy temprana edad (anteriormente se pensaba que era un área estéril), aunque en proporciones más bajas en comparación a otras áreas del cuerpo. Esta

microbiota es diversa y compleja, encontrándose predominio de bacterias del phylum *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacterioides*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*. Investigaciones previas sugieren que la microbiota pulmonar podría contribuir a la patogénesis del asma, así como también la microbiota intestinal puede influenciar el desarrollo de la atopía. Se han demostrado diferencias significativas basadas en el tratamiento corticosteroide, particularmente con la combinación oral e inhalada, así como también con el grado de obstrucción de la vía aérea³⁹.

A nivel nasal se ha demostrado en adultos que la disbiosis de la microbiota en la mucosa del cornete inferior está relacionada con una IgE total alta (mayor a 200 UI/ml) lo que sugiere que esta puede verse afectada por respuestas alérgicas acumuladas contra alérgenos sensibilizados. Las alteraciones de los microbios específicos en este sitio juegan un papel potencial en la fisiopatología de la enfermedad, particularmente un aumento de *Staphylococcus aureus* con baja abundancia de *Actinobacteria* (*Propionibacterium acnes*)⁴⁰. También existen estudios sobre la diversidad bacteriana en los pacientes con rinosinusitis crónica en donde se ha encontrado una reducción significativa en la microbiota sinusal con enriquecimiento de anaerobios, lo cual se asocia con enfermedad más severa y necesidad de cirugía⁴¹.

Por otra parte, se ha demostrado que los probióticos tienen la capacidad de crear condiciones que facilitan una estimulación de la respuesta TH2 inducida por alérgenos hacia un estado de salud regulado y balanceado. Las bacterias ácido-lácticas se encuentran entre los probióticos más importantes del organismo, típicamente asociados con el tracto gastrointestinal humano. *Lactobacillus casei* es una especie que ha sido ampliamente estudiado. Existe evidencia que apoya su uso ya que disminuye los síntomas de inflamación gastrointestinal en niños con dermatitis atópica, modula la inflamación en la enfermedad de Crohn y tiene fuertes propiedades antimicrobianas⁴². Diversos estudios demuestran que su administración por vía oral modifica las respuestas específicas por alérgenos en rinitis alérgica, lo cual se relaciona con un cambio en la producción de citoquinas de TH2 a TH1 especialmente interferón que actúa como inhibidor TH2⁴³.

Es importante tener un mejor entendimiento de la microbiota nasal por varias razones: especies de bacterias de la nasofaringe se han visto asociadas en el desarrollo de sibilancias en niños, lo cual sugiere un papel potencial de la

microbiota nasal en la patogénesis del asma. Segundo, el pasaje nasal se comunica directamente con los pulmones, lo cual sugiere una biología compartida de las vías respiratorias superiores e inferiores⁴⁴.

Dado el papel influyente del microbioma en la patogénesis de las infecciones del tracto respiratorio y las enfermedades atópicas, es importante comprender las interacciones bacterianas, como trabajan para regular la densidad y los factores de expresión de virulencia, así como la capacidad para producir enfermedad. Todo ello proporcionará nuevos enfoques de tratamiento y prevención para las enfermedades atópicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La rinitis alérgica es una enfermedad de alta prevalencia en escolares, la cual condiciona ausentismo escolar, altos costos económicos a nivel hospitalario y disminución de la calidad de vida. Las estrategias para evitar la exposición de alérgenos a menudo son desafiantes y poco prácticas, mientras que los tratamientos farmacéuticos a menudo se limitan solamente a enmascarar los síntomas de la rinitis alérgica y no ofrecen una solución definitiva al problema.

Dado el papel influyente de la microbiota en la patogénesis de las infecciones del tracto respiratorio y las enfermedades atópicas, la modulación de los ecosistemas disbióticos o la reconstitución de la microbiota podría ser una medida posible para reducir las enfermedades respiratorias y las alergias.

A pesar de existir conclusiones distintas entre los estudios publicados, la hipótesis de la disbiosis ha sido ampliamente sugerida como un mecanismo por el cual el desequilibrio de las comunidades microbianas contribuye a la patogenia de la enfermedad alérgica y la exacerbación de los síntomas como sucede en la rinitis alérgica; sin embargo, esta propuesta es controversial debido a la disponibilidad de técnicas adecuadas de secuenciación y purificación de ADN, y por ende en los géneros y familias de bacterias involucradas en el desarrollo de esta enfermedad, así como el impacto de los corticoesteroides intranasales en la microbiota nasofaríngea. No existe información de dichos cambios en los niños escolares de nuestro país.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el método adecuado de secuenciación y purificación de ADN de microbiota nasofaríngea en escolares mexicanos con rinitis alérgica en tratamiento con corticoesteroides intranasales o solución salina?

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades alérgicas son cada vez más prevalentes en población infantil escolar por lo que se han convertido en un problema importante de salud pública, generando carga económica considerable para el sistema de salud. Existe evidencia de que la disbiosis de la microbiota nasofaríngea puede predisponer al desarrollo de enfermedades atópicas como rinitis alérgica.

A la fecha no existen reportes sobre las técnicas de secuenciación y purificación del ADN bacteriano en pacientes pediátricos mexicanos, ni del perfil taxonómico de la microbiota nasofaríngea en población infantil con rinitis alérgica en nuestro país. El proyecto que se propone plantea describir un método correcto de secuenciación de las muestras de microbiota nasofaríngea, que permita conocer su caracterización en pacientes con rinitis alérgica sometidos a esteroides intranasales o solución salina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir el método adecuado de secuenciación y purificación del ADN de la microbiota nasofaríngea en escolares mexicanos con rinitis alérgica sometidos a esteroides intranasales o solución salina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir el método de secuenciación y purificación de ADN (V1 – V9) de la microbiota nasofaríngea en escolares mexicanos.
- Conocer los perfiles taxonómicos de la microbiota nasofaríngea de escolares con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales o solución salina.
- Comparar los perfiles de la microbiota nasofaríngea de escolares con rinitis alérgica y sin rinitis alérgica.
- Comparar los perfiles de la microbiota nasofaríngea de escolares con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales y con solución salina.
- Determinar si existen diferencias en los perfiles taxonómicos de la microbiota nasofaríngea de escolares de los cuatro grupos (pacientes con rinitis alérgica sin tratamiento previo (incidentes), pacientes sin rinitis alérgica, pacientes con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales o con solución salina).

HIPÓTESIS

H₁: Existe diferencia en los perfiles bacterianos de la microbiota nasofaringea de escolares con rinitis alérgica y sin rinitis alérgica, específicamente en la abundancia de los géneros *Haemophilis*, *Moraxella*, y *Neisseria* de al menos 5%.

H₁: Existe diferencia en los perfiles bacterianos de la microbiota nasofaringea de escolares con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales en comparación con escolares en tratamiento con solución salina intranasal, específicamente en la abundancia del género *Neisseria* de al menos 5%.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio: Estudio transversal descriptivo de la metodología para extracción y purificación de ADN bacteriano de microbiota nasofaríngea.

Lugar del estudio: Servicio de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez y Departamento de Genómica de Poblaciones del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Tamaño de la muestra: El número de escolares a incluir en cada grupo, con el propósito de identificar diferencias taxonómicas en la microbiota nasofaríngea de escolares con rinitis alérgica, se calculó considerando la abundancia del género *Neisseria*, el cual reportó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de abundancia relativa en escolares con rinitis alérgica en comparación de los pacientes sanos (5.08 ± 4.60 vs 2.86 ± 2.42), de acuerdo al estudio publicado por Chiu, et al 2017 en población infantil¹³. Este cálculo se realizó por diferencia de medias, para poder observar un efecto similar al previamente reportado y con un poder estadístico de 0.8.

Número necesario para estandarización de método de extracción de ADN: 104 individuos, los cuáles serán distribuidos de la siguiente forma:

Escolares con rinitis alérgica sin tratamiento previo (incidentes): 26 casos

Escolares con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales: 26 casos

Escolares con rinitis alérgica en tratamiento con solución salina: 26 casos

Escolares sin diagnóstico de rinitis alérgica: 26 casos

Este estudio forma parte del Global Asthma Network Fase 2, el cual tiene como propósito confirmar a través de estudios objetivos, los diagnósticos de asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica en escolares con factores de riesgo y síntomas sugestivos de enfermedades alérgicas. Los pacientes son clasificados de acuerdo a sus síntomas y resultados de las pruebas objetivas de diagnóstico (pruebas cutáneas, espirometría pre y post broncodilatador y niveles séricos de IgE total y específica para 5 alérgenos)⁴⁵.

Criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">- Escolares de 6-10 años con participación previa en la Fase II del estudio Global Asthma Network con diagnóstico reciente de rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales o solución salina-Consentimiento informado, firmado por los padres o tutores.	<ul style="list-style-type: none">- Uso de antibióticos 3 meses previos al estudio-Presencia de cuadro infeccioso agudo en vía aérea superior al momento del estudio-Estar en tratamiento con esteroides sistémicos o antileucotrienos-No contar con consentimiento informado firmado por padre, madre o tutor

Diagnóstico de rinitis alérgica:

Cuestionario de síntomas y factores de riesgo:

Se aplicará a los tutores de los escolares seleccionados un cuestionario de síntomas y factores de riesgo. Consta de 97 preguntas, que hacen referencia a síntomas sugestivos de asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica, manejo farmacológico, frecuencia con la que han acudido a los servicios de salud debido a la presencia de síntomas y factores de riesgo ambientales y genéticos asociados:

Preguntas respecto a síntomas de rinitis alérgica⁴⁶:

22. ¿ALGUNA VEZ EN SU VIDA, Su hijo ha tenido estornudos muy frecuentes, escurrimiento nasal o nariz tapada sin estar enfermo o con gripa?

Si

No

23. EN LOS ÚLTIMOS 12 MESES, ¿Su hijo ha tenido estornudos muy frecuentes, escurrimiento nasal o nariz tapada sin estar resfriado o con gripa?

Si

No

24. EN LOS ÚLTIMOS 12 MESES, ¿Los problemas de la nariz de su hijo (estornudos muy frecuentes, escurrimiento nasal, nariz tapada) se han acompañado de enrojecimiento, comezón en los ojos y lagrimeo?

Si

No

25. EN LOS ÚLTIMOS 12 MESES, ¿Los problemas de la nariz de su hijo (estornudos muy frecuentes, escurrimiento nasal, nariz tapada) se han acompañado de comezón en la nariz?

Si

No

26. En cuál de los últimos 12 meses se presentó en su hijo el cuadro de estornudos muy frecuentes, comezón en la nariz, ¿escurrimiento de moco acuoso y obstrucción nasal? (Se puede marcar más de un mes)

Enero

Mayo

Septiembre

Febrero

Junio

Octubre

Marzo

Julio

Noviembre

Abril

Agosto

Diciembre

27. EN LOS ÚLTIMOS 12 MESES, ¿Qué tanto han afectado la vida diaria de su hijo los estornudos frecuentes, escurrimiento nasal, nariz tapada y comezón de nariz?

Nada

Poco

Moderadamente

Mucho

28. ¿Alguna vez le han dicho que su hijo tiene rinitis alérgica?

Si

No

29. ¿La rinitis alérgica fue diagnosticada por un médico?

Si

No

Demográfico: lugar donde habita el escolar, las características del entorno de la casa, lugar donde acude a la escuela, edad, sexo, fecha de realización de cuestionario, lugar, fecha de nacimiento y escolaridad del escolar y los tutores).

Estilo de vida: actividad física (tipo de actividad física y frecuencia al mes) 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 al 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.

Toma de muestra sanguínea venosa:

Se tomará una muestra sanguínea venosa para la determinación de IgE sérica total y específica. Se obtendrán 6 ml de sangre por estudio:

-6 ml de sangre en tubo rojo para obtención de IgE sérica y específica.

La determinación de IgE se medirá en el laboratorio de Alergia del Hospital Infantil de México Federico Gómez con el aparato INMUNOCAP Phadia 100 y permitirá:

- Hacer la comparación y validación de los resultados obtenidos como positivos en las pruebas de Prick to Prick.

- Conocer el grado de susceptibilidad que tiene la población en estudio a enfermedades atópicas.

Los niveles de IgE sérica que se consideran normales son³:

Escolares de 6-8 años de edad: 1-161 U/ml

Escolares de 9-10 años de edad: 0.98-570 U/ml

El nivel de IgE específica normal para Aero alergenicos y alimentos es <0.35 U/ml.

La toma de muestras de sangre se realizará en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez y estará a cargo de personal debidamente capacitado en aspectos técnicos de la venopunción.

El personal involucrado en la extracción de sangre se lavará las manos antes y después de tener contacto con cualquier paciente. Usará el equipo de protección básico como bata, guantes y cubrebocas para evitar cualquier salpicadura de sangre y una posible transmisión de infecciones virales por diferentes agentes biológico-infecciosos. Antes de cada procedimiento, se limpiarán las superficies potencialmente contaminadas de sangre o salpicaduras con hipoclorito de sodio al 0.5% o alcohol al 70%. Si la bata se llegara a contaminar con salpicaduras de sangre, se le entregará a una compañía especializada en su lavado.

Todas las agujas utilizadas en el estudio serán nuevas y estériles. La zona de punción se desinfectará previamente con alcohol. Al salir del empaque la aguja no entrará en contacto con ningún elemento, si esto sucede accidentalmente, la aguja se reemplazará por una nueva.

Se utilizarán tubos vacutainer sellados y manufacturados en plástico para disminuir el riesgo de accidentes ocasionados por rupturas o derrames de sangre. Se conectará una aguja al tubo atravesando su tapa, permitiendo que la sangre fluya directamente del paciente al tubo. Una vez retirada la aguja, la tapa se sella automáticamente.

Se informará a los participantes sobre el tipo de procedimiento y las potenciales molestias que pudiera causar. El responsable de la toma de muestra sanguínea se ayudará de otra persona para sujetar el brazo del participante. Una vez extraída la muestra de sangre, cada tubo se rotulará con un código de identificación único para cada uno de los participantes a los que se les realizará

este estudio y se almacenará en un área reservada a 4°C hasta su procesamiento.

Después de cada proceso, las mesas serán tratadas con hipoclorito para eliminar cualquier residuo biológico.

Todo el material contaminado con fluidos biológicos como algodones, guantes y los tubos ya usados se colocarán en una bolsa de polietileno roja, que se llenará hasta un 80% de su capacidad, mientras que los objetos punzocortantes se colocarán en recipientes de plástico de polipropileno rojo, los cuales serán rígidos y libres de cloro, permitiendo verificar el volumen ocupado. Estos recipientes serán resistentes a golpes o fracturas, contendrán la leyenda “residuos peligrosos punzocortantes biológico-infecciosos”, y serán llenados hasta un 80% de su capacidad. Las agujas no se re-enfundarán, ni se doblarán; se desecharán en el recipiente rígido, evitando su manipulación. Tanto las bolsas de polietileno como los recipientes de polipropileno tendrán un área específica en el laboratorio y no se almacenarán más de un mes.

Pruebas cutáneas:

Las pruebas cutáneas (Prick to prick) se realizarán con el propósito de valorar la sensibilización que tiene el paciente a uno o múltiples alérgenos como hongos, epitelios de animales, pólenes de árboles, malezas y algunos alimentos. Esta prueba consiste en aplicar una pequeña cantidad de extracto alérgico glicerinado sobre la piel de los antebrazos o de la espalda del paciente. Mediante una pequeña punción con una lanceta de 3 milímetros de punta, donde se escarifica de manera que se atraviesa epidermis introduciendo la gota hasta la parte superficial de la piel para lograr la penetración del extracto alérgico justo debajo de la epidermis, liberando histamina. Esto dará como resultado eritema y una roncha. Se considerará un resultado positivo cuando la pápula resultante de la punción del extracto alérgico sea por lo menos 3 mm superior al diámetro mayor del control negativo.

Esta herramienta diagnóstica complementa el diagnóstico de rinitis alérgica, basándose previamente en la historia clínica y la presencia de inmunoglobulina E (IgE).

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*, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* y *Blomia tropicalis*.
- Pólenes: *Ambrosia trifida*, *Artemisa vulgaris*, *Chenopodium album*, *Chenopodium dactyloides*, *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.

Esta prueba se realizará en el Laboratorio de Alergia del Hospital Infantil de México Federico Gómez por personal calificado. Antes de su realización se tomarán los signos vitales (tensión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, porcentaje de saturación en sangre a través de un dispositivo digital y temperatura) y se dará una explicación del procedimiento, tanto al escolar como al tutor. Una vez que se proporcionó la información y se resolvieron las dudas, se le pedirá al tutor que le retire al paciente la ropa del tronco y le coloque una bata de algodón con la abertura hacia la espalda en caso de ser necesario realizar las pruebas en la espalda o que descubra los antebrazos del paciente. Posteriormente, con una torunda de algodón se limpiará el área donde se colocarán los alérgenos. La prueba se realiza aplicando una pequeña cantidad de extracto alérgico 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 alérgico 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 negativo⁴⁷.

Una vez realizadas las pruebas cutáneas, las lancetas metálicas utilizadas en los pacientes (2-3 lancetas punzantes de 3mm por paciente), serán desechadas inmediatamente después de su uso en el contenedor rojo de polietileno perteneciente a los objetos punzocortantes. Los residuos no anatómicos como gasas, algodones y guantes que se encuentren en contacto con la sangre del paciente, serán desechados en el contenedor rojo ubicado en el Laboratorio de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica.

Posterior a la valoración de los pacientes por médicos adscritos y residentes del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica, se seleccionarán los escolares (por muestreo no probabilístico) de acuerdo al diagnóstico (con rinitis alérgica y sin rinitis alérgica) y al tipo de tratamiento (esteroides intranasales o solución salina).

Técnica de hisopado:

Se obtendrán una muestra de microbiota nasofaríngea en pacientes con diagnóstico reciente de rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales o solución salina. Las muestras serán tomadas por otorrinolaringólogos pediatras capacitados, a través de un hisopado nasofaríngeo con hisopos de fibra de nylon (Copan, 503CS019). La muestra obtenida con el hisopo se transferirá a un tubo para microcentrifuga de 2 ml que contenga 1 ml de solución PBS (Phosphate Buffered Saline). El hisopo se sumergirá en el PBS durante 20 segundos, y con movimientos rotatorios se transferirá la muestra. Este tubo se transportará a 4^o C a las instalaciones del Instituto Nacional de Medicina Genómica, donde se realizará el proceso de extracción de ADN microbiano.

El procedimiento para la toma de la muestra en nasofaringe será el siguiente⁴⁸:

1. Se recostará al paciente y se elevará un poco la cabeza.
2. Se introducirá suavemente el hisopo de nylon flexible estériles, paralelo al paladar, casi en su totalidad hasta llegar a la nasofaringe (aproximadamente 2.5 cm en niños)
3. Una vez ahí, se rotará suavemente el hisopo para frotar la pared de la nasofaringe y será retirado cuidadosamente sin dejar de rotar.

4. Se introducirá la punta del hisopo en el tubo de ensayo que contiene medio de transporte estéril o solución salina al 0.85% estéril, el resto se corta y se desecha; se cierra el tubo perfectamente y se mantiene a 4°C.
5. Cada tubo se marca colocando una tela adhesiva (se evitará papel engomado, masking-tape), en la cual se escribe el nombre del paciente, un código de identificación y la fecha de toma de muestra.
6. Los tubos con las muestras deben mantenerse en refrigeración (o en la hielera con la bolsa refrigerante, para ser transportadas en menos de 4 horas al Instituto Nacional de Medicina Genómica para su procesamiento.

En el caso de los pacientes con rinitis alérgica de diagnóstico reciente (<1 mes), sin tratamiento previo y los pacientes sin rinitis alérgica (controles), la toma de la muestra de microbiota nasofaríngea por hisopado se realizará en un periodo de 2 semanas máximo, posterior al diagnóstico.

Los pacientes con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales o solución salina, la toma de muestra se llevará a cabo en un periodo mínimo de 4 semanas y máximo de 8, posterior al inicio del tratamiento.

PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existe diferencias entre la composición de la microbiota nasofaríngea entre escolares con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales o solución salina, se realizarán análisis de PERMANOVA sobre la distancia de Bray-Curtis, y la distancia Unifrac ponderada y no ponderada. Además, para identificar taxones enriquecidos o disminuidos en los grupos de estudio se utilizará el paquete de LEfSe (Linear discriminant analysis effect size, Segata et al., 2011) con los parámetros preestablecidos. Este paquete utiliza un algoritmo diseñado para identificar biomarcadores en análisis multidimensionales caracterizados por dos o más condiciones biológicas. Es importante mencionar que este tipo de análisis se basa en la relevancia estadística, sin embargo, también toma en cuenta la consistencia biológica y el tamaño del efecto.

Para evaluar la relación entre los taxones diferenciados y los marcadores del sistema inmune primero se normalizarán las abundancias a partir del método de BoxCox y posteriormente se realizarán modelos de regresión lineal ajustando por variables básicas como sexo y edad, así como por variables técnicas como el número de secuencias. Los valores de P se ajustarán para pruebas múltiples utilizando el método de Benjamini y Hochberg.

VARIABLES

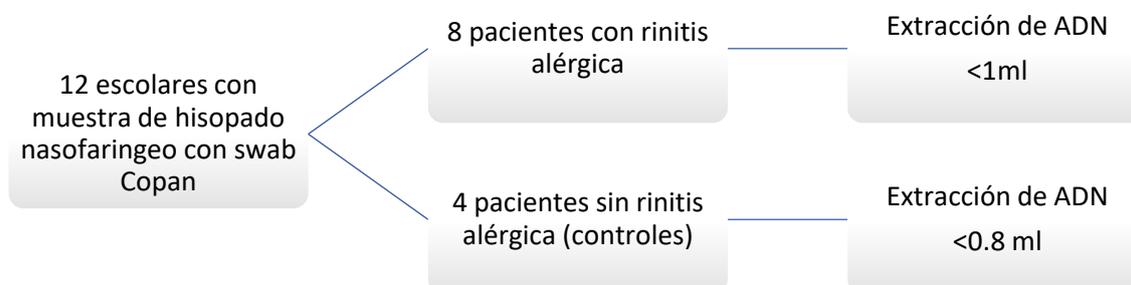
VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	CATEGORÍA
Sexo	Condición orgánica que diferencia a dos individuos por sus características reproductivas	Cualitativa Nominal	Hombre Mujer
Edad	Tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento.	Cuantitativa Continua	Años
Rinitis Alérgica	Enfermedad inflamatoria crónica de la mucosa nasal mediada por IgE.	Cualitativa Dicotómica	Si No
Estornudos, rinorrea, obstrucción nasal alguna vez.	Síntomas de enfermedad o alteración no específica a nivel nasal.	Cualitativa Dicotómica	Si No
Estornudos, rinorrea, obstrucción nasal en los últimos 12 meses	Síntomas de alteración a nivel nasal sugestivos de rinitis alérgica.	Cualitativa Dicotómica	Si No
Ardor de ojo y lagrimeo con molestias nasales en los últimos 12 meses	Síntomas que sugieren cuadro de alergia con rinoconjuntivitis.	Cualitativa Dicotómica	Si No

Inmunoglobulina E sérica total y específica.	Anticuerpo implicado en la alergia y respuesta inmune contra diversos agentes patógenos.	Cuantitativa Continua	>161 U/ml (escolares de 6-8 años) >570 U/ml (escolares de 9-10 años)
Uso de corticoesteroides intranasales	Medicamento de aplicación tópica nasal para el control de los síntomas inflamatorios de la rinitis alérgica	Cualitativa Dicotómica	Si No
Uso de solución salina	Medicamento utilizado para realizar aseos nasales.	Cualitativa Dicotómica	Si No
Microbiota nasofaríngea: Medida la diversidad alfa	Diversidad intrínseca de la comunidad bacteriana en la microbiota nasofaríngea.	Cuantitativa Continua	Riqueza (Índice de Chao), diversidad (Índice de Shannon)
Microbiota nasofaríngea: Medida de la diversidad beta	Tasa de cambio en la composición de distintas comunidades de la microbiota nasofaríngea.	Cuantitativa Continua	Distancia de Bray-Curtis, Unifrac ponderado y no ponderado
Microbiota nasofaríngea:	Conjunto de microorganismos	Cuantitativa Continua	Abundancia relativa de

Medida de la composición de la microbiota nasofaríngea	que se encuentran de manera normal en la nasofaringe.	diferentes taxones en unidades funcionales taxonómicas (OTU's)
---	---	--

RESULTADOS PRELIMINARES

A continuación, se esquematiza la muestra obtenida en el periodo de enero-abril 2019:



Se obtuvieron 24 muestras de hisopado nasofaríngeo de 12 pacientes, de los cuales, 8 fueron de pacientes con rinitis alérgica y 4 de pacientes sin rinitis alérgica con las siguientes características demográficas:

Tabla 1. Características demográficas de pacientes reclutados para estandarización de método de secuenciación.

Características	Grupo con rinitis alérgica	Grupo sin rinitis alérgica
	N (%)	N (%)
Sexo		
Masculino	2 (25)	3 (75)
Femenino	6 (75)	1 (25)
Edad	8 ± 1.4	6 ± 1.8
IgE total >160 UI/ml	8 (100)	3 (75)
IgE específica >0.35 UI/ml (1 o más alérgenos)	7 (87.5)	1 (25)

El procedimiento de extracción y purificación de ADN de microbioma nasofaríngeo en las 24 muestras fue la siguiente:

Una vez obtenido la muestra de ADN nasofaríngeo con hisopos (Copan, 503CS019), se transporta en 1 ml de medio con tioglicolato (Swab, Copan).

Se empleó el kit QiAmp Microbiome (Qiagen) para la extracción de ADN siguiendo lo descrito en el inserto:

- (Para obtener la mayor cantidad de muestra en el medio, se centrifugó el hisopo por 5 minutos).
- Por cada ml de muestra agregar 500 µl de buffer AHL en un microtubo de 2 ml, incubar a temperatura ambiente con rotación por inversión.
- Centrifugar a 10,000 g por 10 minutos y quitar cuidadosamente el sobrenadante.
- Agregar 190 µl de Buffer RDD y 2.5 µl de Benzonasa. Mezclar bien en vórtex e incubar a 37° C por 30 minutos en una placa de calentamiento.
- Agregar 20 µl de proteinasa K e incubar a 56°C por 30 minutos en placa de calentamiento.
- Hacer un ligero spin en el tubo (eliminar condensación). Agregar 200 µl de buffer ATL (con reactivo DX*). Homogenizar en vortex y transferir la muestra al tubo de lisis (Pathogen Lysis tube L).
- Realizar la lisis en equipo FastPrep a una velocidad de 6.5m/s por 45 segundos, esperar 5 minutos con la muestra en hielo y repetir el procedimiento.
- Homogenizar muestra y centrifugar a 10,000 g por 1 minuto, homogenizar cuidadosamente y transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo.
- Agregar 40 µl de proteinasa K, mezclar en vortex e incubar a 56° C durante 30 minutos en la parrilla de calentamiento.
- Colocar 200 µl de buffer APL2 y mezclar en vórtex por 30 segundos.
- Incubar a 70° C durante 10 minutos y hacer un rápido “spin”.
- Añadir 200 µl de EtOH y mezclar en vortex por aproximadamente 30 segundos.
- Transferir los 700 µl de la muestra a la columna (sin mojar el borde), cerrar la tapa y centrifugar a 6,000 g por 1 minuto.
- Desechar “flujo continuo” del tubo colector, poner nuevamente la columna en el tubo colector y volver a centrifugar en caso de tener muestra remanente.

- Transferir la columna a un tubo colector nuevo. Abrir cuidadosamente la tapa y agregar 500 µl de buffer AW1. Cerrar la tapa y centrifugar a 6,000 g por 1 minuto. Colocar la columna en un tubo colector de 2 ml nuevo y eliminar el filtrado.
- Abrir la columna y colocar 500 µl de buffer AW2, centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos.
- Colocar la columna en un tubo colector de 2 ml nuevo. Eliminar el filtrado y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.
- Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml nuevo y agregar 50 µl de buffer AVE en el centro de la membrana. Cerrar columna e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Centrifugar a 6,000 g por 1 minuto para eludir ADN.
- Cuantificar muestra utilizando como blanco el buffer AVE.

Acorde al procedimiento anterior, se obtuvo 1ml de ADN durante la extracción de 12 muestras obtenidas entre ambos grupos de estudio, por lo que se obtuvo muestra suficiente para iniciar la purificación y ampliación del ADN en región V1-V4. La concentración y pureza del ADN bacteriano se medirá con un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®) y la integridad a partir de un gel de agarosa una vez que se obtengan mínimo 50 muestras con adecuada concentración de ADN.

Pasos a seguir una vez obtenida la cantidad de muestra necesaria para completar el proceso de estandarización son:

Preparación de librerías:

Se amplificará la región V3 y V4 del gen 16S rRNA utilizando los *primers* de Illumina. La purificación, indexado y secuenciación de los amplicones se hará siguiendo el protocolo descrito (REF-illumina). Para el multiplexeado de las muestras se utilizará el kit Nextera XT Index para 96 muestras (Illumina). La librería final se secuenciará en la plataforma NextSeq 500 de Illumina de la Unidad de Secuenciación del INMEGEN.

Secuenciación de genomas completos bacterianos:

Con el fin de explorar las diferencias funcionales del microbioma entre los niños atópicos y los controles se realizará la secuenciación de genomas completos

bacterianos. Las librerías serán secuenciadas utilizando la plataforma de secuenciación masiva NextSeq 500 de Illumina de la Unidad de Secuenciación del INMEGEN. Para la construcción de las librerías se utilizará el kit de Illumina Nextera XT. Brevemente, el ADN será fragmentado y posteriormente se someterá a una PCR para ligarle los adaptadores de secuenciación y los códigos de barras. Los fragmentos resultantes serán cargados en un gel de agarosa para corroborar el tamaño de los fragmentos (aproximadamente 300 pb) los cuales serán purificados con perlas de Ampure.

Análisis bioinformático

La identificación de las unidades taxonómicas funcionales (OTUs) y su abundancia, se realizará a través del análisis de las secuencias de 16S rRNA utilizando el programa abierto QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Brevemente se removerán los códigos de barras, se aplicarán los filtros de calidad, se filtrarán las quimeras y se realizará la identificación y abundancia de las unidades taxonómicas funcionales (OTUs) a través de un agrupamiento de referencia cerrada (uclust) y tomando como referencia la base de datos Greengenes. Para realizar una primera exploración de los posibles cambios funcionales en el metagenoma de los escolares con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales o solución salina, se utilizará la herramienta Picrust, la cual permite inferir los genes presentes en la comunidad de bacterias a partir de la clasificación taxonómica.

Por último, con el fin de determinar los cambios funcionales del microbioma entre los escolares con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides intranasales o solución salina, se analizarán en un subgrupo de niños las secuencias de los genomas completos de bacterias. De manera general las lecturas que resulten de la secuenciación de metagenómica (genomas completos bacterianos) serán procesadas para eliminar todas aquellas lecturas que tengan baja calidad y que sean contaminación de ADN humano. Para ello las secuencias obtenidas serán alineadas contra el genoma humano usando BmTagger y todas aquellas que resulten con homología al genoma humano serán descartadas. Todas las lecturas que hayan pasado los anteriores filtros de calidad serán alineadas contra los genomas bacterianos del Human Microbiome Project (HMP) usando Bowtie. Para la determinación de la presencia/ausencia y abundancia relativa de vías

metabólicas microbianas en los perfiles metagenómicos se utilizará el programa HUMAN. Esta herramienta permite establecer la abundancia de cada familia de genes ortólogos presentes en la comunidad y los clasifica acorde a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

DISCUSIÓN

Se estima que la incidencia de la rinitis alérgica ha incrementado en los últimos años por lo que se ha convertido en un problema de salud importante tanto en niños como adultos^{3,12}. En cuanto al género, en términos generales no se han encontrado mayores diferencias, sin embargo, en relación con la edad se estima que las enfermedades alérgicas son más prevalentes en niños mayores³, lo cual corresponde con los hallazgos preliminares de este protocolo.

Por otra parte, la literatura ha marcado el papel de los niveles de IgE sérica en la evaluación diagnóstica de la rinitis alérgica, siendo de mucha utilidad para identificar de manera generalizada poblaciones con atopia o enfermedad alérgica^{3,16}. En los resultados preliminares de este estudio se encontró que el 100% de los niños ya diagnosticados con rinitis alérgica presentaron niveles de IgE total mayores a 160 UI/ml. Chung y col. reportaron que valores > 150 UI/ml se puede considerar como un marcador favorable para realizar el diagnóstico de rinitis alérgica, mientras que Jacobs y col. reportan valores > 100 UI/ml, sin embargo, un nivel bajo no lo excluye. En cuanto a la IgE específica, la mayoría de los niños presentaron niveles mayores a 0.35 UI/ml, mientras que en el grupo sin rinitis solamente se presentó en 1 paciente. Diversos estudios han demostrado que esta prueba tiene una sensibilidad de 67 – 96% y especificidad de 80 – 100%³; además puede dirigir al clínico a seleccionar una terapéutica más apropiada, evitando tratamientos innecesarios o inefectivos.

Si bien, los métodos de extracción y amplificación bacteriana han permitido describir el ADN microbiano, específicamente la región V3-V4 del gen 16S rRNA con *primers* de Illumina, resulta importante reconocer la variabilidad genética entre poblaciones y la técnica para obtener la muestra y procesamiento de esta. De acuerdo con lo reportado, las limitaciones en cuanto al manejo y el procesamiento de las muestras han sido una causa importante de resultados controversiales²⁷.

Además, la mayoría de los estudios realizados sobre microbiota han considerado a la cavidad nasal como un todo y esto no ha permitido determinar la variación biogeográfica de los diversos microambientes nasales, ni como las técnicas para toma de muestras pudieran captar esta diversidad microbiana. La literatura ha reportado que los métodos principalmente utilizados para toma de muestras de

nasofaringe han sido los hisopados transnasales y los lavados nasales, siendo estos últimos menos invasivos; sin embargo, se ha encontrado que los primeros son superiores cuando se trata de llegar a las regiones más posteriores de la nariz, ya que con el hisopado se logran obtener muestras de poblaciones microbianas más específicas¹¹. Esta es la razón por la cual elegimos este método.

Actualmente con el advenimiento de la tecnología de secuenciación de nueva generación se ha facilitado la caracterización de comunidades microbianas en humanos, tanto sanos como enfermos. Esta tecnología incluye la extracción de ADN llevando implícita la selección de un protocolo adecuado y específico para su obtención¹⁰. Múltiples comparaciones sistemáticas realizadas entre los kits disponibles de forma comercial para la extracción de ADN han establecido que tanto la variación en su diseño como en sus componentes pueden llevar a sesgos técnicos, y por lo tanto, presentar diferencias en los resultados de la composición y estructura microbiana³⁰.

La cantidad de ADN obtenido y la representación bacteriana puede variar según los métodos para su extracción ; sin embargo, los que se realizan con los kits comerciales como Norgen y Qiagen, (utilizado en este protocolo) , han mostrado menor variación técnica en relación a los métodos no comerciales, esto probablemente debido al uso de buffers y columnas de purificación pre elaboradas, por lo que cada vez se desarrollan kits comerciales para extracción de ADN a precios más accesibles y de uso más simplificado³⁰.

Durante la primera fase, y a pesar de no contar con artículos de referencia que permitan conocer y comparar el método de extracción y purificación de ADN para microbiota nasofaríngea en población mexicana, se buscó establecer la estandarización de la metodología a partir de 12 muestras nasofaríngeas de grupos heterogéneos, con lo cual durante la segunda fase del estudio, se podrá realizar su secuenciación de una manera objetiva que proporcione información respecto a la taxonomía de la mucosa nasofaríngea de escolares mexicanos con rinitis alérgica.

CONCLUSIÓN

La rinitis alérgica es una condición prevalente en niños escolares mexicanos. La microbiota nasal juega un papel protector en el desarrollo de las enfermedades atópicas, específicamente en la rinitis alérgica, por lo que cada vez se resalta su importancia como una alternativa para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en estos pacientes.

La secuenciación de nueva generación ha mostrado ser de utilidad en el estudio del microbiota humana a través de la extracción de ADN bacteriano y amplificación del gen 16S rRNA, especialmente cuando se dispone de un protocolo adecuado, tanto para la toma de las muestras como para su extracción y purificación; de esta manera se obtienen mejores resultados con menor sesgo técnico.

Con este protocolo queda estandarizado el método para la toma de muestras y secuenciación de ADN bacteriano que será utilizado en la caracterización de la microbiota nasofaríngea en escolares con rinitis alérgica en tratamiento con esteroides nasales y solución salina.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	JUN 2018	JUL - AGO 2018	SEP - OCT 2018	NOV - DIC 2018	ENE 2019	FEB 2019	MAR 2019	ABR 2019	MAY 2019
Elección de tema	X								
Búsqueda de bibliografía		X							
Elaboración de anteproyecto			X						
Aprobación de protocolo				X					
Recolección de datos					X	X	X	X	
Análisis de datos									X
Redacción de tesis									X
Presentación de resultados									X

REFERENCIAS

1. Cook M, Douglass J, Mallon D, et al. The economic impact of Allergic Disease in Australia: Not to Be Sneezed At [REPORT]. Aust Soc Clin Immunol Allergy 2007.
2. Del-Rio-Navarro, B. E., Luna-Pech, J. A., Berber, A., Zepeda-Ortega, B., Avila-Castañon, L., Del-Río-Chivardi, J. M., et al. Factors associated with allergic rhinitis in children from northern Mexico City. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. 2007; 17(2): 77.
3. Wise S.K., Lin S.Y., Toskala E., Orlandi R.R., Akdis C.A., Alt J.A., et al. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Allergic Rhinitis. International Forum of Allergy & Rhinology. Feb 2018; 8 (2): 108 – 352.
4. Mahdavinia M., Engen P.A., LoSavio P.S., Naqib A., Khan R.J., Tobin M.C., The nasal microbiome in chronic rhinosinusitis: analyzing the effects of atopy and bacterial functional pathways in 111 patients. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2018; 142 (1): 287 – 290.
5. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease, Nature reviews Immunology. 2009; 9: 313 – 23
6. Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EA, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJ, Bogaert D. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. Am J Respir Crit Care Med. 2014; (190): 1283 – 1292.
7. Hendley JO, Hayden FG, Winther B: Weekly point prevalence of Streptococcus pneumoniae, Hemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis in the upper airways of normal young children: effect of respiratory illness and season. APMIS 2005; (113): 213 – 220.
8. Hilty. M., Brugger. S.D., Frei. L., Agyeman. P., Frey. P. M., Aebi. S, Muhlemann K. Nasopharyngeal microbiota in infants with acute otitis media. J Infect Dis. 2012; (205):1048 – 1055.
9. Chiu, C. Y., Chan, Y. L., Tsai, Y. S., Chen, S. A., Wang, C. J., Chen, K. F., & Chung, I. F. Airway microbial diversity is inversely associated with mite-sensitized rhinitis and asthma in early childhood. Scientific reports. 2017; 7 (1): 1 – 20.

10. Clooney, A. G., Fouhy, F., Sleator, R. D., O'Driscoll, A., Stanton, C., Cotter, P. D., Claesson, M. J. Comparing apples and oranges? next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. *PLoS One*. 2016; 11 (2), e0148028.
11. Pérez-Losada, M., Crandall, K. A., & Freishtat, R. J. Two sampling methods yield distinct microbial signatures in the nasopharynges of asthmatic children. *Microbiome*. 2016; 4 (1), 25.
12. Bousquet, J., Khaltaev, N., Cruz, A. A., Denburg, J., Fokkens, W. J., Togias, A., et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). *Allergy*. 2008; 63 (86): 8 - 160.
13. Watts, A. M., Cox, A. J., Smith, P. K., Besseling-van der Vaart, I., Cripps, A. W., & West, N. P. A Specifically Designed Multispecies Probiotic Supplement Relieves Seasonal Allergic Rhinitis Symptoms. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2018; 0 (0): 1 – 8.
14. Choi, C. H., Poroyko, V., Watanabe, S., Jiang, D., Lane, J., deTineo, M., Pinto, J. M. Seasonal allergic rhinitis affects sinonasal microbiota. *American journal of rhinology & allergy*. 2014; 28(4): 281-286.
15. Hill, D. A., Siracusa, M. C., Abt, M. C., Kim, B. S., Kobuley, D., Kubo, M., Bushman, F. D. Commensal bacteria–derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nature medicine*. 2012; 18(4), 538 – 547.
16. De La Torre C. (2019). Rinitis Alérgica. Programa de Actualización continua en otorrinolaringología pediátrica. (pp. 37 – 54). Ciudad de México: Intersistemas Editores.
17. Rodríguez-Vicente, A. K., Bustos-Martínez, J., Reyes-Duarte, D., Sainz-Espuñes, T. Bacterial microbiota analysis present in the nose and pharynx of a Mexican young population. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, (2016); 5(6): 223-235.
18. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108: S147–S334.
19. Harvey, R., Hannan, S. A., Badia, L., Scadding, G. Nasal saline irrigations for the symptoms of chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007; 3 (3).

20. Yap, G. C., Tay, C. J. X., Lim, A. S. M., Huang, C. H., Chu, C. W., De Sessions, P. F., Soh, J. Y. Establishment of the nasal microbiota in the first 18 months of life: Correlation with early-onset rhinitis and wheezing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018; 142 (1): 86 – 95.
21. Frank, D. N., Feazel, L. M., Bessesen, M. T., Price, C. S., Janoff, E. N., & Pace, N. R. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PLoS one*. 2010; 5 (5): 1 – 15.
22. Ipci, K., Altintoprak, N., Muluk, N. B., Senturk, M., & Cingi, C. The possible mechanisms of the human microbiome in allergic diseases. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2017; 274 (2): 617-626.
23. Fujimura, K. E., Demoor, T., Rauch, M., Faruqi, A. A., Jang, S., Johnson, C. C., Lynch, S. V. House dust exposure mediates gut microbiome *Lactobacillus* enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111 (2): 805 - 810.
24. Schenck, L. P., Surette, M. G., Bowdish, D. M. Composition and immunological significance of the upper respiratory tract microbiota. *FEBS letters*. 2016; 590 (21): 3705-3720.
25. Bomar, L., Brugger, S. D., & Lemon, K. P. Bacterial microbiota of the nasal passages across the span of human life. *Current opinion in microbiology*. 2018; 41: 8 - 14.
26. Esposito, S., Principi, N. Impact of nasopharyngeal microbiota on the development of respiratory tract diseases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017; 37 (1): 1 - 7.
27. Boutin, S., Graeber, S. Y., Weitnauer, M., Panitz, J., Stahl, M., Clausznitzer, et al. Comparison of microbiomes from different niches of upper and lower airways in children and adolescents with cystic fibrosis. *PLoS one*. 2015; 10(1), e0116029.
28. Bogaert D, Keijser B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, et al. Variability and Diversity of Nasopharyngeal Microbiota in Children: A Metagenomic Analysis. *PLoS ONE*. 2017; 6(2): e17035

29. Yan, M., Pamp, S. J., Fukuyama, J., Hwang, P. H., Cho, D. Y., Holmes, S., et al. Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. *Cell host & microbe*. 2013; 14(6): 631-640.
30. Pérez-Losada, M., Crandall, K., & Freishtat, R. J. Comparison of two commercial DNA extraction kits for the analysis of nasopharyngeal bacterial communities. *AIMS Microbiology*. 2016; 2(2).
31. Tetel, M. J., De Vries, G. J., Melcangi, R. C., Panzica, G., O'Mahony, S. M. Steroids, stress and the gut microbiome-brain axis. *Journal of neuroendocrinology*. 2018; 30 (2): e 12548.
32. Allen, E. K., Koepfel, A. F., Hendley, J. O., Turner, S. D., Winther, B., Sale, M. M. Characterization of the nasopharyngeal microbiota in health and during rhinovirus challenge. *Microbiome*, 2014; 2(1), 22 – 33.
33. Liu, C. M., Kohanski, M. A., Mendiola, M., Soldanova, K., Dwan, M. G., Lester, R., Lane, A. P. Impact of saline irrigation and topical corticosteroids on the postsurgical sinonasal microbiota. In *International forum of allergy & rhinology*. 2015; 5 (3): 185 - 190.
34. Ramakrishnan, V. R., Holt, J., Nelson, L. F., Ir, D., Robertson, C. E., Frank, D. N. Determinants of the Nasal Microbiome: Pilot Study of Effects of Intranasal Medication Use. *Allergy & Rhinology*. 2018; 9, 2152656718789519.
35. Chong, L. Y., Head, K., Hopkins, C., Philpott, C., Schilder, A. G., Burton, M. J. Intranasal steroids versus placebo or no intervention for chronic rhinosinusitis. *The Cochrane Library*. (2016).
36. Jain, R., Hoggard, M., Zoing, M., Jiang, Y., Biswas, K., Taylor, M. W., Douglas, R. G. The effect of medical treatments on the bacterial microbiome in patients with chronic rhinosinusitis: a pilot study. In *International forum of allergy & rhinology*. July 2018.
37. Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., Bruns, T. Effects of antibiotics on gut microbiota. *Digestive Diseases*. 2016; 34 (3): 260 - 268.
38. Goleva, E., Jackson, L. P., Harris, J. K., Robertson, C. E., Sutherland, E. R., Hall, C. F., Leung, D. Y. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013; 188 (10): 1193-1201.

39. Denner, D. R., Sangwan, N., Becker, J. B., Hogarth, D. K., Oldham, J., Castillo, J., White, S. R. Corticosteroid therapy and airflow obstruction influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016; 137 (5): 1398 - 1405.
40. Hyun, D. W., Min, H. J., Kim, M. S., Whon, T. W., Shin, N. R., Kim, P. S., Yoon, J. H. Dysbiosis of inferior turbinate microbiota is associated with high total IgE levels in allergic rhinitis patients. *Infection and immunity*. 2018; 86 (7).
41. Lal, D., Keim, P., Delisle, J., Barker, B., Rank, M. A., Chia, N., Cope, E. K. Mapping and comparing bacterial microbiota in the sinonasal cavity of healthy, allergic rhinitis, and chronic rhinosinusitis subjects. *In International forum of allergy & rhinology*. 2017; 7 (6): 561 - 569.
42. Ivory, K., Chambers, S. J., Pin, C., Prieto, E., Arques, J. L., Nicoletti, C. Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. *Clinical & Experimental Allergy*. 2008; 38 (8): 1282 – 1289.
43. Wang, Y., Li, X., Ge, T., Xiao, Y., Liao, Y., Cui, Y., Zhang, T. Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*. 2016; 95 (31): e 4509.
44. Durack, J., Lynch, S. V., Nariya, S., Bhakta, N. R., Beigelman, A., Castro, M., Mauger, D. T. Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017; 140 (1): 63 - 75.
45. Ellwood P, Asher MI, Billo NE, et al. The Global Asthma Network rationale and methods for Phase I global surveillance: prevalence, severity, management and risk factors. *Eur Respir J*, 2017; 49: 1601605.
46. Ellwood P, Asher I, Ellwood E, and the Global Asthma Network Steering Group. *Global Asthma Network Phase I Manual. Global Surveillance: Prevalence, Severity, Management and Risk Factors*. Auckland, New Zealand. 2015.
47. Larenas D, Ortega J, Del Rio B, Rodríguez N. *Guía Mexicana de Práctica Clínica de Inmunoterapia* 2011. *Revista de Alergia de México*. 2011.

48. <http://himfg.com.mx/descargas/documentos/epidemiologia/boletin18.pdf>.
49. Chung D, Park KT, Yarlalagadda B, Davis EM, Platt M. The significance of serum total immunoglobulin E for in vitro diagnosis of allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2014; (4): 56 – 60.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La principal limitante que se presentó en este trabajo es el hecho de que al tratarse de un protocolo de estandarización de un método para secuenciación de ADN bacteriano, en esta primera fase aún no contamos con resultados de microbiota nasofaríngea de escolares mexicanos con rinitis alérgica por lo que es necesario dar seguimiento a la segunda fase del protocolo para poder obtener información que aporte alternativas para un mejor entendimiento de su papel en el desarrollo y evolución de las enfermedades alérgicas, así como alternativas terapéuticas para su tratamiento y como estas pueden o no afectar a la microbiota de estos pacientes.

Por otra parte, otra limitación fue la carencia de artículos de referencia en cuanto a los métodos de extracción y purificación de ADN para microbiota nasofaríngea en población mexicana, sin embargo con este trabajo se logró estandarizar la metodología y esto dará lugar a la continuación de este protocolo; así como también podrá servir de referencia para otros estudios.