

Universidad CEU San Pablo
CEINDO – CEU Escuela Internacional de
Doctorado

PROGRAMA EN MEDICINA TRASLACIONAL



CEU

*Escuela Internacional
de Doctorado*

**Alteraciones de la microbiota
intestinal asociadas a la alergia
alimentaria en el contexto de la
biología de sistemas**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Elisa Zubeldia Varela

Dirigida por:

Dra. Marina Pérez Gordo y Dr. David Rojo Blanco

MADRID, 2022

TESIS DOCTORAL
ELISA ZUBELDIA VARELA
2022

Agradecimientos

En primer lugar, dar las gracias a mis directores de tesis, Marina Pérez y David Rojo, por guiarme y darme todo el apoyo necesario en todo momento para completar este proyecto.

También quiero expresar mi gratitud a todos los compañeros del IMMA y el CEMBIO, en especial a Domingo Barber y Coral Barbas por permitirme realizar mi doctorado en estos centros, de los cuales me he sentido siempre parte. Gracias también a los que me han apoyado y me han facilitado su ayuda a lo largo de estos 4 años, en especial a todos los profesores que forman o han formado parte del laboratorio.

Gracias a todos los médicos con los que he tenido la suerte de colaborar por su disponibilidad y participación, y que han sido parte esencial de los proyectos realizados.

Gracias a los compañeros de laboratorio de las estancias realizadas, por compartir vuestra experiencia y conocimiento.

Dar las gracias a la Universidad San Pablo CEU y a todo su personal tanto docente como no docente, por toda la ayuda brindada y hospitalidad durante los años de la realización de la Tesis.

Finalmente extender mi gratitud a mi madre, mi padre, mis hermanos, mis gatos y amigos con los que he compartido también este viaje y que han estado presentes en cada momento.

Abreviaturas y Acrónimos

ACN. Acetonitrilo

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ADONIS. Análisis de varianza multivariado permutacional usando matrices de distancia, del inglés *analysis and partitioning sums of squares using semimetric and metric distance matrices*

AGCC. Ácidos grasos de cadena corta

Alum. Hidróxido de aluminio

ARN. Ácido ribonucleico. En inglés, *ribonucleic acid* (RNA)

BI-CEMBIO. Biblioteca interna del CEMBIO

BSTFA. N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CCA. Análisis de correspondencia canónica, del inglés *canonical-correlation analysis*

CEMBIO. Centro de Metabolómica y Bioanálisis

CE-MS. Electroforesis capilar asociado a MS, del inglés *capillary electrophoresis*

CMM. CEU Mass Mediator

CPAs. Células presentadoras de antígenos

EA. Enteritis alérgica

EAACI. Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica, del inglés *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*

EI. Ionización electrónica, del inglés *Electron ionization*

ELISA. Del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

ESI. *Ionización por electrospray*, del inglés *Electrospray ionization*

FA. Ácido fórmico

Fcε1. Receptor de alta afinidad para IgE

FDR. Del inglés, *False Discovery Rate*

FPIES. Síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias, del inglés *Food Protein Induced Enterocolitis Syndrome*

FTA. Del inglés, *Flinders Technology Associates*

GALT. Tejido linfóide asociado a la mucosa intestinal, del inglés *gut-associated lymphoid tissue*

GC-MS. Cromatografía de gases asociado a MS, del inglés *gas chromatography*

HMDB. Del inglés, *Human Metabolome Data Base*

IFN-γ. Interferón gamma

Ig. Inmunoglobulina

IgEki. Del inglés, *IgE knock-in*

IgEki_ns. Ratones IgEki no sensibilizados

IgEki_OVA. Ratones IgEki sensibilizados a OVA

iHMP. Del inglés, *Integrative Human Microbiome Project*

IL. Interleucinas

ILC2. Células linfoides innatas tipo 2

KEGG. Del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KW. Kruskal-Wallis

LA. Lactantes con alergia a las proteínas de la leche de vaca

LC. Lactantes control

LC-MS. Cromatografía de líquidos asociado a MS, del inglés *liquid chromatography*

m/z. Relación masa/carga

MeOH. Metanol

MS. Espectrometría de masas, del inglés *mass spectrometry*

MS/MS. Espectrometría de masas en tándem

MTBE. Metil tert-butil éter

NaOH. Hidróxido de sodio

NK. Linfocitos T *Natural Killer*

OK. Ortólogo KEGG

ORF. Marcos de lectura abiertos, del inglés *open reading frames*

OVA. Ovoalbúmina

PBS. Tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffered saline*

PCA-X. Análisis de componentes principales, del inglés *principal component analysis*

PLS-DA. Análisis discriminante parcial-mínimo cuadrado, del inglés *partial least squares discriminant analysis*

QA. Procedimiento de calidad, del inglés *Quality Assurance*

QC. Control de calidad, del inglés *quality control*

QTOF. Cuadripolo tiempo de vuelo, del inglés *quadrupole time of flight*

RMN. Resonancia magnética nuclear

RSD. Desviación Estándar Relativa, del inglés *Relative Standard Deviation*

RT. Tiempo de retención, del inglés *retention time*

SI. Sistema inmunitario

SPT. Prueba de alergia cutánea, del inglés *Skin Prick Test*

TFA(NH₄). Trifluoroacetato de amonio

Th0. Linfocitos inmaduros

TLR. del inglés, Toll Like Receptor

TMCS. Trimetilclorosilano

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa

Treg. Linfocitos T reguladores

UMW. U-de Mann-Whitney

VIP. Importancia de la variable independiente en proyección, del inglés *variable importance in projection*

WT. Del inglés, *Wild Type*

WT_ns. Ratones WT no sensibilizados

WT_OVA. Ratones WT sensibilizados a OVA

Resumen

Durante los últimos años, se han incrementado tanto la prevalencia como la gravedad de las enfermedades alérgicas. La prevalencia de la alergia alimentaria, en particular, ha aumentado en las últimas tres décadas, afectando en la actualidad aproximadamente a un 8% de la población mundial. Por otro lado, se ha sugerido que la alteración del equilibrio homeostático contribuye de manera importante no sólo a los síndromes metabólicos tradicionales, sino también a múltiples trastornos inflamatorios, incluida la alergia.

La participación del microbioma entre los mecanismos moleculares subyacentes a la alergia ha cobrado especial relevancia en los últimos años. Estos estudios sugieren que la disbiosis, es decir, la composición o funcionalidad alterada de la microbiota, puede causar alteraciones locales y sistémicas en la respuesta inmunitaria a alérgenos específicos. En este sentido, se ha establecido una relación entre la microbiota intestinal y la alergia alimentaria. La composición de la microbiota humana es dinámica y depende de factores asociados al huésped como la dieta, las enfermedades y el estilo de vida, entre otros. Para el análisis y la comprensión de la microbiota se emplean mayoritariamente técnicas ómicas, en las que se trabaja con grandes volúmenes de datos. En las últimas décadas, las técnicas de análisis de la microbiota han avanzado mucho, permitiendo una mejor exploración y mayor comprensión de las enfermedades multifactoriales, incluida la alergia. Así, cada vez son más los estudios que proponen la utilización de la microbiota como diana terapéutica.

Con el fin de indagar en estos aspectos, nos propusimos evaluar el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo y progresión de la alergia alimentaria con un enfoque multiómico. En primer lugar, en el Capítulo 1, se presenta una recopilación de factores intrínsecos y extrínsecos que pueden alterar la microbiota intestinal y se propone una posible

estandarización de las condiciones previas al análisis, así como la de de los pasos preanalíticos de un estudio con técnicas ómicas.

A continuación, en el Capítulo 2, se presenta el análisis realizado de la microbiota intestinal mediante metabolómica en un modelo experimental murino de alergia no mediada por IgE con el fin de dilucidar cómo influye la IgE en el desarrollo de la alergia no mediada y cómo se altera el perfil metabólico, tanto sérico como intestinal. El estudio metabolómico en este modelo murino de alergia mediada por células T permitió confirmar que la IgE promueve alteraciones del metabolismo lipídico y genera productos lipídicos proinflamatorios en las etapas de inflamación leve y moderada, mientras que la presencia de IgE en la etapa de inflamación grave altera un mayor número de procesos fisiológicos incluidos los relacionados con el microbioma intestinal, la integridad de la barrera y las rutas de generación de energía.

Por último, en el Capítulo 3 se presenta el análisis realizado mediante metagenómica *shotgun*, muestras de heces en lactantes alérgicos a proteínas de leche de vaca. Además, nos propusimos determinar correlaciones entre los resultados de metagenómica y tres proteínas fecales relevantes en alergia alimentaria: lactoferrina, α -1 antitripsina y calprotectina. Nuestros resultados mostraron una alteración en el metabolismo de los lípidos y los ácidos grasos, así como un aumento de calprotectina y lactoferrina fecales en los lactantes alérgicos. Lo que podría indicar que existe una inflamación y disrupción de barrera intestinal producida por la alergia alimentaria.

La aproximación multiómica de esta Tesis Doctoral ha permitido avanzar en la comprensión de la interacción de la microbiota con la alergia alimentaria en el contexto de la biología de sistemas. Asimismo, se ha profundizado en el papel de la IgE en la alergia alimentaria. Este trabajo abre la vía para estudios futuros en la línea de la biología de sistemas, integrando datos procedentes de distintas plataformas ómicas.

Summary

In recent years, both the prevalence and severity of allergic diseases have increased. The prevalence of food allergy, in particular, has increased over the past three decades, currently affecting approximately 8% of the world's population. In addition, it has been suggested that impaired homeostatic balance contributes significantly not only to traditional metabolic syndromes, but also to multiple inflammatory disorders, including allergy.

The involvement of the microbiome among the molecular mechanisms underlying allergy has gained special relevance in recent years. These studies suggest that dysbiosis, that is, the altered composition or functionality of the microbiota, may cause local and systemic alterations in the immune response to specific allergens. In this sense, a relationship has been established between the intestinal microbiota and food allergy. The composition of the human microbiota is dynamic and depends on factors associated with the host such as diet, diseases, and lifestyle, among others. For the analysis and understanding of the microbiota, omic techniques are mostly used, in which large volumes of data are used. In recent decades, microbiota analysis techniques have come a long way, allowing for better exploration and greater understanding of multifactorial diseases, including allergy. Thus, more and more studies are proposing the use of the microbiota as a therapeutic target.

In order to investigate these aspects, we set out to evaluate the role of the intestinal microbiota in the development and progression of food allergy with a multiomic approach. First, in Chapter 1, a compilation of intrinsic and extrinsic factors that can alter the intestinal microbiota is presented and a possible standardization of the conditions prior to the analysis is proposed, as well as that of the pre-analytical steps of a study with omic techniques.

Next, in Chapter 2, the analysis of the intestinal microbiota by metabolomics in an experimental mouse model of allergy not mediated by IgE is presented in order to elucidate how IgE influences the development of unmediated

allergy and how the metabolic profile, both serum and intestinal, is altered. The metabolomic study in this mouse model of T-cell-mediated allergy allowed to confirm that IgE promotes alterations of lipid metabolism and generates pro-inflammatory lipid products in the stages of mild and moderate inflammation, while the presence of IgE in the stage of severe inflammation alters a greater number of physiological processes including those related to the intestinal microbiome, the integrity of the barrier and energy routes.

Finally, Chapter 3 presents the analysis carried out by shotgun metagenomics, stool samples in infants allergic to cow's milk proteins. In addition, we set out to determine correlations between metagenomics results and three faecal proteins relevant to food allergy: lactoferrin, antitrypsin α -1 and calprotectin. Our results showed an alteration in lipid and fatty acid metabolism, as well as an increase in faecal calprotectin and lactoferrin in allergic infants. These results suggest that there is inflammation and disruption of the intestinal barrier produced by food allergy.

The multiomic approach of this Doctoral Thesis has allowed advancing in the understanding of the interaction of the microbiota with food allergy in the context of systems biology. Likewise, has offered further insight into the role of IgE in food allergy. This work opens the way for future studies in the line of systems biology, integrating data from different omics platforms.

Índice

HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
INTRODUCCIÓN.....	17
1. Las enfermedades alérgicas	17
1.1. Definición, epidemiología y etiología	17
1.2. Inmunología de las enfermedades alérgicas	19
1.2.1. Alérgenos y anticuerpos.....	19
1.2.2. Células mediadoras del sistema inmunitario en la alergia.....	21
1.2.3. Alergia mediada por IgE	24
1.2.4. Alergia mediada por células T	25
1.3. Alergia alimentaria	26
2. La microbiota	28
2.1. Definición y características generales	28
2.2. La microbiota intestinal	29
2.2.1. Implicación de la microbiota intestinal en la salud	30
3. Participación de la microbiota intestinal en la reacción alérgica	32
4. Biología de sistemas y técnicas ómicas	34
4.1. Genómica y metagenómica	36
4.1.1. Metagenómica shotgun	37
4.2. Metabolómica	39
4.2.1. Técnicas analíticas.....	40
4.2.2. Flujo de trabajo	44
4.3. Búsqueda de biomarcadores en alergia	47
4.3.1. Biomarcadores fecales	49
CAPÍTULO 1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MANEJO DE MUESTRA EN EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	50
1. Introducción	51
2. Hipótesis.....	52
3. Objetivos	52
4. Materiales y métodos	53
5. Resultados y discusión	55
5.1. Consideraciones previas a la recogida de muestra. Factores intrínsecos	55
5.2. Moduladores de la microbiota intestinal	56
5.3. Diseño del estudio. Recopilación de metadatos	58

5.4.	Consideraciones preanalíticas. Factores extrínsecos.	59
5.5.	Recogida de la muestra	61
5.6.	Condiciones de transporte y almacenamiento.....	62
5.7.	Pretratamientos en Metabolómica.....	66
6.	Conclusiones.....	70

CAPÍTULO 2. IMPACTO DE LA IGE EN LOS METABOLOMAS SÉRICO E INTESTINAL DE UN MODELO MURINO DE ENTERITIS ALÉRGICA 72

1.	Introducción	73
2.	Hipótesis.....	75
3.	Objetivos	75
4.	Materiales y métodos	76
4.1.	Modelo animal	76
4.2.	Sensibilización a ovoalbúmina e inducción de enteritis alérgica	77
4.3.	Toma de muestras.....	78
4.4.	Metabolómica no dirigida	78
4.4.1.	Extracción de metabolitos	78
4.4.2.	Tratamiento de la muestra	79
4.4.3.	Preparación de los controles de calidad	80
4.4.4.	Análisis metabolómico	80
4.4.5.	Tratamiento de datos e identificación de compuestos	84
4.5.	Identificación de la clase biológica	86
4.6.	Análisis estadístico	86
5.	Resultados	88
5.1.	La IgE promueve el desarrollo de síntomas clínicos e inflamación intestinal en un modelo murino de EA	88
5.2.	Perfil metabolómico global	90
5.3.	El efecto de la sensibilización con OVA en ratones WT sugiere una alteración metabólica de la microbiota intestinal.....	95
5.4.	La EA moderada altera el metaboloma local en mayor medida que el metaboloma sistémico.....	100
5.5.	El efecto de la sensibilización con OVA en ratones IgEki apunta a una importante alteración metabólica a nivel sistémico	106
5.6.	La EA grave altera los metabolomas sistémicos y locales	113
6.	Discusión	121
7.	Conclusiones.....	125
8.	Anexos.....	126
I.	Lista de reactivos y estándares.....	126
II.	Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 10 entre WT_OVA y WT_ns en heces.....	127
III.	Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 14 entre IgEki_ns y WT_ns en heces.....	128

IV. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 18 entre IgEki_OVA y IgEki_ns en heces	130
V. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 19 entre IgEki_OVA y IgEki_ns en suero	131
VI. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 22 entre IgEki_OVA y WT_OVA en heces	132
VII. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 23 entre IgEki_OVA y WT_OVA en suero.....	135
CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE FUNCIONALIDAD DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SU CORRELACIÓN CON PROTEÍNAS FECALES EN LACTANTES CON ALERGIA A LECHE DE VACA.....	136
1. Introducción	137
2. Hipótesis.....	140
3. Objetivos	140
4. Materiales y métodos	141
4.1. Diseño del estudio.....	141
4.2. Población de estudio	141
4.3. Criterios de inclusión	141
4.4. Recolección y procesamiento de muestras.....	142
4.5. Metagenómica	143
4.5.1. Preparación de la muestra	143
4.5.2. Secuenciación shotgun	143
4.5.3. Bioinformática y análisis estadístico	143
4.6. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	145
4.6.1. Preparación de la muestra	145
4.6.2. Protocolo ELISA	146
4.6.3. Tratamiento de datos y análisis estadístico	146
4.7. Análisis de correlación.....	147
5. Resultados.....	147
5.1. Perfil de la funcionalidad de la microbiota intestinal asociado a la alergia a leche de vaca	147
5.2. Inmunodetección de proteínas fecales	150
5.3. Análisis de correlación.....	152
6. Discusión	157
7. Conclusiones.....	162
8. Anexos.....	163
I. Características demográficas y clínicas.....	163
II. Cuestionario de antecedentes.....	165
CONCLUSIONES GENERALES.....	170

GENERAL CONCLUSIONS	172
ANEXOS	174
1. Publicaciones derivadas del trabajo de Tesis	174
2. Publicaciones no directamente relacionadas con el trabajo de Tesis	175
3. Congresos	176
4. Divulgación	177
BIBLIOGRAFÍA.....	179

Hipótesis

El uso de estrategias ómicas como la metabolómica y la metagenómica *shotgun* aplicada a distintas matrices biológicas permite el estudio de procesos biológicos subyacentes (particularmente la relación entre la microbiota y la alergia alimentaria), así como la identificación de nuevos biomarcadores útiles en el campo de las enfermedades alérgicas.

Objetivos

1. Obtener un procedimiento estandarizado de trabajo para el correcto manejo de muestras de heces para el estudio de la microbiota intestinal en análisis ómicos.
2. Realizar e interpretar el análisis metabolómico del metaboloma de heces y suero, con énfasis en la microbiota, en un modelo murino de alergia alimentaria no mediada por IgE.
3. Analizar los cambios en la microbiota intestinal de lactantes con alergia a proteínas de leche de vaca por metagenómica *shotgun* y evaluar si esas alteraciones se correlacionan con tres biomarcadores fecales, con el fin de descubrir procesos fisiológicos implicados.

Introducción

1. Las enfermedades alérgicas

1.1. Definición, epidemiología y etiología

Las enfermedades alérgicas se producen por reacciones o respuestas inmunitarias exageradas frente a sustancias que generalmente son inocuas (pólenes de plantas, ácaros del polvo, alimentos, etc.) y afectan a más de 150 millones de europeos¹, constituyendo una auténtica epidemia no infecciosa en el siglo XXI². Son enfermedades crónicas que afectan de forma significativa a la calidad de vida de los pacientes en los ámbitos físico, psíquico, emocional y social³. Además, son procesos muy frecuentes, que afectan especialmente a niños y jóvenes, y tienen importantes consecuencias socioeconómicas². Las reacciones alérgicas pueden ser leves o moderadas, afectando a la calidad de vida del paciente en un momento dado, pero también pueden ser graves, y requerir visitas a urgencias, hospitalizaciones e incluso llegando a producir la muerte. Esto conduce a una importante demanda sanitaria que conlleva un impacto en la salud pública y en los recursos sanitarios disponibles.

En los últimos 30 años se ha producido un aumento, tanto en la prevalencia como en la gravedad, de las enfermedades alérgicas especialmente en la rinitis alérgica, el asma alérgica, la alergia alimentaria y la alergia a medicamentos, estimándose que afectan al 20-25% de la población mundial⁴. Tomando Europa como referencia, según los datos facilitados por la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI, del inglés *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*), actualmente 100 millones de personas en Europa presentan rinitis alérgica, 70 millones de personas padecen asma y hasta 7 millones de personas tienen una alergia alimentaria, llegándose a producir una anafilaxia en el 8% de las personas alérgicas. Actualmente, aproximadamente un 35% de la población europea presenta algún tipo de alergia y se estima que para 2025, ese porcentaje estará en torno al 50%³.

Además de alteraciones inmunitarias, factores genéticos, e infecciones víricas respiratorias en edades tempranas que predisponen a los individuos a padecer enfermedades alérgicas, en las últimas décadas se han postulado diferentes hipótesis sobre el incesante crecimiento de la incidencia de estas patologías en el mundo occidental⁴. La primera, y una de las que ha cobrado más protagonismo, fue la “hipótesis de la higiene” de David Strachan, que en 1989 sugirió que las infecciones de la primera infancia protegían contra las enfermedades alérgicas. Aunque actualmente esta hipótesis no ha sido reconocida en su totalidad por la comunidad científica, posteriormente se ha descrito que la pérdida o reducción del contacto con agentes infecciosos reduce la actividad Th1, aumentando la actividad de las células Th2, característica de los trastornos alérgicos^{5,6}. Por otro lado, la “hipótesis de los viejos amigos” fue propuesta en 2003 por Graham Rook como una adaptación de la hipótesis de la higiene⁷. Esta hipótesis sugiere que para el correcto desarrollo del sistema inmunitario es necesaria la exposición temprana y regular a una amplia gama de microbios inofensivos o “viejos amigos”, presentes a lo largo de la evolución humana y reconocidos por el sistema inmunitario, contribuyendo a su maduración para que reaccione adecuadamente ante los distintos estímulos o amenazas⁷. De esta manera, las alteraciones en la población microbiana del cuerpo humano, y factores concomitantes como el cambio climático, el aumento de los niveles de contaminación, el sedentarismo con la consecuente exposición a alérgenos interiores, y el incremento en el uso de antibióticos y fármacos, entre otros factores, han producido un impacto importante en la aparición de enfermedades alérgicas en países industrializados y en desarrollo^{4,8}. En consecuencia, actualmente uno de los principales retos de la Alergología es avanzar en el conocimiento de la complejidad de las enfermedades alérgicas, mejorando su diagnóstico, pronóstico y tratamiento, y realizando así una transición hacia una medicina de precisión del paciente alérgico: predictiva, preventiva, personalizada y participativa¹.

1.2. Inmunología de las enfermedades alérgicas

El sistema inmunitario (SI) es un conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas derivadas, que se encuentra ampliamente distribuido por el organismo. Los órganos que forman parte del SI se denominan órganos linfoides (adenoides, amígdalas palatinas, apéndice, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, timo y placas de Peyer). También se localiza en las mucosas del aparato digestivo, respiratorio y genitourinario⁹. Todos ellos contribuyen a la producción, maduración y activación de las células inmunes.

El SI se clasifica en innato y adaptativo. El SI innato es la primera línea de defensa del huésped y posee mecanismos preexistentes que se activan de manera rápida. Por otro lado, el SI adaptativo nos brinda una respuesta específica para diferentes moléculas y posee memoria y diversidad para reaccionar frente a una gran variedad de antígenos.

La misión principal del SI es la protección del individuo mediante el reconocimiento y la defensa. Se encarga de reconocer, permanentemente, aquello que es propio y forma parte del organismo (tejidos, células), de lo que es ajeno a él y, potencialmente, dañino. Además, es un complejo sistema defensivo frente a agresiones y ataques, tanto externos al organismo (e.g. bacterias y virus), como internos (e.g. células degeneradas o tumorales)².

Las enfermedades alérgicas se manifiestan cuando el SI no es capaz de reconocer una sustancia como inocua (alérgeno), generándose una respuesta inmunológica específica, celular y humoral, y la aparición de síntomas que se pueden extender a lo largo de todo el organismo¹⁰.

1.2.1. Alérgenos y anticuerpos

Los alérgenos son sustancias que producen o pueden producir alergia. Son antígenos que se caracterizan por ser moléculas inocuas para la población que no es alérgica mientras que para los alérgicos tienen la capacidad de estimular al SI para generar anticuerpos, y por ende provocar una reacción

alérgica. Suelen ser proteínas, generalmente glicoproteínas (que participan en el reconocimiento celular) o lipoproteínas (proteínas que transportan los lípidos o grasas) y, excepcionalmente, algunos hidratos de carbono^{2,10}. Estas sustancias desencadenan en los pacientes alérgicos una serie de acontecimientos inflamatorios que ocurren tanto en piel como mucosas y que originan los diferentes signos y síntomas (e.g. urticaria, angioedema, asma, mareos, anafilaxia) de las enfermedades alérgicas^{1,2}.

La clasificación más habitual de los alérgenos es la vía de acceso al organismo, existiendo de esta manera alérgenos por contacto cutáneo (e.g. plantas venenosas, productos químicos, metales, látex, cosméticos); por inyección (e.g. veneno de himenópteros, medicamentos); por ingestión (e.g. fármacos y alimentos); por inhalación (e.g. polen, polvo, hongos, epitelios de animales); y otras vías (e.g. parásitos).

Por otro lado, los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs), son polipéptidos compuestos por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Poseen una región constante que determina su clase (G, A, M, D y E) y sus funciones biológicas, y una región variable de unión con el antígeno¹¹. Las Igs son generadas por los linfocitos B como una respuesta de defensa contra los microorganismos y sustancias exógenas que penetran en el organismo. Si estas sustancias externas son reconocidas por el SI como no perjudiciales, resultan toleradas y se producen Ig del tipo G. Por el contrario, las personas alérgicas producen preferentemente Ig del tipo E (IgE)^{2,12}.

El organismo reconoce los alérgenos a través de la unión de sus epítomos o determinantes antigénicos (grupo de aminoácidos) a la IgE¹². Los epítomos pueden ser lineales (constituidos por aminoácidos consecutivos) o conformacionales (aminoácidos no consecutivos). Los primeros son más estables y son los que suelen causar reacciones de gravedad. Dentro de estos epítomos lineales se encuentran algunos alérgenos alimentarios de la leche y el huevo como la beta-lactoglobulina o la ovoalbúmina, respectivamente^{2,4}.

1.2.2. Células mediadoras del sistema inmunitario en la alergia

Las enfermedades alérgicas se caracterizan por una alteración de la respuesta inmune en la que participan distintas células y sustancias producidas por dichas células, que se detallan a continuación:

- **Mastocitos y basófilos:** se caracterizan por su capacidad de fijar moléculas de IgE en el exterior de su membrana plasmática. Secretan mediadores inflamatorios (histamina, leucotrienos, interleucinas o citocinas Th2) y expresan receptores tipo Toll Like Receptor (TLR). En los pacientes alérgicos, los receptores de alta afinidad para IgE (Fcε1) están casi saturados y listos para iniciar la respuesta mediada por IgE ante la presencia de una cantidad suficiente de alérgeno.
- **Histamina:** es uno de los principales mediadores de la inflamación alérgica. Es el producto más abundante, que se encuentra en los gránulos de los mastocitos y en menor cantidad en los basófilos. La respuesta biológica a la liberación de la histamina es: el picor cutáneo, por estimulación de los nervios; la dilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, con lo que se produce calor y enrojecimiento de la piel y de las mucosas, y salida de líquido hacia los tejidos circundantes, con lo que se origina un edema; y la contracción de la musculatura de los bronquios, que causa dificultad para respirar. Debido a todos estos efectos que produce la histamina, los antihistamínicos H1 son los fármacos más empleados en el tratamiento de los síntomas de las enfermedades alérgicas.
- **Linfocitos T:** se producen en la médula ósea y maduran en el timo. Cabe destacar un fenotipo de linfocitos T, los Th0 o linfocitos inmaduros, que son los que se van a diferenciar en uno de los otros cuatro fenotipos responsables del tipo de respuesta inmune: los linfocitos Th1 (respuesta frente a microorganismos y parásitos intracelulares), los linfocitos Th2 (respuesta frente a helmintos y alérgenos), los linfocitos Th17 (respuesta frente a bacterias extracelulares y hongos), y los linfocitos T reguladores (Treg,

amplifican o suprimen la respuesta inmunológica global, regulando los otros componentes del SI). Hay que destacar que, en condiciones normales, hay un equilibrio entre la respuesta Th1 y Th2. Además, Los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones principales: linfocitos T CD4+ cuya principal función es la secreción de citocinas y colaboración con otras células del SI y los linfocitos T CD8+ que eliminan células infectadas y tumorales.

- **Citocinas:** productos solubles, de tiempo de acción corto, responsables de la comunicación intercelular. Son responsables de la regulación de la respuesta inmune en general, y de la alérgica en particular, y son producidas principalmente por los linfocitos T. Se han identificado un gran número de citocinas, muchas de ellas cruciales para el crecimiento y diferenciación de los linfocitos y monocitos hacia células efectoras involucradas en la eliminación eficiente de los microorganismos, y tienen un papel fundamental en la inflamación¹³. Un tipo de citocinas particular son las interleucinas (IL), que están altamente implicadas en las respuestas alérgicas¹⁴. Así, en la rinitis o el asma bronquial alérgica, se origina una alteración en el equilibrio entre los linfocitos Th1 y Th2, a favor de los Th2, ya que se produce un incremento de IL-4 e IL-5, que va a favorecer el desarrollo de la respuesta alérgica. Por otro lado, los linfocitos Th1 estimulan la producción de IL-12 e interferón gamma (IFN- γ) que neutralizan la respuesta de la IL-4 y de los linfocitos Th2^{2,11}.
- **Eosinófilos:** son leucocitos que tienen un núcleo bilobulado y poseen gránulos citoplasmáticos. Se acumulan en los tejidos y mucosas durante la respuesta alérgica, y su proliferación y diferenciación se lleva a cabo gracias a la IL-5 producida principalmente por células Th2. Modulan las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

- **Linfocitos B:** son responsables de la inmunidad humoral. Dan lugar a las células plasmáticas cuando se activan inmunológicamente, que son las responsables de la producción de anticuerpos.
- **Células epiteliales:** son la interfaz entre el huésped y el exterior, y suponen la primera barrera de defensa frente a agentes externos patógenos como microorganismos y alérgenos. La activación de receptores de reconocimiento de patrones, presentes en las células epiteliales de las vías respiratorias o del intestino, produce la liberación de IL-25, IL-33 y linfopoyetina del estroma tímico, que atraen y activan células del sistema inmune innato y adaptativo y son capaces de iniciar y mantener la respuesta inmunitaria tipo Th2¹⁵. Este es un proceso clave en el reconocimiento de alérgenos, que activa a las células dendríticas, las cuales coordinan el siguiente paso en la respuesta inmunitaria.
- **Células dendríticas:** son células presentadoras de antígenos (CPAs) y hacen de nexo entre el sistema inmune innato y adaptativo. Procesan los alérgenos y se los presentan a las células T en los ganglios linfáticos, liberándose IL4, IL12 e IFN- γ , produciéndose la polarización de las células T.
- **Linfocitos T Natural Killer (NK):** producen citocinas proinflamatorias e inmunosupresoras como IFN- γ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-10.
- **Células linfoides innatas tipo 2 (ILC2):** producen citocinas Th2. Se identificaron por primera vez en el tracto gastrointestinal, el pulmón y sangre¹⁵.

El SI innato proporciona una respuesta inmediata frente antígenos, siendo la primera línea de defensa. Los principales componentes que intervienen en la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas (epitelios, enzimas, etc.), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, etc.), eosinófilos, basófilos, mastocitos, linfocitos NK, el sistema del complemento, citocinas, y TLRs.

Los principales elementos del SI adaptativo son los linfocitos B y T que se activan frente a los antígenos. Posee dos tipos de respuestas inmunes: inmunidad humoral e inmunidad celular. Estas respuestas van a dar lugar a dos principales tipos de alergia: la alergia mediada por IgE y la alergia mediada por células T, respectivamente.

1.2.3. Alergia mediada por IgE

Aunque hay una gran variedad de mecanismos inmunológicos implicados en la patogénesis de la alergia, la mayoría de las respuestas alérgicas se consideran reacciones de hipersensibilidad inmediatas, caracterizadas por la producción de IgE^{11,12,14}.

Las reacciones alérgicas mediadas por IgE se dividen en tres fases principales. En primer lugar, durante la fase de sensibilización, se produce un primer contacto con el alérgeno, el cual es capturado por las CPAs que lo fagocitan en su interior y lo presentan a los linfocitos Th0, que se diferencian a linfocitos Th2 e interaccionan con los linfocitos B, los cuales producen IgE específica frente a ese antígeno concreto. Esta IgE se unirá a los mastocitos y basófilos que contienen receptores para ésta en su superficie. Ante una segunda exposición, en la fase de reacción alérgica aguda, el alérgeno es dirigido directamente hacia los anticuerpos IgE específicos que se habían generado previamente y que estaban unidos a mastocitos y basófilos. Al producirse la unión alérgeno-anticuerpo se produce la liberación de histamina y otros mediadores, que inducen un estado inflamatorio. Es en este momento en el que el individuo comienza a manifestar sintomatología alérgica (picor, estornudos, dificultad respiratoria, etc.). Por último, la fase de reacción alérgica tardía se produce de cuatro a seis horas después debido al efecto de los mediadores quimiotácticos liberados inicialmente, cuya misión es atraer a los eosinófilos al lugar de inflamación, donde liberan de sus gránulos sustancias citotóxicas que generan daño local e inflamación de una manera más permanente, perpetuándose los síntomas^{2,16}.

Si la exposición al alérgeno persiste en el tiempo o la inflamación no se resuelve, la respuesta inmune evoluciona hacia una inflamación alérgica crónica. Esta inflamación se caracteriza por la aparición de múltiples tipos de células inmunes, tanto del sistema inmune innato como adaptativo^{16,17}.

1.2.4. Alergia mediada por células T

La inmunidad celular se caracteriza por no estar mediada por IgE. En este tipo de inmunidad, al entrar el antígeno a través del epitelio, es captado por las CPAs, transportado a los ganglios linfáticos y transformado en péptidos que se expresan en la membrana de las CPAs. Los linfocitos Th0 al interaccionar con estos péptidos, reconociéndolos a través de su receptor, proliferan y se diferencian a linfocitos T efectores y de memoria. Los linfocitos T efectores migran hacia el lugar de inflamación para encontrar el antígeno para el cual son específicos. La subpoblación de linfocitos T CD4+ efectores antígeno-específicos secretan citocinas que permiten a los macrófagos eliminar los microorganismos fagocitados².

La **Figura 1** muestra el mecanismo de acción y las principales células y moléculas implicadas en la respuesta inmune en cada tipo de alergia.

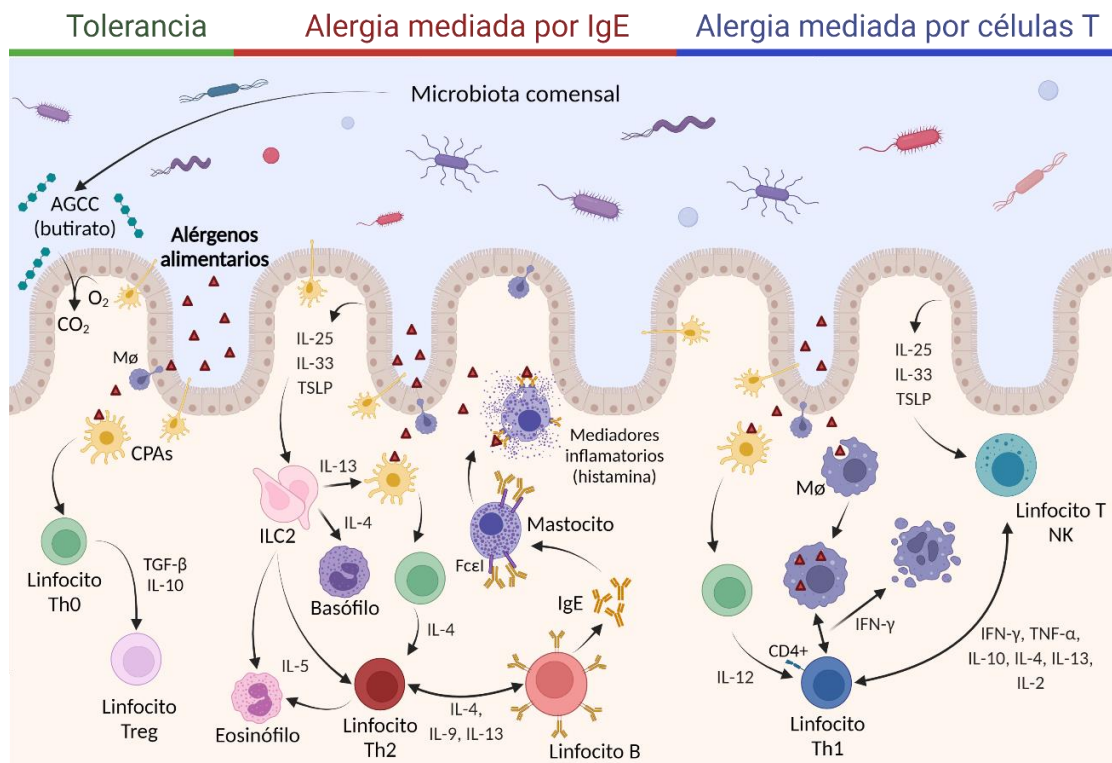


Figura 1. Mecanismo de acción detallado de tolerancia y respuestas inmunes humoral y celular en un modelo de barrera intestinal. AGCC: ácidos grasos de cadena corta; Mφ: macrófago; CPAs: células presentadoras de antígenos; Treg: linfocitos T reguladores; Fcε1: receptores de alta afinidad para IgE; TSLP: linfopoyetina del estroma tímico; NK: Linfocitos T Natural Killer; ILC2: Células linfoides innatas tipo 2.

1.3. Alergia alimentaria

La alergia producida por alimentos genera reacciones que afectan a diferentes órganos: la piel (e.g. picor, enrojecimiento, habones); el sistema digestivo (e.g. náuseas, vómitos, diarrea); el sistema respiratorio (e.g. estornudos, mucosidad nasal, dificultad respiratoria); cardiovascular (e.g. arritmias cardíacas, caída de la tensión arterial) y neurológicos (e.g. mareo). Si las reacciones son muy graves pueden llegar a ocasionar la muerte. Cualquier alimento puede comportarse como un alérgeno. Sin embargo, algunos lo hacen con mayor frecuencia, y ello depende, en gran medida, de los hábitos alimenticios de cada región y de la edad del paciente. Así, en Europa los alimentos más comunes que producen alergia son: soja, semillas de sésamo, pescado, mostaza, moluscos, marisco, leche, huevos, frutos secos, cereales con gluten, cacahuetes, apio y

altramuces¹⁸. Por su parte, en España, los alimentos que más habitualmente causan alergia en los niños son la leche, los huevos y el pescado; mientras que en los adultos es más frecuente la alergia a las frutas y las verduras, los frutos secos y los mariscos².

La alergia producida por alimentos es una respuesta inmunológica específica que se produce de forma reproducible al exponerse a un determinado alérgeno alimentario. Esta reacción inmunológica puede deberse a un mecanismo mediado por IgE o a un mecanismo no mediado por IgE. La alergia producida por alimentos mediada por IgE es mucho más común que la no mediada por IgE, los síntomas son fácilmente reconocibles y los mecanismos subyacentes están mejor establecidos, tal y como se describe anteriormente. Por otro lado, el diagnóstico de la alergia alimentaria gastrointestinal no mediada por IgE es clínico y, debido a la falta de biomarcadores específicos, no siempre es fácil identificarla. El diagnóstico se basa en la compatibilidad de los síntomas, la exclusión de otras enfermedades, la resolución de los síntomas una vez que se retira de la dieta el alimento responsable y la reaparición de los síntomas cuando se vuelve a introducir.

La alergia alimentaria gastrointestinal no mediada por IgE más estudiada es el síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias (FPIES). La FPIES se ha considerado una enfermedad rara, cuyas tasas de incidencia acumulada se sitúan entre el 0,15-0,7%¹⁹. Sin embargo, podría estar infradiagnosticada ya que los datos epidemiológicos son escasos. Se considera un trastorno heterogéneo con un amplio espectro de fenotipos clínicos. Asimismo, aunque la FPIES se considera una alergia producida por alimentos no mediada por IgE, en algunos pacientes es posible detectar IgE específica contra el alimento causante, ya sea al principio o durante el curso de la enfermedad. Esta forma de presentación se conoce como FPIES atípica y parece tener un curso prolongado, con un mayor riesgo de desarrollar síntomas mediados por IgE. Aunque son enfermedades principalmente pediátricas, en los adultos, también se ha descrito que los

fenotipos de FPIES grave desarrollaron IgE y esto está relacionado con el peor pronóstico de la enfermedad¹⁹⁻²⁵.

El estudio y la comprensión de los diferentes fenotipos alérgicos es esencial para desarrollar enfoques terapéuticos precisos y tratamientos personalizados.

2. La microbiota

2.1. Definición y características generales

La microbiota es el conjunto de bacterias, hongos, virus, archaea y parásitos que cohabitan en el interior del cuerpo humano, siendo las bacterias el tipo de microorganismo más abundante. Estos microorganismos pueden establecer una relación simbiótica con el individuo y se localizan en ambientes específicos en el cuerpo como son la piel, la orofaringe, y los tractos gastrointestinal y genitourinario, entre otros. Por otro lado, el microbioma es el conjunto de genes que estos microorganismos aportan a un nicho o ecosistema biológico específico. De esta manera, el microbioma humano es el conjunto de microorganismos (y sus genes) que habitan en el cuerpo²⁶.

La relación simbiótica entre humanos y microbios es el resultado evolutivo de una interacción biológica en la que ambas partes obtuvieron un beneficio y donde, a priori y si no hay alteraciones, no hay daño a las partes involucradas. Los microorganismos residentes nos defienden de enfermedades manteniendo sus nichos ecológicos y utilizando las fibras vegetales que ingerimos para obtener energía y producir metabolitos que son utilizados por nuestras células.

Algunos autores definen el cuerpo humano como un “superorganismo” simbiote de células eucariotas y procarionas^{27,28}. Existen diferentes ecosistemas microbianos en el organismo, pero donde se localizan la mayoría de las bacterias es en el aparato gastrointestinal, donde su número y diversidad va aumentando desde el estómago hasta el colon,

conformando lo que hoy en día denominamos microbiota intestinal (**Figura 2**)²⁹.

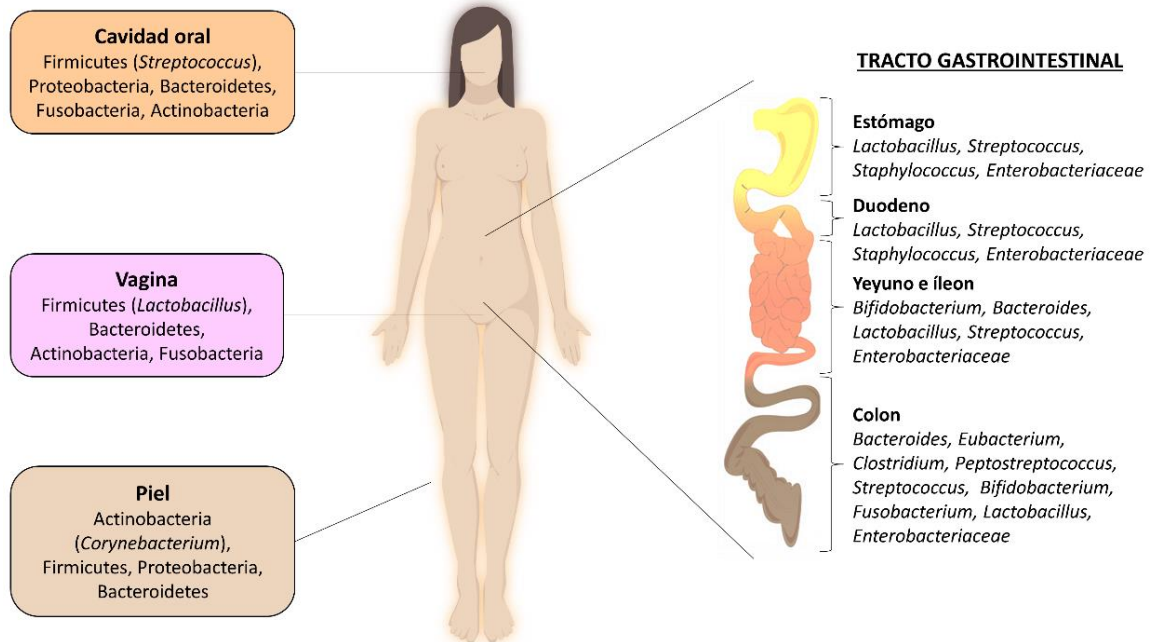


Figura 2. Composición de la microbiota humana en filos y géneros por nicho ecológico. En el tracto gastrointestinal se reportan géneros. Figura adaptada de Clarke G et al. (2019). *Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions*. *Pharmacological Reviews*. 71. 198-224. 10.1124/pr.118.015768²⁹.

2.2. La microbiota intestinal

Dentro de los ecosistemas microbianos presentes en el cuerpo humano, el más complejo y diverso es el del tracto gastrointestinal. Los datos relativos al número de bacterias son de reciente aparición (con publicaciones desde el año 2000) y están en continua revisión, por lo que la comunidad científica todavía no ha llegado a un consenso definitivo. Se ha estimado que el número de microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal está alrededor de 10^9 bacterias y entre 1183 a 3180 géneros bacterianos³⁰.

El epitelio intestinal está formado por enterocitos y células caliciformes en las vellosidades, y por células de Paneth y células M en la base de estas y en las criptas. Este epitelio se encuentra sobre la lámina propia, infiltrada por células dendríticas y por el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT, del inglés *gut-associated lymphoid tissue*). El GALT alberga la

mayor población de células plasmáticas, productoras de anticuerpos, del cuerpo humano, lo que lo convierte en el mayor órgano del sistema inmune. Contiene más de 10^6 linfocitos por gramo de tejido y aproximadamente el 60% del total de inmunoglobulinas producidas diariamente³¹. La microbiota intestinal, puede adherirse a este epitelio a través del moco de las células caliciformes.

La microbiota intestinal cambia a lo largo de nuestra vida. Se estima que alrededor del 70% de la colonización primaria en recién nacidos es por vía materna³², es decir existe una transferencia longitudinal en el nacimiento (continuando con la lactancia materna), y que los primeros 1000 días de vida, en los que el cuerpo se expone por primera vez a factores externos, son claves en su desarrollo. Además, el desarrollo de la microbiota intestinal durante los primeros años de vida, se correlaciona con el desarrollo y la maduración del intestino y del SI. Estableciéndose el eje intestino-sistema inmune que conforma un sistema de comunicación bidireccional entre el sistema neurológico- endocrino-humoral y el sistema gastrointestinal. Desde el momento del nacimiento, se establece una relación simbiótica entre la microbiota y las propias células del cuerpo humano, que evoluciona con el tiempo, adaptándose a los cambios³³. Aunque en general, la composición de la microbiota intestinal se establece y madura durante los dos o tres primeros años, ésta es dinámica y cambia por factores como la dieta, la edad, el consumo de antibióticos, el estilo de vida y factores ambientales³⁴.

2.2.1. Implicación de la microbiota intestinal en la salud

Una de las funciones más conocidas de la microbiota intestinal es la metabólica (e.g. producción de bacteriocinas, degradación de fibra y aprovechamiento nutricional, aporte de metabolitos al hospedador, etc.), pero existen otras como formar parte de la barrera intestinal, evitando la anidación y penetración de patógenos, y contribuir en el desarrollo y modulación del sistema inmunitario³⁵. Asimismo, la microbiota interviene en

la angiogénesis intestinal, incluso en la interacción entre el sistema nervioso central y el entérico³⁶.

El equilibrio entre el sistema inmunitario y la microbiota residente es fundamental para el mantenimiento de la salud. Los cambios y desequilibrios en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal, fenómeno conocido como disbiosis, se han asociado con más de 100 enfermedades, entre ellas, algunas con fenotipo inflamatorio como la obesidad^{37,38}, con la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa^{39,40}, la diabetes tipo I y tipo II^{41,42}, y las enfermedades alérgicas^{16,43}. Un ejemplo de asociación entre ciertas especies bacterianas y su beneficio para la salud, es que se ha descrito que la presencia de ciertas cepas de bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* proporcionan beneficios nutricionales, inhibición de patógenos e inmunomodulación. La presencia de estos microorganismos en nuestra microbiota intestinal aumenta la absorción de minerales y vitaminas, mejora la intolerancia a la lactosa, tiene efectos antidiabéticos, disminuye los niveles de colesterol, aumenta la resistencia a las infecciones del tracto gastrointestinal^{44,45}, y ejerce efectos antiinflamatorios a nivel local y sistémico mejorando el desarrollo del SI⁴⁶.

El alto grado de variabilidad dificulta la definición de una microbiota normal o saludable⁴⁷⁻⁴⁹. Sin embargo, algunos parámetros como el aumento de la diversidad, la riqueza genética o la proporción de productores de butirato suelen considerarse características de una microbiota intestinal sana⁵⁰. De manera indirecta, el impacto en los parámetros del huésped, como la función de barrera intestinal⁵¹ y la inmunidad⁵², también puede tenerse en cuenta a la hora de determinar si la microbiota intestinal es saludable o disbiótica.

Asimismo, en el caso de los ecosistemas microbianos, la resiliencia, así como la diversidad, pueden utilizarse como marcadores de salud del ecosistema^{53,54}. Estos parámetros están vinculados porque cuanto más diverso es un ecosistema, más recursos tiene para adaptarse a los estímulos externos. La diversidad se puede cuantificar mediante

marcadores ecológicos: índices alfa (riqueza de especies que hay en un hábitat determinado) y beta (diversidad entre distintos hábitats). La resiliencia es la propiedad de un ecosistema de resistir los cambios al estrés o de recuperarse rápida y totalmente de las perturbaciones⁵⁵. Las bacterias que habitan el intestino humano están estructuradas como un ecosistema complejo con múltiples interacciones cruzadas, que puede alterarse por factores de estrés tanto externos como internos^{56,57}. Cuando se produce una alteración, tanto funcional como en la composición, este ecosistema microbiano intestinal puede o no volver a su estado original⁵⁸. Una microbiota resiliente volverá a su estado de equilibrio original tras ser sometida a una perturbación, mientras que una microbiota disbiótica pasará a un nuevo estado alterado asociado con cambios irreversibles, no sólo en las funciones del microbioma, sino también en la mucosa intestinal y las células epiteliales⁵⁹. Por lo tanto, una microbiota saludable es diversa y resiliente, ya que está preparada para el cambio.

3. Participación de la microbiota intestinal en la reacción alérgica

El desarrollo de la microbiota intestinal durante los primeros años de vida está relacionado con el desarrollo y la maduración del SI⁶⁰. La mayor fuente de estimulación del SI se encuentra en las superficies mucosas del cuerpo, en contacto con el medio ambiente externo. Además, varios estudios han demostrado que la aparición de respuestas tolerogénicas, en las que se silencian respuestas inmunitarias exacerbadas contra agentes no patógenos, está mediada por la presencia de ciertas bacterias en nuestro tracto gastrointestinal⁶¹⁻⁶³.

Aproximadamente el 70-80% de las células del SI se encuentran en el intestino grueso⁶⁴. La microbiota intestinal estimula y modula el SI mediante una regulación mediada por las células dendríticas. Los microbios promueven la diferenciación de las células Treg mediante la activación de

las células dendríticas presentes en la superficie mucosa del intestino a través del reconocimiento de TLR⁴³. Estas células activadas producen IL que a su vez activan linfocitos Th0 para que maduren hacia el subtipo de linfocitos T correspondiente (Th1, Th2, Th17, Treg)⁴³.

En los individuos sanos, todas las subpoblaciones de linfocitos Th están presentes en un equilibrio dinámico con los linfocitos Treg. Sin embargo, se han encontrado alteraciones en la microbiota intestinal y disminución de la presencia de Treg en personas que sufren de rinitis, eczema atópico, asma o alergia alimentaria al cacahuete, al huevo o a la leche de vaca⁶⁵⁻⁶⁷. La presencia de linfocitos Treg en la mucosa parece estar ligada a la presencia de ciertos géneros de bacterias en la microbiota intestinal⁶⁸, y por tanto este podría ser uno de los mecanismos por el que la microbiota intestinal influenciase el desarrollo de la alergia a los alimentos. Sin embargo, qué grupos o especies bacterianas se encuentran implicadas en la presencia de linfocitos Treg en la mucosa intestinal es algo todavía desconocido, si bien es cierto que parece ser que los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* estimulan su presencia y parecen disminuir los síntomas de la alergia alimentaria^{69,70}. Además, la falta de señales mediadas por la microbiota podría ser un factor a tener en cuenta, ya que se ha asociado a deficiencias en linfocitos Treg y una consecuente expresión de células efectoras⁷¹. Asimismo, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por la microbiota (particularmente el butirato), también aumentan la proporción de linfocitos Treg y son capaces de acelerar la tolerancia a la leche de vaca⁷².

A pesar de los avances en este campo, todavía se desconoce si el desequilibrio de la microbiota intestinal (i.e. la disbiosis) es la causa que desencadena una enfermedad o, por el contrario, si esta es una consecuencia de dicha enfermedad que alteraría las poblaciones bacterianas y su funcionalidad.

4. Biología de sistemas y técnicas ómicas

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo cuyo análisis y comprensión se ha desarrollado gracias, en gran parte, a las técnicas ómicas. El nuevo enfoque del microbioma conceptualizado por Martin Blaser, abrió las puertas a un estudio más profundo y exhaustivo de los microbios endógenos humanos, incluyendo la transmisión vertical, la comunicación entre los reinos y la simbiosis⁷³. En la misma línea, la "revolución ómica" ha cambiado por completo la forma de estudiar el microbioma intestinal y de abordar su papel en la relación con la salud humana⁷⁴⁻⁷⁶. En las últimas décadas, los avances en bioinformática, así como el desarrollo de tecnologías de alto rendimiento, han contribuido al desarrollo de las ciencias ómicas para el estudio de las enfermedades multifactoriales, incluidas las alérgicas⁷⁷⁻⁸⁰. De esta manera, el punto crítico diferencial es el salto cualitativo que ofrecen las técnicas ómicas, respecto al análisis clásico, en el procesado masivo de datos. Este grupo de ciencias abarca diferentes disciplinas como la genómica (el genoma y su función), la transcriptómica (ARNm y expresión génica), la proteómica (estructura, función, localización e interacción de las proteínas) y la metabolómica (metabolitos y metabolismo) (**Figura 3**)^{81,82}.

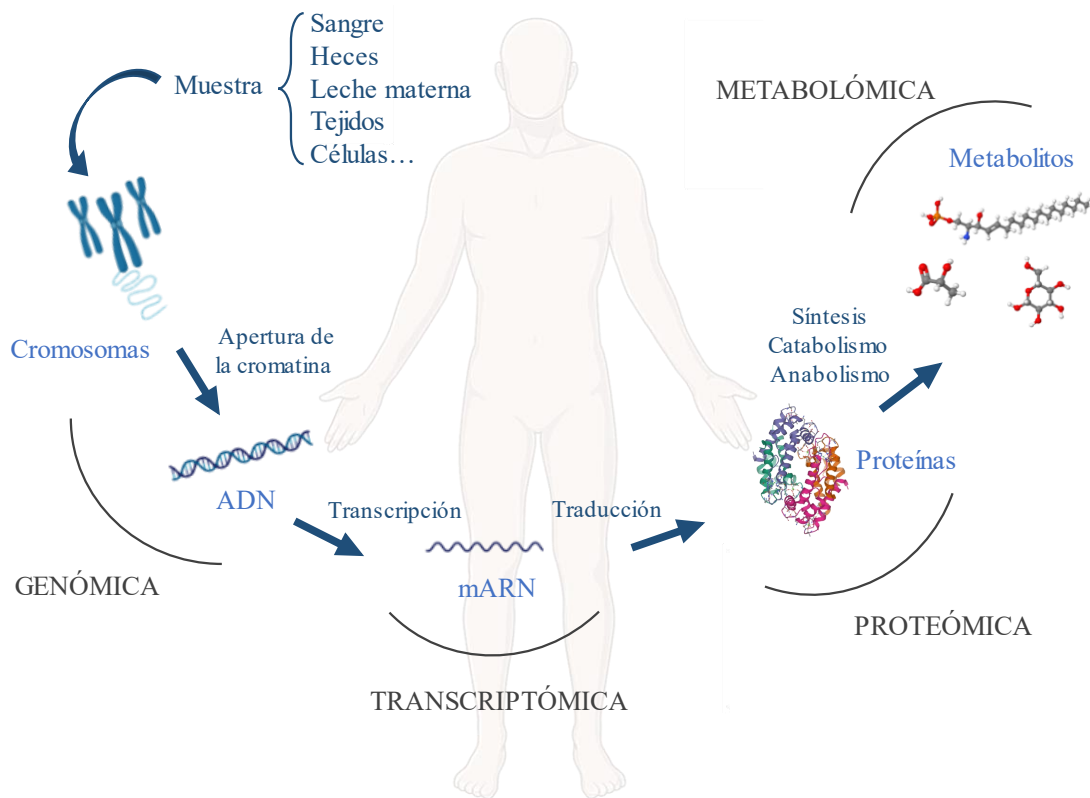


Figura 3. Principales ciencias ómicas: genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. Figura adaptada de Zubeldia-Varela E et al. *Non-IgE-Mediated Gastrointestinal Food Protein-Induced Allergic Disorders. Clinical Perspectives and Analytical Approaches. Foods.* 2021 Nov 2;10(11):2662. doi: 10.3390/foods10112662. PMID: 34828942; PMCID: PMC8623505⁸¹.

La integración de estas técnicas ha permitido desarrollar el conocimiento de lo que se conoce como biología de sistemas. Este nuevo campo de investigación permite comprender integradamente el funcionamiento de sistemas complejos (como una enfermedad multifactorial o un nicho ecológico) si se consideran como un “todo” compuesto de varias partes. Todas las ómicas se basan en el análisis de un gran volumen de datos, y han permitido un cambio paradigmático en el desarrollo de estas nuevas estrategias de investigación⁸³⁻⁸⁵. En este contexto, un enfoque multiómico ofrece una mejor oportunidad para comprender los mecanismos subyacentes con un sentido global. Este enfoque es especialmente adecuado en la microbiota, frente a las técnicas de cultivo tradicionales. En la realización de esta Tesis Doctoral, se han utilizado dos plataformas

ómicas para el estudio de la microbiota, la metagenómica *shotgun* y la metabolómica. Esto nos ha permitido identificar funciones y metabolitos de la microbiota en distintos grupos experimentales. En la **Figura 4** se muestra el flujo de trabajo de estas dos ómicas.

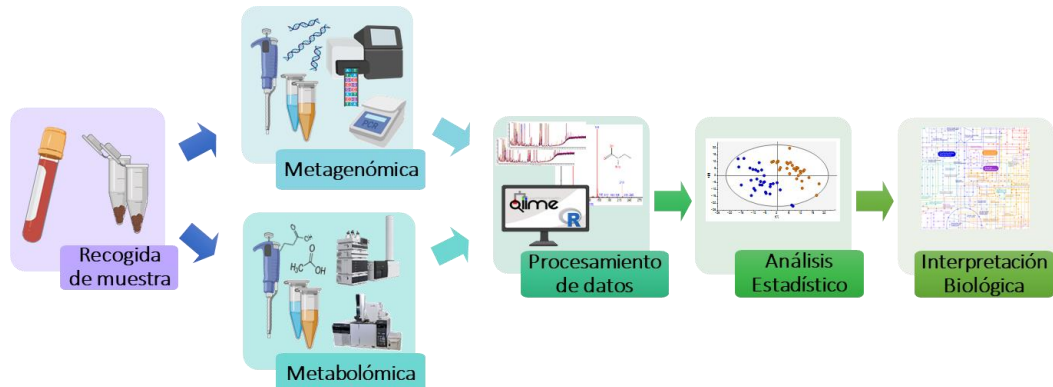


Figura 4. Flujo de trabajo seguido en un análisis metagenómico y en un análisis metabolómico.

4.1. Genómica y metagenómica

En el estudio de la microbiota intestinal, las heces son la matriz más representativa y su recogida supone un método no invasivo⁸⁶. En cuanto a las técnicas para su estudio, la ómica más comúnmente utilizada es la genómica, es decir, el estudio del ADN, y más concretamente, la secuenciación del gen del rRNA16S para el fenotipado de especies, y la metagenómica *shotgun* para estudiar su funcionalidad (**Figura 5**)⁸⁷. La metagenómica *shotgun* es la que se ha utilizado en esta tesis y se detalla a continuación.

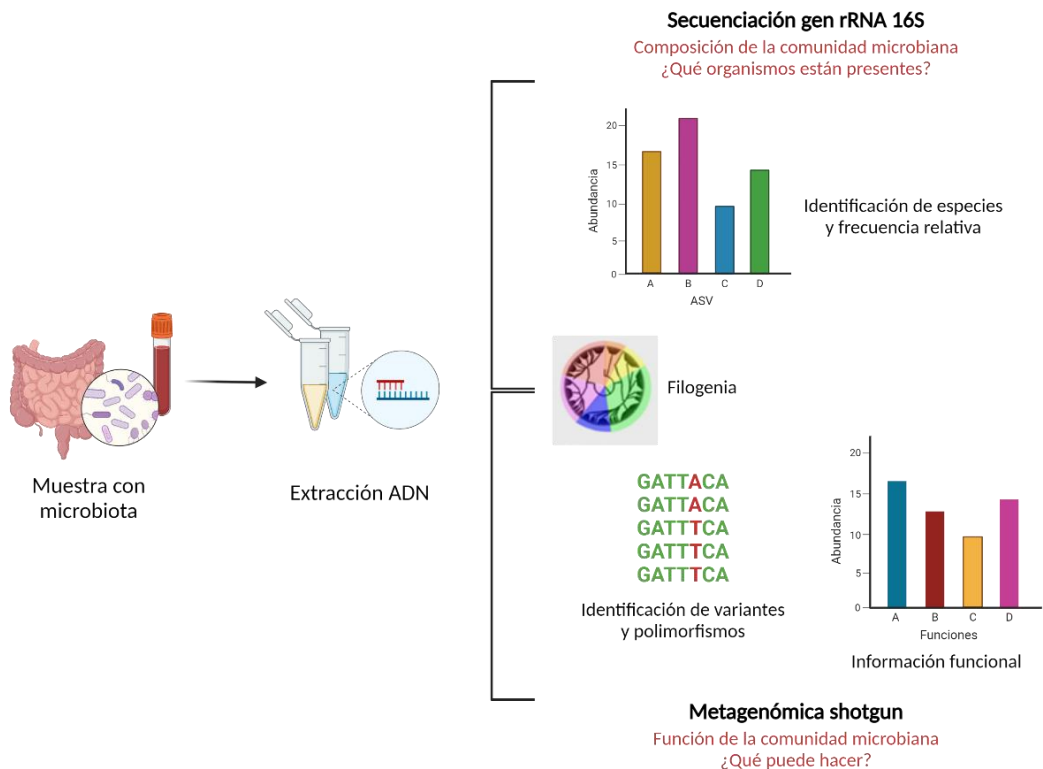


Figura 5. Comparación de las dos técnicas genómicas para el análisis de microbiota: secuenciación del gen rRNA 16S y la metagenómica *shotgun*. Figura adaptada de Morgan XC, Huttenhower C (2012) Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Comput Biol* 8(12): e1002808. doi:10.1371/journal.pcbi.1002808⁸⁷.

4.1.1. Metagenómica shotgun

La secuenciación metagenómica *shotgun* es un enfoque alternativo para el estudio de la microbiota. Mientras que la secuenciación del gen del rRNA 16S es la aproximación más usada para la identificación taxonómica de bacterianas totales en el estudio de la microbiota^{88,89}, la metagenómica *shotgun* permite determinar, además de la propia taxonomía, las funciones biológicas asociadas a esta⁹⁰, lo que implica una importante información adicional.

Para el análisis metagenómico, el ADN se extrae de todas las células de una comunidad microbiana y se corta posteriormente en pequeños fragmentos que se secuencian de forma independiente. Esto da lugar a secuencias de ADN que se alinean con diversas localizaciones genómicas de los innumerables genomas presentes en la muestra, incluidos los no

microbianos. Estas secuencias proporcionan una visión de las funciones biológicas codificadas en el genoma. Como resultado, los datos metagenómicos ofrecen la oportunidad de explorar qué rutas metabólicas están codificadas en la comunidad microbiana.

A pesar de estas ventajas, los datos de secuencias metagenómicas presentan varios retos. En primer lugar, el análisis metagenómico tiende a requerir un gran volumen de datos para identificar resultados significativos debido a la gran cantidad de información genómica que se muestrea. Este requisito puede plantear problemas computacionales. Afortunadamente, el desarrollo de software informático está avanzando rápidamente y mejorando la facilidad y eficiencia del análisis metagenómico^{27,90}. En segundo lugar, los genomas pueden contener ADN del huésped no deseado, especialmente en el caso de la microbiota, particularmente la intestinal. En algunas situaciones, es necesario utilizar métodos de enriquecimiento, moleculares y bioinformáticos para filtrar el ADN del huésped de los genomas antes o después de la secuenciación de los datos^{91,92}. En el caso de la microbiota intestinal, es importante el procesamiento de las heces, tal y como se detallará en el Capítulo 1. En tercer lugar, la identificación y eliminación de los contaminantes de las secuencias es especialmente problemática⁹³. Un contaminante genómico puede inducir a error en los análisis de la diversidad genética de la comunidad si el genoma del contaminante está enriquecido para genes que no son comunes en la comunidad, especialmente cuando el contaminante es muy abundante o tiene un genoma grande. Afortunadamente, existen herramientas de software que identifican y filtran las secuencias contaminantes en un genoma⁹⁴. Por último, la metagenómica supone un coste más elevado que la secuenciación del gen 16S rRNA. Sin embargo, los continuos avances en la tecnología de secuenciación del ADN están mejorando la asequibilidad de la secuenciación metagenómica *shotgun*.

4.2. Metabolómica

La metabolómica es la ciencia ómica más reciente y se encarga del estudio del metaboloma, conjunto de metabolitos, que son los compuestos de bajo peso molecular (<1500 Da), sustratos y productos de las reacciones químicas presentes en un sistema biológico. Además, la metabolómica permite la adquisición de nuevos conocimientos sobre la interacción entre la microbiota intestinal y el estado de salud del huésped, al ser los metabolitos los agentes activos en dicha interacción. Asimismo, a través del análisis diferencial comparado del metaboloma se pueden buscar, entre otros, biomarcadores de diagnóstico o de pronóstico de una enfermedad, de su evolución ante un tratamiento o una dieta, del mecanismo de acción o de la potencial toxicidad de un fármaco^{80,95}.

El objetivo de la metabolómica es identificar y cuantificar la variación de los metabolitos presentes en un sistema biológico^{96,97}. Dado que los metabolitos son los productos finales de cualquier reacción bioquímica, se consideran los mejores marcadores de la actividad microbiana⁹⁸.

El análisis de los metabolitos de una determinada muestra biológica se puede enfocar principalmente de dos modos distintos. En primer lugar, el análisis no dirigido, que se utiliza cuando el objetivo es obtener una visión global del perfil metabólico, buscando diferencias entre casos y controles. Requiere un diseño experimental fuerte para minimizar la variabilidad interindividual. Por el contrario, la metabolómica dirigida se centra en la cuantificación de un pequeño conjunto de moléculas con unidades de concentración, tratando de optimizar los procedimientos analíticos con el fin de maximizar la relación señal-ruido, siguiendo la clásica visión de la química analítica⁷⁴. En la investigación de patologías, ambas metodologías son complementarias. El análisis no dirigido se utiliza para generar nuevas hipótesis y conocimientos (por ejemplo, nuevos biomarcadores para una enfermedad) y el análisis dirigido se utiliza para la validación de las hipótesis (por ejemplo, confirmar los beneficios potenciales de cualquier tratamiento bajo estudio).

El principal desafío del análisis de los metabolitos radica en su heterogeneidad química (e.g. aminoácidos, lípidos, azúcares), y en su distinta concentración en los sistemas biológicos. Por tanto, el uso de diferentes herramientas analíticas y métodos novedosos de tratamiento de muestra es crucial para la detección de la mayor cantidad de metabolitos presentes⁹⁹. Además, otro reto de los estudios metabolómicos es realizar una quimiometría precisa (tratamiento de datos) para proporcionar información biológica valiosa y fiable a partir de muestras complejas.

4.2.1. Técnicas analíticas

La metabolómica utiliza dos principales técnicas analíticas: la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN), que permiten la detección y elucidación estructural de los compuestos de una mezcla compleja.

La RMN es una técnica no destructiva que permite la obtención de información física, química, electrónica y estructural sobre las moléculas. Las ventajas e inconvenientes de esta técnica se encuentran detalladas en la **Tabla 1**.

La MS es una técnica de química analítica basada en la ionización que permite identificar la cantidad y tipo de compuestos químicos presentes en una muestra midiendo la relación masa/carga (m/z) y la abundancia de iones en fase gaseosa. Para ello, utiliza un espectrómetro de masas, que se compone de tres elementos fundamentales: una fuente de iones en la que las moléculas se ionizan a presión atmosférica o al vacío, un analizador en el que los iones se separan por su relación m/z , y un detector, que registra y amplifica la señal proveniente del analizador de masas, posteriormente la envía al procesador de datos en donde la información se registra en forma de espectro de masas, que es una representación gráfica de los iones separados por su valor de m/z y ajustados de acuerdo y la intensidad relativa de cada señal. Algunas de las fuentes de ionización más relevantes son las fuentes de ionización electrónica (EI), que provocan la ionización mediante la retirada de un electrón de las moléculas neutras lo

que confiere un alto exceso de energía que provoca una amplia fragmentación de las moléculas; y las fuentes de ionización por electrospray (ESI), que ionizan las moléculas formando principalmente aductos del disolvente (por ejemplo, $[M+H]^+$, $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$), donde se transfiere un bajo exceso de energía a las moléculas ionizadas, por lo que sólo se produce un panel restringido de fragmentación (fragmentación en fuente).

Existen diferentes tipos de analizadores para la metabolómica, siendo el analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF) uno de los más utilizados, al tener una precisión de masa aproximada de 10 partes por millón de error máximo y alta resolución. El analizador de masas cuadrupolar de tiempo de vuelo (QTOF) permite el aislamiento de iones y la posterior disociación inducida por colisión para la espectrometría de masas en tándem, útil para la identificación de metabolitos. Por otro lado, el analizador de masas de triple cuadrupolo es ideal para la cuantificación dirigida de metabolitos debido a sus características de máxima selectividad y sensibilidad, a pesar de poseer baja resolución de masas¹⁰⁰.

La MS se puede aplicar tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo, y, debido a la complejidad de la muestra, se acopla habitualmente a métodos de separación como cromatografía de líquidos (LC-MS), cromatografía de gases (GC-MS) y electroforesis capilar (CE-MS). Este acoplamiento supone la separación de los compuestos de las mezclas complejas y permite la determinación del peso molecular con alta resolución (4 decimales) gracias a la posibilidad de separar los componentes de la mezcla según transcurre el análisis¹⁰¹. La **Tabla 1** muestra la descripción comparativa de las principales técnicas analíticas, describiendo la base de su mecanismo de separación y sus pros y contras.

Tabla 1. Descripción comparativa de las principales técnicas analíticas metabolómicas para el estudio de la microbiota intestinal, describiendo la base de su mecanismo de separación, sus ventajas y desventajas, y referencias de interés en la materia. Tabla adaptada de Zubeldia-Varela E, et al. *Techniques for Phenotyping the Gut Microbiota Metabolome. In: Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and Other Strategic Applications. Elsevier; 2019:33-41. doi:10.1016/b978-0-12-815249-2.00004-x*¹⁰¹.

Técnica analítica	Base	Ventajas	Desventajas
RMN	Determinación de la estructura molecular de una molécula por la absorción de radiación electromagnética del núcleo atómico (con momento magnético distinto de cero) cuando está sometido a pulsos de radiofrecuencia colocados en un campo magnético.	Espectros altamente reproducibles. Cuantificación absoluta. Tasas de adquisición de alta velocidad.	Baja sensibilidad. Superposición de señales. Control estricto del pH.
LC-MS	La separación se basa en la diferente afinidad de los analitos con la fase estacionaria. La naturaleza química de la fase estacionaria determina el rango de polaridad de los analitos que están más retenidos y, posteriormente, el orden de elución.	Alta sensibilidad. Amplio espectro de polaridades. Relativo fácil pretratamiento de muestras.	Alto número de señales. La identificación requiere tiempo y experiencia.
GC-MS	Los metabolitos están separados debido a sus diferencias en el punto de ebullición y su afinidad con la fase estacionaria.	Alta resolución y eficacia. Reproducibilidad en el perfil de fragmentación. Potentes bibliotecas espectrales (e.g. Fiehn, NIST).	Tedioso pretratamiento (derivatización). Limitado a metabolitos volátiles.
CE-MS	La separación se basa en el flujo electroosmótico (debido a la carga superficial de la pared del capilar) y la movilidad electroforética (debido a la relación carga-volumen en el compuesto).	Bajo consumo de muestra.	Reproducibilidad. Limitado a compuestos iónicos y polares.

Además de las técnicas mencionadas anteriormente, en este trabajo se utilizó la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La MS/MS es una técnica de análisis instrumental en la que se acoplan dos o más analizadores de masas para aumentar la capacidad de análisis de muestras químicas. En un espectrómetro de masas en tándem, los iones se forman en la fuente de ionización y se separan por su relación m/z en la primera

etapa. Se seleccionan iones de una relación de m/z particular (iones precursores), se aplica energía y se fragmentan en iones productos. Esta fragmentación puede realizarse por varios métodos, algunos son disociación inducida por colisión, reacción de ion-molécula, o fotodisociación¹⁰⁰. En este trabajo el mecanismo que se ha utilizado fue disociación inducida por colisión con un analizador QTOF. Así, los iones producto se introducen en el segundo espectrómetro de masas, que a su vez separa los fragmentos por su relación m/z y los detecta. Con esta técnica se pueden detectar y cuantificar selectivamente múltiples analitos dentro de una familia de compuestos. También se puede obtener información estructural acerca de un compuesto a través de la formación de fragmentos específicos y es útil para descubrir compuestos en mezclas complejas de acuerdo a su patrón de fragmentación¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Cada técnica analítica cubre una cierta parte del metaboloma porque es una mezcla compleja de sustancias con gran diversidad de propiedades fisicoquímicas. Esto se puede observar en la **Figura 6A** en referencia a la microbiota. Por ejemplo, la GC-MS es ideal para analizar compuestos térmicamente estables y volátiles como ácidos grasos de cadena corta, ésteres, cetonas, alcoholes, aldehídos o aminoácidos⁷⁴. La LC-MS se aplica principalmente a los ácidos biliares y lípidos¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. La CE-MS es ideal para la detección y cuantificación de pequeñas moléculas ionizables¹⁰⁸ como aminas, aminoácidos y ácidos carboxílicos. Por último, la RMN se utiliza para detectar ácidos grasos de cadena corta, pequeños lípidos y aminoácidos que requieren la adición de un tampón deuterado a las muestras, siendo la solución salina tamponada de fosfato la más utilizada¹⁰⁹⁻¹¹¹. La **Figura 6B**, muestra los grupos de metabolitos más detectados en la microbiota intestinal por categoría bioquímica. Estos son: ácidos grasos de cadena corta, seguidos de aminoácidos y derivados, ácidos carboxílicos y ácidos biliares. Es importante destacar que los metabolitos que pueden identificarse mediante diferentes técnicas analíticas pueden utilizarse también para la validación de los resultados.

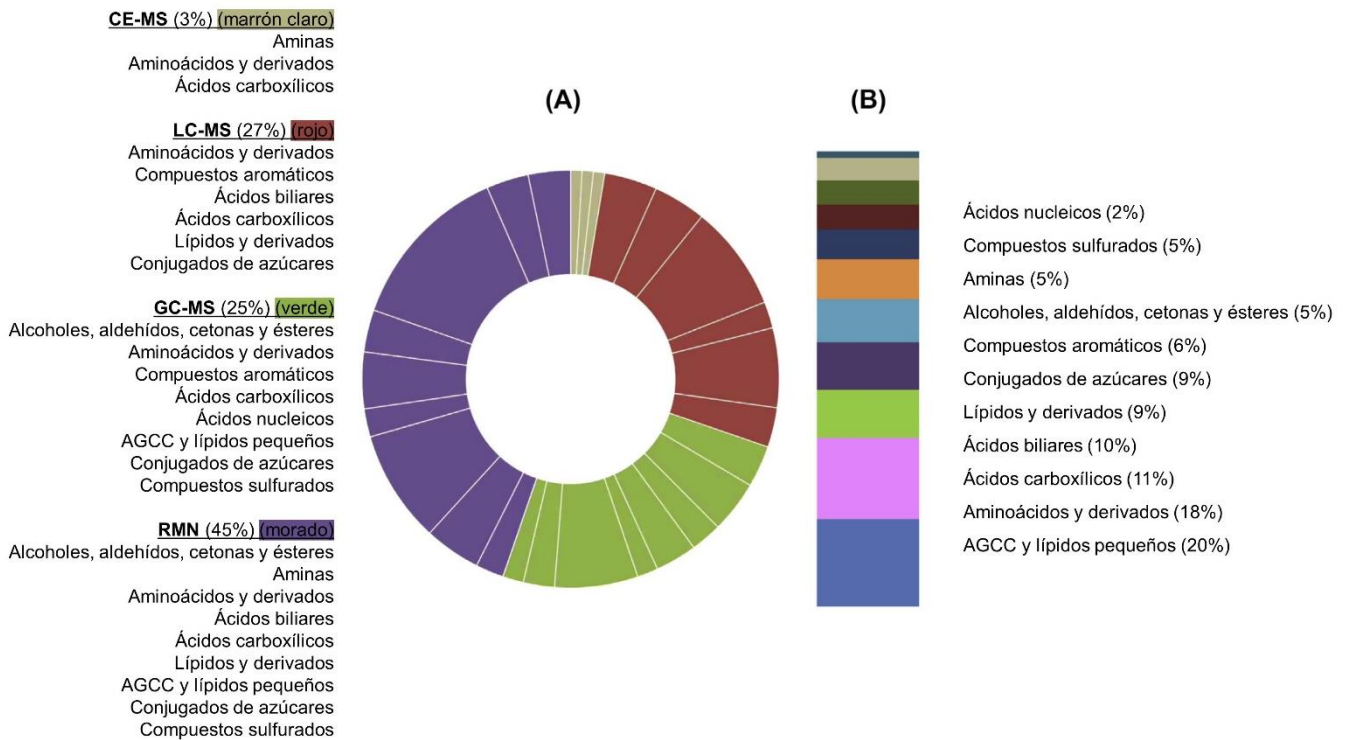


Figura 6. (A) Porcentaje de uso de cada técnica analítica y metabolitos detectados ordenados alfabéticamente dentro de cada color. (B) Porcentaje de cada categoría bioquímica de los metabolitos identificados en la microbiota intestinal (figura adaptada de Rojo D, et al. *Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. FEMS Microbiol Rev 2017;41(4):453e78*)⁷⁴. Solo se han considerado los artículos que realizan metabolómica no dirigida realizada en la microbiota intestinal.

4.2.2. Flujo de trabajo

El flujo de trabajo que se sigue habitualmente en un análisis no dirigido en metabolómica, y que es el que ha sido utilizado en este trabajo, se encuentra descrito en forma gráfica en la **Figura 4**.

La recogida de muestra, el pretratamiento de dicha muestra y la extracción de metabolitos son etapas críticas en el flujo de trabajo de metabolómica, ya que afectan a la calidad de los datos finales y no es posible corregir su impacto posteriormente. Por ejemplo, en una aproximación no dirigida la extracción de metabolitos requerirá ser lo más completa posible ya que pretende obtener el metaboloma de una muestra biológica y se utilizarán tanto disolventes polares como apolares⁹⁹. Todas estas etapas están descritas en detalle en el Capítulo 1.

Para el análisis de las muestras biológicas en metabolómica se necesita combinar la capacidad de separación que presenta la cromatografía o la electroforesis con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. Para la elección de la técnica, es necesario tener un diseño robusto del estudio en el que quede detallado que parte o partes del metaboloma quieren quedar cubiertas y que tipo de análisis metabolómico va a realizarse.

Tras el análisis de la muestra por GC/MS, CE/MS o LC/MS, se generan archivos de datos sin procesar, que contienen la relación m/z y la abundancia de los iones detectados en tiempos de retención específicos (RTs, en GC/MS y LC/MS) o tiempos de migración (MTs, en CE/MS). Esta información tridimensional suele inspeccionarse mediante interfaces visuales para evaluar el rendimiento del análisis y ofrecer resultados de alta calidad. En este contexto, la trazabilidad del lote analítico a través de un estándar interno o basado en controles de calidad (QCs) son las dos estrategias principales para garantizar un rendimiento estable del equipo.

Para extraer y asociar la información de la MS a un compuesto químico específico, la deconvolución suele ser el primer paso del procesamiento de datos. La deconvolución detecta grupos de características de metabolitos (un m/z definido a lo largo de un RT, que idealmente muestra una distribución de tipo gaussiano) correspondientes a un compuesto específico, incluyendo posibles iones moleculares, aductos, fragmentos y sus patrones isotópicos. A continuación, se lleva a cabo la agrupación y el emparejamiento de los compuestos en el lote de muestras o la alineación de compuestos. Posteriormente, se realiza la integración de compuestos mediante algoritmos de integración, en los que se obtiene un valor de área bajo la curva para cada señal en cada muestra. Este proceso da lugar a una matriz de áreas de compuestos representativa de las concentraciones de metabolitos (matriz de metabolitos). Un caso particular de procesamiento de datos se realiza en GC/MS, donde la identificación de las señales post deconvolución se realiza generalmente antes de la integración

de la señal de pico mediante una metodología que compara los RT y los espectros de los datos empíricos con las bibliotecas de referencia.

Según proceda, la sustracción de los blancos suele realizarse después de la integración de los compuestos, restando la media de las áreas integradas de cada metabolito presente en los blancos que deben incluirse en la secuencia de análisis. Este proceso permite eliminar las señales artificiales que no están presentes en la muestra biológica, o aquellas cuya abundancia es notablemente mayor en términos de orden de magnitud que en los blancos. A continuación, se suele realizar un paso de imputación de valores perdidos (*missing values*) para reducir el sesgo en el análisis estadístico que se genera por las abundancias de metabolitos que faltan y que pueden estar ausentes debido a ciertos artefactos de la deconvolución^{112,113}. Tras la aplicación de estos algoritmos, en todas las técnicas se realiza un procedimiento de calidad (QA, del inglés *Quality Assurance*) para asegurar que sólo los metabolitos que están fuertemente representados en el conjunto de muestras se consideran para el análisis de datos posterior.

Para obtener resultados representativos y minimizar el sesgo sistemático inducido por la variabilidad analítica y biológica no deseada, suele ser necesaria la normalización de las áreas en las matrices de metabolitos. Distintos tipos de normalización tienen como objetivo reducir fuentes específicas de sesgo. Por ejemplo, el sesgo sistemático atribuible a la variabilidad analítica introducida por la preparación de la muestra o las desviaciones en la estabilidad de las plataformas analíticas se reduce normalmente mediante la normalización del estándar interno¹¹⁴. Asimismo, antes del análisis estadístico, se puede realizar una transformación de los datos para ajustarlos a una distribución normal. Un método comúnmente utilizado es la transformación logarítmica. Además, en algunas ocasiones es interesante realizar un escalado de los datos. Los más utilizados son el autoescalado y el escalado de Pareto.

A continuación, se realiza un análisis estadístico tanto multivariante (datos como conjunto) como univariante (datos individuales). Ambos análisis son complementarios.

Por último, se realiza la interpretación biológica con herramientas online en las cuales se introducen los metabolitos significativos y se realiza una búsqueda de las rutas metabólicas que podrían estar implicadas. Algunas de estas herramientas son Metaboanalyst, KEGG, IMPaLA, Reactome o iPath. Además, habitualmente es necesario recurrir a la literatura publicada para poder entender los cambios detectados en los grupos de estudio. El procesamiento de datos, el análisis estadístico y la interpretación biológica se describen en profundidad en el Capítulo 2.

La metabolómica se está aplicando cada vez más al diagnóstico y al tratamiento de distintas enfermedades, particularmente también las relacionadas con la microbiota (REF Rojo FEMS). Además, los perfiles metabólicos podrían proporcionar una información valiosa para las estrategias de prevención¹¹⁵. Por este motivo, se espera que el desarrollo de tecnologías metabolómicas tenga efectos importantes en la investigación biomédica en el futuro⁷⁷.

4.3. Búsqueda de biomarcadores en alergia

Como aplicación de una investigación de base con técnicas ómicas, es posible identificar biomarcadores. Un biomarcador es una entidad biológica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos normales o patológicos, o como respuesta a una intervención terapéutica. Algunos ejemplos son los patrones de expresión genética o los niveles de una proteína o un metabolito concretos en los fluidos corporales¹¹⁶. El biomarcador ideal debe ser reproducible, robusto, específico, sensible y fácil de medir¹¹⁷.

La búsqueda de potenciales biomarcadores relacionados con la inflamación alérgica ha obtenido resultados prometedores, particularmente en criterios de estratificación de pacientes¹¹⁸. Sin embargo, es necesario

seguir investigando en este campo tanto en modelos animales como en humanos, ya que, hasta la fecha, no existen suficientes biomarcadores disponibles para realizar una caracterización completa de los fenotipos de las enfermedades alérgicas que permitan su diagnóstico¹¹⁹.

Conociendo el proceso inflamatorio, se pueden buscar candidatos a biomarcador. En el proceso de inflamación alérgica se desencadenan una serie de reacciones químicas y celulares en el área dañada, que determinan los cambios en los grandes vasos sanguíneos como la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad. Estos eventos están regulados por mediadores químicos, principalmente histamina, leucotrienos, IL-1 y TNF. Simultáneamente a los cambios vasculares, se produce el desplazamiento de los glóbulos blancos desde la luz del vaso sanguíneo al área afectada. Entre los mediadores químicos, la IL-1 y el TNF tienen una gran relevancia al provocar reacciones de fase aguda, con efectos endoteliales y efectos sobre los fibroblastos (células del tejido conectivo) y los glóbulos blancos. Por otro lado, el dolor durante la inflamación es causado principalmente por la actividad de prostaglandinas, bradicinina y sustancia P (neuropéptido); el calor se produce por la hiperemia (aumento de sangre) en el sitio de lesión como consecuencia de vasodilatación; y el rubor, por la propia hiperemia y el edema por el aumento del volumen extravasado¹²⁰.

Todas las células que participan en la inflamación necesitan obtener energía para desarrollar sus funciones. Por este motivo, se producen reacciones del catabolismo para degradar nutrientes orgánicos transformándolos en productos finales simples, con el fin de extraer de ellos energía química y convertirla en una forma útil para la célula¹²¹. La energía liberada por las reacciones catabólicas es usada en la síntesis del ATP (adenosín trifosfato)¹²².

Existen ciertos metabolitos con una mayor implicación en los procesos inflamatorios, siendo uno de los más relevantes el ácido araquidónico (ARA). El ARA es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6 que

se ubica en la membrana plasmática de muchas células y que es el principal precursor de los eicosanoides, una familia de mediadores lipídicos (prostanoides, leucotrienos y lipoxinas). Se metaboliza por dos vías enzimáticas principales: ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX)¹²³. La oxidación del ARA por la vía de la COX da lugar a las prostaglandinas, sustancias de carácter lipídico derivadas de eicosanoides, causantes del dolor en un proceso inflamatorio. Por otro lado, la oxidación del ARA por la vía de la LOX da lugar a diferentes leucotrienos, que se producen fundamentalmente por los mastocitos y los leucocitos, y ejercen un efecto tardío en la inflamación¹²⁰.

4.3.1. Biomarcadores fecales

En el ámbito del análisis de proteínas fecales por la técnica ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) se han realizado numerosos avances, principalmente para el diagnóstico de alergia producida por alimentos no mediadas por IgE¹²⁴.

Las proteínas más relevantes son la calprotectina fecal, la α -1 antitripsina, la lactoferrina, la β -defensina, el TNF, la IgA fecal, la neurotoxina derivada de los eosinófilos y la proteína catiónica eosinofílica. De ellas, la calprotectina fecal ha sido la más discutida, y ha sido objeto de una reciente revisión sistemática por su uso como biomarcador de la alergia a leche de vaca mediada por IgE y no mediada por IgE¹²⁵.

**CAPÍTULO 1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MANEJO
DE MUESTRA EN EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA
INTESTINAL**

1. Introducción

Las comunidades microbianas varían en los distintos nichos ecológicos del cuerpo humano, como la piel, el tracto respiratorio, el tracto urogenital y el tracto gastrointestinal. Entre ellos, la microbiota intestinal se considera un ecosistema de gran importancia debido al gran número de microorganismos que la componen y a la estrecha relación que existe entre ellos y sus huéspedes^{27,76,126}.

La microbiota intestinal es variable y a su vez resiliente. Por lo tanto, el diseño experimental de un estudio en el que esté implicada debe hacerse en base a ciertas consideraciones preanalíticas para obtener resultados fiables. La selección de los participantes y los grupos experimentales deben diseñarse cuidadosamente teniendo en cuenta que las diferencias dentro del grupo deben ser mínimas. Además, el tipo de muestra, la recolección, el almacenamiento y el transporte deben estar debidamente planificados para evitar sesgos que podrían reducir la validez de los resultados.

Para el estudio de la microbiota intestinal, las heces son la muestra biológica de elección debido a su sencilla y no invasiva recolección y a su alta densidad microbiana¹²⁷⁻¹²⁹. Aunque las heces no son un reflejo exacto de la composición total de la microbiota del aparato digestivo (cavidad oral, estómago, intestino delgado e intestino grueso) se consideran representativas del segmento final del intestino, que es el más relevante en cuanto a número y complejidad. La cantidad de bacterias que hay por gramo o por mililitro de contenido intestinal varía en función del individuo, por lo que no existe un dato exacto. No obstante, algunos autores indican que, en un individuo adulto tipo de 70 kg, el colon está densamente poblado de anaerobios y los recuentos de bacterias alcanzan densidades de alrededor de 10^9 unidades formadoras de colonias por gramo de contenido intestinal¹³⁰. Sin embargo, otros autores aseguran que el número puede ascender hasta 10^{11} bacterias por gramo de contenido¹³¹. Las principales familias presentes en este segmento del intestino grueso son *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* y *Rikenellaceae*, pertenecientes al filo

Bacteroidetes y *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, pertenecientes al filo Firmicutes^{29,127,130,132}.

Existen otro tipo de muestras como la toma de contenido luminal de segmentos superiores del tracto gastrointestinal^{133,134}. Sin embargo, las microbiotas son mucho menos diversas en otros segmentos, y a nivel funcional, es con la que tenemos mayor grado de simbiosis. Además, tienen un mayor número de desventajas, siendo la más importante su técnica invasiva de recogida¹³⁵. Por otro lado, aunque las heces sean la muestra de elección, también es posible medir indirectamente los metabolitos intestinales en la sangre y la orina^{42,136}.

Este capítulo recopila los factores intrínsecos y extrínsecos que pueden alterar la microbiota intestinal del colon y proporciona una posible estandarización de las condiciones previas al análisis y los pasos preanalíticos de un estudio con técnicas ómicas. De acuerdo con la literatura, pocos artículos han desarrollado la optimización de este procedimiento¹³⁷.

2. Hipótesis

La adopción de un protocolo estandarizado permite el correcto manejo de las muestras de heces y la sistematización de los estudios de microbiota intestinal en análisis ómicos.

3. Objetivos

1. Identificar los factores intrínsecos y extrínsecos que pueden alterar la microbiota intestinal.
2. Detallar los pasos preanalíticos en un estudio ómico.
3. Diseñar un kit de recogida de heces fácil de utilizar y que asegure la viabilidad y estabilidad de las muestras.

4. Proponer las condiciones previas al análisis y desarrollar un protocolo de recogida, almacenamiento y posibles pretratamientos de muestras de heces.

4. Materiales y métodos

En primer lugar, se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica en dos de los principales buscadores online: Web of Science (www.webofknowledge.com) y PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>). Esta búsqueda se centró en identificar las líneas principales de investigación sobre la microbiota intestinal, así como los factores intrínsecos y extrínsecos que pueden alterarla antes de su análisis mediante técnicas ómicas.

Se consideraron artículos desde enero del 2015 hasta diciembre del 2020, utilizando como palabra clave "microbiota intestinal" y asociándola a otras como "dieta", "edad", "antibióticos", "ejercicio", "tipo de parto", "lactancia", "género", "tabaquismo", "etnia", "tenencia de mascotas", "localización geográfica" y "estilo de vida". Se filtraron los artículos y las revisiones, excluyendo de la selección los relacionados con "tenencia de mascotas", "localización geográfica" y "estilo de vida" por parecer duplicados al compararlos con otras palabras clave. A continuación, se realizó una segunda búsqueda bibliográfica en Web of Science y PubMed sin límite de tiempo y utilizando como palabras clave las siguientes "microbiota intestinal", "ómicas", "heces", "condiciones de temperatura", "pretratamiento", "homogeneización", "liofilización", "agua fecal" y "reactivos". A pesar de la extensa investigación, no existe excesiva literatura relacionada con el pretratamiento de las heces. Aun así, seleccionamos los temas de interés para nuestro objetivo; primero basándonos en los títulos, después en los resúmenes y finalmente en la lectura completa de los artículos. Una vez recopilados los artículos y las revisiones que trataban los puntos de interés, se realizó un metaanálisis. Al final se consideraron 105 publicaciones adecuadas.

La **Figura 1** muestra los principales moduladores de la microbiota intestinal descritos en relación con el número de publicaciones de los últimos 5 años. Es interesante observar el creciente interés que ha tenido en los últimos años el estudio de la interacción entre la microbiota intestinal y ciertas enfermedades.

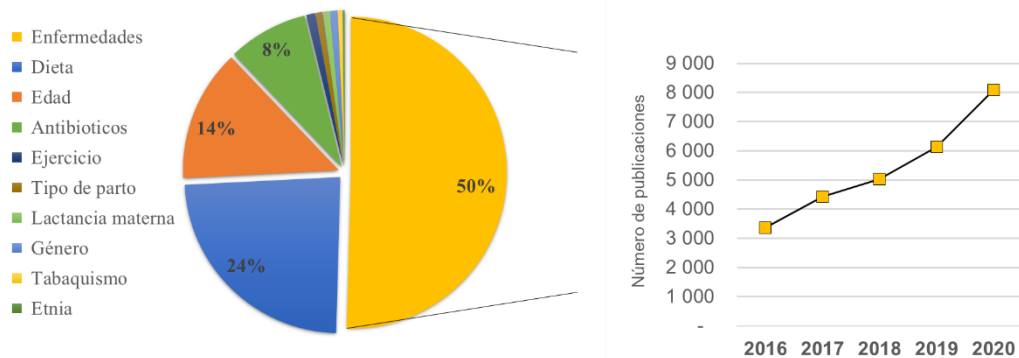


Figura 1. Principales factores en la investigación sobre la microbiota intestinal incluyendo todas las técnicas ómicas. Se utilizó *Web of Science* y PubMed para identificar el número de publicaciones en los últimos cinco años. En el lado izquierdo, se muestra el porcentaje total de publicaciones para cada variable en cinco años. En el lado derecho, el gráfico muestra una distribución del número de publicaciones por año en relación con la microbiota intestinal y la enfermedad, ya que es la que tiene más impacto en la investigación en el área.

Para la realización de este trabajo, se hizo hincapié en la colaboración con profesionales sanitarios de los hospitales universitarios madrileños Niño Jesús y Gregorio Marañón. En este sentido, se diseñó un kit de recogida de muestra, con sus correspondientes instrucciones, que se explicó meticulosamente a los médicos, y que éstos, a su vez, explicaron en detalle a los pacientes. Además, se estableció un protocolo de comunicación donde se facilitó a los pacientes un correo electrónico para la resolución de dudas relacionadas con la utilización del kit que permitió desarrollarlo y mejorarlo para que la recogida de muestra fuese lo más sencilla posible.

Por último, se realizó un metaanálisis con la información recopilada que permitió identificar los puntos clave previos al análisis en el manejo de muestras fecales. Una vez identificados estos factores, se propuso un protocolo que muestra el flujo de trabajo a seguir focalizado en la

investigación en metabolómica. Este protocolo indica recomendaciones a seguir, factores que pueden alterar las muestras y los distintos pretratamientos metabolómicos.

5. Resultados y discusión

Las heces son la muestra de elección para el estudio de la microbiota intestinal^{86,101,138}. Para diseñar correctamente los estudios que incluyen la recogida de heces y el posterior análisis de su microbiota intestinal, hay que tener en cuenta ciertos factores tanto intrínsecos como extrínsecos que se detallan a continuación.

5.1. Consideraciones previas a la recogida de muestra. Factores intrínsecos

Los factores intrínsecos son aquellos no modificables que hay que tener en cuenta ya que influyen y sesgan los resultados. Existen numerosos factores intrínsecos entre los que se incluyen: enfermedades, intervenciones dietéticas, el envejecimiento, la administración de fármacos (principalmente antibióticos), el embarazo, la duración del periodo gestacional, el tipo de parto, el sexo y la preferencia sexual, la menopausia, la exposición al polvo y productos químicos, el ritmo circadiano, el tabaquismo, el origen geográfico, la zona de residencia, los suplementos prebióticos y probióticos, y las cirugías y tratamientos no quirúrgicos, por citar algunos de los más relevantes⁷⁴. De entre todas estas variables, la más descrita en las publicaciones encontradas, ya que puede modificar considerablemente el ecosistema intestinal, es la dieta^{139,140}. Se ha visto que el tipo de alimentación, e.g. una alimentación rica en fibra favorece la actividad de ciertas bacterias, aerobias o anaerobias, que pueden dar lugar a una disfuncionalidad de la microbiota intestinal¹⁴¹. De ahí, que las intervenciones dietéticas se utilicen cada vez más como terapias para las enfermedades relacionadas con la microbiota intestinal¹⁴⁰. Se ha descrito que el predominio en la comunidad microbiana de bacterias anaerobias

facultativas de la familia *Enterobacteriaceae*, es un marcador común de disbiosis¹⁴². Estas bacterias pueden dar lugar a la fermentación de hidratos de carbono, cuyos productos principales son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), o a la fermentación de proteínas, que produce derivados nitrogenados como aminas, amonio y compuestos fenólicos, dando lugar a una microbiota sacarolítica o proteolítica, respectivamente¹³⁹. Por ejemplo, la abundancia de especies de *Bacteroides* y la fermentación de proteínas están relacionadas con las dietas a base de carne, mientras que las dietas a base de plantas han mostrado una asociación positiva con varias especies de *Bifidobacterium*, productoras de butirato, y la fermentación de carbohidrato¹³⁹.

La microbiota intestinal también cambia con la edad, aumentando la abundancia del filo Proteobacteria¹⁴³ y disminuyendo la capacidad de sintetizar triptófano e indol¹⁴⁴. Los primeros 1.000 días de vida ofrecen una oportunidad para modular la microbiota y, de esa forma, promover un crecimiento y desarrollo saludables¹⁴⁵. Asimismo, el consumo de antibióticos está relacionado con una pérdida considerable de la diversidad de la microbiota intestinal^{84,146,147}. Otros factores a tener en cuenta al estar descrito el impacto que provocan en la microbiota intestinal son: el tipo de parto, la lactancia materna, el sexo, el hábito de fumar, el origen étnico, el número de hermanos, la tenencia de mascotas, y el ejercicio físico¹⁴⁸⁻¹⁵³.

5.2. Moduladores de la microbiota intestinal

La variabilidad en la composición de la microbiota intestinal también puede ser inducida, lo que la convierte en un objetivo terapéutico. De esta manera, el uso del trasplante fecal de microbiota es prometedor en la práctica clínica para el tratamiento de ciertas enfermedades gastrointestinales; como, por ejemplo, la infección por *Clostridium difficile*¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Sin embargo, es necesario realizar más estudios en este campo para abordar problemas como la pérdida de especies anaerobias obligadas del intestino que se ven afectadas por la exposición al oxígeno, como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Subdoligranulum variable*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* y

Anaerostipes hadrus, que contribuyen en gran medida a la biosíntesis del butirato¹⁵⁷.

Otra forma de modificar la composición de la microbiota intestinal es a través de los alimentos funcionales, cuya principal característica es producir un efecto beneficioso para la salud, además de su valor nutricional. La amplitud del concepto de alimento funcional está todavía en debate. Hasta el momento se ha descrito que forman parte de esta categoría los probióticos, prebióticos y simbióticos¹⁵⁸. Los probióticos son organismos vivos que, cuando se ingieren en la cantidad adecuada, producen un efecto beneficioso al contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal^{159,160}. Las bacterias más utilizadas pertenecen a los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*¹⁶¹. Por otro lado, un prebiótico es un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped confiriendo un beneficio para la salud¹⁶². Son sustancias no digeribles que estimulan el crecimiento y la actividad de la microbiota intestinal y que son capaces de actuar como sustrato trófico específico para los probióticos¹⁴⁰. Los prebióticos con indicación terapéutica autorizados por la Unión Europea son la inulina y los fructooligosacáridos, que contribuyen a un tránsito intestinal normal al aumentar la frecuencia de las deposiciones¹⁶³. La combinación de probióticos y prebióticos para potenciar el efecto beneficioso sobre la salud intestinal se denomina simbiótico, por ejemplo, la combinación de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus* con un fructooligosacárido, o el género *Lactobacillus* con inulina¹⁵⁸. En lo que se refiere a la administración de probióticos y prebióticos para el tratamiento de la alergia, se ha demostrado que los probióticos modulan el sistema inmunitario hacia una respuesta Th1¹⁶⁴. Varios estudios in vitro sugieren el papel de los probióticos en el tratamiento de los trastornos alérgicos⁷⁰. Sin embargo, los ensayos en humanos demuestran un beneficio limitado^{164,165}. La Organización Mundial de la Salud en su Guía para la Prevención de Enfermedades Alérgicas¹⁶⁶, concluyó que los probióticos probados en mujeres embarazadas proporcionan un beneficio claro para la prevención del eczema en lactantes

de alto riesgo. No obstante, puso de manifiesto que se trataba de una recomendación basada en "evidencia de muy baja calidad". Por lo tanto, es necesario profundizar en la investigación para determinar el papel exacto de los probióticos en las enfermedades alérgicas.

5.3. Diseño del estudio. Recopilación de metadatos

Dado que son múltiples las variables que pueden contribuir e influir en la composición de la microbiota intestinal, es esencial la recopilación adecuada de estas variables en los participantes en el estudio. Las enfermedades, la dieta, la edad, el consumo de antibióticos, el tipo de parto, la lactancia materna, el género, el tabaquismo, el origen étnico, la tenencia de animales domésticos, el ejercicio, la localización geográfica, el estilo de vida, el trasplante fecal de microbiota y los alimentos funcionales, son los principales factores que deben tenerse en cuenta y recogerse en cuestionarios bien definidos desarrollados por los investigadores⁷⁴. Existen cuestionarios de frecuencia alimentaria ya elaborados y orientados a diversas enfermedades, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la esclerosis múltiple, que resultan muy útiles para la recopilación de datos¹⁶⁷. Además, dado que con relativa frecuencia se describen nuevos factores que alteran la microbiota, es necesario realizar una revisión bibliográfica exhaustiva previa de las variables que pueden afectar al estudio previsto. Los metadatos obtenidos de los cuestionarios serán fundamentales durante el tratamiento estadístico y añadirá valor a los resultados.

El diseño y la selección cuidadosa de los grupos de estudio son importantes para eliminar y reducir la variabilidad biológica no deseada en los datos. Así, los criterios de inclusión y exclusión, el número de individuos por grupo y unos cuestionarios donde se definan edad, dieta, etnia, particularidades familiares, enfermedades, etc., son fundamentales para lograr resultados fiables. También es importante la correcta transmisión de la información sobre el muestreo a los pacientes, para evitar errores comunes como la recogida de una cantidad insuficiente de muestra o el almacenamiento

incorrecto. En este sentido, la comunicación entre investigadores, médicos y pacientes es esencial para lograr resultados fiables. Para ello, es importante invertir el tiempo necesario en reuniones personalizadas con los pacientes para explicar detenidamente el diseño del estudio y dejar claros sus objetivos, así como informar de las variables que pueden afectar a los resultados. Además, será útil que los pacientes dispongan de cuestionarios claros y sencillos de acuerdo con su nivel de comprensión, así como de instrucciones detalladas sobre cómo recoger la muestra fecal.

El “Integrative Human Microbiome Project” (iHMP) ha diseñado un repositorio de datos de microbiota obtenidos a partir del estudio de tres cohortes humanas diferentes con afecciones asociadas al microbioma: embarazo y parto prematuro, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes de tipo II^{168,169}. Este repositorio es de gran utilidad e incluye protocolos clínicos para la recogida de datos por parte del paciente, así como para la recogida de datos por parte de los investigadores y los médicos. Estos protocolos incluyen plantillas para el etiquetado de muestras y formularios para el seguimiento de las heces, así como para registrar el índice de actividad y la rutina dietética. El iHMP también ofrece procedimientos estandarizados y focalizados para el procesamiento de muestras y la generación de datos para diferentes ómicas, incluyendo metabolómica, transcriptómica y genómica^{168,169}. Seguir estos procedimientos de referencia facilitará en gran medida la coordinación y el metaanálisis.

5.4. Consideraciones preanalíticas. Factores extrínsecos.

Además de los factores intrínsecos de la muestra, existen también factores extrínsecos que pueden alterar las poblaciones bacterianas después de la recogida. Durante el manejo de muestras de heces es necesario tener en cuenta ciertas variables que pueden alterar significativamente los resultados del estudio (**Figura 2**). Por ejemplo, las variaciones en la temperatura de almacenamiento, el mantenimiento de las condiciones estériles, o la correcta transmisión de las pautas de recogida a médicos y pacientes. Todos estos factores se explicarán detalladamente más

adelante. Por último, es imprescindible contar con un número suficiente de sujetos que se deberá calcular para cada estudio concreto. Esto puede causar dificultades y alargar el periodo de recogida, pero minimiza el impacto de las posibles diferencias debidas al procesamiento interindividual de las muestras¹⁷⁰⁻¹⁷³.



Figura 2. Principales consideraciones preanalíticas en el estudio de la microbiota intestinal con muestras de heces.

La planificación preanalítica también depende de la técnica ómica que se vaya a realizar. Esto debe tenerse especialmente en cuenta, ya que en la mayoría de los casos sólo es posible obtener de manera puntual una muestra fecal por paciente. Por este motivo, debe establecerse un protocolo operativo estandarizado para llevar a cabo un análisis multiómico, lo que puede suponer un reto debido a los requisitos técnicos de cada plataforma analítica. Desde el punto de vista del análisis ómico, y teniendo en cuenta la heterogeneidad de las muestras fecales, la cantidad de muestra recogida y la manera de conservarla puede variar en función de la técnica utilizada. Por ejemplo, un análisis metabolómico requerirá más cantidad de muestra mientras que un análisis transcriptómico necesitará la adición de ciertos reactivos para evitar la degradación del ARN¹⁷⁴. A continuación, se explican los diferentes métodos de recogida, transporte y almacenamiento de heces y su impacto en las poblaciones bacterianas

(genómica y metagenómica) y los metabolitos (metabolómica) de las mismas. Se profundizará exclusivamente en estas técnicas ya que son las que se han aplicado en la parte experimental de esta tesis doctoral.

5.5. Recogida de la muestra

La recogida de heces debe realizarse, idealmente, directamente en el hospital antes de un examen endoscópico o una intervención quirúrgica, para evitar las fluctuaciones de temperatura antes de su preservación que producen cambios en la microbiota¹⁷⁵. Sin embargo, no siempre es posible por razones logísticas. Por lo tanto, en muchos casos la recogida se lleva a cabo en el domicilio del paciente y es necesario proporcionar un kit de recogida de heces para facilitar el proceso y prevenir la contaminación^{176,177}. Es importante mantener condiciones asépticas durante la recogida, tanto en el domicilio como en el hospital^{178,179}. El kit de recogida debe cumplir dos funciones principales: garantizar el mantenimiento de las condiciones de temperatura adecuadas y prevenir contaminaciones innecesarias. Existen kits de recogida comerciales como el *Fe-Col® Faecal Sample Collection Kit*, el *Cardinal Health Stool Collection Kit*, o el *EasySampler® Stool Collection Kit*. Sin embargo, es posible que estos kits no proporcionen todos los elementos necesarios o no se adapten a las condiciones del estudio. Por ejemplo, no todos tienen en cuenta la edad de los pacientes, el análisis ómico posterior que se realizará, o si la enfermedad estudiada produce cambios en la consistencia de las heces. Por ello, es conveniente diseñar un kit adaptado a las necesidades de cada estudio que incluya: nevera portátil, papel de recolección, un recipiente de recogida de heces, guantes, una bolsa de frío, una bolsa hermética y etiquetas para la codificación y el seguimiento de las muestras (**Figura 3**)^{128,169}. Los kits también deben incluir unas instrucciones de recogida que deben ser explicadas cuidadosamente de antemano por el personal sanitario o investigador a los pacientes. Además, es importante redactar y distribuir directrices fáciles de leer que los pacientes puedan seguir en casa, así como proporcionar detalles de contacto, para responder las posibles preguntas o dudas que puedan surgirle al paciente.



Figura 3. Kit de recogida de muestras fecales.

Desde un enfoque multiómico, es importante recoger una cantidad adecuada de muestra fecal para su alicuotado. Las muestras fecales son complejas ya que se componen de bacterias, células eucariotas, restos de alimentos, virus y arqueas. Asimismo, existe cierta variabilidad intraindividual en las muestras fecales, se recomienda la recogida de una cantidad relativamente grande de heces (por ejemplo, 15 g) y realizar una posterior homogenización¹³⁷. Además, hay que tener en cuenta que cuando las muestras fecales se almacenan en reactivos comerciales específicos de conservación, normalmente no se pueden alicuotar para otros usos, ya que pueden sesgar los resultados analíticos. De hecho, es muy recomendable incluir en el kit diferentes tubos de recogida con los reactivos correspondientes e informar al paciente sobre cómo recoger las diferentes muestras.

5.6. Condiciones de transporte y almacenamiento

Inmediatamente después de la recolección, las muestras deben congelarse y llevarse al lugar de almacenamiento final lo antes posible, evitando fluctuaciones de temperatura, ya que los cambios de temperatura

producirán alteraciones tanto en la función y composición bacteriana, como en los metabolitos de la muestra, causando estrés en muchas de las bacterias de las heces y por tanto en su actividad metabólica.

Desde el punto de vista genómico, algunos estudios afirman que, tras 30 minutos de almacenamiento a temperatura ambiente, se ha observado una disminución significativa del filo Bacteroidetes y un aumento del filo Firmicutes¹⁸⁰. Otros estudios describen un aumento en la abundancia relativa de las especies de *Bifidobacterium*, pertenecientes al filo Actinobacteria y una disminución en la abundancia relativa de las especies de los géneros *Anaerostipes*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* y *Lachnospiraceae*, pertenecientes al filo Firmicutes, debido a la actividad fermentativa microbiana en curso¹⁸¹. Desde un punto de vista metabolómico, Gratton *et al.*¹³⁷ compararon muestras de heces no procesadas después de 24 horas en la nevera y en el congelador, seguidas de 5 horas a temperatura ambiente, con el fin de imitar las condiciones a las que se transportan las muestras de heces cuando no existe un control de temperatura. Los autores observaron que las muestras almacenadas en el frigorífico mostraban mayores niveles de AGCC, aminoácidos (valina, glicina, alanina, fenilalanina y tirosina), lactato y uracilo; mientras que las muestras congeladas mostraban menores niveles de AGCC y mayores niveles de fumarato, aminoácidos, glucosa y uracilo. Según las observaciones publicadas más recientemente, para mantener estable la fracción polar del metaboloma (por ejemplo, los alcoholes, los polioles, los hidratos de carbono y los ácidos di y monocarboxílicos), el almacenamiento no debe superar las cuatro semanas a -20°C o las 8 semanas a -80°C; asimismo, para el mantenimiento del lipidoma (la totalidad de los lípidos de las células), el almacenamiento no debe superar las 8 semanas a -20°C o las 18 semanas a -80°C¹⁸².

En conclusión, el transporte debe ser lo más rápido posible y la temperatura debe ser controlada y no superior a 4°C para evitar el proceso de descongelación y alteraciones en la muestra^{137,181,183}. Asimismo, las muestras deben almacenarse a -80°C, ya que la congelación produce

cambios menores en las comunidades microbianas al inhibir la actividad bacteriana y permite aproximadamente duplicar la duración del almacenamiento^{184–186}.

Por otro lado, algunos autores afirman que se pueden realizar hasta cuatro ciclos de congelación-descongelación durante el almacenamiento sin apenas cambios en la composición microbiana¹⁸⁰. Sin embargo, se han descrito alteraciones en el metaboloma fecal que podrían estar relacionadas con la liberación de contenido intracelular tras la lisis celular debido a la formación de cristales que dañan la pared celular durante la congelación¹⁸⁷. Gratton *et al.*¹³⁷ describieron los efectos metabólicos en alícuotas de agua fecal almacenadas a -80°C durante 24 horas y descongeladas a temperatura ambiente durante 2 horas, repitiendo el ciclo una, dos o tres veces. Observaron un aumento de los niveles de aminoácidos (alanina, lisina, leucina e isoleucina) y uracilo después de dos ciclos de congelación-descongelación y un aumento adicional de los niveles de fenilalanina y una disminución de la N6-acetil-lisina después del tercer ciclo de congelación-descongelación, en comparación con las muestras control de agua fecal. Los autores concluyeron que el perfil polar del metaboloma se ve afectado desde el primer ciclo de congelación-descongelación, lo que ha sido corroborado por otros autores^{137,182}. Por lo tanto, la planificación del seguimiento, alicuotado y pretratamiento de la muestra es esencial para evitar los ciclos de congelación-descongelación y asegurar la menor alteración posible de la muestra fecal. Cabe destacar la existencia del equipo CryoXtract®, que permite el alicuotado de las muestras congeladas para evitar los ciclos de congelación-descongelación¹⁸⁸.

La práctica de referencia en metabolómica, por lo tanto, es congelar las heces a -80°C, ya que este procedimiento preserva la composición microbiana^{137,171,181,182}. Además, es preferible que el análisis se realice simultáneamente en todas las muestras con independencia del tiempo que lleven almacenadas para reducir al mínimo los sesgos analíticos. Sin embargo, para el análisis fecal con otras ómicas, a menudo es necesario

añadir reactivos que rompan las células y preserven el material a analizar (ADN y ARN), tal y como se detalla a continuación.

En el caso de la genómica y la metagenómica, el objetivo es conservar el ADN para obtener posteriormente información taxonómica y funcional de todas las poblaciones bacterianas presentes en el intestino. En este caso, a diferencia de la metabolómica, se recomienda procesar primero la muestra y almacenar el ADN aislado a -80°C hasta la secuenciación. Para la recogida y conservación del ADN microbiano de las heces a temperatura ambiente, están disponibles las tarjetas *Flinders Technology Associates* (FTA) y *OMNIgene Gut*¹⁷⁰. Además, las tarjetas FTA también están diseñadas para el aislamiento del ADN. Song *et al.*¹⁷⁴ observaron que las muestras conservadas en tarjetas FTA, en ausencia de condiciones de temperatura ultra baja, presentaron una mayor abundancia de varios taxones pertenecientes al filo Firmicutes. Estos métodos presentaron una mayor abundancia del filo Actinobacteria y una menor abundancia del filo Bacteroidetes en comparación con la congelación. En este estudio, tanto las tarjetas FTA como el *OMNIgene Gut*, proporcionaron una mayor estabilidad a lo largo de un periodo de 8 semanas en cualquier condición de temperatura, y demostraron un carácter protector frente a las alteraciones microbianas de los ciclos de congelación y descongelación. Asimismo, Wang *et al.*¹⁷⁰ observaron que las muestras conservadas con *OMNIgene Gut* y tarjetas FTA presentaban una alta concordancia con el método de congelación con respecto a la abundancia de los AGCC predominantes (ácido butírico y ácido propiónico) utilizando un enfoque dirigido, y buenas correlaciones entre los géneros bacterianos y estos AGCC. A pesar de que *OMNIgene Gut* no se recomienda para la metabolómica no dirigida, podría ser una alternativa interesante para estudios con un enfoque de metabolómica dirigida cuando la congelación no está disponible.

Las muestras de ARN se utilizan para la transcriptómica y la metatranscriptómica. Estas técnicas proporcionan información sobre la población bacteriana activa de la microbiota intestinal. La prevención de la

degradación aguda del ARN requiere no sólo el mantenimiento de la temperatura adecuada, sino también el uso correcto de reactivos, como el *RNA later*, que permeabiliza rápidamente los tejidos para estabilizar y proteger el ARN celular con la inactivación inmediata de las ribonucleasas (RNAsas). El *RNA later*, de composición comercial, tiene efectos menores en la muestra durante el almacenamiento a largo plazo, tales como niveles más altos de variabilidad de la microbiota, en términos de composición o abundancia relativa^{184,189}. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, para el análisis metabolómico de una larga secuencia de muestras, este reactivo no es apropiado ya que tiene sales en su composición que podrían contaminar el espectrómetro de masas y producir interferencias y supresión iónica¹⁷⁰. Además, las muestras almacenadas en *RNA later* no conservan el ADN. Por lo tanto, es recomendable hacer tantas alícuotas como sea necesario en el momento de la recogida para proceder a un estudio multiómico.

Los principales métodos de conservación y almacenamiento y su relación con las diferentes ómicas se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Métodos de conservación de las muestras fecales. Se utilizan diferentes reactivos y métodos de conservación para técnicas ómicas específicas. (*) La congelación a -80°C se considera el de elección. El método recomendado para cada ómica está resaltado en negrita.

Métodos de conservación y almacenamiento	Genómica & metagenómica (ADN)	Transcriptómica & Metatranscriptómica (RNA)	Metabolómica (metabolitos)	Refs.
Ultracongelación (-80°C)*	Si	Si	Si	137,171,181, 182
Tarjetas FTA	Si	No	Si	170,174
<i>OMNIgene Gut</i>	Si	No	Si	170,174
<i>RNAlater</i>	Si	Si	No	170,174,182

5.7. Pretratamientos en Metabolómica

En el análisis y alicuotado de las heces para el tratamiento por metabolómica, es conveniente realizar una homogenización de las muestras para obtener una alícuota representativa de la totalidad de las

heces¹³⁷. Varios autores han llegado a la conclusión de que la homogeneización de las muestras fecales antes de la extracción de metabolitos es muy recomendable para obtener un perfil de metabolitos representativo tan amplio como sea posible^{180,190}, ya que las heces son una matriz heterogénea y compleja que contiene, además de los productos metabólicos de los microorganismos, otras sustancias como células eucariotas y compuestos dietéticos no digeridos. Por un lado, varios autores han descrito las ventajas de separar las bacterias de las heces antes de la extracción de metabolitos^{40,105,147,191–193}. La **Figura 4** resume el procedimiento de extracción recomendado. Estos métodos de enriquecimiento de bacterias, como la centrifugación diferencial, mejoran la riqueza de los microbios detectados y reducen la contaminación de la muestra evitando variabilidad en los resultados^{194–196}. Sin embargo, este procedimiento es laborioso y consume mucho tiempo y pasaría por alto los metabolitos excretados por las bacterias al lumen intestinal.

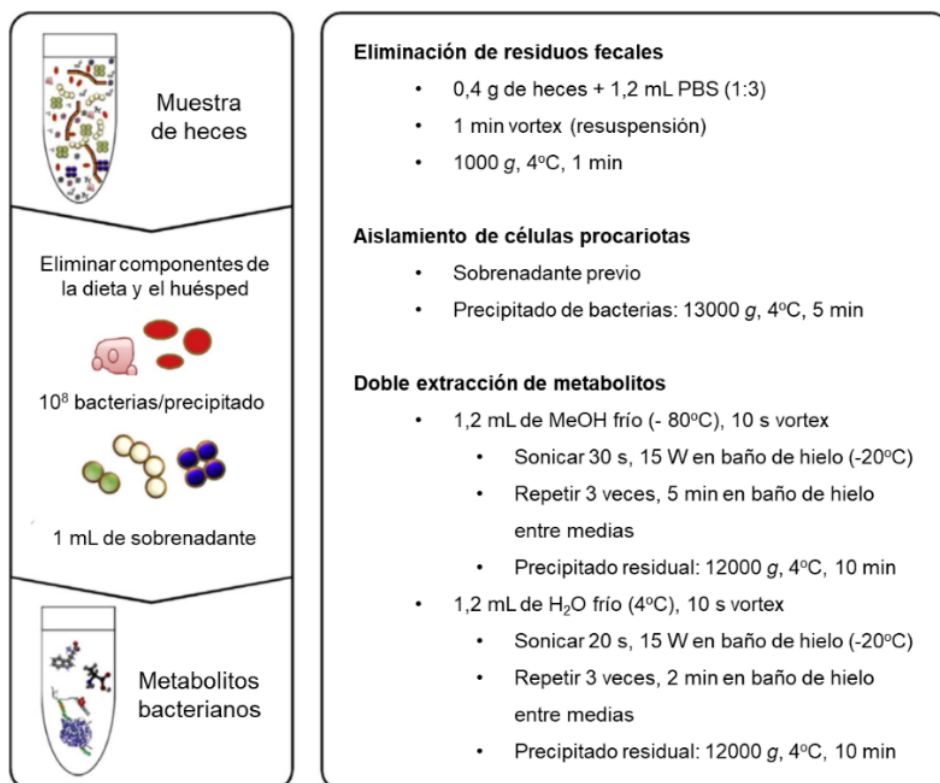


Figura 4. Procedimiento robusto para el aislamiento microbiano de muestras fecales y la posterior extracción de metabolitos. Comprende varios pasos de centrifugación para eliminar los restos fecales y las células eucariotas. Por último, la extracción de metabolitos se realiza utilizando dos disolventes, con el fin de ampliar la cobertura de metabolitos.

Como alternativa, otra opción validada por varios autores es proceder a la extracción de agua fecal^{144,197}. Los datos de las muestras de agua fecal son más reproducibles que los de las muestras fecales no procesadas, y su perfil metabólico es estable a -80°C ¹³⁷. Es recomendable extraer el agua fecal antes de congelarla porque la congelación podría aumentar los aminoácidos aromáticos, los intermediarios del ciclo de Krebs y los monosacáridos, y disminuir los AGCC, como el butirato¹⁹⁸. El tercer pretratamiento posible es la liofilización. Ésta permite la estandarización de las muestras, utilizando su peso seco, y la preservación de la estabilidad microbiana y química¹⁸². Por lo tanto, este pretratamiento es muy útil si las muestras fecales de diferentes individuos del mismo estudio tienen un contenido de agua diferente. La liofilización se realiza en muestras no procesadas debido a las diferencias interindividuales de consistencia, factor que se ha relacionado con la composición taxonómica de la microbiota¹⁹⁹. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la liofilización de las heces produce un aumento relativo de los ácidos grasos de cadena ramificada y una disminución de la concentración de AGCC y succinato²⁰⁰. Además, el laboratorio debe estar equipado con un ultracongelador y un liofilizador.

Finalmente, independientemente del pretratamiento realizado, se debe llevar a cabo la extracción de metabolitos de la muestra. En este paso, el disolvente a elegir depende del objetivo del análisis y de la metodología metabolómica que se vaya a llevar a cabo. La selección del disolvente puede sesgar los resultados del estudio, debido a su enorme impacto en la pérdida, subestimación o sobreestimación de la recuperación de los metabolitos, al extraer los de un cierto rango de polaridad⁹⁹. En el caso de un análisis dirigido, el disolvente debe ser uno que maximice la recuperación del analito adquirido⁷⁴. Sin embargo, para un enfoque no dirigido, es muy recomendable realizar un método de dos pasos con dos disolventes complementarios con diferentes polaridades, por ejemplo, la combinación de metanol y agua^{201,202}, triclorometano y etanol/metanol¹⁵³, o acetonitrilo y agua^{106,203}, para aumentar la cobertura metabólica¹⁰¹. Extraer

sólo la parte polar o lipídica conduciría a resultados sesgados. La doble extracción, con disolventes miscibles entre ellos, proporciona muestras mucho más representativas y similares en la composición metabólica a la muestra original⁹⁹.

La **Figura 6** se ha elaborado en base a la bibliografía revisada y resume de forma esquemática los principales factores que deben tenerse en cuenta en la recogida, el transporte, el pretratamiento y el almacenamiento de las de las muestras antes del análisis.

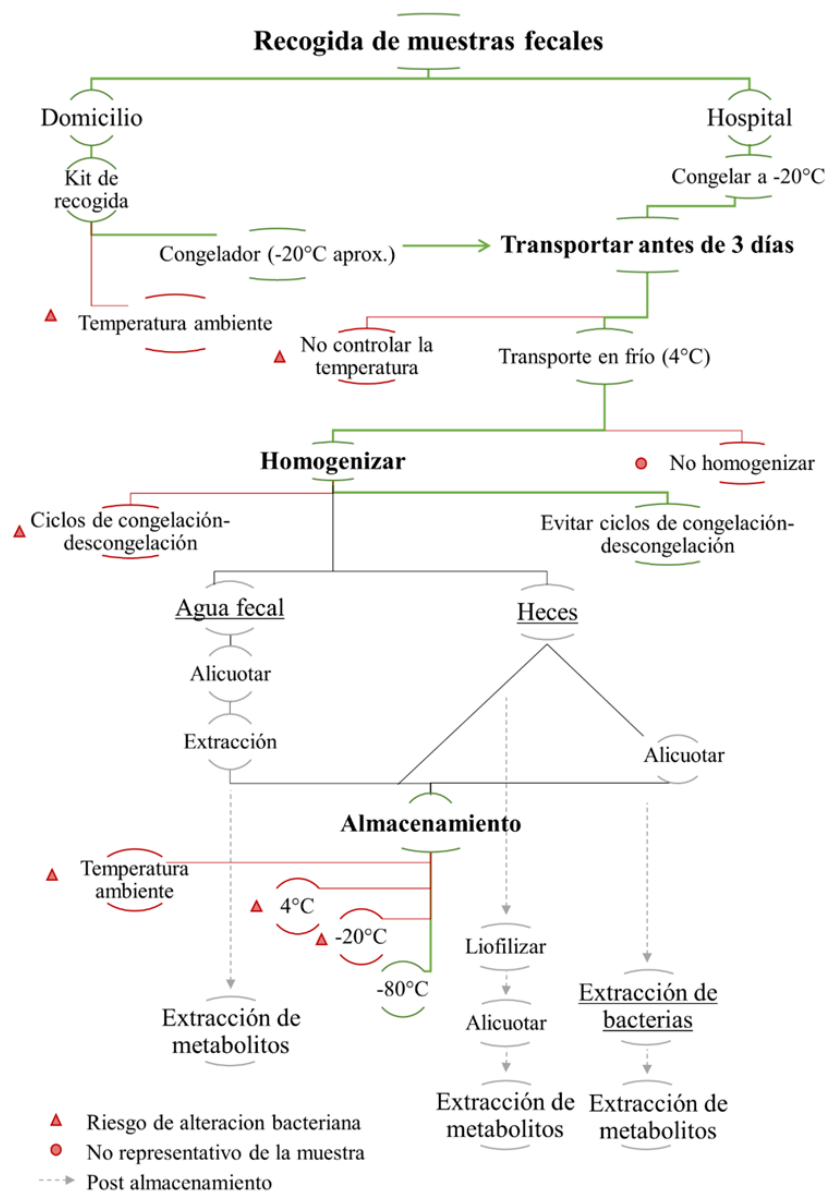


Figura 6. Diagrama que muestra el flujo de trabajo para la investigación metabólica. Líneas verdes: recomendaciones. Líneas y símbolos rojos: factores que pueden alterar las muestras. Las líneas negras indican rutas alternativas para la extracción de metabolitos.

6. Conclusiones

Las heces son la muestra biológica de elección para los estudios de la microbiota intestinal. El kit de recogida de heces supone una importante mejora para el transporte de la muestra al hospital. Además, la entrega de cuestionarios incluyendo preguntas sobre dieta y alimentos funcionales, así como sobre otros factores intrínsecos (edad, consumo de antibióticos, estilo de vida, etc.) es de gran ayuda para eliminar los sesgos interindividuales. Las variables extrínsecas que pueden influir en las muestras fecales también deben tenerse en cuenta en el diseño del estudio. El transporte, la temperatura y duración del almacenamiento de las muestras son problemas críticos que influyen en la estabilidad de la muestra y producen variabilidad en la microbiota. Por esta razón, durante el transporte, las heces deben conservarse como máximo a 4°C en una bolsa de frío o en hielo. Por lo general, no es conveniente analizar las heces inmediatamente después de la recolección, especialmente en estudios a gran escala. Por este motivo, las muestras deben almacenarse en congeladores a -80°C, evitando así posibles cambios en las comunidades microbianas. Además, para reducir la variabilidad inducida por el investigador, las muestras deben ser analizadas al mismo tiempo.

Para una correcta selección de los reactivos de preservación del material que va a ser analizado (ADN, ARN o metabolitos) se debe considerar todas las técnicas ómicas que se van a llevar a cabo (**Tabla 1**). La homogeneización de las muestras es fundamental para obtener alícuotas representativas de la muestra y los pretratamientos por enriquecimiento bacteriano, la extracción de agua fecal o la liofilización deben utilizarse dependiendo del objetivo final del estudio. En el caso de la metabolómica, se propone un flujo de trabajo para minimizar la influencia de los factores externos y aumentar la estabilidad de la composición microbiana de las heces (**Figura 6**).

Hasta la fecha no existe un protocolo estandarizado de recogida de heces que permita evitar el sesgo de la recogida en estos estudios y, lo que es

más importante, que facilite la comparación de los resultados entre las diferentes investigaciones. La estandarización de los protocolos proporcionará precisión y reproducibilidad y mejorará la calidad general de los resultados de este tipo de estudios.

**CAPÍTULO 2. IMPACTO DE LA IGE EN LOS
METABOLOMAS SÉRICO E INTESTINAL DE UN
MODELO MURINO DE ENTERITIS ALÉRGICA**

1. Introducción

La prevalencia de las alergias alimentarias ha aumentado en la última década, llegando a alcanzar cifras en Europa de más de 17 millones de personas²⁰⁴. Además, estudios epidemiológicos recientes, que incluyen pruebas alimentarias controladas para el diagnóstico de las alergias alimentarias, indicaron que entre el 1% y el 10,8% de la población presenta una hipersensibilidad alimentaria mediada por el SI^{205,206}.

El papel de la IgE en las reacciones alérgicas se ha estudiado en profundidad y es muy conocido. Esta función, tal y como se explica en la introducción con detalle, es principalmente consecuencia de la unión de IgE, producida por los linfocitos B, al receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (FcεRI) expresado en la superficie celular de los mastocitos y los basófilos²⁰⁷⁻²⁰⁹. La unión de la IgE a su receptor FcεRI, y posterior activación por el alérgeno específico, induce desgranulación y liberación de mediadores proinflamatorios que generan reacciones fisiológicas como la vasodilatación, la secreción de moco, la contracción del músculo liso, el aumento de la permeabilidad vascular y la afluencia de otras células inflamatorias^{209,210}. Mientras que estas afirmaciones son ciertas en la alergia mediada por IgE, el papel de la IgE en la exacerbación de las alergias no IgE mediadas no está claro. A priori no cabría esperar que tuviese ningún rol, sin embargo, aunque normalmente se describen como alergias mediadas por células T, los pacientes con alergias no IgE mediadas producidas por alimentos a menudo muestran IgE detectable al alimento específico en el diagnóstico inicial o desarrollan IgE alérgeno-específica durante el curso de la patología. Dichos pacientes, en particular los que tienen niveles elevados de IgE, tienden a experimentar un curso prolongado de la enfermedad, lo que sugiere que la IgE es un factor de mal pronóstico de las alergias alimentarias no mediadas por IgE, y que, por lo tanto, podría tener un papel relevante en su fisiopatología²¹¹⁻²¹³. Sin embargo, el mecanismo patogénico que subyace a estas enfermedades alérgicas no IgE mediadas no se conoce con exactitud.

En esta línea de investigación, Burggraf *et al.*²¹⁴ generaron un modelo de ratón con síntomas intestinales de alergias producidas por alimentos, para estudiar sus mecanismos patogénicos. Este modelo se conoce como enteritis alérgica (EA), e imita en los ratones, algunos rasgos observados en los pacientes con alergias alimentarias no mediadas por IgE, como la inflamación intestinal caracterizada por una membrana basal más gruesa, elongación de las criptas, atrofia de las vellosidades e infiltración de granulocitos²¹⁴. El estímulo inicial que conduce al desarrollo de la EA aún no se ha dilucidado, pero se postula que las respuestas mediadas por células Th2 están implicadas en el desarrollo de la inflamación²¹⁵⁻²¹⁷. A pesar de que la EA se describe como una alergia no mediada por IgE, los pacientes con EA suelen desarrollar IgE durante el curso de la patología²⁰⁻²⁴. Caubet *et al.*²⁴ observaron que el 24% de los sujetos con EA, confirmada por provocación alimentaria controlada, desarrollaron IgE específica al alimento del estudio. Aunque algunos autores postulan que la EA suele superarse^{20,21,24}, parece que la IgE tiene un papel importante en su persistencia. En algunos casos, la EA puede incluso evolucionar a una alergia mediada por IgE con el tiempo^{23,24,211,218}. En el mismo artículo, Caubet *et al.*²⁴ describieron que el 41% de los pacientes con IgE específica frente a la leche de vaca, no se hicieron tolerantes durante el estudio.

Por otro lado, se ha sugerido que la alteración del metabolismo contribuye de manera importante no sólo a los síndromes metabólicos tradicionales, sino también a múltiples trastornos inflamatorios, incluida la alergia⁴³. En esta línea, el metaboloma se ha estudiado con el objetivo de identificar biomarcadores en el diagnóstico y la predicción de enfermedades, y de comprender el papel de los metabolitos como agentes activos en los procesos patológicos. Sin embargo, hasta el momento, no se ha investigado el metaboloma intestinal de las alergias no mediadas por IgE como la EA.

Este capítulo se propone ahondar en el estudio de cómo influye la IgE en el desarrollo de la EA y cómo se altera el metaboloma, tanto sérico como intestinal. Para ello, se utilizó un modelo murino de EA en ratones *Wild Type*

(WT) e IgE *knock-in* (IgEki), que simulan la desregulación de la IgE de manera similar a la enfermedad, sensibilizados o no a ovoalbúmina (OVA); trabajando en total con cuatro grupos experimentales: WT no sensibilizados (WT_ns), WT sensibilizados a OVA (WT_OVA), IgEki no sensibilizados (IgEki_ns) y IgEki sensibilizados a OVA (IgEki_OVA). Este modelo ya había sido utilizado en un estudio anterior en el que se observó que los ratones con la patología más grave desarrollaron síntomas clínicos más intensos como pérdida de peso y disminución de temperatura corporal²¹⁹. Además, los ratones IgEki sensibilizados a OVA, mostraron inflamación intestinal, atrofia de las vellosidades con edema en la lámina propia y un gran número de neutrófilos y eosinófilos infiltrados en la lámina propia^{219,220}. Para profundizar en la fisiopatología de la EA, se analizaron los metabolomas séricos e intestinales mediante metabolómica no dirigida utilizando tres plataformas complementarias: GC-MS, LC-MS y CE-MS.

2. Hipótesis

Existe un perfil metabólico característico que puede estar directamente relacionado con un aumento de los niveles de IgE y que tiene una relación directa con la inflamación alérgica y la EA.

3. Objetivos

Para investigar el papel de la IgE en el desarrollo de la EA se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Obtener el perfil metabólico de muestras de suero y heces mediante metabolómica no dirigida en ratones BALB/c WT, sensibilizados a OVA y sin sensibilizar (WT_OVA vs WT_ns).
2. Obtener el perfil metabólico de muestras de suero y heces mediante metabolómica no dirigida en ratones BALB/c modificados

genéticamente para la depleción en los niveles de IgG1 y ratones BALB/c WT sin sensibilizar (IgEki_ns vs WT_ns).

3. Obtener el perfil metabólico de muestras de suero y heces mediante metabolómica no dirigida en ratones BALB/c modificados genéticamente para la depleción en los niveles de IgG1 y el aumento en los niveles de IgE, sensibilizados a OVA y sin sensibilizar (IgEki_OVA vs IgEki_ns).
4. Obtener el perfil metabólico de muestras de suero y heces mediante metabolómica no dirigida en ratones BALB/c modificados genéticamente para la depleción en los niveles de IgG1 y ratones BALB/c WT sensibilizados a OVA (IgEki_OVA vs WT_OVA).
5. Analizar los perfiles metabólicos obtenidos utilizando herramientas estadísticas tanto univariantes como multivariantes.
6. Realizar la interpretación biológica de los resultados para estudiar las rutas metabólicas afectadas en esta patología y los principales metabolitos implicados de cada una de ellas.

4. Materiales y métodos

4.1. Modelo animal

Se utilizaron ratones *knock-in* de IgE (C.lghg1^{tm1.1^{Pyu}})221, es decir, ratones IgEki. Los ratones IgEki homocigóticos son capaces de expresar 10 veces más IgE total y una ausencia de IgG1 en comparación con los WT, como consecuencia de la sustitución de los exones que codifican para la parte soluble de la región constante de la IgG1 murina por la contraparte IgE²¹⁴.

Los ratones BALB/c WT e IgEki en fondo BALB/c se mantuvieron y reprodujeron en condiciones específicas, libres de patógenos, en el animalario del Instituto Paul-Ehrlich de Langen (Frankfurt, Alemania). Los experimentos con animales se llevaron a cabo de conformidad con la legislación nacional y fueron aprobados por la autoridad local (Consejo regional -Regierungspräsidium- de Darmstadt, Alemania, número de licencia: F107/1020). Los ratones homocigotos IgEki fueron proporcionados

por el Dr. Philipp Yu del Instituto de Inmunología en la Universidad Philipps de Marburg, Alemania.

4.2. Sensibilización a ovoalbúmina e inducción de enteritis alérgica

Los ratones (hembras, de 6 a 8 semanas de edad) fueron sensibilizados por una inyección intraperitoneal con 10 µg de ovoalbúmina (OVA, grado V, Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania) y 1 mg de hidróxido de aluminio (Alum, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Alemania) en 500 µl de tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*), o tratados sólo con PBS o Alum dos veces a intervalos de dos semanas como se describe en Burggraf *et al.*²¹⁴. Dos semanas después de la segunda sensibilización, los ratones recibieron una dieta a base de pellets y clara de huevo con una alta cantidad de OVA durante 7 días. La dieta fue preparada por la empresa ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Alemania). El proceso completo de sensibilización se muestra en la **Figura 1**.

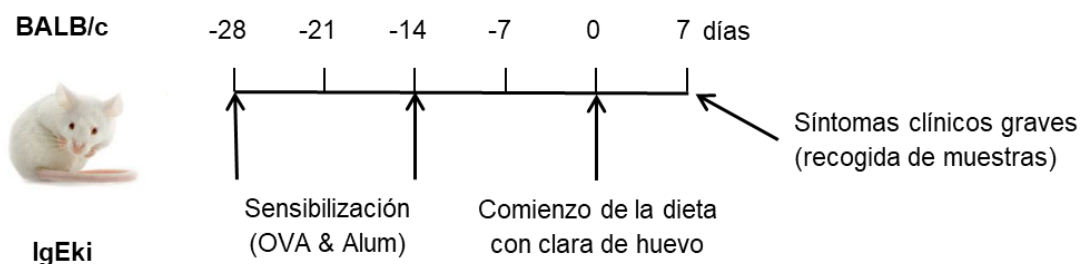


Figura 1. Diagrama temporal de la sensibilización a OVA de los ratones IgEki y BALB/c WT. Realizado en el animalario del Instituto Paul-Ehrlich de Langen (Frankfurt, Alemania)

Un total de 29 ratones fueron utilizados en este estudio: 7 WT_ns, 7 WT_OVA, 7 IgEki_ns y 8 IgEki_OVA tal y como se muestra en la **Figura 2**. Todos los ratones recibieron la misma dieta.

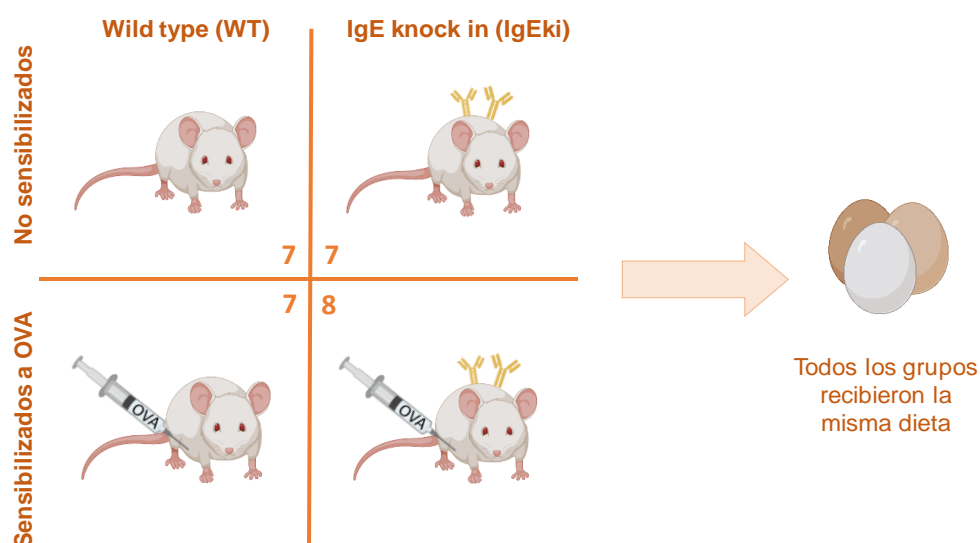


Figura 2. Diseño de los grupos experimentales. IgEki: modelo murino que expresa IgE en lugar de IgG1.

4.3. Toma de muestras

Tras siete días de alimentación con la dieta a base de clara de huevo, los ratones fueron sacrificados mediante dióxido de carbono de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de bioética correspondiente, en el animalario del Instituto Paul-Ehrlich. Las muestras de heces y suero se conservaron a -80°C hasta la extracción de metabolitos en el Centro de Metabolómica y Bioanálisis (CEMBIO) de la Universidad San Pablo CEU de Madrid, España.

4.4. Metabolómica no dirigida

4.4.1. Extracción de metabolitos

Las muestras de heces se retiraron del congelador y se liofilizaron, para su estandarización en peso seco, durante la noche a -80°C (LyoQest -85, Telstar, España). Cabe destacar que en las heces aparecen tanto productos de excreción como metabolitos microbianos resultantes del metabolismo celular. Los metabolitos de los pellets fecales se extrajeron con dos disolventes siguiendo el mismo protocolo: (i) primero con MeOH:MTBE (4:1, v/v) y (ii) con MeOH:H₂O (4:1, v/v).

- (i) 100 mg de heces liofilizadas fueron resuspendidas en 350 μ L de MeOH:MTBE frío (4:1, v/v) y puestas 10 min a 50 mHz en un TissueLyser LT (Qiagen, Alemania) con 50 mg de perlas de vidrio (710-1180 μ m, Sigma-Aldrich, Alemania), y 5 min en un Sonicator XL (Misonix, EE.UU.) a 15 W. A continuación, se realizaron tres ciclos de congelación / descongelación en un baño de nitrógeno líquido / agua fría. Las partículas sólidas se eliminaron por centrifugación a 16000 \times g durante 20 min a 4 °C. Finalmente, se recolectaron 300 μ L de sobrenadante y se almacenaron a -20°C hasta el siguiente paso.
- (ii) Los pellets de (i) se volvieron a suspender en 350 μ L de MeOH:H₂O frío (4:1, v/v) y se siguieron los mismos pasos que en (i).

Volúmenes iguales (300 μ L) de los sobrenadantes de (i) y (ii) se mezclaron y alicuotaron para su posterior análisis.

Las muestras de suero (100 μ L) se desproteinizaron mediante la adición de 300 μ L de acetonitrilo frío (1:3 v/v) y se homogeneizaron durante 15 min en un vórtex. Después de un baño de hielo de 10 minutos, las muestras se centrifugaron (16000 \times g, 4 °C, 20 min) y se almacenaron a -20 °C hasta el inicio del tratamiento de la muestra.

La lista de reactivos y estándares utilizados se detalla en el **Anexo I**.

4.4.2. Tratamiento de la muestra

Los sobrenadantes resultantes se filtraron a través de filtros de jeringa de nylon de 0,22 μ m (FisherBrand, Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). Para LC-MS, se transfirieron 80 μ L a un vial analítico para su análisis. Para CE-MS, 80 μ L de los sobrenadantes se evaporaron utilizando un concentrador SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) y se reconstituyeron en 80 μ L de agua MilliQ® con un estándar interno (0,2 mM L-metionina sulfona) y 0,1 M FA. Finalmente, para GC-MS, 120 μ L de las alícuotas correspondientes se evaporaron utilizando un concentrador

Speedvac, seguido de la adición de 10 µL de clorhidrato de O-metoxiamina (15 mg/mL) en piridina para la metoximación. Después de agitar suavemente en un vórtex, los viales fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas. A continuación, se añadieron 10 µL de BSTFA con 1 % de TMCS (v/v) a las muestras, se agitaron durante 5 min y se realizó una sililación durante 1 h a 70 °C. La metoximación y la sililación están diseñadas para permitir la derivatización y análisis de hidroxí y aminoácidos, alcoholes, azúcares, poliaminas y ácidos aromáticos, entre otros⁹⁷. Finalmente, se añadieron 120 µL de éster metílico C18:0 (10 mg/L en heptano) como estándar interno y se agitaron las muestras en un vórtex. Ocho viales control sin muestra fueron preparados para GC-MS por el mismo procedimiento de extracción y derivatización.

4.4.3. Preparación de los controles de calidad

En paralelo a las muestras analíticas se prepararon las muestras de control de calidad (QC). Los QCs se elaboraron de forma independiente para cada plataforma analítica mediante la combinación de volúmenes iguales de cada muestra procesadas. Después de un vórtex suave, las mezclas se transfirieron a viales analíticos. Los QCs proporcionan durante el análisis una medida de la estabilidad del sistema y su rendimiento, así como de la reproducibilidad del procedimiento del tratamiento de muestra.

4.4.4. Análisis metabólico

Las muestras de heces y suero se midieron en tres plataformas analíticas, con el fin de maximizar la cobertura metabólica.

- Cromatografía de líquidos (LC) acoplada a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y analizador cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF-MS): **LC-ESI-QTOF-MS o LC-MS.**
 - Operado en dos modos de ionización: positivo, ESI (+), y negativo, ESI (-).

- Posteriormente operó en modo de espectrometría de masas en tándem: **LC-ESI-QTOF-MS/MS o LC-MS/MS.**
- Electroforesis capilar (CE) con una fuente de ESI acoplada a un TOF-MS: **CE-ESI-TOF-MS o CE-MS.**
- Cromatografía de gases (GC) acoplada a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización electrónica (EI) y un analizador de cuadrupolo (Q): **GC-EI-Q-MS o GC-MS.**

Ambas matrices se analizaron en la misma secuencia analítica en dos bloques independientes: primero heces y luego suero. En cada uno de ellos se midieron las muestras en orden aleatorio.

LC-ESI-QTOF-MS. El análisis LC-MS se realizó en un sistema Agilent HPLC, equipado con un desgasificador, dos bombas binarias y un inyector automático termostatzado (serie 1290 infinity II, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), acoplado a un QTOF-MS serie 6545 (Agilent Technologies). Se inyectaron 0,5 µL de muestra en una columna de fase invertida (Zorbax Extend C18 50 x 2,1 mm, 1,8 µm; Agilent) manteniendo la temperatura a 60 °C. El flujo se fijó en 0,6 mL/min. La fase móvil estaba compuesta de: (A) 0,1% de FA en agua y (B) 0,1% de FA en acetonitrilo. El gradiente fue de 5% de B (0–1 min), aumentando a 5% de A y 80% de B (1–7 min), seguido de 80% de A y 100% de B (7–11,5 min), y finalizando con 100% de A y 5% de B (11,5–12 min). El sistema finalmente se mantuvo al 5% de B durante 3 min para reequilibrar el sistema (15 min del tiempo total de análisis). Los datos de la fuente de ionización por ESI se adquirieron en modo de ion positivo y negativo, respectivamente. El voltaje capilar se estableció en 3.500 para ESI (+) y 4.000 V para ESI (-). El caudal de gas de secado fue de 12 L/min a 250 °C y el nebulizador de gas a 52 psi; el voltaje de la boquilla fue de 1.000 V; el voltaje del fragmentador fue de 175 V; el *skimmer* y el voltaje de radiofrecuencia del cuadrupolo (OCT RF Vpp) fueron fijados a 65 y 750 V, respectivamente. Los datos fueron recogidos en el modo centroide a una velocidad de barrido de 1,5 espectros por segundo. La detección por MS se realizó en un escaneo completo de 50 a

1.000 m/z para ambos modos de ESI. Las masas de referencia (m/z detectadas) fueron purina (121,0508) y HP-0921 (922,0097) para el modo ESI (+), y TFA NH₄⁺ (119,0363) y HP-0921 (966,0007) para el modo ESI (-); cuya inyección continua permite al sistema la corrección constante de la masa detectada. Estas condiciones fueron adaptadas de trabajos anteriores²²². Las secuencias analíticas para ambas polaridades se establecieron comenzando con el equilibrado (análisis de diez QCs) seguido por el bloque analítico (las muestras), inyectando un QC entre bloques de tres muestras hasta el final de la secuencia. Las muestras se analizaron en series separadas para cada modo de ionización.

LC-ESI-QTOF-MS/MS. La anotación de los metabolitos se confirmó mediante LC-MS/MS utilizando un QTOF (modelo 6545, Agilent). Los experimentos se repitieron en las mismas condiciones cromatográficas. Los fragmentos se seleccionaron utilizando la ventana m/z estrecha (1.3 Da) y se generaron aplicando 10 eV, 20 eV y 40 eV de energía de colisión para la fragmentación en el cuadrupolo en el tiempo de retención (RT) previamente determinado.

CE-ESI-TOF-MS. Se utilizó un sistema CE (7100 Agilent) acoplado a un analizador TOF (6224 Agilent). Para el control del sistema CE-MS se utilizó el software Mass Hunter Workstation (versión B.06.01). La separación se produjo en un capilar de sílice fundida (Agilent: longitud total, 100 cm; i.d., 50 μ m). Todas las separaciones se realizaron en polaridad normal con un electrolito de fondo que contenía 1,0 M de FA en MeOH al 10% (v/v) a 20°C. Antes de cada análisis, el capilar fue acondicionado con una descarga del electrólito del fondo durante 5 minutos. El *sheath liquid* (10 μ L/min) fue MeOH:H₂O (1:1) conteniendo 1,0 mM de FA con dos masas de referencia 121,0509 (purina) y 922,0098 (HP), lo que permitió la corrección y una mayor exactitud de masa en el MS. El *sheath liquid* fue introducido por una bomba ISO (1200 Agilent). Las muestras se inyectaron hidrodinámicamente a 50 mBar durante 50 s. El voltaje de separación fue de 30 kV, la presión interna fue de 25 mBar y los análisis se realizaron en 40 min. Los parámetros de MS fueron los siguientes: fragmentador 125 eV,

skimmer 65 eV, octopolo 750 eV, presión del nebulizador 4 psi, temperatura del gas de secado 250°C, caudal 10 L/min y voltaje capilar 4.000 eV. Los datos fueron adquiridos en modo positivo de 74 a 1.000 *m/z* a una velocidad de barrido de 1,00 por segundo. Este método fue adaptado de publicaciones anteriores^{223–225}. La secuencia analítica se estableció comenzando con el análisis de cinco QCs seguidos de las muestras y se inyectó una muestra de control de calidad entre bloques de tres muestras hasta el final del análisis.

GC-EI-Q-MS. Las muestras se midieron en un sistema GC (Agilent Technologies 7890A) equipado con un inyector automático (Agilent 7693) y acoplado a un MS con un detector de cuadrupolo MSD inerte (Mass Selective Detector, Agilent 5975C). Los parámetros específicos para el análisis se encuentran en la literatura publicada previamente^{226,227}. Se inyectaron dos microlitros (2 μ L) de la muestra derivatizada a través de una columna GC DB5-MS (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno, película de 0,25 μ m 95% dimetilpolifenilpolisiloxano) con una precolumna integrada (10 m J&W, Agilent). El caudal del gas portador (helio) se fijó en 1 mL/min y la temperatura del inyector en 250 °C. El *split* de la muestra se estableció de 1:5 a 1:10 con un flujo de helio de 3 a 10 mL/min. El *split* se llevó a cabo en el interior de una guía de lana de vidrio desactivada (Restek 20782, Bellefonte, PA, EE.UU). El gradiente de temperatura se programó de la siguiente manera: la temperatura inicial del horno se fijó en 60 °C (mantenido durante 1 min), después aumentó hasta 325 °C a una velocidad de 10 °C/min (dentro de 26,5 min) y se mantuvo a 325 °C durante 10 min. El tiempo total de análisis fue de 37,5 min. Se aplicó un período de enfriamiento durante 10 minutos antes de la siguiente inyección. La línea de transferencia del detector, la fuente de filamento y la temperatura del cuadrupolo se fijaron en 280 °C, 230 °C y 150 °C, respectivamente. La detección de MS se realizó con el modo de ionización EI a -70 eV. El espectrómetro de masas funcionó en un rango de *m/z* de 50-600 a una velocidad de 2,7 exploraciones/s. Al inicio del análisis, se realizaron varias inyecciones de estándar interno, una mezcla estándar de ésteres metílicos

de ácidos grasos (FAME C8-C30, Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.)), cuatro QCs, y cuatro blancos de extracción. Después se inyectó el bloque analítico con un QC cada tres muestras y otro al final de la lista de trabajo. Por último, se inyectaron cuatro blancos al final de la secuencia.

4.4.5. Tratamiento de datos e identificación de compuestos

LC-ESI-QTOF-MS. Los datos adquiridos se procesaron utilizando el software MassHunter Profinder (B.06.00, Agilent Technologies).

En primer lugar, se realizó una deconvolución. Se utilizó el algoritmo *Molecular Feature Extraction* (MFE) para reducir el tamaño y la complejidad de los datos. Con los datos obtenidos del MFE, se realizó una segunda deconvolución más dirigida aplicando el algoritmo de *Recursive Feature Extraction* para mejorar la fiabilidad en la búsqueda de compuestos. Una vez obtenidos los datos brutos, se aplicó un procedimiento de filtrado de calidad o *Quality Assurance* (QA) adaptado de Godzien *et al.*^{102,112}. De esta manera, los datos se filtraron manteniendo aquellos compuestos detectados en más del 70% de los QCs y con una Desviación Estándar Relativa (RSD) menor al 30%. Además, para tener en cuenta aquellos compuestos que podrían estar presentes solo en un grupo experimental, se mantuvieron aquellos con menos del 20% de presencia en QCs y más del 50% de presencia en al menos un grupo experimental.

Los compuestos significativos ($p < 0.05$) fueron identificados tentativamente utilizando la herramienta de búsqueda “CEU Mass Mediator” (CMM, <http://ceumass.eps.uspceu.es>) que presenta una interfaz, en línea, unificando la consulta en diferentes bases de datos de metabolómicas, esto es *Human Metabolome Data Base* (HMDB), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), Lipidmaps y Metlin (CMM 1.0)^{99,228}. La identificación se realizó teniendo en cuenta el RT, el patrón isotópico y los posibles aductos. La identificación final se confirmó mediante **LC-MS/MS**, comparando los espectros de fragmentación resultantes de cada metabolito con los de cada estructura propuesta mediante la base de datos

METLIN (<https://metlin.scripps.edu/>), complementada con una base de datos interna del CEMBio.

CE-ESI-TOF-MS. Los datos adquiridos se procesaron de la misma manera que para LC-MS utilizando MassHunter Profinder (B.06.00, Agilent Technologies). Después de una cuidadosa comprobación de los datos, se aplicaron los mismos filtros de QA que en LC-MS. En este caso, como todos los compuestos tenían una presencia del 100% en los QCs, solo se descartaron aquellos con RSD mayor al 30%. La identificación se realizó utilizando una biblioteca interna de estándares²²³.

GC-EI-Q-MS. Los datos de GC-MS se procesaron utilizando el software Agilent Mass Hunter (Agilent). El rendimiento analítico general se examinó cuidadosamente mediante la inspección de *Total Ion Chromatogram* de muestras experimentales, QCs, blancos y estándar interno; descartándose las muestras no conformes (ver en resultados). Posteriormente, se realizó la deconvolución de los datos de las muestras conformes para identificar compuestos coeluidos de acuerdo con sus índices de retención, incluyendo el tiempo de retención (RT), utilizando el software de "Unknown analysis" versión B.07.00 de Agilent. Antes de la deconvolución, se utilizaron los RTs del análisis de la solución estándar FAME C8-C30 para crear un archivo de datos de corrección que permitió un ajuste adicional de RTs en las muestras, mejorando así su exactitud y por extensión su comparabilidad con los de las bases de datos. Esta mejora de la exactitud de RT se basó en la determinación del índice de retención de Kovats que permite convertir los RTs en constantes independientes del sistema. Además del espectro de fragmentación de cada compuesto, en su deconvolución/identificación, se comparó el valor de RT contenido en la biblioteca FiehnLib de tiempos de retención bloqueados con el valor de RT experimental. Los compuestos que no se lograron asignar, se identificaron comparando sus patrones de fragmentación de masa con la biblioteca NIST v.14 (G1676AA, Agilent) utilizando el software "MassHunter Qualitative" (Agilent). La integración y la alineación de los datos obtenidos se realizó mediante el programa informático "MassHunter Quantitative" (Agilent). El filtrado de datos

deconvolucionados se realizó eliminando aquellas señales detectadas en menos del 50% de todas las muestras de QC. La matriz de datos fue normalizada por el estándar interno para corregir la variabilidad analítica del equipo.

La abundancia media de cada metabolito en los blancos se calculó y se restó de la abundancia en el resto de las muestras. Como último paso, los datos se normalizaron utilizando el algoritmo QC-SVRC229, para minimizar la varianza dentro del grupo para maximizar la potencia de las pruebas estadísticas posteriores. Posteriormente, se aplicaron los filtros QA descritos con anterioridad y se descartaron los compuestos con valores de RSD superiores al 30% en los QCs.

4.5. Identificación de la clase biológica

Para la identificación de la clase biológica de cada metabolito, se consultaron las siguientes bases de datos: HMDB, <http://www.hmdb.ca/230> y KEGG, www.genome.jp/kegg/. La categoría “clase” se asignó de manera manual para cada uno de ellos. En compuestos frontera entre dos clases, se anotó según la función biológica a la clase más similar.

4.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, se realizó previamente una sustitución de los valores perdidos (*missing values*) generados tras la deconvolución con el algoritmo MFE. Para reemplazarlos se utilizó la función matemática kNN (del inglés, *k-nearest neighbors*, desarrollado por Fix y Hodges en 1951). Este algoritmo permite estimar el valor perdido mediante la similitud del perfil con las muestras cercanas o vecinos del grupo al que pertenecen²³¹.

Tras este pretratamiento, los datos de todas las técnicas fueron analizados utilizando estadística multivariante y univariante. Para el análisis multivariante se utilizó el software SIMCA (v.14.1, Umetrics®, Umeå, Suecia). Se obtuvieron modelos de análisis de componentes principales (PCA-X) y análisis discriminante parcial-mínimo cuadrado (PLS-DA)²³².

Después del análisis PCA-X, y considerando como criterio el agrupamiento de los QC y de las muestras de los grupos biológicos, se identificaron las muestras *outliers* y fueron excluidas para su posterior análisis. Los modelos supervisados PLS-DA fueron validados con la prueba de permutación, también en SIMCA. Se obtuvieron valores de importancia de la variable independiente en proyección (VIP) para cada metabolito en cada modelo PLS-DA como medida de su relevancia en la capacidad de separación del modelo. Los compuestos se consideraron significativos si $VIP > 1$.

Paralelamente, se realizó un análisis univariante en MATLAB (v.R2018b, MathWorks®, Natick, Massachusetts, EE.UU.) para obtener el p valor para cada compuesto del estudio. En primer lugar, se realizó un análisis de normalidad, decidiéndose aplicar dos pruebas no paramétricas ($n < 30$), por un lado, (i) una U-de Mann-Whitney (UMW) para comparaciones entre dos grupos con una corrección *post-hoc* de Bonferroni para las comparaciones por pares; y (ii) un ANOVA-no paramétrico para tres o más grupos de Kruskal-Wallis (KW). Para este propósito, se utilizaron scripts MATLAB internos. La significación estadística fue fijada en el nivel del 95% ($p < 0,05$), y los compuestos fueron considerados significativos si $p < 0,05$ para ambas pruebas no paramétricas (KW y UMW).

El porcentaje de cambio ($\% \Delta$) para cada metabolito significativo de las dos comparaciones del estudio se calculó en Excel con la fórmula que se muestra a continuación. Qué grupos son A y B se explica en cada comparación, siendo B el considerado basal o control.

$$\% \Delta = \frac{\text{Media A} - \text{Media B}}{\text{Media B}} \times 100$$

La herramienta en línea MetaboAnalyst (v. 4.0) se utilizó para producir *Heatmaps* con agrupaciones jerárquicas²³³. Los diagramas de Venn se generaron con la herramienta web Venny (v. 2.1.0; <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Para el análisis de las rutas metabólicas, se seleccionaron las rutas significativas ($p < 0,05$) con

MetaboAnalyst 5,0234 (<https://www.metaboanalyst.ca>) e IMPaLA (<http://impala.molgen.mpg.de>). Los datos se representaron utilizando la base de datos KEGG y la herramienta Metscape (<http://metscape.ncibi.org/>) del software Cytoscape (<https://cytoscape.org/>).

La fiabilidad de los metabolitos obtenidos como significativos se aseguró mediante la comparación de sus respectivas identificaciones en todas las técnicas analíticas, así como su porcentaje de cambio, asegurándose la coincidencia para los metabolitos que se detectaron respectivamente en más de una plataforma analítica. Esta prueba permitió asegurar la calidad de los resultados.

5. Resultados

5.1. La IgE promueve el desarrollo de síntomas clínicos e inflamación intestinal en un modelo murino de EA

Para evaluar el impacto de la IgE en el desarrollo de EA, los ratones WT e IgEki fueron sensibilizados con OVA y provocados con una dieta a base de clara de huevo. Los ratones IgEki_OVA desarrollaron síntomas clínicos significativamente más fuertes, es decir, reducción del peso y la temperatura corporales durante 7 días, en comparación con los ratones WT_OVA. Por el contrario, sus controles, WT_ns y IgEki_ns, no desarrollaron signos de síntomas clínicos (**Figura 3**).

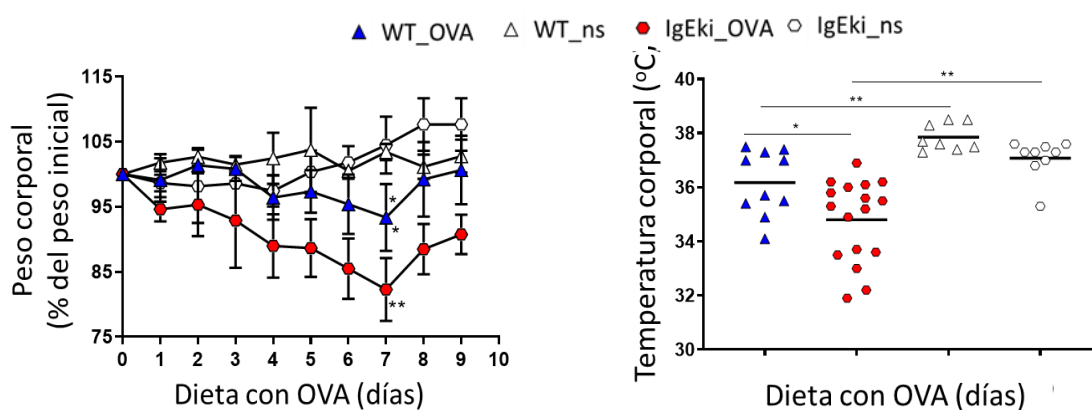


Figura 3. Fluctuaciones en el peso y temperatura corporales en los cuatro grupos experimentales.

Por otro lado, investigadores del Instituto Paul-Ehrlich midieron los niveles de anticuerpos IgG1 e IgE específicos de OVA²³⁴. Tal y como se muestra en la **Figura 4**, los ratones IgEki_OVA produjeron niveles significativamente más altos de anticuerpos IgE específicos de OVA que los ratones WT_OVA en lugar de IgG1 como consecuencia de la modificación en cadena. Asimismo, los ratones IgEki_ns, pero no los ratones WT_ns, produjeron niveles detectables, pero marginales, de anticuerpos IgE específicos de OVA.

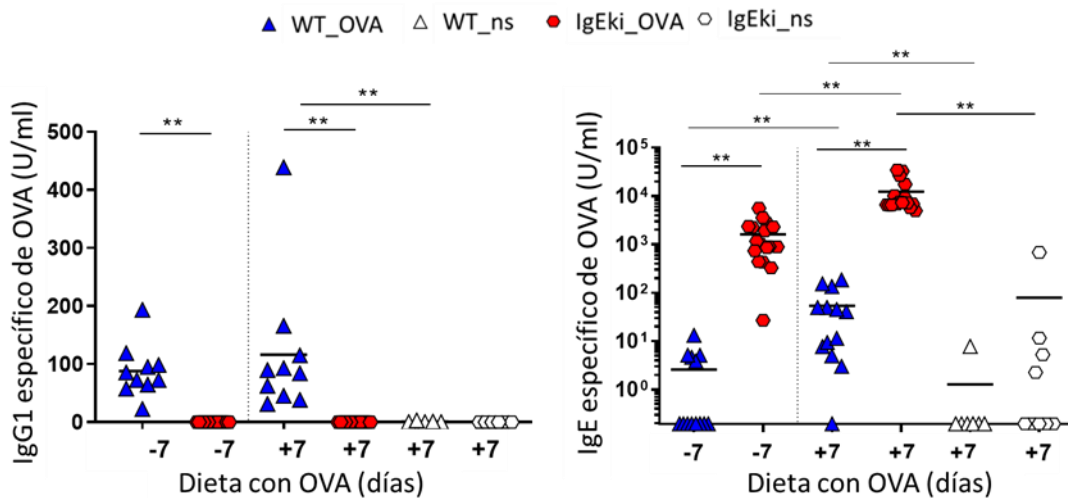


Figura 4. Niveles de IgG1 e IgE específicos a OVA en los cuatro grupos experimentales.

En relación con el estudio histológico realizado en el Instituto Paul-Ehrlich, se obtuvieron los siguientes resultados. Los ratones WT_OVA desarrollaron características inflamatorias moderadas de EA, como criptas alargadas, abundantes células caliciformes hipertróficas y atrofia de vellosidades con edema en la lámina propia, mientras que los ratones IgEki_OVA agravaron la EA. Tales características inflamatorias no pudieron detectarse en ratones WT_ns, mientras que sí se observó inflamación marginal en ratones IgEki_ns (**Tabla 1**).

Tabla 1. Evaluación de los niveles de inflamación en el tejido intestinal en ratones WT e IgEki. La puntuación histológica total representa la suma del nivel de inflamación, la puntuación de las vellosidades y el edema. La puntuación va de 0 a 6 (puntuación total = I + V + E). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (1) vs WT (NC/EW); (2) vs IgEki (OVA/EW); (3) vs IgEki (NC/EW) ²³⁴.

<u>Grupo</u>	<u>Inflamación</u>	<u>Vellosidades</u>	<u>Edema</u>	<u>Total</u>
WT_OVA	3.75 ^{**} (1) ± 0.5	0.75 ± 0.5	0.75 ± 0.5	5.25 ^{**} (1) ± 1.5
WT_ns	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00* ± 0.0
IgEki_OVA	4 ^{**} (3) ± 0.0	0.80 ± 0.5	0.60 ± 0.6	5.40 ^{**} (3) ± 0.5
IgEki_ns	1.33 [*] (1) ± 0.6	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	1.33 ^{**} (1) ± 0.5

Los resultados indican que la IgE agrava la EA en un modelo murino. La sensibilización a OVA y/o la alimentación con huevo en ratones WT e IgEki inducen cuatro grupos con diferentes grados de gravedad: ratones alérgicos con EA agravado (IgEki_OVA), ratones alérgicos con EA moderado (WT_OVA), ratones alérgicos con etapa marginal o leve de sensibilización (IgEki_ns) y ratones no alérgicos (WT_ns).

5.2. Perfil metabolómico global

Para obtener información sobre el metaboloma en los distintos casos de estudio de EA, se analizaron las muestras de heces y suero de ratones de cuatro grupos experimentales: WT_ns, WT_OVA, IgEki_ns y IgEki_OVA.

La multiplataforma analítica permitió detectar un total de 5155 señales metabólicas tras el QA, 3059 en las heces y 2096 en las muestras de suero, incluyendo las señales comunes para ambas matrices. Respecto a las muestras de heces, se detectaron 194 señales en GC-MS, 1835 señales en LC-MS (±) y 1030 señales en CE-MS (+). Por otro lado, en las muestras de suero, se detectaron 71 señales en GC-MS, 1645 señales en LC-MS (±) y 380 señales en CE-MS (+). En GC-MS se obtuvieron menos señales metabólicas debido a su diferente flujo de trabajo que incluye la identificación de la señal.

El análisis multivariante PCA-X, permitió identificar los *outliers* en cada grupo experimental, quedando excluidas del análisis estadístico diferencial las muestras: WT_ns 2 y WT_OVA 6 (para heces en GC-MS); WT_ns 6

(para suero en GC-MS); y IgEki_OVA 7 (para heces en CE-MS). En la **Figura 5**, se presentan los modelos PCA-X no supervisados, que muestran una visión general del agrupamiento de las muestras para ambas matrices (suero y heces). En el caso de los modelos de heces, se observó en todas las técnicas, una separación entre los grupos IgEki y WT. Además, en LC-MS (\pm) se pudo apreciar la separación de los cuatro grupos experimentales. Este hecho demuestra que el perfil metabolómico de las heces presenta claras diferencias que permiten separar a los ratones por un factor, principalmente por la mutación IgEki. Asimismo, en todos los modelos, la estrecha agrupación de las muestras QC indica la alta calidad del análisis analítico (en todos los modelos con un R^2 superior a 0,6).

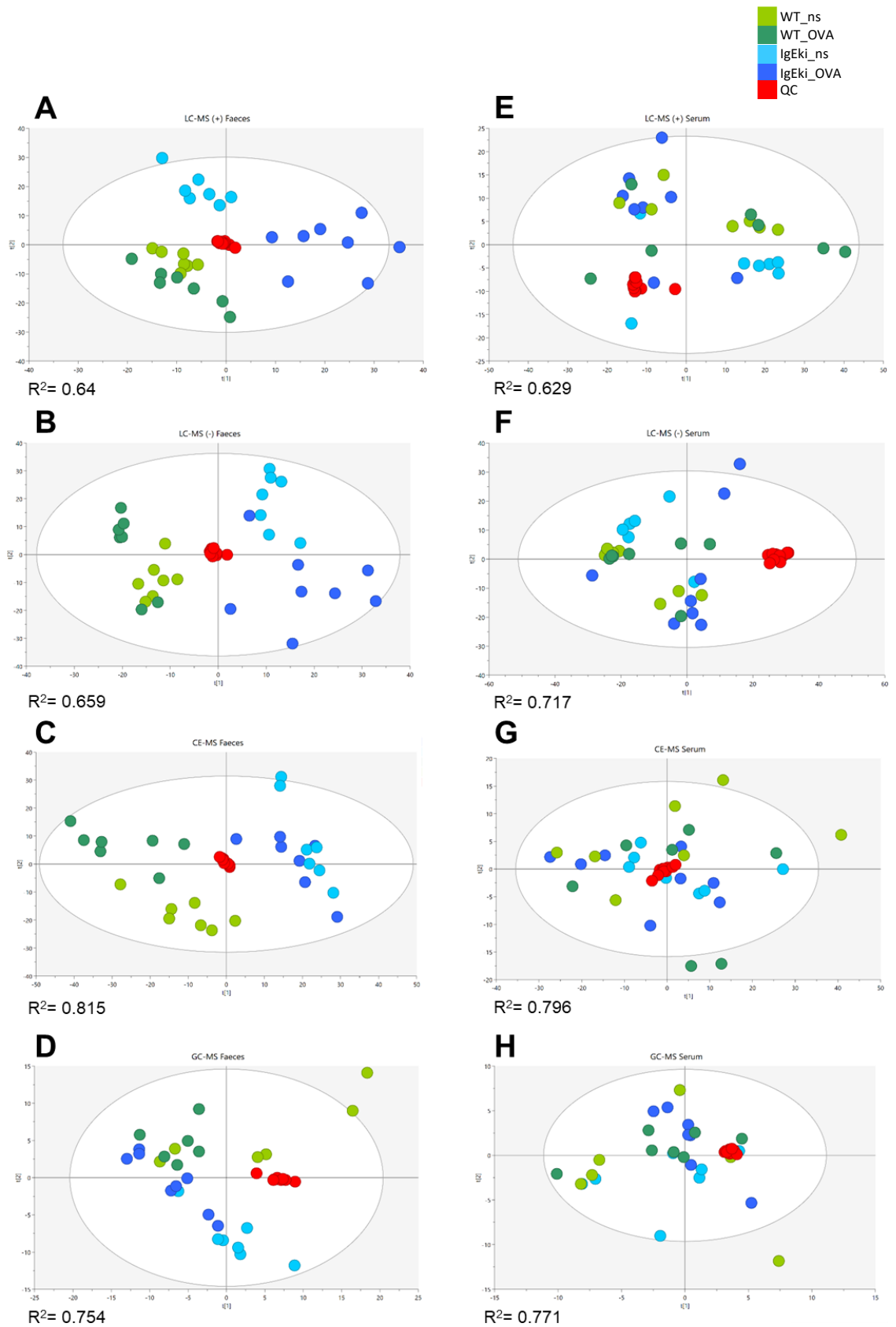


Figura 5. Modelos PCA-X no supervisados para A-D) heces y E-H) suero, utilizando LC-MS (+), LC-MS (-), CE-MS y GC-MS. En todos los modelos se utilizó la escala UV. QC: Control de calidad.

La identificación final de los metabolitos significativos en todas las comparaciones dio, como resultado, un total de 215 metabolitos en suero y heces. El número de metabolitos tras el pretratamiento y el análisis estadístico se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Número de metabolitos tras: A) el tratamiento de los datos, B) el análisis estadístico univariante y C) la anotación de metabolitos para el suero y las heces utilizando, LC-MS+, LC-MS-, CE-MS y GC-MS. *Los datos de GC-MS mostrados son en todos los casos señales identificadas. VIP: valores de importancia de la proyección variable; QA: *Quality Assurance*; KW: Kruskal-Wallis; UMW: U de Mann-Whitney; CMM: CEU Mass Mediator; WT_ns: ratones de WT con dieta de clara de huevo; WT_OVA: ratones de WT sensibilizados a la ovoalbúmina con dieta de clara de huevo; IgEki_ns: ratones IgEki con dieta de clara de huevo, IgEki_OVA: ratones IgEki sensibilizados a la ovoalbúmina con dieta de clara de huevo.

		LC-MS (+)		LC-MS (-)		CE-MS		GC-MS*		
		Suero	Heces	Suero	Heces	Suero	Heces	Suero	Heces	
A) Tratamiento de datos										
Señales iniciales		1814		1674		515	1431	176	437	
Señales tras un filtrado visual		1478		1473		384	1045	91	233	
QA y análisis multivariante (VIP)		697	912	948	923	380	1030	71	194	
B) Análisis estadístico univariante										
Compuestos significativos con KW		107	633	202	734	46	835	15	129	
		Comparaciones								
Compuestos significativos con UMW	WT_OVA vs WT_ns	6	135	12	103	1	227	0	6	
	IgEki_ns vs WT_ns	34	238	38	382	3	469	2	28	
	IgEki_OVA vs IgEki_ns	37	214	69	206	26	83	9	48	
	IgEki_OVA vs WT_OVA	20	214	26	282	9	426	2	31	
C) Identificación de metabolitos										
Basado en masa exacta y búsqueda web (CMM, NIST y Fienh)	WT_OVA vs WT_ns	1	32	3	15	0	24			
	IgEki_ns vs WT_ns	22	81	20	107	1	40			
	IgEki_OVA vs IgEki_ns	12	35	6	32	13	6			
	IgEki_OVA vs WT_OVA	7	73	6	106	4	57			
Basado en MS/MS y biblioteca interna CEMBIO	WT_OVA vs WT_ns	0	6	0	3	0	15	0	4	28
	IgEki_ns vs WT_ns	3	9	3	10	1	25	1	12	64
	IgEki_OVA vs IgEki_ns	3	1	1	2	8	4	9	18	46
	IgEki_OVA vs WT_OVA	1	10	0	7	3	34	2	20	77
										Total

Con el fin de obtener una imagen global del tipo de compuestos detectados se identificaron las clases bioquímicas de los metabolitos significativos para las heces y el suero, representándose en un gráfico de barras (**Figura 6**). Estos resultados indican que los ratones IgEki presentan mayor diversidad de clases afectadas en comparación con los WT, lo que indica que el grupo IgEki desarrolla una patología más grave. Además, se puede apreciar un aumento considerable de metabolitos séricos en los ratones IgEki_OVA cuando se les compara con su estado basal IgEki_ns. Por último, en la comparación IgEki_OVA vs WT_OVA, se observa un aumento muy significativo, tanto en número de metabolitos como de clases bioquímicas en IgEki_OVA.

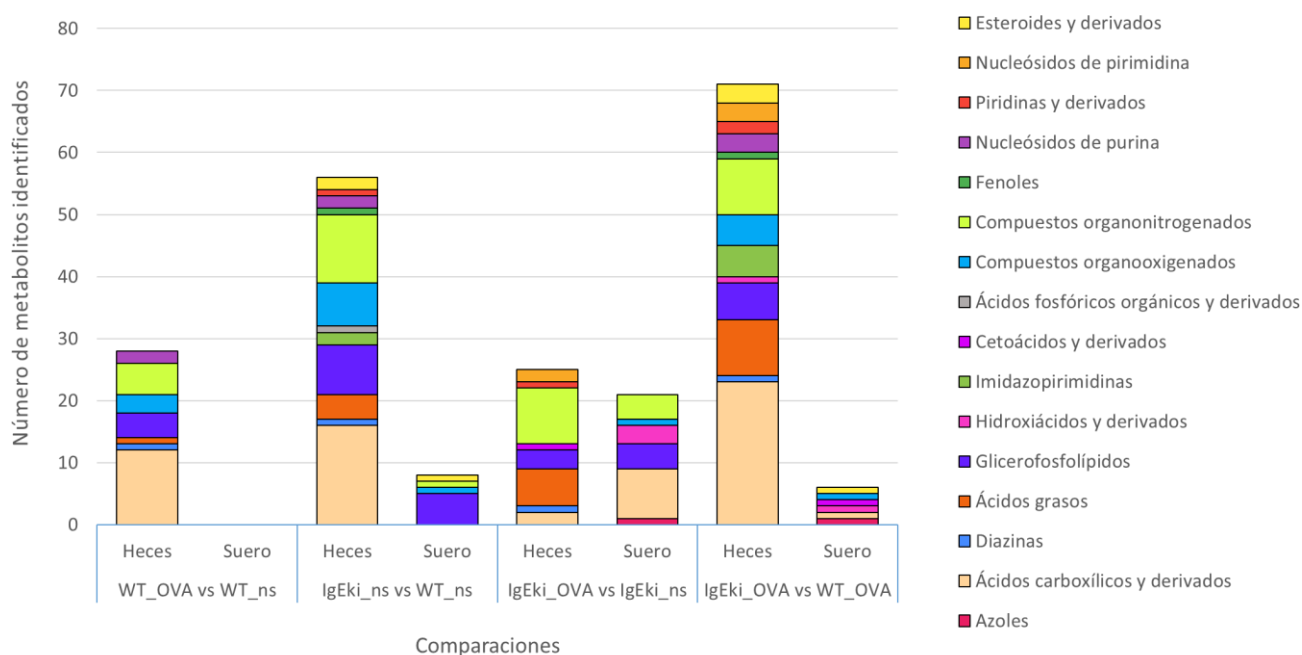


Figura 6. Gráfico de barras de las clases bioquímicas de los metabolitos finales y número de metabolitos en las cuatro comparaciones para heces y suero. Las categorías se obtuvieron de la web HMDB (<http://www.hmdb.ca/>).

5.3. El efecto de la sensibilización con OVA en ratones WT sugiere una alteración metabólica de la microbiota intestinal

La primera comparación analizada fue entre los grupos WT_OVA y WT_ns, con el fin de estudiar el efecto de la sensibilización con OVA en ratones WT. En esta comparación, solo se observaron diferencias claras en heces utilizando modelos de PLS-DA validados con un porcentaje de predicción (Q^2) de hasta el 89% (Figura 7).

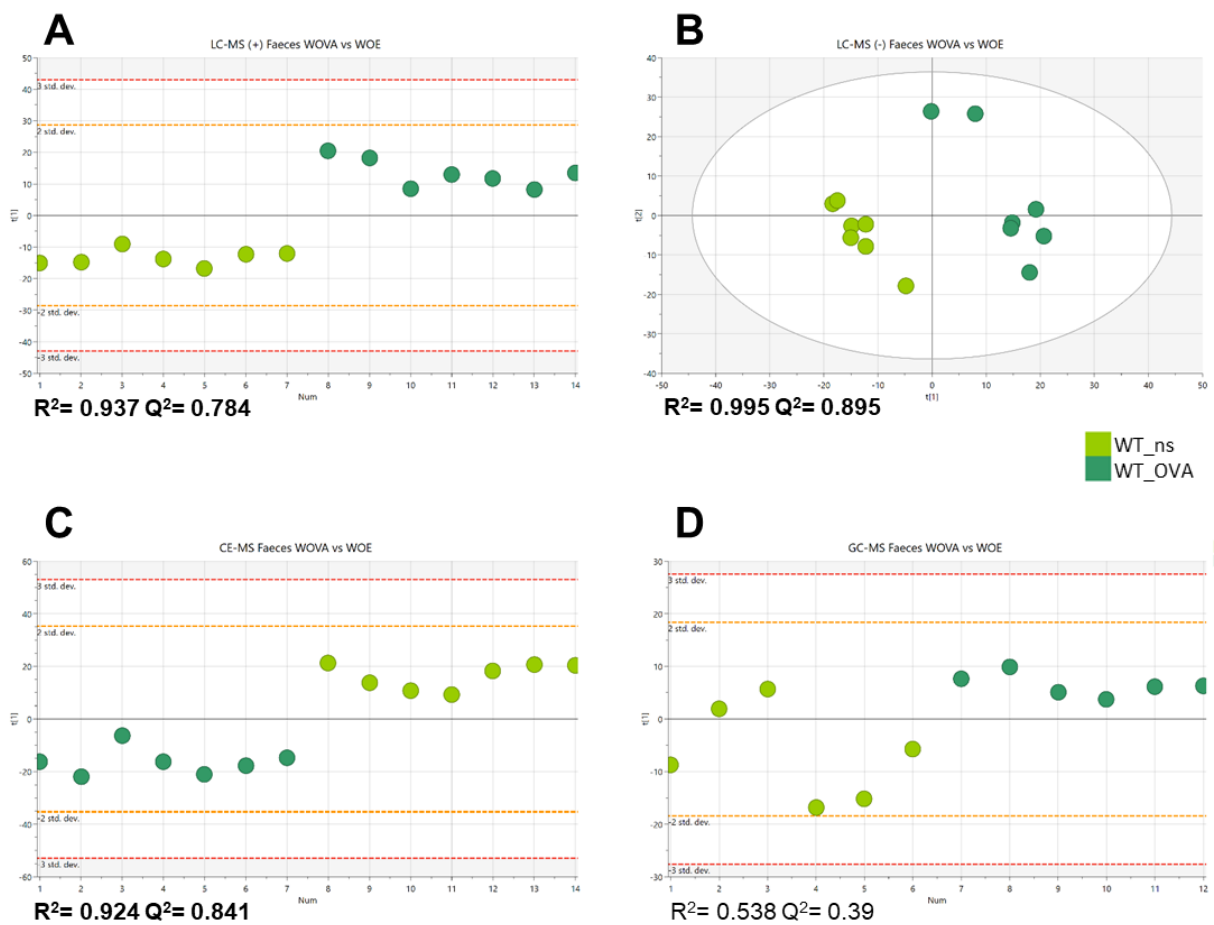


Figura 7. Modelos de análisis discriminante PLS-DA de las heces para la comparación WT_OVA vs WT_ns en A) LC-MS(+) B) LC-MS(-) C) CE-MS y D) GC-MS. En todos los modelos se utilizó el escalado UV. Los caracteres en negrita señalan parámetros de calidad adecuados para el modelo ($Q^2 > 0,5$)²³². R^2 explica la capacidad del modelo para clasificar las muestras y Q^2 explica la capacidad del modelo para predecir una nueva muestra. Para ambos, el valor teórico más alto es 1.

Se identificaron con exactitud un total de 28 metabolitos en heces y se representaron utilizando un *heatmap* con representación de agrupamiento jerárquico que permite la visualización de los datos de manera global (**Figura 8**).

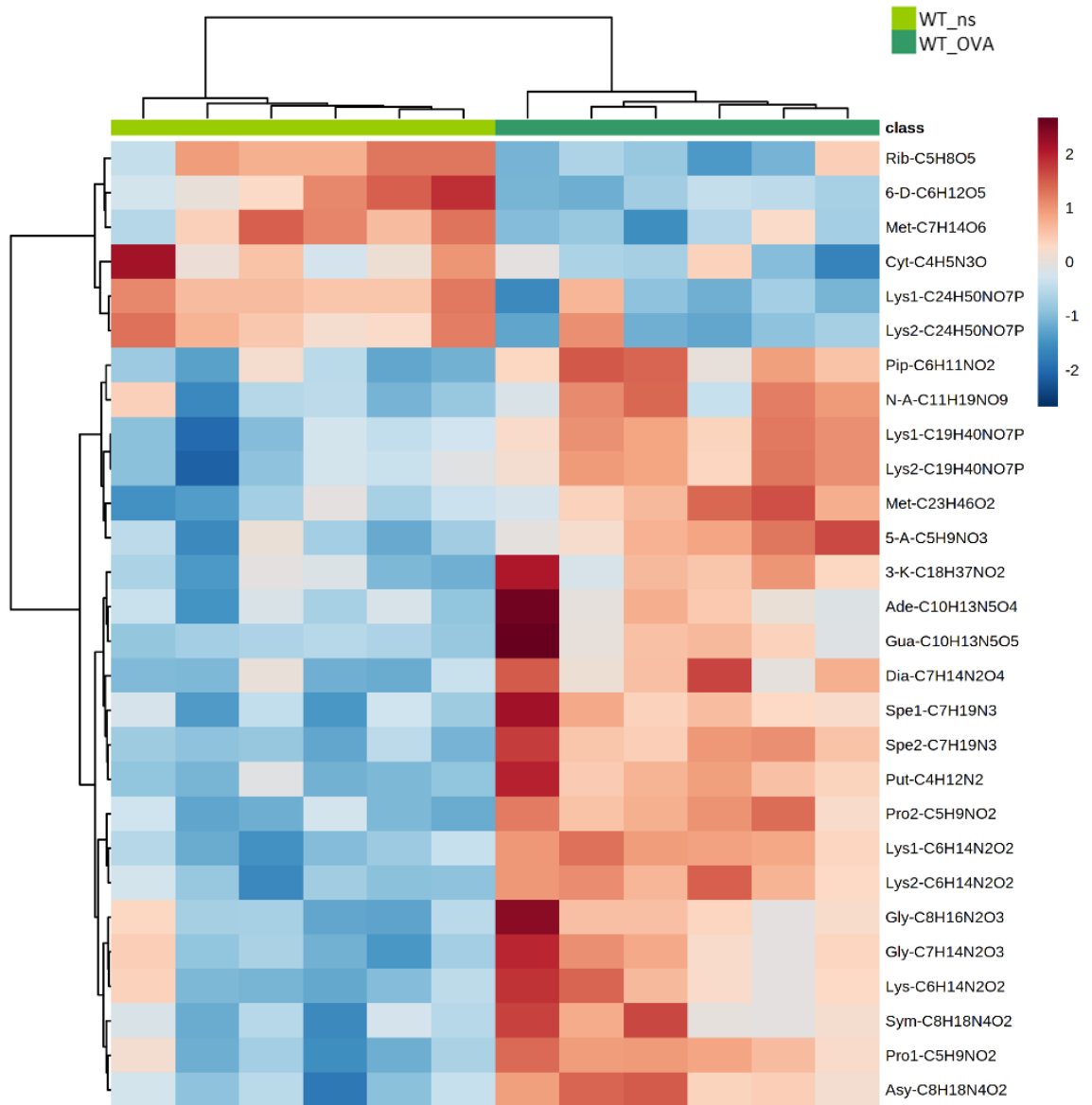


Figura 8. *Heatmap* utilizando la agrupación jerárquica de las muestras fecales (representadas en columnas) y los metabolitos (en filas) para los metabolitos significativos identificados considerando todas las técnicas entre los grupos WT_OVA y WT_ns. El color rojo representa un aumento del metabolito específico en esa muestra, mientras que el color azul representa una disminución de los metabolitos. Las muestras y los metabolitos se agrupan según su similitud. Nótese que se representan metabolitos estadísticamente significativos, para detectar la significación estadística se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni ($p < 0,05$) y los valores VIP (> 1).

A continuación, se seleccionaron los metabolitos con mayor relevancia biológica para su discusión. Las características bioquímicas, estadísticas y analíticas de los metabolitos significativos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Metabolitos significativos con mayor relevancia biológica entre los grupos WT_OVA y WT_ns. BI-CEMBIO: biblioteca interna del CEMBIO223.

Información del compuesto				Información estadística				Información analítica				
Matriz	Nombre	Fórmula	Código del <i>heatmap</i>	p valor (KW)	VIP	%Δ en WT_OVA	%RSD (QC)	Técnica	Aducto	Masa	RT (min)	Nivel de identificación
Heces	LysoPC (16:0)	C24H50NO7P	Lys1-C24H50NO7P	6.62E-04	1.63	-43%	7%	LC-MS (-)	[M+FA-H]-	495.3325	5.7	MS/MS
Heces	LysoPC (16:0)	C24H50NO7P	Lys2-C24H50NO7P	6.45E-04	1.59	-41%	5%	LC-MS (+)	[M+H]+	495.3327	5.7	MS/MS
Heces	Prolina	C5H9NO2	Pro1-C5H9NO2	2.11E-04	1.67	73%	3%	CE-MS	[M+H]+	115.0634	11.1	BI-CEMBIO
Heces	3-Ketosfinganina	C18H37NO2	3-K-C18H37NO2	3.69E-03	1.47	115%	5%	LC-MS (+)	[M+H]+	299.2825	5.7	MS/MS
Heces	LysoPE (14:0)	C19H40NO7P	Lys1-C19H40NO7P	1.04E-03	1.93	122%	3%	LC-MS (+)	[M+H]+	425.2549	4.9	MS/MS
Heces	Prolina	C5H9NO2	Pro2-C5H9NO2	5.09E-04	1.94	126%	7%	LC-MS (+)	[M+H]+	115.0643	0.3	MS/MS
Heces	LysoPE (14:0)	C19H40NO7P	Lys2-C19H40NO7P	8.69E-04	1.72	127%	6%	LC-MS (-)	[M+FA-H]-	379.2488	4.9	MS/MS
Heces	Espermidina	C7H19N3	Spe1-C7H19N3	1.97E-02	1.38	146%	3%	CE-MS	[M+H]+	145.1579	5.2	BI-CEMBIO
Heces	Espermidina	C7H19N3	Spe2-C7H19N3	1.32E-02	1.87	214%	5%	LC-MS (+)	[M+H]+	145.1574	0.3	MS/MS
Heces	Putrescina	C4H12N2	Put-C4H12N2	5.06E-04	1.43	526%	4%	CE-MS	[M+H]+	88.1004	5.4	BI-CEMBIO

Se observó que la mayoría de los cambios que afectaban al metabolismo de los lisofosfolípidos (e.g. LysoPE (14:0) y LysoPC (16:0)), las aminas (e.g. espermidina y putrescina), los esfingolípidos (e.g. 3-ketosfinganina) y los aminoácidos (prolina) aumentaban en WT_OVA respecto a WT_ns (**Figura 9**).

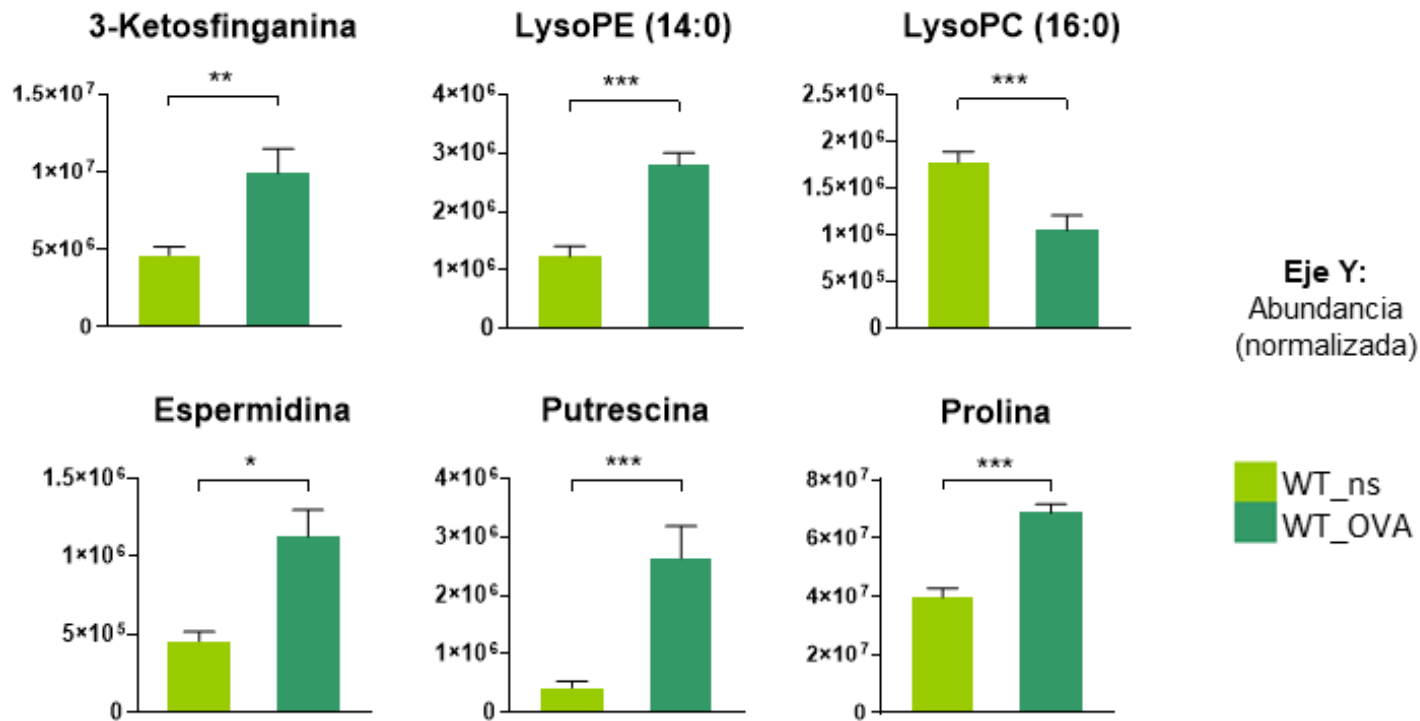


Figura 9. Figuras de abundancias relativas de los metabolitos anotados significativos con mayor relevancia biológica en las heces entre WT_OVA y WT_ns. Los *p* valores < 0,05, < 0,01 y < 0.001 fueron designados con *, ** y *** respectivamente y considerados significativos. Para detectar la significación estadística se utilizaron también los valores VIP (> 1).

En esta comparación las rutas metabólicas, de los metabolitos detectados, que se alteraron significativamente fueron el ciclo de la urea y el metabolismo de los glicoesfingolípidos (**Figura 10**). Por otro lado, No se obtuvo ningún modelo multivariante ni metabolitos significativos en suero, sugiriendo una alteración metabólica exclusivamente local.

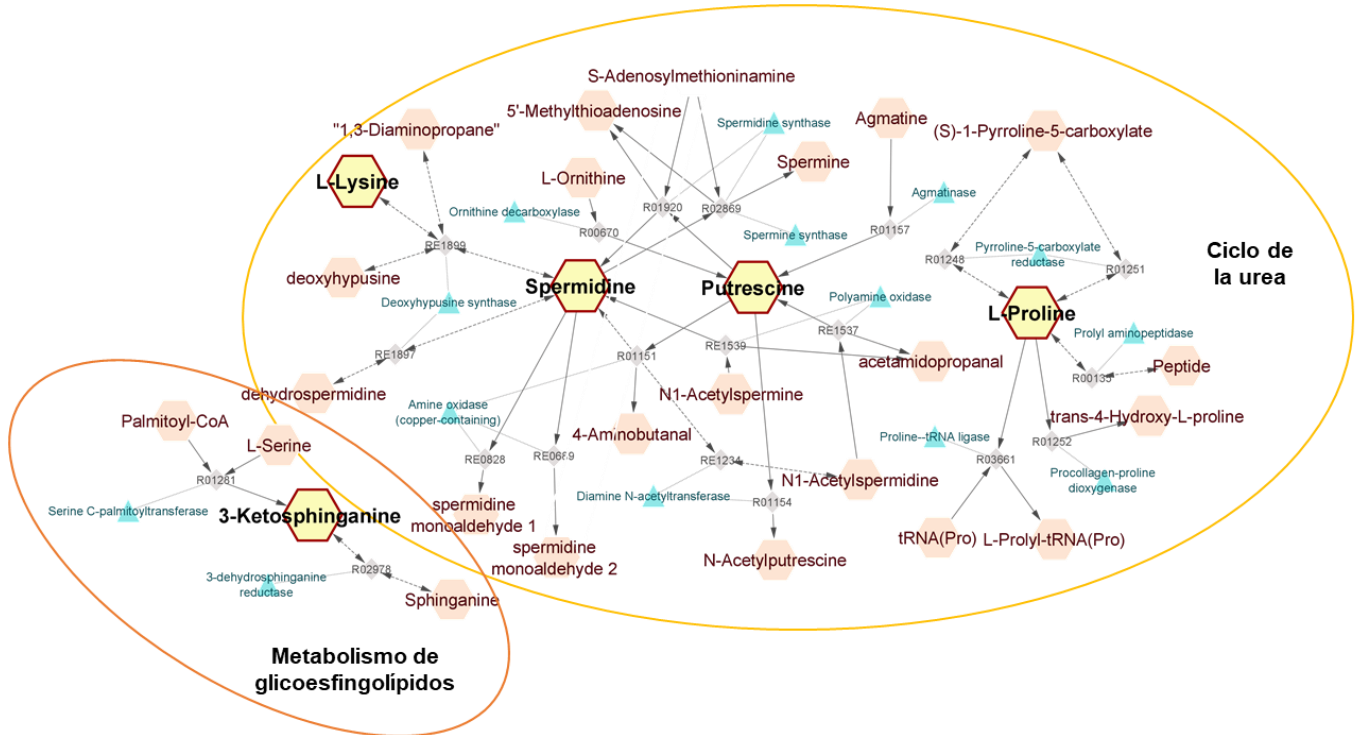


Figura 10. Rutas metabólicas significativas ($p < 0,05$) en heces en la comparación entre WT_OVA y WT_ns. Los hexágonos amarillos son los metabolitos significativamente alterados. El borde azul significa que disminuyen en esa comparación y el rojo que aumentan. Los hexágonos anaranjados son los metabolitos que participan en la ruta. Los diamantes grises son las reacciones que tienen lugar (detalladas en el **Anexo II**). Los triángulos azules son las enzimas que participan en cada una de las reacciones. Las elipses agrupan las diferentes rutas. Figura generada con Cytoscape.

5.4. La EA moderada altera el metaboloma local en mayor medida que el metaboloma sistémico

Para investigar el perfil metabólico del efecto de la IgE en ratones no sensibilizados, se compararon los niveles de metabolitos entre los grupos IgEki_ns y WT_ns. En esta comparación, se observaron claras diferencias en heces en todas las plataformas analíticas mediante modelos de PLS-DA validados con un Q^2 de hasta el 96% (**Figura 11**). En cuanto a las muestras de suero, no se pudieron obtener modelos significativos en estadísticas multivariantes entre los dos grupos no sensibilizados. Los metabolitos en muestras de suero y heces reflejan el metaboloma sistémico y local, respectivamente.

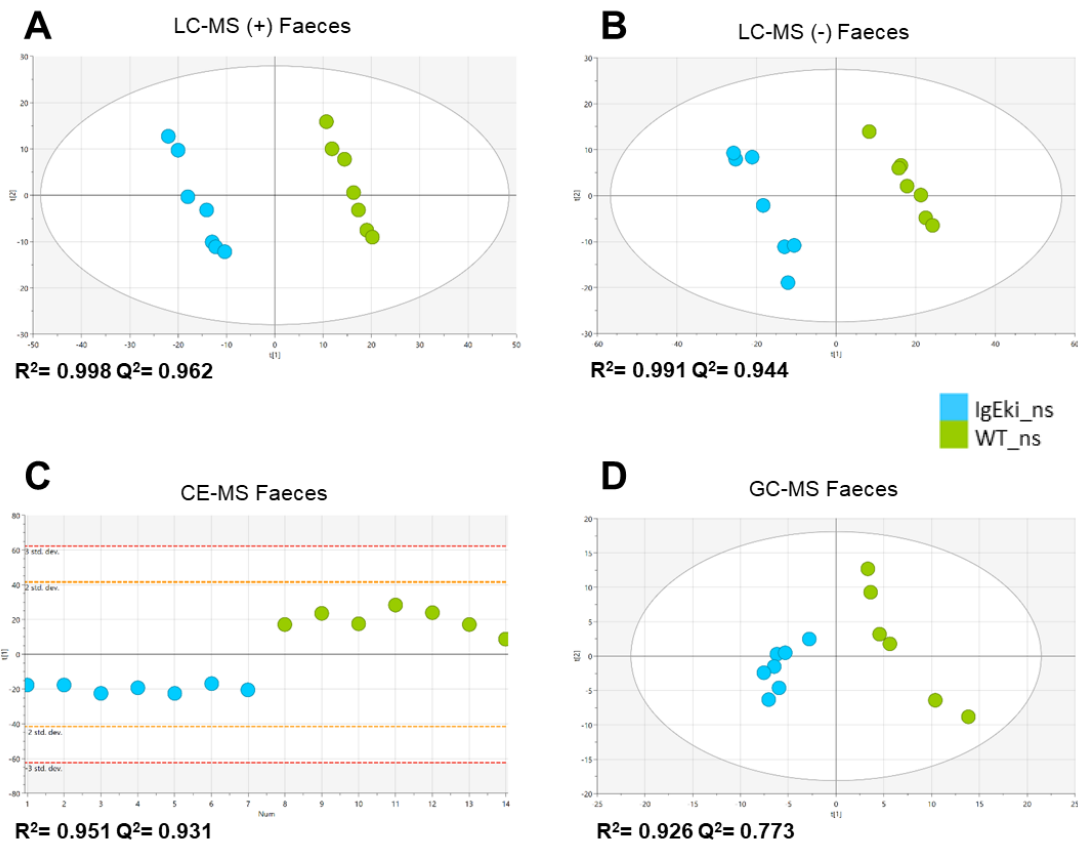


Figura 11. Modelos de análisis discriminante PLS-DA de las heces para la comparación IgEki_ns vs WT_ns en A) LC-MS(+) B) LC-MS(-) C) CE-MS y D) GC-MS. En todos los modelos se utilizó el escalado UV. Los caracteres en negrita señalan parámetros de calidad adecuados para el modelo ($Q^2 > 0,5$)²³². R^2 explica la capacidad del modelo para clasificar las muestras y Q^2 explica la capacidad del modelo para predecir una nueva muestra. Para ambos, el valor más alto es el que se acerca a 1.

En esta comparación se identificaron un total de 56 metabolitos en heces y 8 metabolitos en suero. Los metabolitos de las heces se representaron utilizando un *heatmap* con representación de agrupamiento jerárquico que mostró patrones metabólicos claros tanto en IgEki_ns como en WT_ns (**Figura 12**).

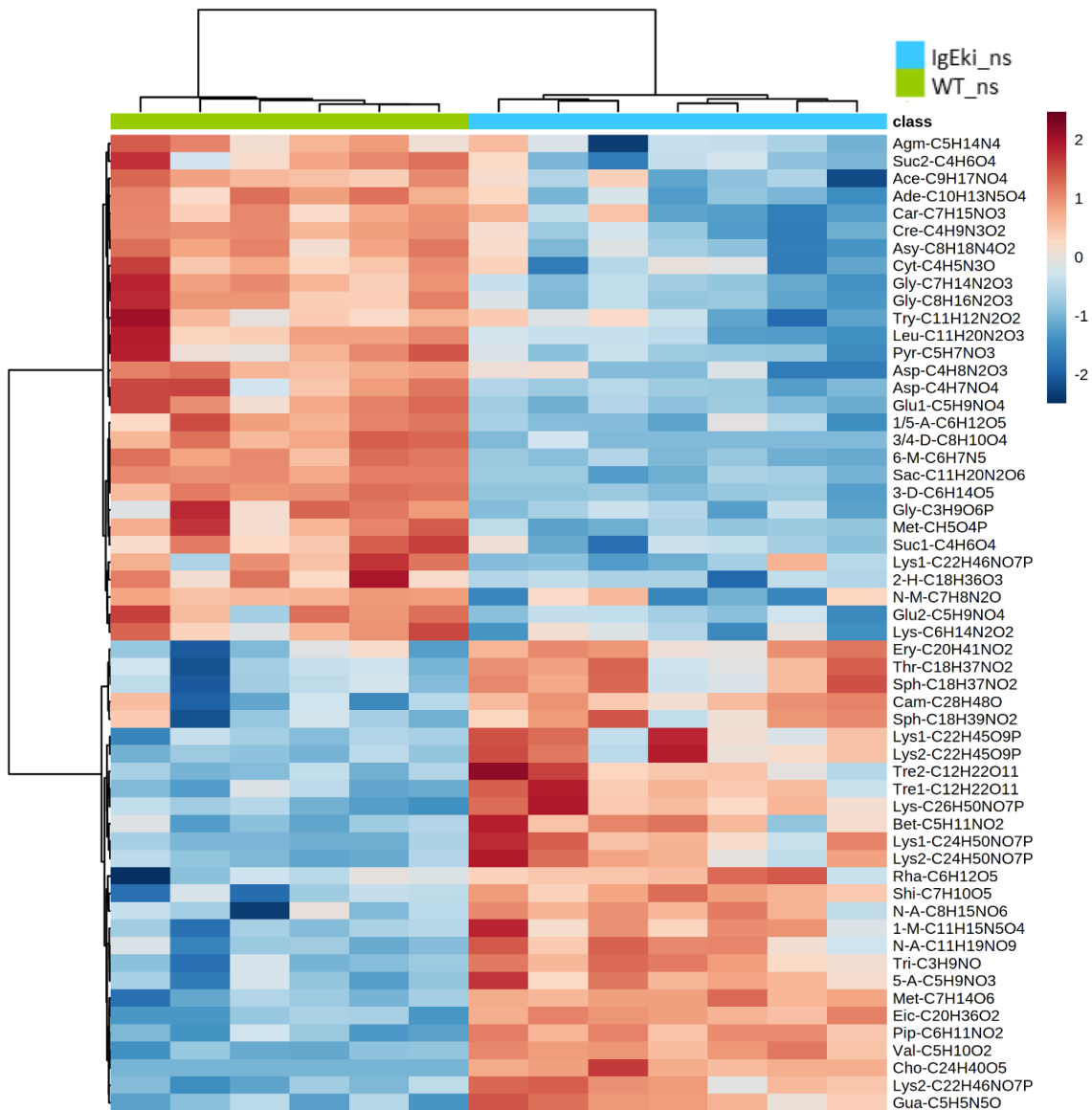


Figura 12. *Heatmap* utilizan la agrupación jerárquica de las muestras fecales (representadas en columnas) y los metabolitos (en filas) para los metabolitos significativos identificados considerando todas las técnicas entre los grupos IgEki_ns y WT_ns. El color rojo representa un aumento del metabolito específico en esa muestra, mientras que el color azul representa una disminución de los metabolitos. Las muestras y los metabolitos se agrupan según su similitud. Para detectar la significación estadística se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni ($p < 0,05$) y los valores VIP (> 1).

A continuación, se seleccionaron los metabolitos con mayor relevancia biológica. Las características bioquímicas, estadísticas y analíticas de los metabolitos significativos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Metabolitos significativos con mayor relevancia biológica entre los grupos IgEki_ns y WT_ns. BI-CEMBIO: biblioteca interna del CEMBIO223.

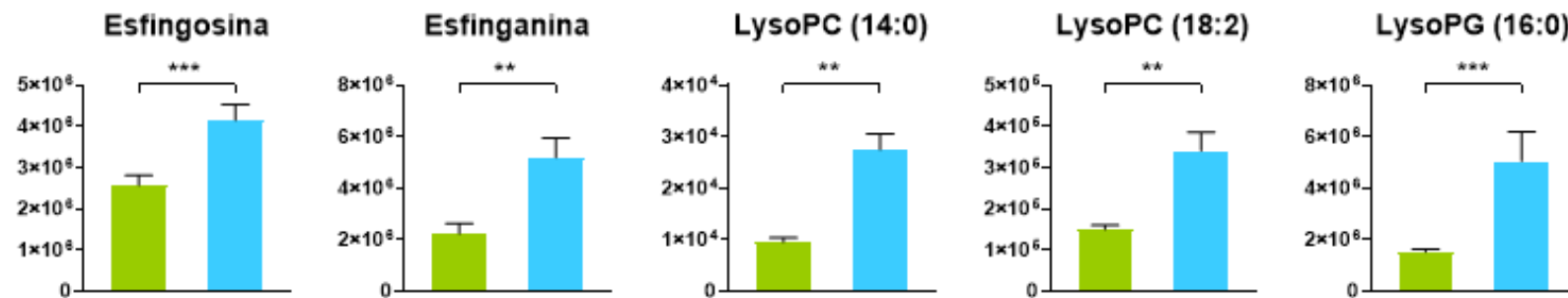
Información del compuesto				Información estadística				Información analítica				
Matriz	Nombre	Fórmula	Código del heatmap	p valor (KW)	VIP	%Δ en IgEki_ns	%RSD (QC)	Técnica	Aducto	Masa	RT (min)	Nivel de identificación
Heces	Ácido Aspártico	C4H7NO4	Asp-C4H7NO4	2.60E-04	1.07	-94%	4%	CE-MS	[M+H] ⁺	133.0378	11.7	BI-CEMBIO
Heces	Acetilcarnitina	C9H17NO4	Ace-C9H17NO4	1.49E-04	1.24	-77%	6%	CE-MS	[M+H] ⁺	203.1146	9.4	BI-CEMBIO
Heces	Ácido Succínico	C4H6O4	Suc1-C4H6O4	6.82E-04	1.48	-77%	9%	GC-MS			10.5	Fiehn + NIST
Heces	Glicerol 3-Fosfato	C3H9O6P	Gly-C3H9O6P	2.13E-04	1.48	-77%	6%	GC-MS			15.9	BI-CEMBIO
Heces	Ácido Glutámico	C5H9NO4	Glu1-C5H9NO4	1.00E-03	1.41	-74%	3%	CE-MS	[M+H] ⁺	147.0546	11.1	BI-CEMBIO
Heces	Agmatina	C5H14N4	Agm-C5H14N4	2.74E-03	-	-73%	26%	CE-MS	[M+H] ⁺	130.1218	5.8	BI-CEMBIO
Heces	Ácido Piroglutámico	C5H7NO3	Pyr-C5H7NO3	4.64E-04	1.17	-72%	8%	CE-MS	[M+H] ⁺	129.0424	20.1	BI-CEMBIO
Heces	Ácido Succínico	C4H6O4	Suc2-C4H6O4	8.96E-04	1.12	-55%	11%	LC-MS (-)	[M-H] ⁻	118.0266	0.2	MS/MS
Heces	Ácido Glutámico	C5H9NO4	Glu2-C5H9NO4	8.26E-04	1.28	-41%	5%	LC-MS (-)	[M-H] ⁻	147.0532	0.2	MS/MS
Heces	Esfingosina	C18H37NO2	Sph-C18H37NO2	8.25E-04	1.29	61%	2%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	299.2824	5.3	MS/MS
Heces	LysoPC (16:0)	C24H50NO7P	Lys1-C24H50NO7P	6.62E-04	1.25	103%	7%	LC-MS (-)	[M+FA-H] ⁻	495.3325	5.7	MS/MS
Heces	LysoPC (18:2)	C26H50NO7P	Lys-C26H50NO7P	1.00E-03	1.47	127%	10%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	519.3322	5.5	MS/MS
Heces	Esfinganina	C18H39NO2	Sph-C18H39NO2	2.12E-03	1.29	133%	4%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	301.2982	5.5	MS/MS
Heces	LysoPC (16:0)	C24H50NO7P	Lys2-C24H50NO7P	6.45E-04	1.32	158%	5%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	495.3327	5.7	MS/MS

Heces	LysoPC (14:0)	C22H46NO7P	Lys2-C22H46NO7P	1.78E-03	1.34	188%	25%	LC-MS (-)	[M+FA-H]-	467.3012	5.0	MS/MS
Heces	LysoPG (16:0)	C22H45O9P	Lys1-C22H45O9P	2.99E-03	1.22	192%	8%	LC-MS (+)	[M+H-H ₂ O]+	484.2816	5.7	MS/MS
Heces	LysoPG (16:0)	C22H45O9P	Lys2-C22H45O9P	9.70E-04	1.06	231%	17%	LC-MS (-)	[M-H]-	484.2801	5.7	MS/MS
Heces	Ácido Shikímico	C7H10O5	Shi-C7H10O5	1.95E-03	1.80	252%	6%	GC-MS			16.5	Fiehn + NIST
Heces	Ácido Valérico	C5H10O2	Val-C5H10O2	8.13E-05	1.82	1395%	10%	GC-MS			10.7	Fiehn + NIST
Suero	LysoPC (18:2)	C26H50NO7P	-	1.18E-02	-	89%	2%	LC-MS (+)	[M+H]+	519.3322	5.5	MS/MS
Suero	LysoPC (14:0)	C22H46NO7P	-	9.73E-03	-	97%	2%	LC-MS (-)	[M+FA-H]-	467.3014	5.0	MS/MS
Suero	LysoPC (14:0)	C22H46NO7P	-	1.35E-03	-	101%	3%	LC-MS (+)	[M+H]+	467.3014	5.1	MS/MS
Suero	LysoPE (18:1)	C23H46NO7P	-	2.98E-03	-	111%	3%	LC-MS (+)	[M+H]+	479.3017	5.8	MS/MS
Suero	LysoPG (16:0)	C22H45O9P	-	1.04E-02	-	133%	2%	LC-MS (-)	[M-H]-	484.2801	5.7	MS/MS

En las muestras de heces en los ratones IgEki_ns, se detectaron niveles más altos de esfingolípidos (esfingosina y esfinganina) y lisofosfolípidos (LysoPC (14:0), LysoPC (16:0) y LysoPG (16:0)), y niveles más bajos de acetilcarnitina, carnitina y aminoácidos (ácido aspártico y glutámico). Los metabolitos derivados de la microbiota intestinal, como los ácidos valérico y shikímico, también aumentaron en muestras de heces de ratones IgEki_ns. En cuanto a las muestras de suero, se detectaron niveles más altos de lisofosfolípidos (LysoPC (14:0), LysoPC (18:2), LysoPE (18:1) y LysoPG (16:0)) en ratones IgEki_ns, en comparación con ratones WT_ns.

En la **Figura 13** se muestran las figuras de abundancias relativas de los metabolitos significativos alterados implicados en la respuesta inflamatoria. El aumento en los niveles de esfingolípidos y lisofosfolípidos muestra una tendencia similar entre los grupos WT_OVA y IgEki_ns.

Heces



Suero

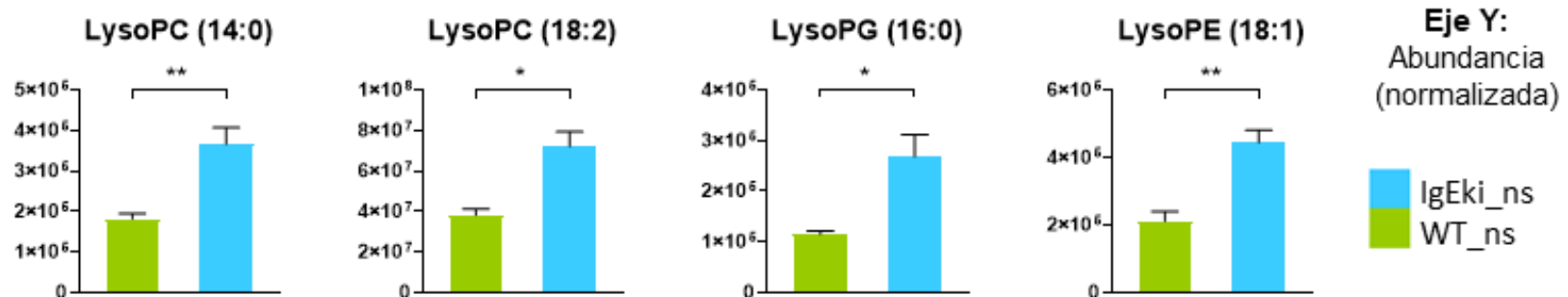


Figura 13. Figuras de abundancias relativas de los metabolitos anotados significativos con mayor relevancia biológica en inflamación entre IgEki_ns y WT_ns. Los *p* valores < 0,05, < 0,01 y < 0.001 fueron designados con *, ** y *** respectivamente y considerados significativos. Para detectar la significación estadística se utilizaron también los valores VIP (> 1).

En el análisis de rutas metabólicas se observaron alteraciones en las heces de los ratones IgEki_ns en el metabolismo de los glicerofosfolípidos, glicoesfingolípidos, la lisina y el ciclo de la urea ($p < 0,05$) (**Figura 14**).

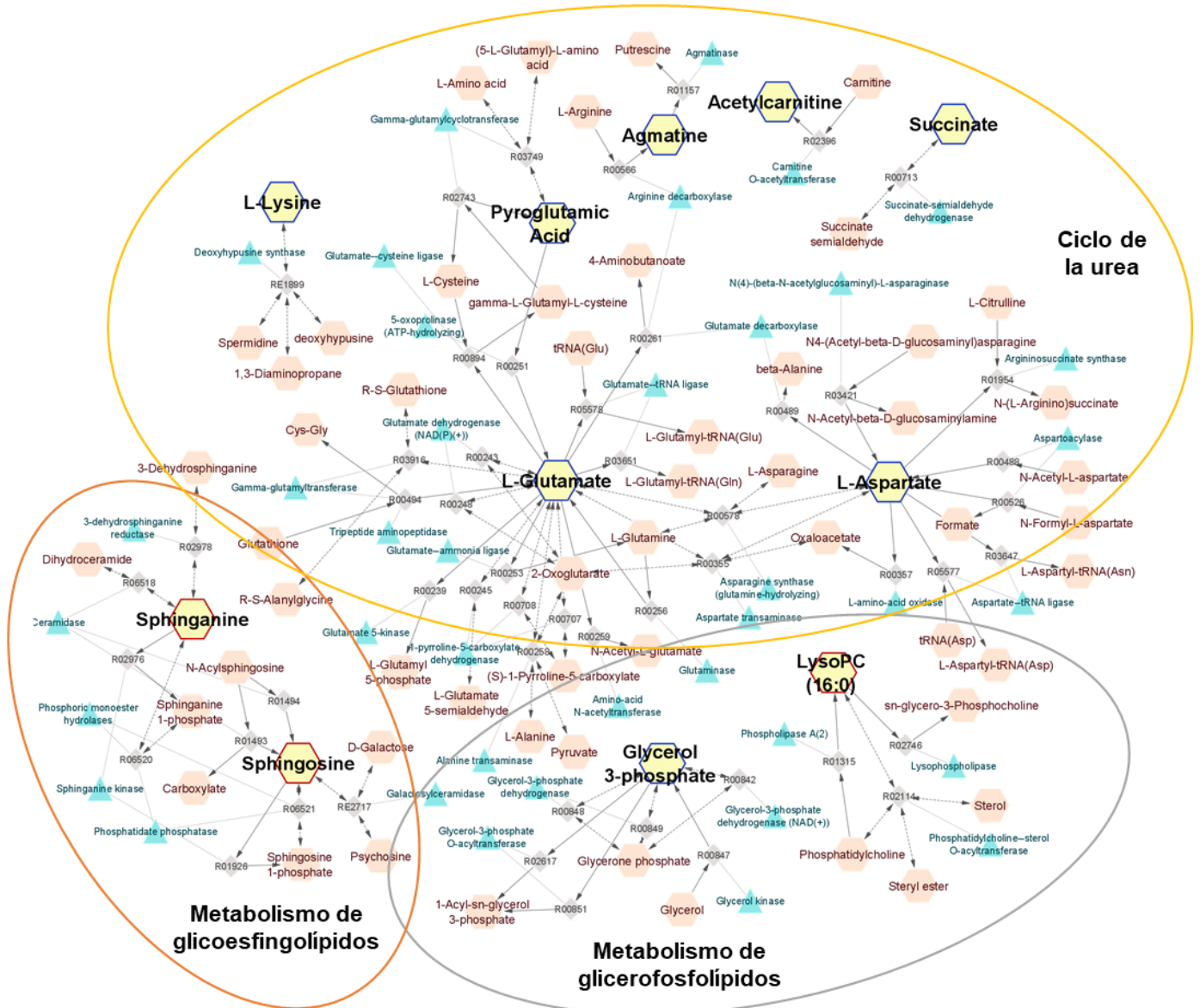


Figura 14. Rutas metabólicas significativas ($p < 0,05$) en heces en la comparación entre IgEki_ns y WT_ns. Los hexágonos amarillos son los metabolitos significativamente alterados. El borde azul significa que se disminuyen en esa comparación y el rojo que se aumentan. Los hexágonos anaranjados son los metabolitos que participan en la ruta. Los diamantes grises son las reacciones que tienen lugar (detalladas en el **Anexo III**). Los triángulos azules son las enzimas que participan en cada una de las reacciones. Las elipses agrupan las diferentes rutas. Figura generada con Cytoscape.

5.5. El efecto de la sensibilización con OVA en ratones IgEki apunta a una importante alteración metabólica a nivel sistémico

La tercera comparación, IgEki_OVA vs IgEki_ns, permite estudiar el efecto de la sensibilización con OVA en ratones IgEki. En esta comparación, se observaron claras diferencias en los modelos de PLS-DA validados de heces y suero para todas las técnicas con un Q² de hasta 79% y 81%, respectivamente (**Figura 15**).

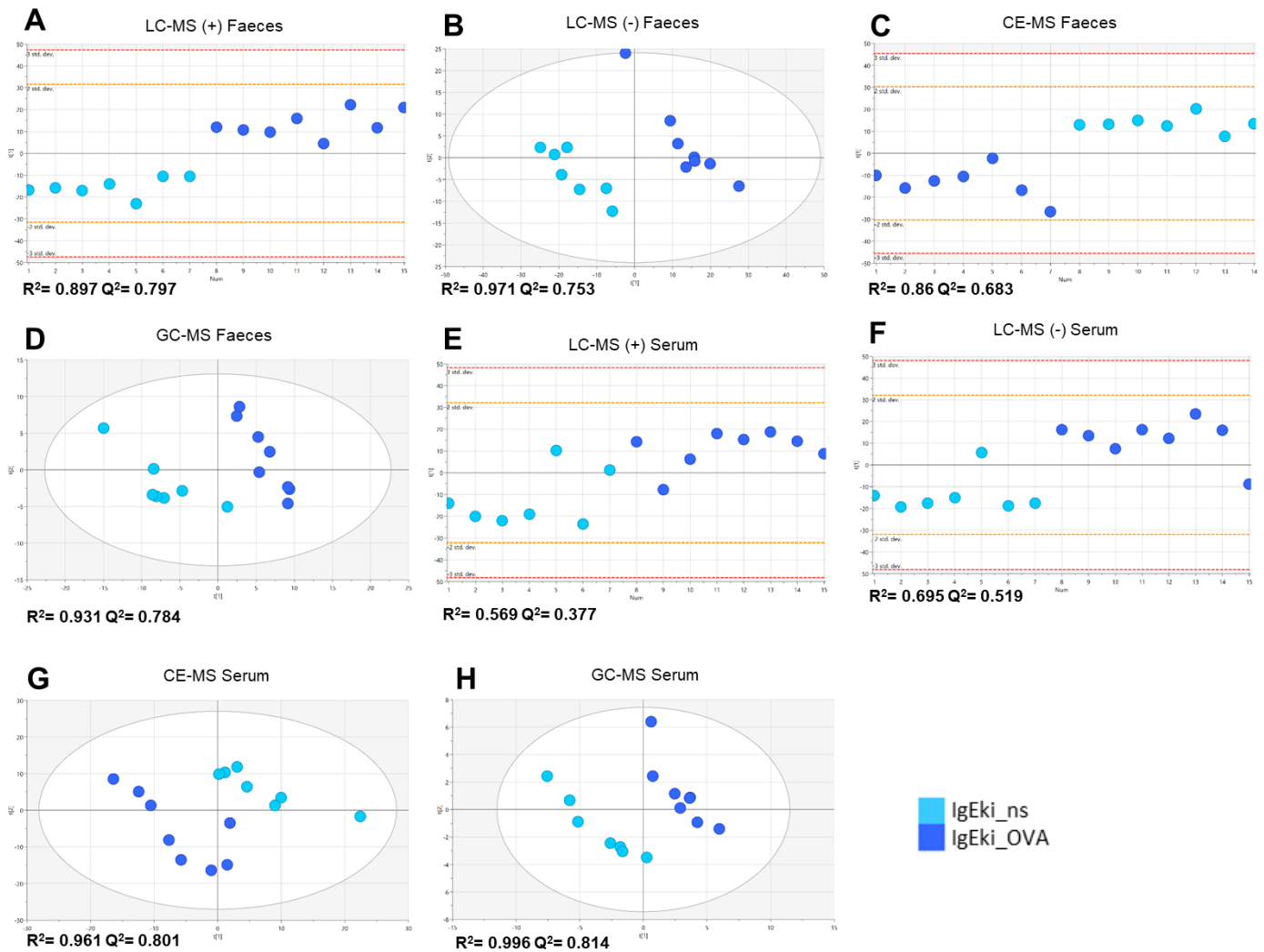


Figura 15. Modelos de análisis discriminante PLS-DA de A-D) heces E-H) suero para la comparación IgEki_OVA vs IgEki_ns en LC-MS(+), LC-MS(-), CE-MS y GC-MS. En todos los modelos se utilizó el escalado UV. Los caracteres en negrita señalan parámetros de calidad adecuados para el modelo (Q²>0,5)²³². R² explica la capacidad del modelo para clasificar las muestras y Q² explica la capacidad del modelo para predecir una nueva muestra. Para ambos, el valor más alto es el que se acerca a 1.

Se identificaron un total de 25 metabolitos en heces y 21 en suero que se representaron en *heatmaps* con representación de agrupamiento jerárquico facilitando la visualización de los datos (**Figura 16**).

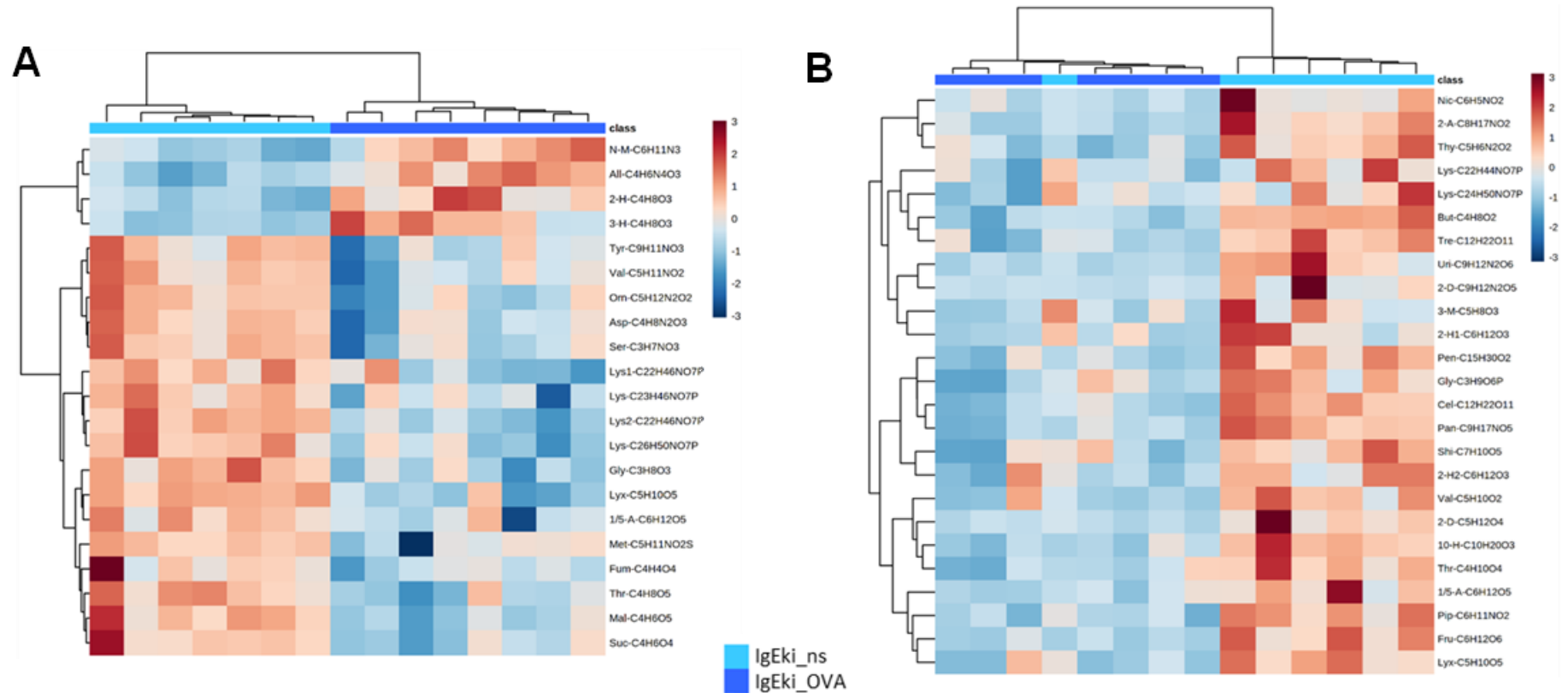


Figura 16. *Heatmaps* utilizando la agrupación jerárquica de las muestras de A) suero y B) heces (columnas) y los metabolitos (en filas) para los metabolitos significativos identificados considerando todas las técnicas entre los grupos IgEki_OVA y IgEki_ns. El color rojo representa un aumento del metabolito específico en esa muestra, mientras que el color azul representa una disminución de los metabolitos. Las muestras y los metabolitos se agrupan según su similitud. Para detectar la significación estadística se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni ($p < 0,05$) y los valores VIP (> 1).

A continuación, se seleccionaron los metabolitos con mayor relevancia biológica. Las características bioquímicas, estadísticas, y analíticas de los metabolitos significativos se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Metabolitos significativos con mayor relevancia biológica entre los grupos IgEki_OVA y IgEki_ns. BI-CEMBIO: biblioteca interna del CEMBIO223.

Información del compuesto				Información estadística				Información analítica				
Matriz	Nombre	Fórmula	Código del heatmap	p valor (KW)	VIP	%Δ en IgEki_OVA	%RSD (QC)	Técnica	Aducto	Masa	RT (min)	Nivel de identificación
Heces	Uridina	C9H12N2O6	Uri-C9H12N2O6	3.02E-03	1.33	-84%	4%	GC-MS			22.4	Fiehn + NIST
Heces	2-Deoxiuridina	C9H12N2O5	2-D-C9H12N2O5	2.90E-03	-	-83%	29%	GC-MS			21.6	Fiehn + NIST
Heces	Ácido Butírico	C4H8O2	But-C4H8O2	4.27E-04	1.61	-62%	10%	GC-MS			12.0	Fiehn + NIST
Heces	Ácido Valérico	C5H10O2	Val-C5H10O2	8.13E-05	1.30	-59%	10%	GC-MS			10.7	Fiehn + NIST
Heces	Glicerol 3-Fosfato	C3H9O6P	Gly-C3H9O6P	2.13E-04	1.25	-53%	6%	GC-MS			15.9	Fiehn + NIST
Heces	LysoPC (16:0)	C24H50NO7P	Lys-C24H50NO7P	6.62E-04	1.39	-51%	7%	LC-MS (-)	[M+FA-H] ⁻	495.3325	5.7	MS/MS
Heces	Ácido 2-Hydroxiisocapróico	C6H12O3	2-H2-C6H12O3	6.31E-03	1.17	-49%	8%	GC-MS			9.3	Fiehn + NIST
Heces	Timina	C5H6N2O2	Thy-C5H6N2O2	4.99E-03	1.60	-37%	5%	CE-MS	[M+H] ⁺	126.0427	19.0	BI-CEMBIO
Suero	Ácido Málico	C4H6O5	Mal-C4H6O5	3.49E-03	1.42	-68%	17%	GC-MS			12.7	Fiehn + NIST
Suero	LysoPC (14:0)	C22H46NO7P	Lys1-C22H46NO7P	1.35E-03	1.82	-61%	3%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	467.3014	5.1	MS/MS
Suero	Ornitina	C5H12N2O2	Orn-C5H12N2O2	2.26E-02	1.44	-58%	8%	CE-MS	[M+H] ⁺	132.0890	7.974	BI-CEMBIO

Suero	Ácido Succínico	C4H6O4	Suc-C4H6O4	2.90E-02	1.24	-51%	17%	GC-MS			10.4	Fiehn + NIST
Suero	Ácido Fumárico	C4H4O4	Fum-C4H4O4	2.75E-02	-	-46%	3%	GC-MS			10.9	Fiehn + NIST
Suero	LysoPC (18:2)	C26H50NO7P	Lys-C26H50NO7P	1.18E-02	1.63	-44%	2%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	519.3322	5.5	MS/MS
Suero	LysoPC (14:0)	C22H46NO7P	Lys2-C22H46NO7P	9.73E-03	1.47	-44%	2%	LC-MS (-)	[M+FA-H] ⁻	467.3014	5.0	MS/MS
Suero	LysoPE (18:1)	C23H46NO7P	Lys-C23H46NO7P	2.98E-03	-	-39%	3%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	479.3017	5.8	MS/MS
Suero	Ácido 2-Hidroxi- butírico	C4H8O3	2-H-C4H8O3	1.96E-02	1.71	132%	12%	GC-MS			7.8	Fiehn + NIST
Suero	N-Tau- Metilhistamina	C6H11N3	N-M-C6H11N3	7.60E-04	2.00	250%	3%	CE-MS	[M+H] ⁺	125.0951	5.8	BI-CEMBIO

En las muestras de heces en los ratones IgEki_OVA, se detectaron niveles más bajos de todos los metabolitos significativos en comparación con los ratones IgEki_ns. Entre ellos, lisofosfolípidos (LysoPC (16:0)), metabolitos derivados de la microbiota intestinal (ácidos valérico y butírico), bases nitrogenadas (timina) y nucleósidos (uridina). En cuanto a las muestras de suero, se detectaron niveles más bajos de lisofosfolípidos (LysoPC (14:0), LysoPC (18:2), y LysoPE (18:1)) y de metabolitos del ciclo de Krebs (ácido succínico y ácido fumárico) en ratones IgEki_OVA. Cabe destacar los niveles aumentados de N-tau-metilhistamina en el suero de ratones IgEki_OVA.

En la **Figura 17** se muestran las abundancias relativas de los metabolitos significativos implicados en la alteración intestinal y la respuesta inflamatoria.

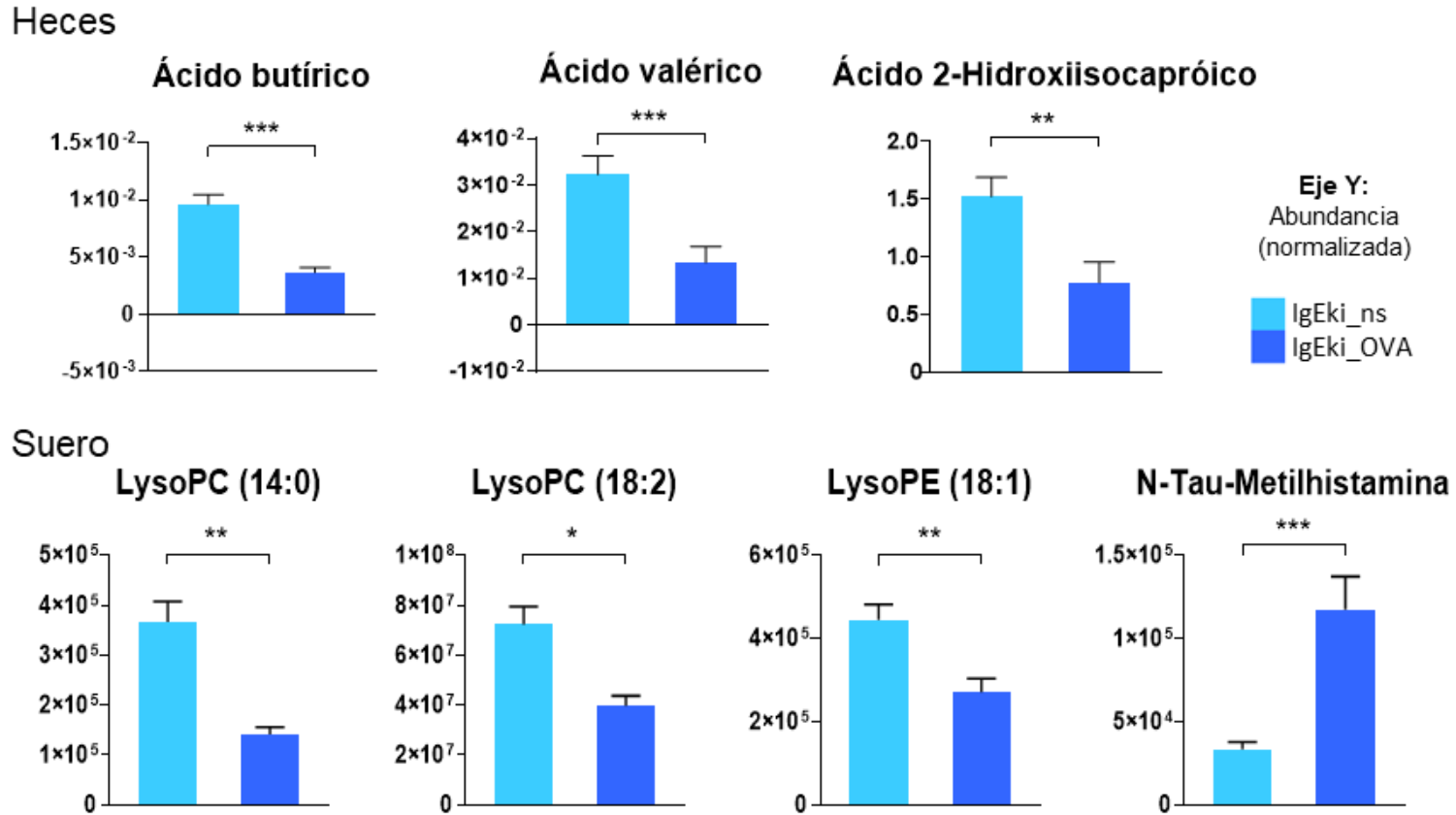


Figura 17. Figuras de abundancias relativas de los metabolitos anotados significativos con mayor relevancia biológica en alteración intestinal e inflamación entre IgEki_OVA y IgEki_ns. Los *p* valores < 0,05, < 0,01 y < 0.001 fueron designados con *, ** y *** respectivamente y considerados significativos. Para detectar la significación estadística se utilizaron también los valores VIP (> 1).

En esta comparación, se detectaron niveles más bajos de lisofosfolípidos, esfingolípidos y ácido butírico en muestras fecales, lo que podría ser indicativo de alteración intestinal. Asimismo, en esta comparación fueron significativas varias rutas metabólicas relacionadas con la microbiota intestinal: metabolismo del ácido butírico, metabolismo de los glicerofosfolípidos y metabolismo de la pirimidina ($p < 0,05$) (**Figura 18**).

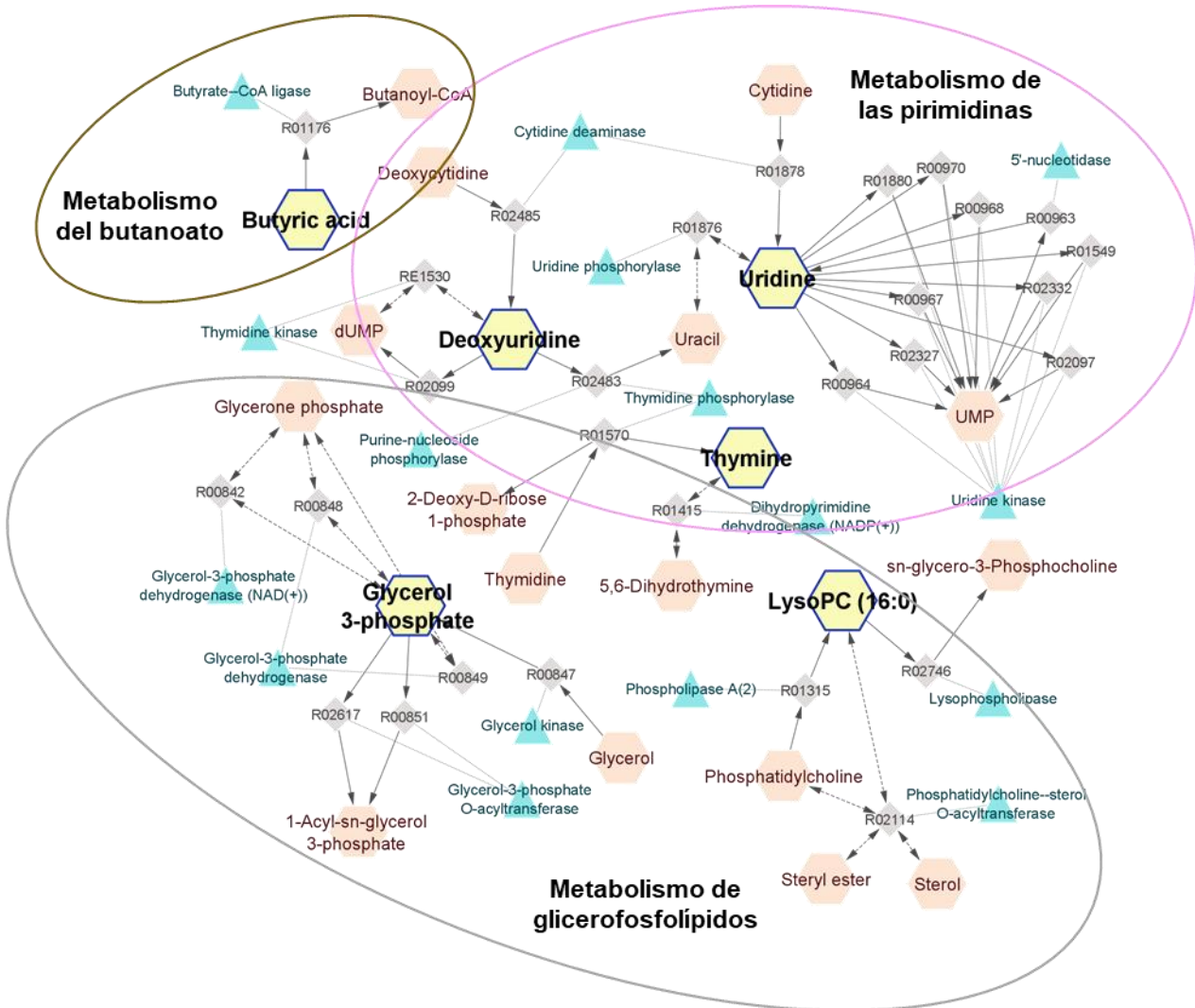


Figura 18. Rutas metabólicas significativas ($p < 0,05$) en heces en la comparación entre IgEki_OVA y IgEki_ns. Los hexágonos amarillos son los metabolitos significativamente alterados. El borde azul significa que se disminuyen en esa comparación y el rojo que se aumentan. Los hexágonos anaranjados son los metabolitos que participan en la ruta. Los diamantes grises son las reacciones que tienen lugar (detalladas en el **Anexo IV**). Los triángulos azules son las enzimas que participan en cada una de las reacciones. Las elipses agrupan las diferentes rutas. Figura generada con Cytoscape.

El número de compuestos encontrados en suero fue mayor que las comparaciones anteriores. En IgEki_OVA se observaron niveles disminuidos de lisofosfolípidos (LysoPC (14:0), LysoPC (18:2), y LysoPE (18:1)), aminoácidos (ornitina) y metabolitos del ciclo de Krebs (ácidos málico, succínico y fumárico) en comparación con IgEki_ns. Por otro lado, la N-tau-metilhistamina apareció significativamente aumentada en IgEki_OVA. Las rutas metabólicas alteradas fueron las del butanoato, el ciclo de Krebs, el ciclo de la urea y la glucólisis y gluconeogénesis (**Figura 19**).

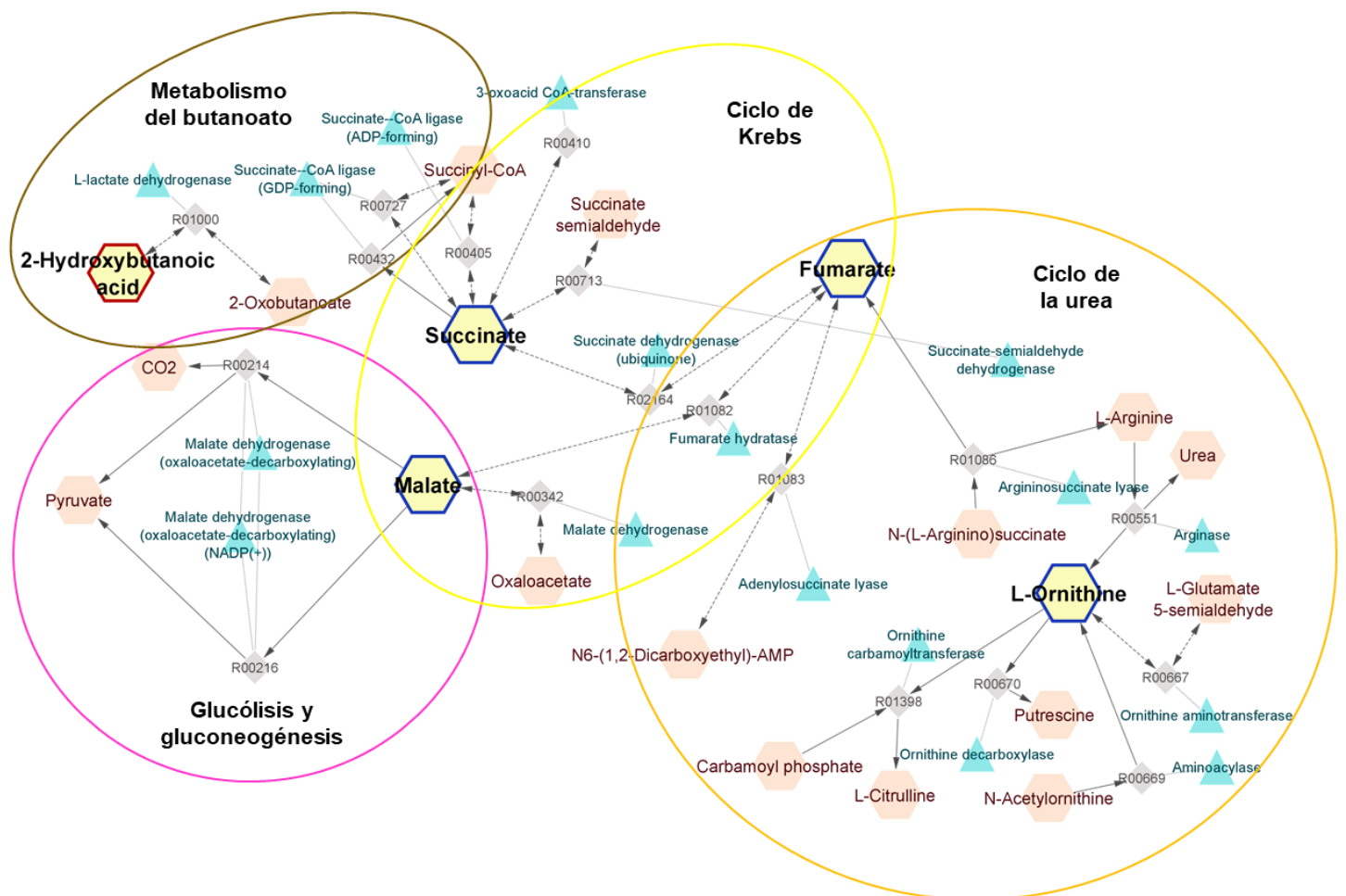


Figura 19. Rutas metabólicas significativas ($p < 0,05$) en suero en la comparación entre IgEki_OVA y IgEki_ns. Los hexágonos amarillos son los metabolitos significativamente alterados. El borde azul significa que disminuyen en esa comparación y el rojo que aumentan. Los hexágonos anaranjados son los metabolitos que participan en la ruta. Los diamantes grises son las reacciones que tienen lugar (detalladas en el **Anexo V**). Los triángulos azules son las enzimas que participan en cada una de las reacciones. La figura generada con Cytoscape.

5.6. La EA grave altera los metabolomas sistémicos y locales

Por último, se analizó la influencia de la IgE en ratones sensibilizados en los metabolomas intestinal y sérico comparando los grupos de ratones IgEki_OVA y WT_OVA. En esta comparación se observaron claras diferencias entre los grupos sensibilizados a OVA, tanto en muestras de heces como de suero, en todas las plataformas analíticas mediante modelos de PLS-DA validados con un Q^2 de hasta el 95% y el 89%, respectivamente (**Figura 20**).

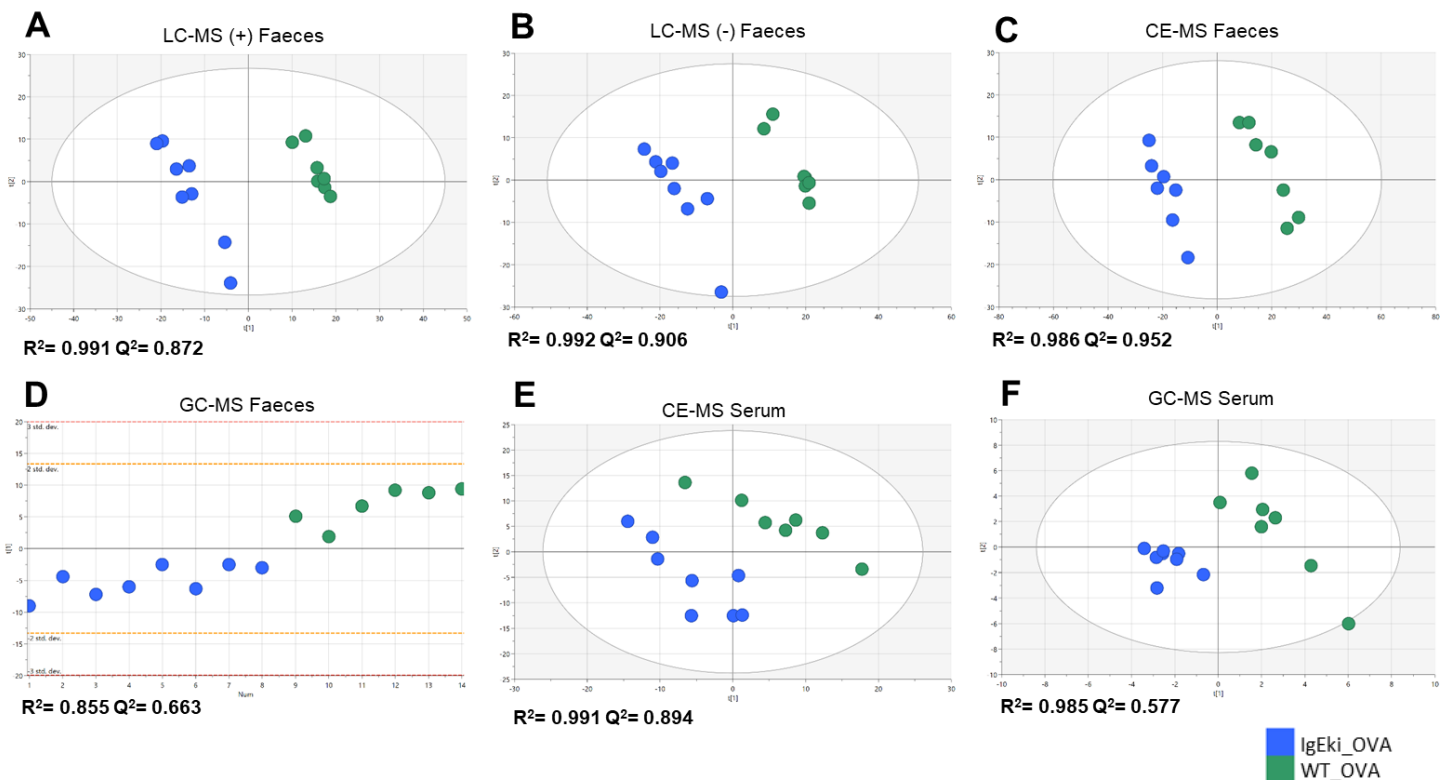


Figura 20. Modelos de análisis discriminante PLS-DA para la comparación IgEki_OVA vs WT_OVA de las muestras de A-D) heces en LC-MS(+), LC-MS(-), CE-MS and GC-MS y E-F) suero en CE-MS y GC-MS. En todos los modelos se utilizó el escalado UV. Los caracteres en negrita señalan parámetros de calidad adecuados para el modelo ($Q^2 > 0,5$)²³². R^2 explica la capacidad del modelo para clasificar las muestras y Q^2 explica la capacidad del modelo para predecir una nueva muestra. Para ambos, el valor más alto es el que se acerca a 1.

En esta comparación se obtuvieron 77 metabolitos, tal y como se muestra en la Tabla 2. Entre estos, se encontraron 71 metabolitos en heces y 6 metabolitos en suero. Los metabolitos de las heces se representaron utilizando un *heatmap* con representación de agrupamiento jerárquico (**Figura 21**).

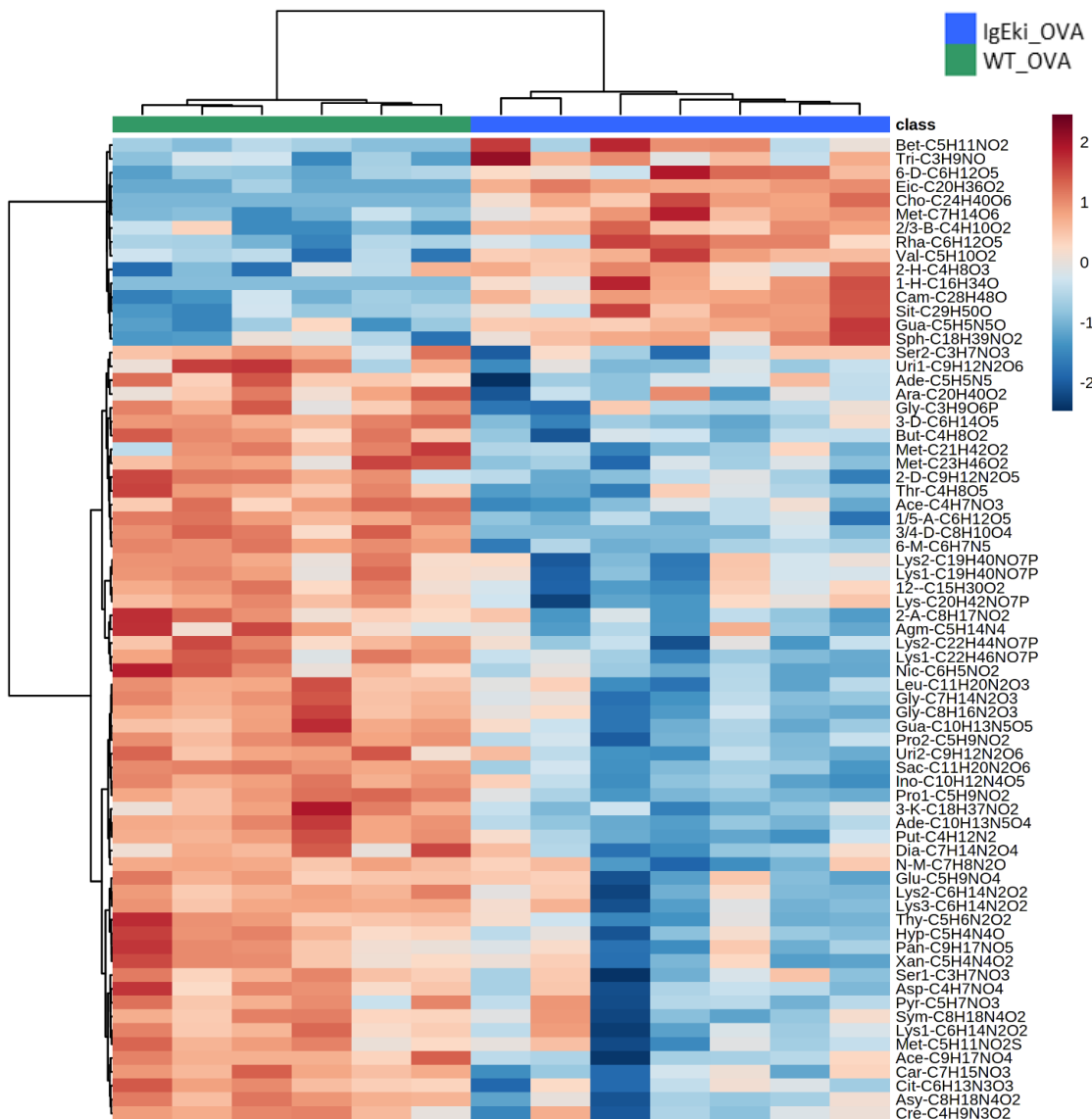


Figura 21. *Heatmap* utilizando la agrupación jerárquica de las muestras fecales (representadas en columnas) y los metabolitos (en filas) para los metabolitos significativos identificados considerando todas las técnicas entre los grupos IgEki_OVA y WT_OVA. El color rojo representa un aumento del metabolito específico en esa muestra, mientras que el color azul representa una disminución de los metabolitos. Las muestras y los metabolitos se agrupan según su similitud. Para detectar la significación estadística se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni ($p < 0,05$) y los valores VIP (> 1).

A continuación, se seleccionaron los metabolitos con mayor relevancia biológica para su discusión. Las características bioquímicas, estadísticas y analíticas de los metabolitos significativos se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Metabolitos significativos con mayor relevancia biológica entre los grupos IgEki_OVA y WT_OVA. BI-CEMBIO: biblioteca interna del CEMBIO223.

Información del compuesto				Información estadística				Información analítica				
Matriz	Nombre	Fórmula	Código del <i>heatmap</i>	p valor (KW)	VIP	%Δ en IgEki_OVA	%RSD (QC)	Técnica	Aducto	Masa	RT (min)	Nivel de identificación
Heces	Putrescina	C4H12N2	Put-C4H12N2	5.06E-04	1.23	-90%	4%	CE-MS	[M+H] ⁺	88.1004	5.4	BI-CEMBIO
Heces	Agmatina	C5H14N4	Agm-C5H14N4	2.74E-03	1.03	-86%	26%	CE-MS	[M+H] ⁺	130.1218	5.8	BI-CEMBIO
Heces	Guanosina	C10H13N5O5	Gua-C10H13N5O5	2.85E-04	1.05	-86%	4%	CE-MS	[M+H] ⁺	283.0933	13.0	BI-CEMBIO
Heces	Uridina	C9H12N2O6	Uri1-C9H12N2O6	3.02E-03	1.48	-86%	4%	GC-MS			22.4	Fiehn + NIST
Heces	Ácido Aspártico	C4H7NO4	Asp-C4H7NO4	2.60E-04	1.10	-84%	4%	CE-MS	[M+H] ⁺	133.0378	11.7	BI-CEMBIO
Heces	LysoPE (17:0)	C22H46NO7P	Lys1-C22H46NO7P	1.97E-04	1.63	-83%	3%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	467.3016	5.8	MS/MS
Heces	Inosina	C10H12N4O5	Ino-C10H12N4O5	6.80E-04	1.36	-82%	5%	CE-MS	[M+H] ⁺	268.0807	17.8	BI-CEMBIO
Heces	Adenosina	C10H13N5O4	Ade-C10H13N5O4	4.06E-05	1.38	-81%	5%	CE-MS	[M+H] ⁺	267.0990	10.3	BI-CEMBIO
Heces	2-Deoxyuridine	C9H12N2O5	2-D-C9H12N2O5	2.90E-03	1.82	-81%	29%	GC-MS			21.6	Fiehn + NIST
Heces	Ácido Butírico	C4H8O2	But-C4H8O2	4.27E-04	1.96	-68%	10%	GC-MS			12.0	Fiehn + NIST
Heces	Acetilcarnitina	C9H17NO4	Ace-C9H17NO4	1.49E-04	1.29	-67%	6%	CE-MS	[M+H] ⁺	203.1146	9.4	BI-CEMBIO
Heces	Prolina	C5H9NO2	Pro1-C5H9NO2	5.09E-04	1.81	-66%	7%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	115.0643	0.3	MS/MS

Heces	Prolina	C5H9NO2	Pro2-C5H9NO2	2.11E-04	1.48	-60%	3%	CE-MS	[M+H] ⁺	115.0634	11.1	BI-CEMBIO
Heces	LysoPE (17:1)	C22H44NO7P	Lys2-C22H44NO7P	2.85E-03	1.55	-59%	3%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	465.2855	5.5	MS/MS
Heces	Citrulina	C6H13N3O3	Cit-C6H13N3O3	1.15E-03	1.26	-55%	4%	CE-MS	[M+H] ⁺	175.0966	11.3	BI-CEMBIO
Heces	Adenina	C5H5N5	Ade-C5H5N5	1.40E-02	1.04	-55%	3%	CE-MS	[M+H] ⁺	135.0548	8.3	BI-CEMBIO
Heces	3-Ketosfingalina	C18H37NO2	3-K-C18H37NO2	3.69E-03	1.36	-55%	5%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	299.2825	5.7	MS/MS
Heces	Hipoxantina	C5H4N4O	Hyp-C5H4N4O	4.17E-03	1.27	-53%	4%	CE-MS	[M+H] ⁺	136.0395	12.1	BI-CEMBIO
Heces	Lisina	C6H14N2O2	Lys1-C6H14N2O2	4.01E-03	1.13	-53%	3%	CE-MS	[M+H] ⁺	146.1057	7.6	BI-CEMBIO
Heces	Ácido Piroglutámico	C5H7NO3	Pyr-C5H7NO3	4.64E-04	1.09	-49%	8%	CE-MS	[M+H] ⁺	129.0424	20.1	BI-CEMBIO
Heces	Timina	C5H6N2O2	Thy-C5H6N2O2	4.99E-03	1.29	-44%	5%	CE-MS	[M+H] ⁺	126.0427	19.0	BI-CEMBIO
Heces	LysoPE (14:0)	C19H40NO7P	Lys1-C19H40NO7P	8.69E-04	1.30	-44%	6%	LC-MS (-)	[M+FA-H] ⁻	379.2488	4.9	MS/MS
Heces	LysoPE (14:0)	C19H40NO7P	Lys2-C19H40NO7P	1.04E-03	1.42	-40%	3%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	425.2549	4.9	MS/MS
Heces	LysoPE (15:0)	C20H42NO7P	Lys-C20H42NO7P	4.82E-03	1.44	-39%	2%	LC-MS (+)	[M+H] ⁺	439.2700	5.3	MS/MS
Heces	Xantina	C5H4N4O2	Xan-C5H4N4O2	4.02E-02	1.20	-39%	4%	CE-MS	[M+H] ⁺	152.0339	17.8	BI-CEMBIO
Heces	Ácido Glutámico	C5H9NO4	Glu-C5H9NO4	8.26E-04	1.25	-36%	5%	LC-MS (-)	[M-H] ⁻	147.0532	0.2	MS/MS
Heces	Uridina	C9H12N2O6	Uri2-C9H12N2O6	6.26E-03	1.30	-33%	4%	LC-MS (-)	[M-H] ⁻	244.0695	0.2	MS/MS
Heces	Ácido 2-Hidroxibutírico	C4H8O3	2-H-C4H8O3	1.22E-02	1.49	250%	9%	GC-MS			7.8	Fiehn + NIST
Heces	Guanina	C5H5N5O	Gua-C5H5N5O	1.63E-04	1.04	462%	4%	CE-MS	[M+H] ⁺	151.0512	8.9	BI-CEMBIO
Heces	2,3-Butanodiol	C4H10O2	2/3-B-C4H10O2	7.70E-04	1.23	3424%	6%	GC-MS			6.6	Fiehn + NIST
Heces	Ácido Eicosadienoico	C20H36O2	Eic-C20H36O2	2.69E-05	1.36	120598%	4%	LC-MS (-)	[M-H] ⁻	308.2715	7.5	MS/MS

Suero	N-Tau-Metilhistamina	C6H11N3	-	7.60E-04	2.01	146%	3%	CE-MS	[M+H] ⁺	125.0951	5.8	BI-CEMBIO
Suero	Ácido 3-Hidroxibutírico	C4H8O3	-	5.17E-03	1.59	766%	13%	GC-MS			8.3	Fiehn + NIST

En las muestras de heces en los ratones IgEki_OVA, se detectaron niveles más bajos de las lisofosfatidiletanolaminas (LysoPE (17:0), LysoPE (17:1), LysoPE (14:0), LysoPE (15:0)), de ácido butírico y de nucleósidos (uridina y guanosina). Sin embargo, otros metabolitos derivados de la microbiota intestinal, como el 2,3-Butanodiol y el ácido 2-Hidroxibutírico, y bases nitrogenadas (Guanina), aumentaron. En cuanto a las muestras de suero, se detectaron niveles aumentados de N-tau-metilhistamina en los ratones IgEki_OVA.

En la **Figura 22** se muestran las abundancias relativas de los metabolitos significativos alterados seleccionados.

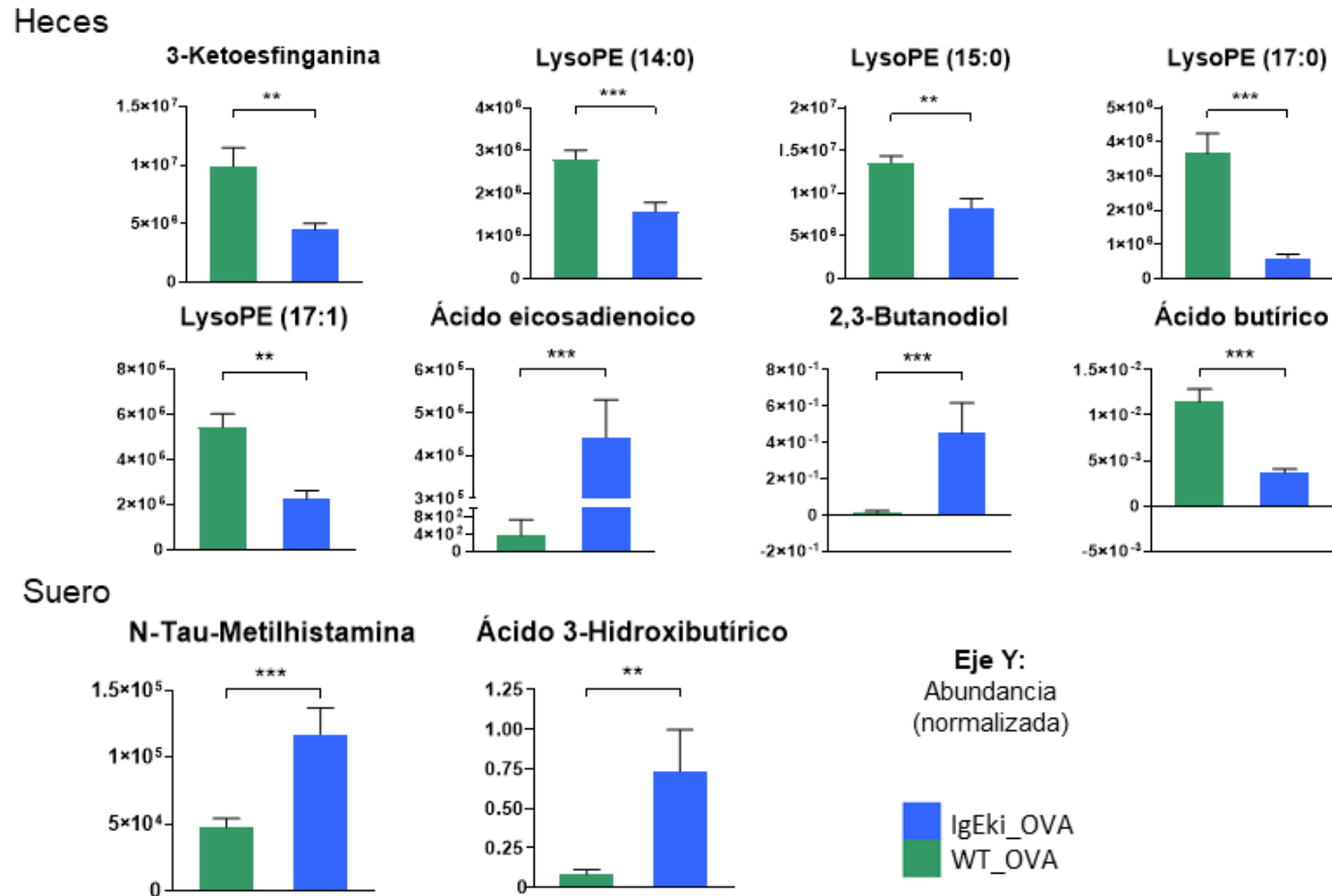


Figura 22. Figuras de abundancias relativas de los metabolitos anotados significativos con mayor relevancia biológica en alteración intestinal e inflamación entre IgEki_OVA y WT_OVA. Los *p* valores < 0,05, < 0,01 y < 0.001 fueron designados con *, ** y *** respectivamente y considerados significativos. Para detectar la significación estadística se utilizaron también los valores VIP (> 1).

En esta comparación, se observaron alteraciones en las heces de ratones IgEki_OVA en los metabolismos del butanoato, el ciclo de la urea, la purina y la pirimidina ($p < 0,05$) (**Figura 22**). Pudiéndose observar un mayor número de rutas y metabolitos implicados respecto a las otras comparaciones.

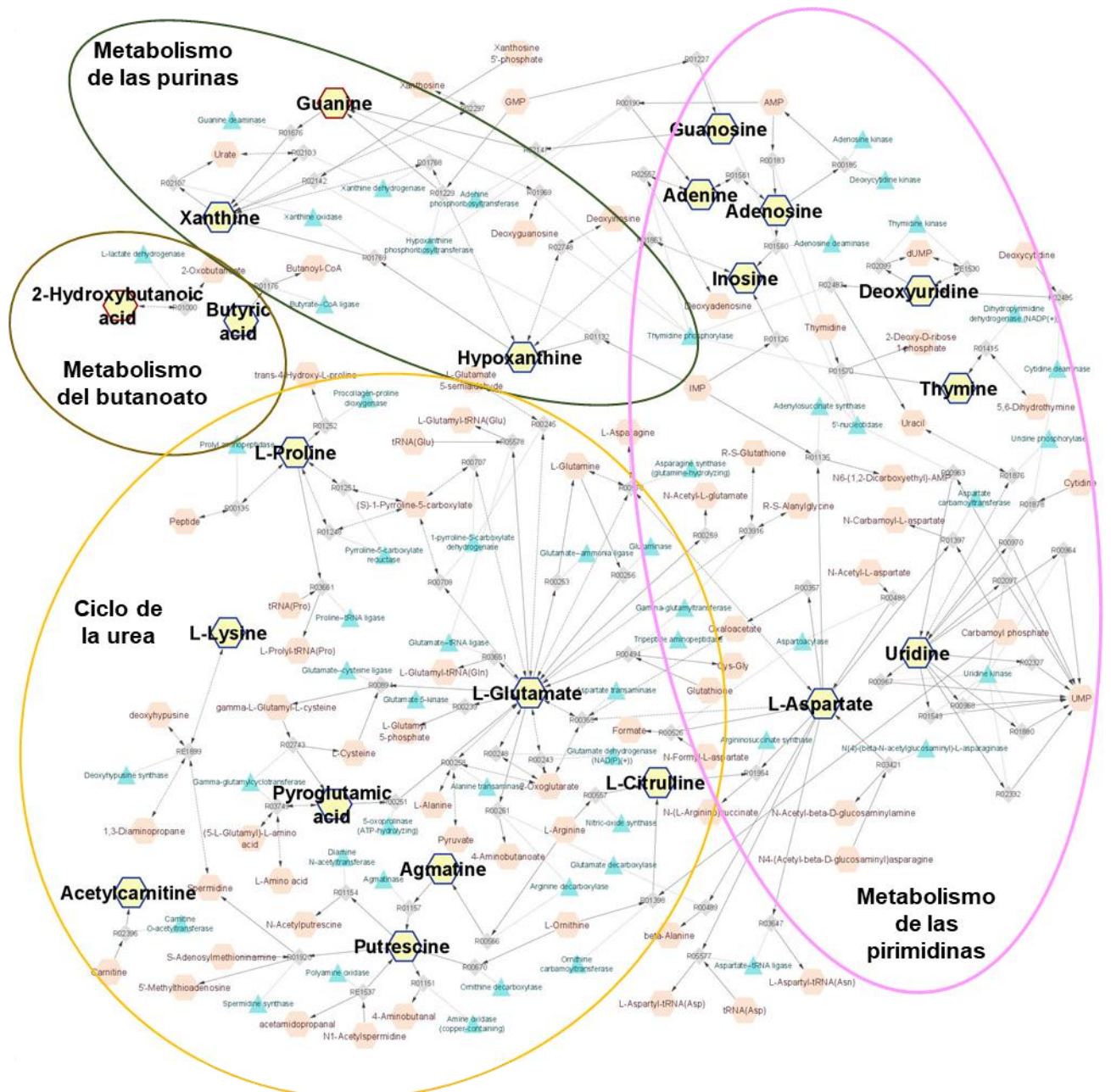


Figura 22. Rutas metabólicas significativas ($p < 0,05$) en heces en la comparación entre IgEki_OVA y WT_OVA. Los hexágonos amarillos son los metabolitos significativamente alterados. El borde azul significa que se disminuyen en esa comparación y el rojo que se aumentan. Los hexágonos anaranjados son los metabolitos que participan en la ruta. Los diamantes grises son las reacciones que tienen lugar (detalladas en el **Anexo VI**). Los triángulos azules son las enzimas que participan en cada una de las reacciones. Las elipses agrupan las diferentes rutas. Figura generada con Cytoscape.

En el análisis de rutas metabólicas en suero de ratones IgEki_OVA se observaron alteraciones en el metabolismo del butanoato y de la histidina ($p < 0,05$) (**Figura 23**). En las muestras de suero de este grupo, se encontró un aumento de los niveles de N-tau-metilhistamina y de 3-hidroxybutanoato. Estos resultados sugieren que los altos niveles de IgE en AE alteran significativamente los niveles tanto de algunos metabolitos endógenos como de otros derivados de la microbiota intestinal.

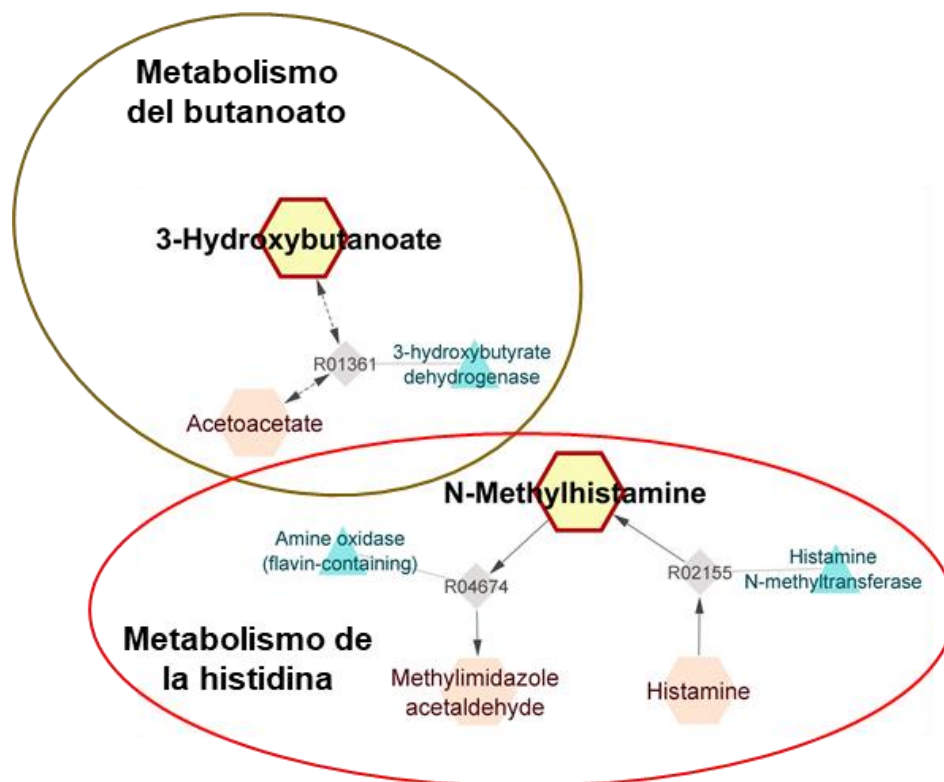


Figura 23. Rutas metabólicas significativas ($p < 0,05$) en suero en la comparación entre IgEki_OVA y WT_OVA. Los hexágonos amarillos son los metabolitos significativamente alterados. El borde azul significa que se disminuyen en esa comparación y el rojo que se aumentan. Los hexágonos anaranjados son los metabolitos que participan en la ruta. Los diamantes grises son las reacciones que tienen lugar (detalladas en el **Anexo VII**). Los triángulos azules son las enzimas que participan en cada una de las reacciones. Las elipses agrupan las diferentes rutas. Figura generada con Cytoscape.

6. Discusión

La investigación en alergia alimentaria no mediada por IgE es escasa a pesar de que su diagnóstico ha aumentado considerablemente en las últimas décadas²¹¹. Se postula que la presencia de IgE no específica empeora el pronóstico de estas enfermedades²¹². Sin embargo, los mecanismos subyacentes implicados en estas patologías no se conocen con exactitud. En este trabajo, se ha utilizado un modelo único de ratón IgEki que ha permitido profundizar en la patogenia de estas enfermedades, así como en el conocimiento sobre el desarrollo de la EA y la alteración que ésta produce en el metabolismo.

El modelo murino IgEki es de utilidad en el estudio de estas enfermedades alérgicas alimentarias. En este capítulo, se han creado cuatro grupos experimentales (**Figura 2**). En el perfil inflamatorio de los ratones IgEki_OVA, se observó una acumulación de granulocitos y una pérdida de peso similares a las de pacientes con enfermedades alérgicas intestinales, asemejándose a la EA grave. Mientras que los ratones IgEki_ns, sin síntomas clínicos detectables, podrían ser un modelo de la etapa inicial o leve de la enfermedad²¹⁹.

El análisis metabolómico no dirigido permitió identificar firmas metabólicas distintivas en ratones WT e IgEki en las diferentes etapas de la enfermedad. En este análisis, se pudieron identificar metabolitos y rutas metabólicas en suero y/o heces que se han clasificado por su función biológica en tres grupos: inflamación, microbiota intestinal y metabolismo energético.

Dentro de los metabolitos relacionados con la inflamación, uno de los grupos más alterados fue el de los lípidos, incluyendo esfingolípidos, glicerofosfolípidos y ácidos grasos. En la comparación entre los grupos WT_OVA y WT_ns, se observó que los niveles de 3-ketosfinganina (un precursor de la esfinganina) y LysoPE (14:0) fueron más altos en muestras de heces en ratones WT_OVA, un modelo de EA moderado, en comparación con los de los ratones WT_ns, un control no alérgico. Lee-Sarwar K *et al.*²³⁵ demostraron que la 3-ketosfinganina aumenta

significativamente en muestras de heces de sujetos con sensibilización alimentaria. Además, pudieron detectar una asociación de respuestas respiratorias deterioradas con niveles plasmáticos de esfingolípidos (e.g. esfinganina y ceramidas) en pacientes con asma alérgico. Por otro lado, se observó que la esfingosina y la esfinganina estaban aumentadas en muestras de heces de ratones IgEki_ns, mientras que los lisofosfolípidos (e.g. LysoPC (14:0), LysoPC (18:2) y LysoPG (16:0)) estaban elevados tanto en muestras de heces como en suero de estos ratones, en comparación al grupo control WT_ns. Algunos estudios han descrito un aumento de lisofosfolípidos en fluidos de lavado bronco alveolar de pacientes con asma y en modelos animales con lesión pulmonar aguda, así como en muestras de suero de pacientes con cáncer colorrectal^{118,236–238}. Otros estudios han demostrado que los lisofosfolípidos exhiben propiedades proinflamatorias, por ejemplo, por inducción de la expresión inflamatoria de citocinas en monocitos humanos⁶². Los esfingolípidos y los glicerofosfolípidos son los componentes principales de las membranas celulares, y pueden ser liberados por las células dañadas en el lugar de inflamación, mejorando su desarrollo^{52,239}. Estos resultados sugieren que el aumento de esfingolípidos y lisofosfolípidos podría ser indicativo de inflamación alérgica o intestinal. El análisis de rutas metabólicas apoyó los resultados metabolómicos al ser significativo el metabolismo de los glicoesfingolípidos a nivel intestinal en WT_OVA y IgEki_ns en comparación con WT_ns. El metabolismo de glicerofosfolípidos, por su parte, resultó significativamente alterado en las muestras de heces de las comparaciones de los ratones WT_ns e IgEki_OVA contra los ratones IgEki_ns. En conjunto, en este trabajo se observa una correlación entre los niveles de estos lípidos y la gravedad de la EA, siendo más bajos en los ratones WT_ns, y más elevados en los ratones IgEki_ns y WT_OVA. Sin embargo, los niveles de 3-ketosfinganina y lisofosfolípidos disminuyeron en ratones IgEki_OVA. Este resultado sugiere que la disrupción del epitelio intestinal por una inflamación severa podría saturar el metabolismo de los lípidos, reduciéndose así los niveles de esfingolípidos y lisofosfolípidos en

los casos más graves de EA. Asimismo, en el modelo WT_OVA se observaron síntomas locales (heces), mientras que el análisis en modelos IgEki mostró afectación tanto local como sistémica (suero), pudiéndose apreciar un aumento considerable de metabolitos séricos en los ratones IgEki_OVA.

Por otro lado, el ácido eicosadienoico, un ácido graso poliinsaturado n-6 del ácido linoleico, aumentó considerablemente en muestras de heces de ratones IgEki_OVA en comparación al grupo WT_OVA. El ácido eicosadienoico se encuentra en los tejidos animales principalmente cuando se inhibe la actividad de la desaturasa de ácido graso $\Delta 6$, la enzima clave en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados. El ácido eicosadienoico es un precursor de la biosíntesis de eicosanoides que proporcionan señales proinflamatorias²⁴⁰, y podría estar involucrado en el desarrollo y empeoramiento de la EA. Está muy aumentado en los ratones IgEki_OVA, lo que puede sugerir que la inflamación influye en la expresión de la desaturasa y, por lo tanto, altera el metabolismo de los lípidos.

Cabe destacar, en relación con la inflamación alérgica, el aumento significativo de los niveles séricos de N-tau-metilhistamina en ratones IgEki_OVA en comparación con los ratones IgEki_ns y WT_OVA. Así como la alteración significativa del metabolismo de la histidina en la comparación entre IgEki_OVA y WT_OVA. La N-tau-metilhistamina es un metabolito derivado directamente de la histamina por la acción de la enzima histamina N-metiltransferasa, y Steiner *et al.*²⁴¹ demostraron que es un buen parámetro sérico de la liberación de histamina. Además, se ha descrito que la N-tau-metilhistamina aumenta en muestras de suero y orina en personas con mastocitosis²⁴². De esta manera, se puede deducir que debido a los altos niveles de IgE de los ratones IgEki, la activación de los mastocitos aumenta, induciendo un aumento en los niveles de N-tau-metilhistamina en ratones IgEki_OVA. Por lo tanto, la N-tau-metilhistamina podría servir como un marcador de la activación de los mastocitos y de gravedad de la enfermedad en la EA.

Dentro del grupo de metabolitos relacionados con la microbiota intestinal, se detectaron niveles reducidos de butirato y niveles aumentados de 2,3-butanodiol en muestras de heces del grupo de ratones IgEki_OVA al compararlos con los grupos IgEki_ns y WT_OVA. Resultando también significativa en estas comparaciones la alteración del metabolismo del butanoato tanto a nivel intestinal como a nivel sérico. El ácido butírico es un AGCC producido por la microbiota intestinal, entre las que destacan *Faecalibacterium prausnitzii* y *Eubacterium rectal*, pertenecientes al filo Firmicutes^{72,243–245}. Los AGCC son la principal fuente de energía para los colonocitos (células epiteliales del colon) e influyen epigenéticamente en funciones no inmunitarias (e.g. mantenimiento del ambiente anaerobio, proteínas de unión estrecha y producción de moco) e inmunitarias (e.g. macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos T y B)^{246–249}. Entre los AGCC, el butirato desempeña un papel fundamental en la inducción de la tolerancia inmunitaria^{250,251}. Se ha descrito que los AGCC son capaces de favorecer la diferenciación de las Tregs del colon. Asimismo, en el tratamiento *in vitro* de las Tregs colónicas, procedentes de ratones libres de gérmenes, se observó que con propionato aumentó significativamente la expresión del factor de transcripción FoxP3, que participa directamente en la función de las células reguladoras T CD4+, y de IL-10, una citocina clave que regula las funciones de las Tregs²⁵². En la misma línea, estudios realizados en modelos murinos han demostrado que el butirato facilita la generación de Tregs²⁵³. Además, estudios previos describen una reducción en las bacterias intestinales productoras de butirato en pacientes alérgicos^{254,255}. Por otro lado, el 2,3-butanodiol es producido por *bacterias intestinales de los géneros Klebsiella, Enterobacter y Serratia*, que se han relacionado con un mayor riesgo de alergia²⁵⁶. En este trabajo, también se detectaron en las muestras de heces de ratones IgEki_OVA, niveles reducidos de ácido valérico, otro AGCC, y de ácido 2-hidroxiisocaproico, un metabolito de la especie *Lactobacillus*. En conjunto, estos resultados sugieren que existe una correlación entre la disrupción de barrera intestinal

(**Tabla 1**), con la consecuente alteración en la microbiota y el metaboloma, y el gradiente de gravedad de la EA.

Por último, el análisis de rutas metabólicas indicó una clara afectación del metabolismo energético en varias comparaciones. En primer lugar, en la comparación entre IgEki_ns y WT_ns, el ciclo de la urea resultó ser muy significativo en las muestras de heces. Asimismo, en el grupo IgEki_OVA, se observó una desregulación tanto local como sistémica en el ciclo de la urea y el ciclo de Krebs en comparación con los grupos IgEki_ns y WT_OVA, indicando un impacto importante en el metabolismo energético. Además, en estas dos comparaciones, se observó un aumento en el catabolismo de bases púricas y pirimidínicas sugiriendo un posible desvío hacia rutas energéticas al liberar energía para la síntesis del ATP²⁵⁷. Estos resultados van en concordancia con la pérdida de peso y la inflamación intestinal de los ratones en el grupo más grave (IgEki_OVA), ya que son procesos metabólicamente exigentes que suelen aparecer durante el desarrollo de las alergias producidas por alimentos.

7. Conclusiones

Este trabajo describe cambios notables en el metabolismo de la EA experimental. Mediante la sensibilización a OVA y/o la alimentación con huevo en ratones WT e IgEki se han inducido cuatro grupos experimentales siguiendo un gradiente de gravedad de EA: ratones alérgicos con EA agravado (IgEki_OVA), ratones alérgicos con EA moderado (WT_OVA), ratones alérgicos con etapa marginal o leve de sensibilización (IgEki_ns) y ratones no alérgicos (WT_ns).

Este estudio metabolómico de las heces ha permitido confirmar que la IgE promueve alteraciones del metabolismo lipídico y genera productos lipídicos proinflamatorios en las etapas de inflamación leve y moderada, mientras que la presencia de IgE altera metabolismos más amplios en la etapa de inflamación severa, incluidos los relacionados con el microbioma

intestinal y las rutas energéticas. Nuestros resultados sugieren que la disrupción del epitelio intestinal por una inflamación severa podría saturar el metabolismo de los lípidos, reduciéndose así los niveles de esfingolípidos y lisofosfolípidos en los casos más graves de EA. Además, cabe destacar el aumento de la N-tau-metilhistamina, que podría servir como un marcador de la activación de los mastocitos y de gravedad de la enfermedad en la EA. Por último, dentro del grupo de metabolitos relacionados con la microbiota intestinal, se detectaron niveles reducidos de butirato y niveles aumentados de 2,3-butanodiol en los ratones más graves. Estos resultados son de gran utilidad para el planteamiento de futuros estudios de cara a poder diseñar un panel de biomarcadores de diagnóstico precoz de la EA. Nuestros resultados también sugieren que la IgE está involucrada en la EA, no solo por la disrupción de barrera y el empeoramiento de la inflamación, sino también por la alteración de metabolitos intestinales, que podrían alterar la inducción de respuestas inmunes reguladoras.

Este capítulo ofrece una visión del impacto de la IgE en el metaboloma en la alergia alimentaria no mediada por IgE. Se ha demostrado una notable alteración del metaboloma intestinal en las fases leve y moderada de sensibilización e inflamación en un modelo de EA experimental. Así como una alteración intestinal (local) y sérica (sistémica) en fases más avanzadas de la enfermedad. Los hallazgos de este estudio reiteran la complejidad de la EA y guían los enfoques para la prevención, el tratamiento y el control de dicha enfermedad.

8. Anexos

I. Lista de reactivos y estándares utilizados en metabolómica.

Acetonitrilo (ACN) (grado LC-MS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), ácido fórmico (FA) (grado MS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), agua MilliQ® (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.), heptano (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), metanol (MeOH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), metil tert-butil éter (MTBE) (Sigma-Aldrich, Steinheim,

Alemania), hidróxido de sodio (NaOH) (Panreac, Montcada I Reixac, España), piridina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), clorhidrato de O-metoxiamina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) con 1 % de trimetilclorosilano (TMCS) (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, EE. UU.). La L-metionina sulfona (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y éster metílico del ácido esteárico (C18:0 éster metílico) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) fueron utilizados como estándar interno para CE-MS y GC-MS, respectivamente. Para las masas de referencia tanto en LC-MS como en CE-MS, se utilizaron purina (m/z [C₅H₄N₄+H]⁺), hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxi)fosfazina (HP, m/z [C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄+H]⁺) y trifluoroacetato de amonio (TFA(NH₄)) de Agilent (kit de solución de masa de referencia API-TOF). En GC-MS se compró a Supelco (Bellefonte, PA, USA) una mezcla FAME (ésteres metílicos de ácidos grasos, incluyendo ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido tridecanoico, ácido miristoléico, ácido pentadecanoico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido heptadecanoide, ácido esteárico, ácido elídico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquídico, ácido cis-11-eicosenoico, ácido linolénico, ácido behénico y ácido erúcico).

II. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 10 entre WT_OVA y WT_ns en heces

Reacción	Descripción	Ruta
R02978	Esfinganina+NADP+=3-Deshidroesfinganina+NADPH+H+	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R01281	Palmitoil-CoA+L-Serina=3-Deshidroesfinganina+CoA+CO2	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R00135	Péptido+H2O=L-Prolina+Péptido	Ciclo de la urea
RE1899	L-lisina+espermidina = 1,3-diaminopropano+desoxihipusina	Ciclo de la urea
RE1897	NAD(+)+espermidina = NADH+2 H(+)+deshidroespermidina	Ciclo de la urea
RE1539	H(,2)O+O(,2)+`N`('1)-acetilespermina = H(,2)O(,2)+espermidina+acetamidopropanal	Ciclo de la urea
RE1537	"H(,2)O+O(,2)+`N`('1)-acetilespermidina = H(,2)O(,2)+putrescina+acetamidopropanal"	Ciclo de la urea

RE1234	acetil-CoA+espermidina = CoA+H('')+`N`('1)-acetilespermidina	Ciclo de la urea
RE0828	H(,2)O+O(,2)+espermidina = H(,2)O(,2)+NH(,4)('')+espermidina monoaldehído 1	Ciclo de la urea
RE0689	H(,2)O+O(,2)+espermidina = H(,2)O(,2)+NH(,4)('')+H('')+espermidina monoaldehído 2	Ciclo de la urea
R03661	ATP+L-Prolina+tRNA(Pro)=AMP+Pirofosfato +L-Prolil-tRNA(Pro)	Ciclo de la urea
R02869	S-adenosilmetioninamina+espermidina=5'-metiltioadenosina +espermidina	Ciclo de la urea
R01920	S-adenosilmetioninamina+putrescina=5'-metiltioadenosina +espermidina	Ciclo de la urea
R01252	L-prolina+2-oxoglutarato+oxígeno=trans-4-hidroxi-L-prolina +succinato+CO2	Ciclo de la urea
R01251	L-prolina+NADP+=(S)-1-pirrolina-5-carboxilato+NADPH+H+	Ciclo de la urea
R01248	L-prolina+NAD+=(S)-1-pirrolina-5-carboxilato+NADH+H+	Ciclo de la urea
R01157	Agmatina+H2O=Putrescina+Urea	Ciclo de la urea
R01154	Acetil-CoA+Putrescina=CoA+N-Acetilputrescina	Ciclo de la urea
R01151	Putrescina+Oxígeno+H2O=4-Aminobutanal+NH3+H2O2	Ciclo de la urea
R00670	L-Ornitina=Putrescina+CO2	Ciclo de la urea

III. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 14 entre IgEki_ns y WT_ns en heces

Reacción	Descripción	Ruta metabólica
R01157	Agmatina+H2O=Putrescina+Urea	Ciclo de la urea
R00894	ATP+L-Glutamato+L-Cisteína=ADP+Ortofosfato +gamma-L-Glutamil-L-cisteína	Ciclo de la urea
R00713	Succinato semialdehído+NAD++H2O=Succinato+NADH+H+	Ciclo de la urea
R00708	(S)-1-pirrolina-5-carboxilato+NADP++2 H2O=L-glutamato +NADPH+H+	Ciclo de la urea
R00707	(S)-1-pirrolina-5-carboxilato+NAD++2 H2O=L-glutamato+NADH+ H+	Ciclo de la urea
R00578	ATP+L-Aspartato+L-Glutamina+H2O=AMP+Pirofosfato +L-Asparagina+L-Glutamato	Ciclo de la urea
R00566	L-Arginina=Agmatina+CO2	Ciclo de la urea
R00526	N-Formil-L-aspartato+H2O=Formiato+L-Aspartato	Ciclo de la urea
R00494	Glutación+H2O=Cys-Gly+L-Glutamato	Ciclo de la urea
R00489	L-aspartato=beta-alanina+CO2	Ciclo de la urea
R00488	N-acetil-L-aspartato+H2O=acetato+L-aspartato	Ciclo de la urea
R00357	L-Aspartato+H2O+Oxígeno=Oxaloacetato+NH3+H2O2	Ciclo de la urea
R00355	L-aspartato+2-oxoglutarato=oxalacetato+L-glutamato	Ciclo de la urea
R00261	L-Glutamato=4-Aminobutanoato+CO2	Ciclo de la urea
R00259	Acetil-CoA+L-Glutamato=CoA+N-Acetil-L-glutamato	Ciclo de la urea
R00258	L-alanina+2-oxoglutarato=piruvato+L-glutamato	Ciclo de la urea
R00256	L-Glutamina+H2O=L-Glutamato+NH3	Ciclo de la urea

R00253	ATP+L-Glutamato+NH ₃ =ADP+Ortofosfato+L-Glutamina	Ciclo de la urea
R00251	ATP+5-Oxoprolina+2 H ₂ O=ADP+Ortofosfato+L-Glutamato	Ciclo de la urea
R00248	L-Glutamato+NADP ⁺⁺ +H ₂ O=2-Oxoglutarato+NH ₃ +NADPH+H ⁺	Ciclo de la urea
R00245	L-Glutamato 5-semialdehído+NAD ⁺⁺ +H ₂ O=L-Glutamato+NADH+H ⁺	Ciclo de la urea
R00243	L-Glutamato+NAD ⁺⁺ +H ₂ O=2-Oxoglutarato+NH ₃ +NADH+H ⁺	Ciclo de la urea
R00239	ATP+L-Glutamato=ADP+L-Glutamil 5-fosfato	Ciclo de la urea
RE1899	L-lisina+espermidina = 1,3-diaminopropano+desoxihipusina	Ciclo de la urea
R05578	ARNt(Glu)+L-Glutamato+ATP=L-Glutamil-ARNt(Glu)+Pirofosfato+AMP	Ciclo de la urea
R05577	ARNt(Asp)+L-aspartato+ATP=L-aspartil-ARNt(Asp)+pirofosfato+AMP	Ciclo de la urea
R03916	RS-Glutatión+H ₂ O=RS-Alanilglicina+L-Glutamato	Ciclo de la urea
R03749	(5-L-Glutamil)-L-aminoácido=5-Oxoprolina+L-Aminoácido	Ciclo de la urea
R03651	ATP+L-Glutamato+tRNA(Gln)=AMP+Pirofosfato +L-Glutamil-tRNA(Gln)	Ciclo de la urea
R03647	ATP+L-Aspartato+tRNA(Asn)=AMP+Pirofosfato +L-Aspartil-tRNA(Asn)	Ciclo de la urea
R03421	N ⁴ -(Acetil-beta-D-glucosaminil)asparagina+H ₂ O <=>N-Acetil-beta-D-glucosaminilamina+L-Aspartato	Ciclo de la urea
R02743	gamma-L-glutamil-L-cisteína=5-oxoprolina+L-cisteína	Ciclo de la urea
R02396	Acetil-CoA+Carnitina=CoA+O-Acetilcarnitina	Ciclo de la urea
R01954	ATP+L-Citrulina+L-Aspartato=AMP+Pirofosfato +N-(L-Arginino)succinato	Ciclo de la urea
R01493	N-acilesfingosina+H ₂ O=carboxilato+esfingosina	Metabolismo de glicoesfingolípidos
RE2717	H _(,2) O+galactosilesfingosina = D-galactosa+D-esfingosina	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R06521	Esfingosina 1-fosfato+H ₂ O=Esfingosina+Ortofosfato	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R06520	Esfinganina 1-fosfato+H ₂ O=Esfinganina+Ortofosfato	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R06518	Dihidroceramida+H ₂ O=Ácido graso+Esfinganina	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R02978	Esfinganina+NADP ⁺ =3-Deshidroesfinganina+NADPH+H ⁺	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R02976	ATP+Esfinganina=ADP+Esfinganina 1-fosfato	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R01926	Esfingosina+ATP=Esfingosina 1-fosfato+ADP	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R01494	N-acilesfingosina+H ₂ O=ácido graso+esfingosina	Metabolismo de glicoesfingolípidos
R01315	Fosfatidilcolina+H ₂ O=1-Acil-sn-glicero-3-fosfocolina +Ácido graso	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R00851	sn-glicerol 3-fosfato+acil-CoA=1-acil-sn-glicerol3-fosfato+CoA	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R00849	sn-glicerol 3-fosfato+aceptor=fosfato de glicerona+aceptor reducido	Metabolismo de glicerofosfolípidos

R00848	sn-glicerol 3-fosfato+FAD=glicerona fosfato+FADH2	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R00847	ATP+Glicerol=ADP+sn-Glicerol 3-fosfato	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R00842	sn-Glicerol 3-fosfato+NAD+=Glicerona fosfato+NADH+H+	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R02746	1-acil-sn-glicero-3-fosfocolina+H2O <=>sn-glicero-3-fosfocolina+ácido graso	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R02617	3-fosfato de 2,3-deshidroacil-CoA+sn-glicerol=CoA + 3-fosfato de 1-acil-sn-glicerol	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R02114	Fosfatidilcolina+esterol=1-acil-sn-glicero-3-fosfocolina+ éster esterílico	Metabolismo de glicerofosfolípidos

IV. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 18 entre IgEki_OVA y IgEki_ns en heces

Reacción	Descripción	Ruta metabólica
R00963	UMP+H2O=Uridina+Ortofosfato	Metabolismo de las pirimidinas
R00964	ATP+Uridina=ADP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R00967	UTP+Uridina=UDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R00968	GTP+Uridina=PIB+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R00970	ITP+Uridina=IDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R01415	5,6-Dihidrotimina+NADP+=Timina+NADPH+H+	Metabolismo de las pirimidinas
R01549	dATP+Uridina=dADP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R01570	Timidina+Ortofosfato=Timina+2-Desoxi-D-ribosa1-fosfato	Metabolismo de las pirimidinas
R01876	Uridina+Ortofosfato=Uracilo+alfa-D-Ribosa 1-fosfato	Metabolismo de las pirimidinas
R01878	Citidina+H2O=Uridina+NH3	Metabolismo de las pirimidinas
R01880	dGTP+Uridina=dPIB+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R02097	dTTP+Uridina=dTDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R02099	ATP+Desoxiuridina=ADP+dUMP	Metabolismo de las pirimidinas
R02327	dCTP+Uridina=dCDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R02332	dUTP+Uridina=dUDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas

R02483	Desoxiuridina+Ortofosfato=Uracilo+2-Desoxi-D-ribosa1-fosfato	Metabolismo de las pirimidinas
R02485	Desoxicitidina+H ₂ O=Desoxiuridina+NH ₃	Metabolismo de las pirimidinas
RE1530	dGTP+2'-desoxiuridina = dPIB+dUMP+H(+)	Metabolismo de las pirimidinas
R00842	sn-Glicerol 3-fosfato+NAD+=Glicerona fosfato+NADH+H+	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R00847	ATP+Glicerol=ADP+sn-Glicerol 3-fosfato	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R00848	sn-glicerol 3-fosfato+FAD=glicerona fosfato+FADH ₂	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R00849	sn-glicerol 3-fosfato+aceptor=fosfato de glicerona+aceptor reducido	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R00851	sn-glicerol 3-fosfato+acil-CoA=1-acil-sn-glicerol3-fosfato+CoA	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R01315	Fosfatidilcolina+H ₂ O=1-Acil-sn-glicero-3-fosfocolina +Ácido graso	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R02114	Fosfatidilcolina+esterol=1-acil-sn-glicero-3-fosfocolina+éster esterílico	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R02617	3-fosfato de 2,3-deshidroacil-CoA+sn-glicerol=CoA + 3-fosfato de 1-acil-sn-glicerol	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R02746	1-acil-sn-glicero-3-fosfocolina+H ₂ O <=>sn-glicero-3-fosfocolina+ácido graso	Metabolismo de glicerofosfolípidos
R01176	ATP+ácido butanoico+CoA=AMP+pirofosfato+butanoil-CoA	Metabolismo del butanoato

V. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 19 entre IgEki_OVA y IgEki_ns en suero

Reacción	Descripción	Ruta metabólica
R00551	L-Arginina+H ₂ O=L-Ornitina+Urea	Ciclo de la urea
R00667	L-ornitina+2-oxoglutarato=L- glutamato 5-semialdehído +L- glutamato	Ciclo de la urea
R00669	N-acetilornitina+H ₂ O=acetato+L-ornitina	Ciclo de la urea
R00670	L-Ornitina=Putrescina+CO ₂	Ciclo de la urea
R00713	Succinato semialdehído+NAD++H ₂ O=Succinato+NADH+H+	Ciclo de la urea
R01086	N-(L-Arginino)succinato=Fumarato+L-Arginina	Ciclo de la urea
R01398	Carbamoil fosfato+L-Ornitina=Ortofosfato+L-Citrulina	Ciclo de la urea
R00342	(S)-Malato+NAD+=Oxaloacetato+NADH+H+	Ciclo de Krebs
R00405	ATP+succinato+CoA=ADP+ortofosfato+succinil-CoA	Ciclo de Krebs
R00432	GTP+succinato+CoA=PIB+ortofosfato+succinil-CoA	Ciclo de Krebs
R00727	ITP+Succinato+CoA=IDP+Ortofosfato+Succinil-CoA	Ciclo de Krebs
R01082	(S)-malato=fumarato+H ₂ O	Ciclo de Krebs
R02164	Ubiquinona+succinato=ubiquinol+fumarato	Ciclo de Krebs

R00214	(S)-Malato+NAD+=Piruvato+CO2+NADH	Glucólisis y Gluconeogénesis
R00216	(S)-Malato+NADP+=Piruvato+CO2+NADPH	Glucólisis y Gluconeogénesis
R00410	Succinil-CoA+Acetoacetato=Succinato+Acetoacetyl-CoA	Metabolismo del butanoato
R01000	Ácido 2-hidroxibutanoico+NAD+=2-oxobutanoato+NADH+H+	Metabolismo del butanoato

VI. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 22 entre IgEki_OVA y WT_OVA en heces

Reacción	Descripción	Ruta metabólica
RE1899	L-lisina+espermidina = 1,3-diaminopropano+desoxihipusina	Ciclo de la urea
RE1537	H(,2)O+O(,2)+`N`('1)-acetilespermidina = H(,2)O(,2)+putrescina+acetamidopropanal	Ciclo de la urea
R05578	ARNt(Glu)+L-Glutamato+ATP=L-Glutamil-ARNt(Glu)+Pirofosfato+AMP	Ciclo de la urea
R05577	ARNt(Asp)+L-aspartato+ATP=L-aspartil-ARNt(Asp)+pirofosfato+AMP	Ciclo de la urea
R03916	RS-Glutatión+H2O=RS-Alanilglicina+L-Glutamato	Ciclo de la urea
R03749	(5-L-Glutamil)-L-aminoácido=5-Oxoprolina+L-Aminoácido	Ciclo de la urea
R03661	ATP+L-Prolina+tRNA(Pro)=AMP+Pirofosfato +L-Prolil-tRNA(Pro)	Ciclo de la urea
R03651	ATP+L-Glutamato+tRNA(Gln)=AMP+Pirofosfato +L-Glutamil-tRNA(Gln)	Ciclo de la urea
R03647	ATP+L-Aspartato+tRNA(Asn)=AMP+Pirofosfato +L-Aspartil-tRNA(Asn)	Ciclo de la urea
R03421	N4-(Acetil-beta-D-glucosaminil)asparagina+H2O <=>N-Acetil-beta-D-glucosaminilamina+L-Aspartato	Ciclo de la urea
R02743	gamma-L-glutamyl-L-cisteína=5-oxoprolina+L-cisteína	Ciclo de la urea
R02396	Acetil-CoA+Carnitina=CoA+O-Acetilcarnitina	Ciclo de la urea
R01954	ATP+L-Citrulina+L-Aspartato=AMP+Pirofosfato +N-(L-Arginino)succinato	Ciclo de la urea
R01920	S-adenosilmetioninamina+putrescina=5'-metiltioadenosina+espermidina	Ciclo de la urea
R01398	Carbamoil fosfato+L-Ornitina=Ortofosfato+L-Citrulina	Ciclo de la urea
R01252	L-prolina+2-oxoglutarato+oxígeno=trans-4-hidroxi-L-prolina+succinato+CO2	Ciclo de la urea
R01251	L-prolina+NADP+=L-pirrolina-5-carboxilato+NADPH+H+	Ciclo de la urea
R01248	L-prolina+NAD+=L-pirrolina-5-carboxilato+NADH+H+	Ciclo de la urea
R01157	Agmatina+H2O=Putrescina+Urea	Ciclo de la urea
R01154	Acetil-CoA+Putrescina=CoA+N-Acetilputrescina	Ciclo de la urea
R01151	Putrescina+Oxígeno+H2O=4-Aminobutanal+NH3+H2O2	Ciclo de la urea

R00894	ATP+L-Glutamato+L-Cisteína=ADP+Ortofosfato +gamma-L-Glutamil-L-cisteína	Ciclo de la urea
R00708	(S)-1-pirrolina-5-carboxilato+NADP++2 H2O=L-glutamato+NADPH+H+	Ciclo de la urea
R00707	(S)-1-pirrolina-5-carboxilato+NAD++2 H2O=L-glutamato+NADH+ H+	Ciclo de la urea
R00670	L-Ornitina=Putrescina+CO2	Ciclo de la urea
R00578	ATP+L-Aspartato+L-Glutamina+H2O=AMP+Pirofosfato +L-Asparagina+L-Glutamato	Ciclo de la urea
R00566	L-Arginina=Agmatina+CO2	Ciclo de la urea
R00557	L-Arginina+Oxígeno+NADPH=Óxido nítrico+L-Citrulina+NADP+	Ciclo de la urea
R00526	N-Formil-L-aspartato+H2O=Formiato+L-Aspartato	Ciclo de la urea
R00494	Glutación+H2O=Cys-Gly+L-Glutamato	Ciclo de la urea
R00489	L-aspartato=beta-alanina+CO2	Ciclo de la urea
R00488	N-acetil-L-aspartato+H2O=acetato+L-aspartato	Ciclo de la urea
R00357	L-Aspartato+H2O+Oxígeno=Oxaloacetato+NH3+H2O2	Ciclo de la urea
R00355	L-aspartato+2-oxoglutarato=oxalacetato+L-glutamato	Ciclo de la urea
R00261	L-Glutamato=4-Aminobutanoato+CO2	Ciclo de la urea
R00259	Acetil-CoA+L-Glutamato=CoA+N-Acetil-L-glutamato	Ciclo de la urea
R00258	L-alanina+2-oxoglutarato=piruvato+L-glutamato	Ciclo de la urea
R00256	L-Glutamina+H2O=L-Glutamato+NH3	Ciclo de la urea
R00253	ATP+L-Glutamato+NH3=ADP+Ortofosfato+L-Glutamina	Ciclo de la urea
R00251	ATP+5-Oxoprolina+2 H2O=ADP+Ortofosfato+L-Glutamato	Ciclo de la urea
R00248	L-Glutamato+NADP++H2O=2-Oxoglutarato+NH3+NADPH+H+	Ciclo de la urea
R00245	L-Glutamato 5-semialdehído+NAD++H2O=L-Glutamato+NADH+H+	Ciclo de la urea
R00243	L-Glutamato+NAD++H2O=2-Oxoglutarato+NH3+NADH+H+	Ciclo de la urea
R00239	ATP+L-Glutamato=ADP+L-Glutamil 5-fosfato	Ciclo de la urea
R00135	Péptido+H2O=L-Prolina+Péptido	Ciclo de la urea
RE1530	dGTP+2'-desoxiuridina = dPIB+dUMP+H(+)	Metabolismo de las pirimidinas
R02485	Desoxicitidina+H2O=Desoxiuridina+NH3	Metabolismo de las pirimidinas
R02483	Desoxiuridina+Ortofosfato=Uracilo+2-Desoxi-D-ribosa1-fosfato	Metabolismo de las pirimidinas
R02332	dUTP+Uridina=dUDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R02327	dCTP+Uridina=dCDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R02099	ATP+Desoxiuridina=ADP+dUMP	Metabolismo de las pirimidinas
R02097	dTTP+Uridina=dTDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R01880	dGTP+Uridina=dPIB+UMP	Metabolismo de las pirimidinas

R01878	Citidina+H ₂ O=Uridina+NH ₃	Metabolismo de las pirimidinas
R01876	Uridina+Ortofosfato=Uracilo+alfa-D-Ribosa 1-fosfato	Metabolismo de las pirimidinas
R01570	Timidina+Ortofosfato=Timina+2-Desoxi-D-ribosa1-fosfato	Metabolismo de las pirimidinas
R01549	dATP+Uridina=dADP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R01415	5,6-Dihidrotimina+NADP+=Timina+NADPH+H+	Metabolismo de las pirimidinas
R01397	Carbamoil fosfato+L-Aspartato=Ortofosfato +N-Carbamoil-L-aspartato	Metabolismo de las pirimidinas
R00970	ITP+Uridina=IDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R00968	GTP+Uridina=PIB+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R00967	UTP+Uridina=UDP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R00964	ATP+Uridina=ADP+UMP	Metabolismo de las pirimidinas
R00963	UMP+H ₂ O=Uridina+Ortofosfato	Metabolismo de las pirimidinas
R02748	Desoxiinosina+Ortofosfato=Hipoxantina+2-Desoxi-D-ribosa1-fosfato	Metabolismo de las purinas
R02557	Desoxiadenosina+Ortofosfato=Adenina+2-Desoxi-D-ribosa1-fosfato	Metabolismo de las purinas
R02297	Xantosina+Ortofosfato=Xantina+alfa-D-Ribosa1-fosfato	Metabolismo de las purinas
R02147	Guanosina+Ortofosfato=Guanina+alfa-D-Ribosa 1-fosfato	Metabolismo de las purinas
R02142	Xantosina 5'-fosfato+pirofosfato=xantina +5-fosfo-alfa-D-ribosa 1-difosfato	Metabolismo de las purinas
R02107	Xantina+H ₂ O+Oxígeno=Urato+H ₂ O ₂	Metabolismo de las purinas
R02103	Xantina+NAD ⁺⁺ +H ₂ O=Urato+NADH	Metabolismo de las purinas
R01969	Desoxiguanosina+Ortofosfato=Guanina+2-Desoxi-D-ribosa1-fosfato	Metabolismo de las purinas
R01863	Inosina+Ortofosfato=Hipoxantina+alfa-D-Ribosa1-fosfato	Metabolismo de las purinas
R01769	Hipoxantina+Oxígeno+H ₂ O=Xantina+H ₂ O ₂	Metabolismo de las purinas
R01768	Hipoxantina+NAD ⁺⁺ +H ₂ O=Xantina+NADH	Metabolismo de las purinas
R01676	Guanina+H ₂ O=Xantina+NH ₃	Metabolismo de las purinas
R01561	Adenosina+Ortofosfato=Adenina+alfa-D-Ribosa 1-fosfato	Metabolismo de las purinas
R01560	Adenosina+H ₂ O=Inosina+NH ₃	Metabolismo de las purinas
R01229	GMP+pirofosfato=guanina+5-fosfo-alfa-D-ribosa1-difosfato	Metabolismo de las purinas

R01227	GMP+H ₂ O=Guanosina+Ortofosfato	Metabolismo de las purinas
R01135	GTP+IMP+L-aspartato=PIB+ortofosfato +N ₆ -(1,2-dicarboxietil)-AMP	Metabolismo de las purinas
R01132	IMP+pirofosfato=hipoxantina+5-fosfo-alfa-D-ribosa1-difosfato	Metabolismo de las purinas
R01126	IMP+H ₂ O=Inosina+Ortofosfato	Metabolismo de las purinas
R00190	AMP+pirofosfato=adenina+5-fosfo-alfa-D-ribosa1-difosfato	Metabolismo de las purinas
R00185	ATP+Adenosina=ADP+AMP	Metabolismo de las purinas
R00183	AMP+H ₂ O=Adenosina+Ortofosfato	Metabolismo de las purinas
R01176	ATP+ácido butanoico+CoA=AMP+pirofosfato+butanoil-CoA	Metabolismo del butanoato
R01000	Ácido 2-hidroxibutanoico+NAD ⁺ =2-oxobutanoato+NADH+H ⁺	Metabolismo del butanoato

VII. Reacciones de las rutas metabólicas significativas de la Figura 23 entre IgEki_OVA y WT_OVA en suero

R04674	N-metilhistamina+H ₂ O+oxígeno=metilimidazol acetaldehído +NH ₃ +H ₂ O ₂	Metabolismo de la histidina
R02155	S-adenosil-L-metionina+1H-imidazol-4-etanamina <=> S-adenosil-L-homocisteína+N-metilhistamina	Metabolismo de la histidina
R01361	(R)-3-Hidroxibutanoato+NAD ⁺ =Acetoacetato+NADH+H ⁺	Metabolismo del butanoato

**CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE FUNCIONALIDAD DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL Y SU CORRELACIÓN
CON PROTEÍNAS FECALES EN LACTANTES CON
ALERGIA A LECHE DE VACA**

1. Introducción

Las enfermedades alérgicas a los alimentos afectan al 6.8% de la población infantil en países industrializados. Entre los alimentos más prevalentes motivo de consulta en los servicios de Alergología están la leche y el huevo².

Los mecanismos moleculares subyacentes a la alergia a las proteínas de la leche de vaca, así como la adquisición de tolerancia oral, son procesos muy complejos que no se conocen todavía con exactitud. No obstante, se cree que la microbiota intestinal puede estar jugando un papel muy importante en este sentido⁶⁵. Se sabe que la microbiota es necesaria para la inducción de tolerancia a los antígenos alimentarios y cada vez son más los estudios que sugieren que una composición alterada de la microbiota intestinal o disbiosis, pudiera resultar en una alteración local y sistémica de la respuesta inmunológica a determinados alérgenos alimentarios^{49,258}. Sin embargo, no se conoce con exactitud si es causa o consecuencia. La interacción bidireccional de la microbiota con el sistema inmunitario del huésped comienza en el nacimiento, a partir del cual, la microbiota intestinal modula el desarrollo del sistema inmune y viceversa, al influir directamente el sistema inmune en la composición de esta microbiota^{9,32,258}.

Por otro lado, tal y como se explica en detalle en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, la composición de la microbiota intestinal cambia a lo largo de la vida. Se postula que el 70% de la colonización primaria de la microbiota intestinal es de origen materno³², y que los primeros 1.000 días de vida, cuando el cuerpo se enfrenta por primera vez a factores externos, son muy importantes para el desarrollo de la microbiota intestinal³³. Además, el desarrollo de la microbiota intestinal en los primeros años de vida se correlaciona temporalmente con el desarrollo y la maduración del intestino y el sistema inmunológico²⁵⁹. Desde el nacimiento, se establece una relación, idealmente simbiótica y no patológica, entre la microbiota y nuestras células, que evoluciona con el tiempo, adaptándose a los cambios^{260,261}. Después de los primeros 2-3 años de vida, la microbiota

intestinal se asemeja a la adulta^{262,263}. Sin embargo, la composición de la microbiota intestinal es dinámica y depende de multitud de factores asociados al huésped, como la edad, la dieta, el uso de antibióticos, el estilo de vida y las condiciones ambientales^{34,74}.

Los primeros 6 meses de vida son críticos para el inicio de los cambios inmunológicos que pueden dar lugar a una sensibilización a los alérgenos, y es en este periodo de tiempo donde las perturbaciones en la microbiota intestinal podrían tener efecto en la etiología de la alergia^{9,259}. La adquisición de la microbiota intestinal hasta los 2-3 años, en la que ya el perfil bacteriano es muy similar al de la microbiota de adultos, consta de 4 fases que van asociadas a los cambios en la alimentación de los niños²⁶⁴. Una primera fase de adquisición inicial que comprende las 2 primeras semanas de vida en las que la microbiota fluctúa incluso de un día a otro. Después del nacimiento, diversos géneros de bacterias aerobias o anaerobias facultativas, como enterobacterias (*Escherichia coli*), estreptococos y estafilococos, consumen el oxígeno del ambiente intestinal y progresivamente se establecen las bacterias anaerobias, como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, a partir de los 10 días, son detectables los *Lactobacillus*. La segunda fase comprende desde el final de la segunda semana hasta la introducción de cualquier tipo de alimentación suplementaria²⁶⁵. En esta fase es diferente la microbiota de los niños alimentados con lactancia materna que aquellos alimentados con fórmulas infantiles, y no hay muchos cambios a excepción de cuando se pasa de la lactancia materna exclusiva a una alimentación combinada con fórmula. Estudios recientes muestran a la leche materna como el principal factor en la iniciación, desarrollo y composición de la microflora del lactante, ya que es una fuente continua de bacterias comensales y mutualistas para el intestino del lactante, llegando a contener más de 10⁴ bacterias/mL, entre los que se encuentran: estreptococos, enterococos, estafilococos y bacterias lácticas (*Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, etc.). Asimismo, se ha demostrado que, en lactantes amamantados, predominan las bifidobacterias (*B. longum*, *B.*

breve e *B. infantis*), y en menor concentración las bacterias lácticas (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*), con pocos bacteroides, coliformes y clostridios. Mientras que en los lactantes alimentados con leche de fórmula predominan bacteroides, enterococos, coliformes y clostridios, y en menor proporción bifidobacterias, con una flora más diversa y similar a la de los adultos²⁶⁵. La tercera fase comprende la introducción de la alimentación sólida. En esta fase se pierden las diferencias entre la microbiota de niños alimentados mediante lactancia materna y los alimentados con fórmula. La cuarta fase comienza cuando se produce el destete²⁶⁴. Teniendo todo esto en cuenta, la fase óptima para analizar los cambios en la microbiota intestinal asociados a la lactancia materna, es la fase 2.

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, la prevalencia de las alergias se ha visto muy incrementada en las últimas décadas, siendo la alergia a la leche de vaca una de las más frecuentes en niños. En general, en torno al 80% de los pacientes que la sufren suelen adquirir tolerancia a los 4 años, pero la etiología y los mecanismos de esta enfermedad son hoy en día aun desconocidos^{266,267}. Además, no está claro si la alteración de la microbiota intestinal es el desencadenante de la alergia o, por el contrario, es una consecuencia de la enfermedad que altera la composición bacteriana y su funcionalidad. En este sentido, la secuenciación metagenómica *shotgun* ofrece un enfoque alternativo para el estudio de la microbiota. La metagenómica *shotgun* permite determinar las funciones biológicas asociadas a la taxonomía de la microbiota intestinal a través del análisis del ADN⁹⁰. Esta técnica ómica proporciona una visión de las funciones biológicas codificadas en el genoma. Como resultado, los datos metagenómicos ofrecen la oportunidad de explorar qué rutas metabólicas están codificadas en la comunidad microbiana²⁶⁸.

Por otro lado, recientemente se ha revisado el uso de biomarcadores fecales para el diagnóstico de alergias a proteínas de leche de vaca¹²⁴. Un biomarcador se define como una entidad biológica que puede utilizarse para predecir e identificar el estado de las células, los tejidos y los individuos¹¹⁷. En la actualidad, la mayoría de los biomarcadores disponibles

son marcadores moleculares (genes, proteínas y metabolitos) que pueden utilizarse para el diagnóstico, el pronóstico y la predicción de la respuesta a un determinado tratamiento^{80,116}. En relación con el diagnóstico de alergias a proteínas de leche de vaca, las proteínas más estudiadas como potenciales biomarcadores fecales de esta patología, son la calprotectina fecal, la α -1 antitripsina y la lactoferrina^{269–273}. De ellas, la calprotectina ha sido la más discutida, y ha sido objeto de una reciente revisión sistemática por su uso como biomarcador en alergias a proteínas de leche de vaca, incluyendo las formas mediadas por IgE y las no mediadas¹²⁵.

Por todo lo expuesto anteriormente, este trabajo evalúa los cambios a nivel de funcionalidad en la microbiota intestinal, durante la fase 2, en lactantes alérgicos a leche de vaca en comparación con lactantes controles, mediante el análisis por metagenómica *shotgun*, así como la correlación de estos resultados con las concentraciones de los biomarcadores α -1 antitripsina, lactoferrina y calprotectina en heces.

2. Hipótesis

Existen alteraciones, que se correlacionan entre sí, en la funcionalidad de la microbiota intestinal y las concentraciones de proteínas fecales – calprotectina fecal, α -1 antitripsina y lactoferrina– en las heces de lactantes con alergia a leche de vaca en comparación a los lactantes control.

3. Objetivos

1. Analizar la funcionalidad de la microbiota intestinal obtenida por metagenómica *shotgun* en casos y controles.
2. Obtener y analizar las concentraciones de calprotectina fecal, α -1 antitripsina y lactoferrina en las muestras de heces de lactantes.
3. Realizar una correlación de los resultados obtenidos en los puntos 1 y 2.

4. Materiales y métodos

4.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio de casos y controles longitudinal y observacional aprobado por el Comité Regional de Ética en Investigación Clínica del Hospital Universitario Niño Jesús de Madrid de acuerdo con las directrices éticas esbozadas en la Declaración de Helsinki y sus modificaciones²⁷⁴. Los lactantes fueron reclutados en el Servicio de Alergia del Hospital Universitario Infantil Niño Jesús, el Hospital General Universitario Gregorio Marañón y cinco centros de salud de Madrid (España). Todos los participantes proporcionaron su consentimiento informado.

4.2. Población de estudio

Para este estudio se reclutaron un total de 50 participantes hasta 8 meses de edad: 34 lactantes con alergia a las proteínas de la leche de vaca (LA) y 16 lactantes sanos como control (LC). Los datos epidemiológicos de los lactantes incluidos se encuentran en el **Anexo I**. La secuenciación *shotgun* se realizó en muestras de lactantes entre 4 y 6 meses, incluyendo de esta manera: 26 lactantes (19 LA y 7 LC). Esta selección permitió estandarizar aún más los grupos LA y LC y evitar sesgos debido a la edad de los lactantes y la introducción de alimentos sólidos. Por otro lado, para el análisis de proteínas fecales, se analizaron un total de 20 muestras de heces de lactantes, 10 LA y 10 LC. Por último, el análisis de correlación se realizó con datos pareados de 10 lactantes, 6 LA y 4 LC.

4.3. Criterios de inclusión

Los LA fueron reclutados en el Servicio de Alergia del Hospital Universitario Infantil Niño Jesús y en el del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (España). Se incluyeron lactantes con antecedentes clínicos de alergia alimentaria mediada por IgE y prueba de alergia cutánea (SPT, del inglés *Skin Prick Test*) positiva a las proteínas de leche de vaca: α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y/o caseína (Diater®, Madrid, España). Se incluyeron también lactantes con una historia compatible con alergia a

las proteínas de la leche de vaca y un SPT negativo en su primera visita si la prueba positivizaba después de tres meses. Todas las SPT se realizaron utilizando técnicas estandarizadas de acuerdo con las directrices internacionales²⁷⁵.

Los LC incluidos no presentaban síntomas relacionados con la alergia a proteínas de leche de vaca o con cualquier patología grave concomitante con la alergia, y fueron reclutados en cinco centros de salud de Madrid. Los criterios de exclusión fueron la ingesta de fórmula hidrolizada durante más de 2 semanas en el momento del diagnóstico de la alergia a las proteínas de leche de vaca y la ingesta de antibióticos en los 3 meses anteriores al reclutamiento del estudio (también aplicable a sus madres).

Todos los centros participantes aplicaron los mismos protocolos de reclutamiento y cuestionarios. Se recopiló información sobre los datos personales y los posibles factores de riesgo de alergia en lactantes, como la edad, el sexo, el régimen de alimentación, el modo de parto y el uso de antibióticos al nacer para los lactantes; y la edad, la dieta y el estado de tabaquismo y alergia de las madres y las abuelas a través del cuestionario del **Anexo II**.

4.4. Recolección y procesamiento de muestras

Cada participante recibió un kit de recolección de muestras diseñado y confeccionado por nuestro grupo, que incluía: papel de recolección, un recipiente estéril de recogida de heces, guantes, una bolsa de frío, una bolsa hermética, etiquetas para la codificación y el seguimiento de las muestras y una guía fácil de leer, desarrollada por nuestro grupo, para facilitar la recogida de muestra en el domicilio particular (Capítulo 1. Figura 3). Los participantes registraron la fecha de recolección de cada muestra, y las almacenaron en el congelador doméstico a -20°C un máximo de tres días antes de llevarlas al hospital. Un total de 50 muestras fecales (una por lactante) fueron recogidas y almacenadas a -80°C antes de ser procesadas para la extracción de ADN y proteínas.

4.5. Metagenómica

La secuenciación *shotgun* se realizó en 26 muestras de lactantes entre 4 y 6 meses, incluyendo de esta manera 19 LA y 7 LC.

4.5.1. Preparación de la muestra

Se realizó en el centro de investigación FISABIO (Valencia, España). El ADN se extrajo de 200 mg de heces utilizando el kit “QIAamp DNA Stool Mini Kit” (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. A este protocolo se le añadió un paso adicional de ruptura de la membrana utilizando perlas metálicas²⁷⁶. Se lisaron las muestras con 1 mL de InhibitEX buffer, resuspendiendo con un palillo y realizando un vórtex de 5 minutos con 500 µL de perlas magnéticas. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL que se calentó a 95°C durante 7 minutos y se centrifugó 1 minuto a velocidad máxima. Se separaron 200 µL del sobrenadante resultante de la centrifugación a los cuales se añadió 15 µL de proteinasa K y un volumen de buffer AL, centrifugando el lisado 1 minuto a velocidad máxima. Finalmente, se añadió etanol 100% para precipitar el ADN y se pasaron 600 µL del lisado por las columnas incluidas en el Kit para purificar el ADN, que fue eluido en 100 µL de agua libre de nucleasas. Se incluyeron controles negativos en cada tanda de extracción. El ADN extraído se cuantificó mediante el fluorómetro Qubit® 2.0 siguiendo el protocolo del kit “dsDNA HS Assay”. Aquellas muestras con una concentración superior a 0,2 µg/µL fueron seleccionadas para la secuenciación.

4.5.2. Secuenciación *shotgun*

La secuenciación metagenómica se realizó utilizando una plataforma NextSeq (Illumina, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para obtener secuencias (*paired-end*) de 150 pares de bases.

4.5.3. Bioinformática y análisis estadístico

Las secuencias fueron recortadas y filtradas por calidad desde su extremo 3' usando PrinSeq v.0.20.4 con los siguientes parámetros: ns_max_p=1;

min_len=50; trim_qual_right=30; trim_qual_type=media;
trim_qual_window=10; trim_qual_step=5; min_qual_mean=30;
lc_method=entropy; lc_threshold=6023. Las secuencias se unieron mediante el programa FLASH v.1.2.11²⁷⁷ aplicando los parámetros: min-overlap=12; max-mismatch-density=0.1. Se mantuvieron todas las secuencias para los siguientes pasos del análisis. A continuación, se eliminó la contaminación del ADN humano alineando las lecturas con el genoma humano GRCh38.p13 con el programa bowtie2 v2.3.5.1²⁷⁸. Posteriormente, las secuencias se ensamblaron en cóntigos utilizando MEGAHIT v.1.2.7²⁷⁹ y los marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés *open reading frames*) se predijeron utilizando Prodigal v.2.6.3²⁸⁰ (modo metagenómico) y se anotaron con HMMER v.3.2.1²⁸¹ hmmsearch e-value=1e-3 utilizando la base de datos KEGG²⁸². Posteriormente, las secuencias se compararon con la base de datos generada de cóntigos utilizando blastn v2.9.0²⁸³ y los siguientes parámetros: task=megablast; qcov_hsp_perc=90; perc_identity=97; max_target_seqs=1. El número de secuencias en superposición con un ORF se dividió por la longitud del ORF^{284,285}. Los recuentos normalizados de longitud de todos los ORF dentro de una muestra que se anotaron como el mismo KEGG se sumaron para obtener el número de recuentos de un ortólogo KEGG (OK) particular por muestra. Cada recuento de OK se dividió posteriormente por la suma de todos los recuentos de OK para obtener la abundancia relativa de un OK particular dentro de una muestra. Además, la taxonomía de las bacterias que codifican los ORF identificados se determinó comparando las lecturas utilizando Kaiju v1.7.2²⁸⁶ (desajustes máximos = 5; longitud de coincidencia mínima = 20; valor máximo e = 1e-10) con la base de datos de proteínas no redundantes de NCBI (nr_euk 2019-06-26).

Para identificar diferencias significativas en la abundancia entre módulos KEGG, las rutas metabólicas y los OKs entre los grupos LA y LC, se utilizó el algoritmo DESeq2 v.1.24.0²⁸⁷ con parámetros por defecto en el programa R. El paquete DESeq2 está diseñado para la normalización, visualización y análisis diferencial de datos de alta dimensión. Utiliza el método empírico

de Bayes para estimar los valores del logaritmo del *Fold Change* y la dispersión, y para calcular las estimaciones posteriores de estas cantidades. Se aplicó el enfoque de *False Discovery Rate* (FDR) para ajustar las pruebas de hipótesis múltiples utilizando el test “doTestDESeq2” proporcionado por el FISABIO. Este test incluye el análisis de correspondencia canónica (CCA, utilizado para determinar los modos lineales dominantes de covariabilidad entre dos conjuntos de datos) y el análisis de varianza multivariado permutacional usando matrices de distancia (ADONIS, realiza comparaciones de medias entre dos o más grupos, es decir prueba la hipótesis de igualdad de medias multivariada entre grupos²⁸⁸ y su significancia es evaluada con permutaciones. Análisis multivariante no paramétrico). Las rutas metabólicas con un *p* valor < 0.05 y un *p* valor ajustado < 0.05 por FDR, fueron consideradas significativas.

4.6. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Un total de 20 muestras de heces de lactantes de las que había cantidad suficiente, 10 LA y 10 LC, se analizaron por la técnica ELISA para obtener las concentraciones de tres proteínas: α 1-antitripsina, lactoferrina, y calprotectina.

4.6.1. Preparación de la muestra

Las 20 muestras de heces seleccionadas se homogeneizaron y se realizó una alícuota de 180 mg. A continuación, se realizó la extracción de proteínas mediante una dilución 1:9 (muestra:PBS) en tres diluciones seriadas. En primer lugar, se añadieron 540 μ L de PBS a los tubos Eppendorf con 180 mg de muestra de heces y se realizó una sonicación de 5 minutos. Después, las muestras se centrifugaron (10.000 rpm, 10 min, 4°C) y se transfirieron los sobrenadantes a otro tubo Eppendorf. Sobre el pellet restante, se repitió dos veces el proceso de extracción. El *pool* de sobrenadantes obtenido se alicuotó en 3 alícuotas de 400 μ L para los diferentes análisis de proteínas.

4.6.2. Protocolo ELISA

Se calcularon y prepararon las diluciones apropiadas para cada proteína, considerando las concentraciones esperadas obtenidas en la búsqueda bibliográfica. Las diluciones finales fueron 1:250, 1:500 y 1:100 para α 1-antitripsina, lactoferrina, y calprotectina, respectivamente. Una vez realizadas las correspondientes diluciones en todas las muestras, se siguió el protocolo del kit comercial para ELISA de Fine Test® (Wuhan, China) para cada una de las proteínas de estudio.

La densidad óptica de los resultados fue analizada por un lector de placas Varioskan a 450 nm y a 620 nm en dos mediciones. Con los datos obtenidos de los 7 patrones estándar se obtuvo una curva patrón de 5 parámetros que fue empleada para interpolar los datos de las muestras.

4.6.3. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Para el tratamiento de datos se restaron las absorbancias medidas a 450nm menos las medidas a 620nm en cada muestra y se promediaron los duplicados de la primera medición. A continuación, se realizó el mismo proceso con la segunda medición y se realizó un promedio de las medidas obtenidas en cada muestra.

El análisis estadístico se realizó con el software Graphpad Prism v8.0.1. (GraphPad Software). Este programa se utilizó para calcular las concentraciones con la curva de calibrado, la significancia con análisis paramétricos y no paramétricos y la gráfica de barras de cada proteína de estudio. Las comparaciones entre grupos experimentales se llevaron a cabo en 3 pasos. En primer lugar, se realizó un análisis de ajuste no lineal y una posterior interpolación de concentraciones. Después, se comprobó si dentro de cada grupo los datos se comportaban siguiendo una distribución normal. Para ello se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Finalmente, se realizaron análisis paramétricos para muestras no pareadas (T-Student). En caso de que alguno de los grupos no se comportara siguiendo una distribución normal se aplicó la prueba no paramétrica U de

Mann-Whitney, que compara las medias de los grupos experimentales. En todos los análisis se estableció un nivel de significación p inferior a 0,05 como significativo.

4.7. Análisis de correlación

El estudio de correlación, entre los resultados obtenidos por metagenómica y la técnica ELISA, se realizó con una población total de 10 lactantes, 6 LA (LA_16, LA_22, LA_29, LA_31, LA_32, y LA_35) y 4 LC (LC_04, LC_05, LC_06 y LC_11). El tamaño muestral se redujo considerablemente debido a dos factores: la cantidad de muestra recogida en muchos casos no fue suficiente para llevar a cabo la correlación y no todos los lactantes fueron incluidos en el estudio antes de realizar la secuenciación, por lo que se obtuvieron datos de los ELISAs pero no de la metagenómica en algunos de ellos. La información demográfica y clínica de estos lactantes se muestra en el **Anexo I**.

En primer lugar, se realizó un curado manual de las rutas biológicas significativas por sentido biológico, y, a continuación, los datos de cada una de las proteínas se unificaron, según los requisitos de la plataforma Metaboanalyst, con los datos de las rutas metabólicas seleccionadas en un archivo csv. Se utilizó la plataforma web Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) para realizar el análisis estadístico de correlación introduciendo los datos sin normalización ni transformación y con auto escalado. Se obtuvo el *heatmap* de las proteínas de estudio mostrando la correlación de rutas metabólicas por pares y el agrupamiento de las mismas utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Por último, se realizó un estudio de patrones para cada proteína y se obtuvieron los p valores de la correlación con cada una de las rutas metabólicas.

5. Resultados

5.1. Perfil de la funcionalidad de la microbiota intestinal asociado a la alergia a leche de vaca

Con el fin de obtener una visión general de la relación entre la funcionalidad de la microbiota intestinal y el desarrollo de la alergia alimentaria a leche de vaca, se realizó el análisis multivariante de correspondencia canónica entre los grupos LA y LC (**Figura 1**). Cuyo objetivo es buscar las relaciones que pueda haber entre dos grupos de variables y la validez de estas.

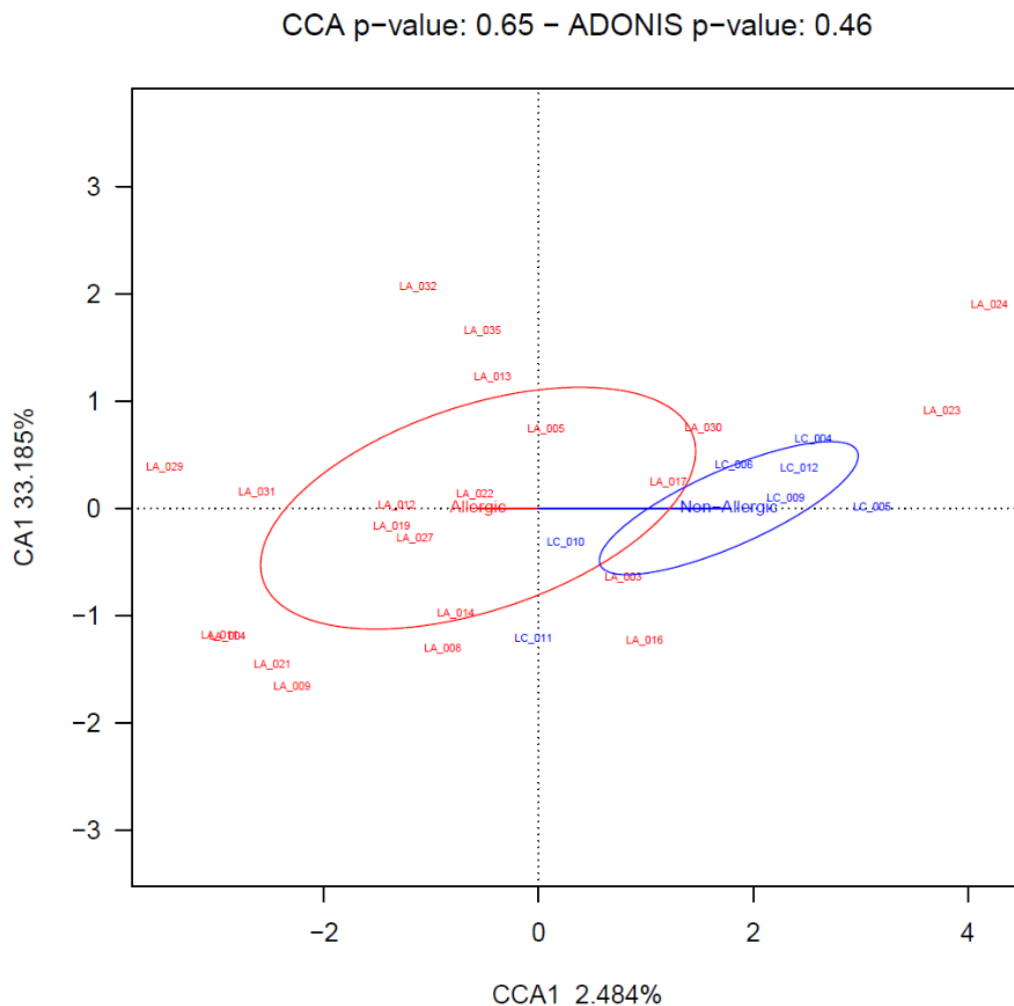


Figura 2. Para investigar la correlación entre la funcionalidad de la microbiota intestinal y el desarrollo de la alergia alimentaria a leche de vaca se utilizó el Análisis de Correspondencias (CCA). Las elipses representan los grupos experimentales (LA y LC) y la agrupación de las muestras (valor de Adonis $p=0,46$). LA= -0.564; LC= 1.773.

Se obtuvieron un total de 313 rutas metabólicas asociadas a un número ortólogo KEGG (OK). Del total, 15 rutas metabólicas fueron significativas (p

valor < 0.05) entre LA y LC. Todas las rutas metabólicas significativas con sus correspondientes valores estadísticos se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Rutas metabólicas significativas (p valor < 0.05) entre lactantes alérgicos y controles. OK: ortólogo KEGG; FC: *Fold Change*. En verde: rutas con un p valor ajustado < 0.05.

Ruta metabólica	OK	p valor	p valor ajustado	log2FC
Metabolismo de los glicerofosfolípidos	564	0.000008	0.002419	0.243
Metabolismo del nicotinato y la nicotinamida	760	0.001577	0.246808	0.233
Inmunodeficiencia primaria	5340	0.005161	0.538457	0.328
Metabolismo del fosfatidilinositol	562	0.008359	0.654097	0.451
Metabolismo de los glicerolípidos	561	0.016640	0.892611	0.183
Sistema de señalización de fosfatidilinositol	4070	0.017552	0.892611	0.203
Metabolismo del ácido lipóico	785	0.022028	0.892611	0.328
Degradación de la atrazina	791	0.028442	0.892611	0.983
Metabolismo de glicina, serina y treonina	260	0.028572	0.892611	0.139
Degradación del clorociclohexano y el clorobenceno	361	0.030698	0.892611	0.404
Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	1040	0.035266	0.892611	0.337
Vías de fijación de carbono en procariontas	720	0.035961	0.892611	-0.175
Metabolismo de los nucleótidos	99984	0.043704	0.892611	0.610
Sistema de ubiquitina	4121	0.046358	0.892611	0.461
Degradación de limoneno y pineno	903	0.047001	0.892611	0.438

Entre las 15 rutas significativas se observaron 4 con una posible relación con la alergia a proteínas de leche de vaca: los metabolismos de los glicerofosfolípidos, el fosfatidilinositol, los glicerolípidos y el sistema de señalización de fosfatidilinositol. Es interesante destacar que la única ruta metabólica con un p valor ajustado significativo (< 0.05) fue la del metabolismo de los glicerofosfolípidos. Además, se observó que este metabolismo estaba aumentado en los LA tal y como se observa en el diagrama de cajas de la **Figura 3**.

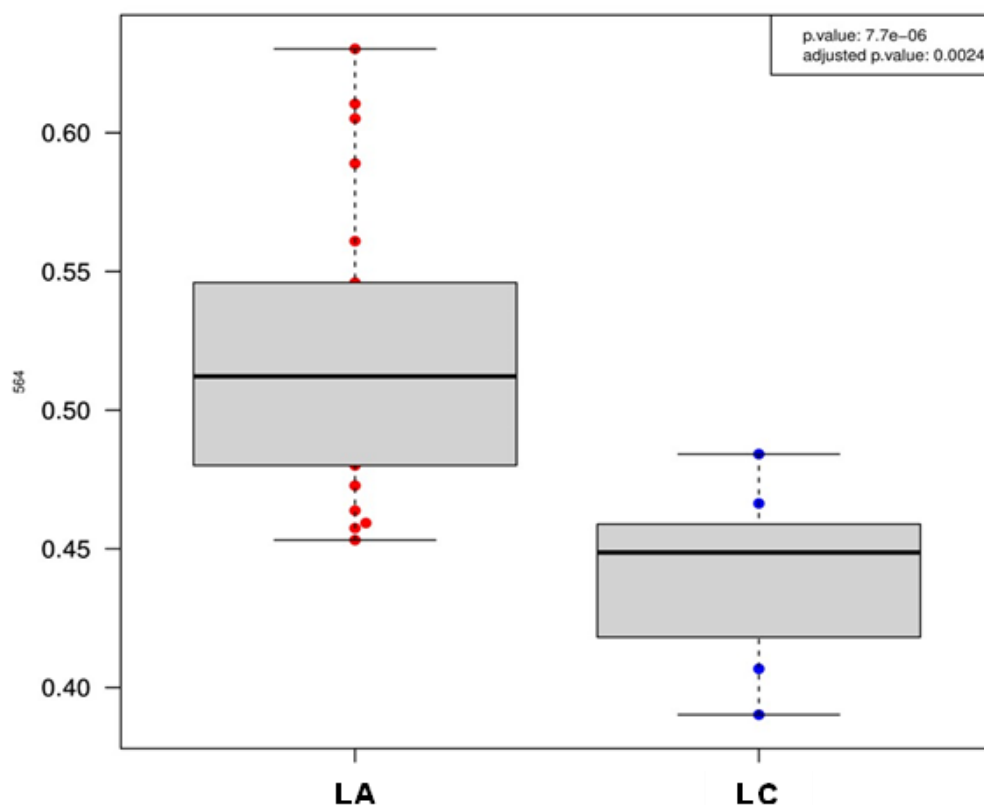


Figura 3. Diagrama de cajas de los dos grupos de lactantes en relación a la abundancia de genes del metabolismo de los glicerofosfolípidos. LA: lactantes alérgicos; LC: Lactantes control. Las medias de los grupos fueron: LA= 0.521 y LC= 0.439.

5.2. Inmunodetección de proteínas fecales

El análisis por ELISA mostró claras diferencias en las concentraciones de todas proteínas fecales entre LA y LC.

En el análisis de la α 1-antitripsina, las concentraciones de la proteína fueron mayores en los lactantes control en relación con los lactantes alérgicos. En la **Figura 4** se muestra el gráfico de barras entre ambos grupos. En el análisis estadístico univariante por U de Mann Whitney se obtuvo un p valor significativo de 0,0068.

Por último, se realizó el análisis de calprotectina fecal. Las concentraciones de calprotectina siguieron una línea similar a la lactoferrina, siendo mayores en los LA en comparación con los LC, tal y como se observa en la **Figura 6**. En el análisis estadístico univariante por U de Mann Whitney se obtuvo un p valor significativo de 0,0132.

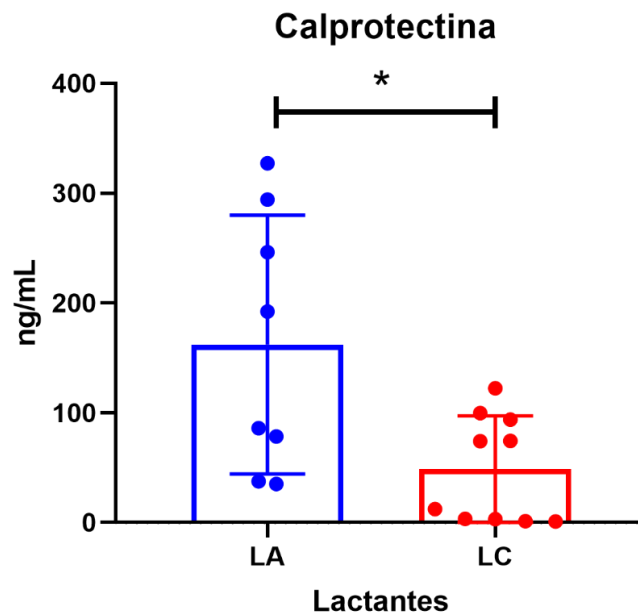


Figura 6. Gráfico de barras de la Calprotectina. * p valor $<$ 0.05 por U de Mann Whitney. **LA:** lactante alérgico; **LC:** lactante control.

5.3. Análisis de correlación

En el análisis de correlación exploratorio entre las tres proteínas fecales y todas las rutas metabólicas obtenidas en el análisis metagenómico, se obtuvieron un total de 39 rutas con un coeficiente de correlación mayor de cero en al menos dos de las tres proteínas. En la **Figura 7** se muestra el *heatmap* del análisis de correlación de las rutas metabólicas entre ellas y con las tres proteínas fecales.

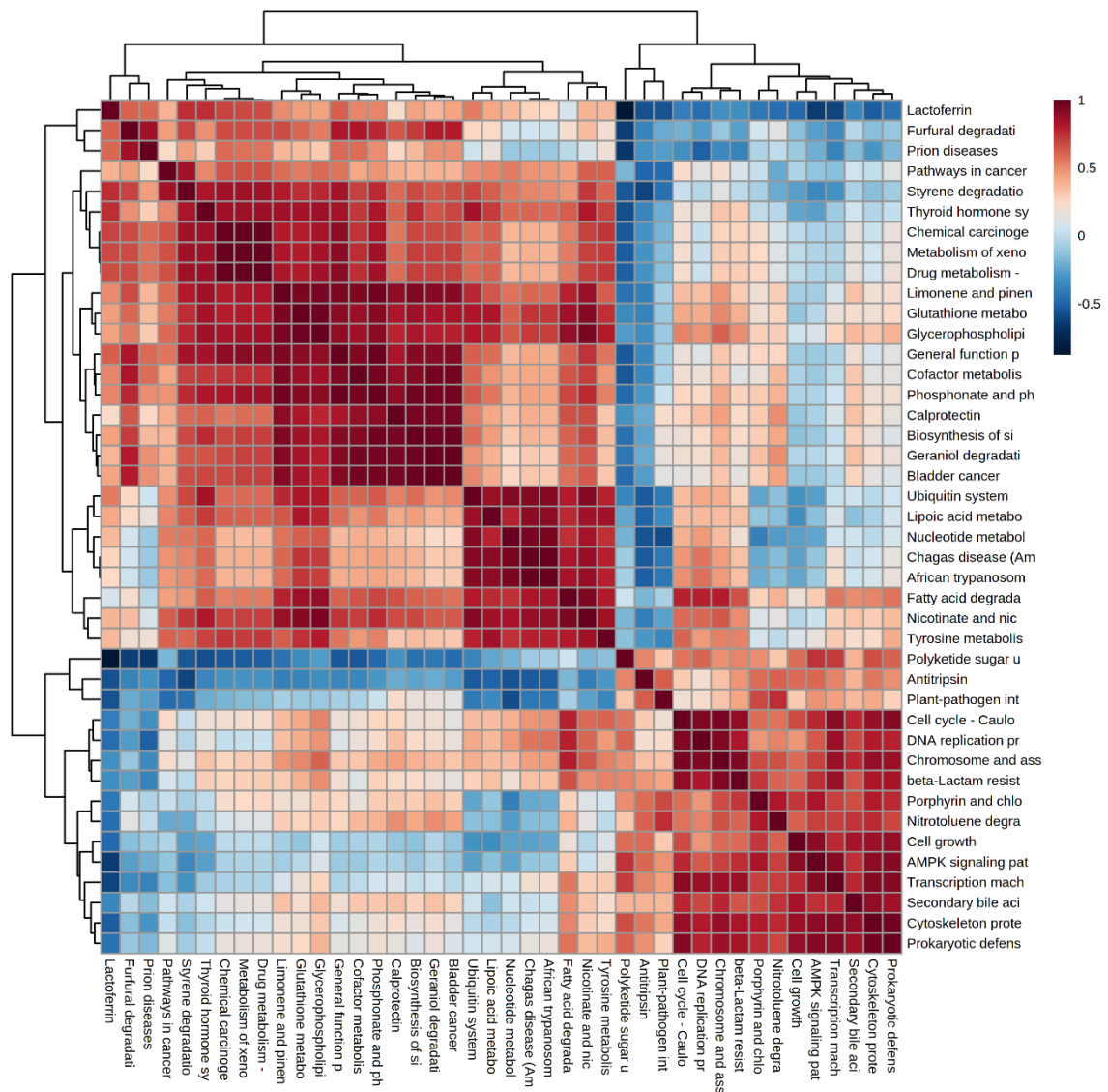


Figura 7. Heatmap del análisis de correlación de las proteínas de estudio y las rutas metabólicas en un agrupamiento por pares utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Cabe destacar que las rutas obtenidas que carecían de sentido biológico en este estudio fueron descartadas en el análisis posterior, como, por ejemplo: la interacción planta-patógeno, la enfermedad de Chagas y la tripanosomiasis africana, entre otras.

Tras el filtrado por sentido biológico un total de 22 rutas metabólicas fueron seleccionadas para realizar el análisis de correlación. Cabe destacar que entre las 22 rutas metabólicas estaba presente el metabolismo de los

glicerofosfolípidos, la ruta más significativa del análisis metagenómico (Tabla 1).

A continuación, en una segunda fase de exploración, se realizó el análisis de correlación entre las 22 rutas seleccionadas y cada una de las proteínas de manera individual y se obtuvieron los p valores correspondientes.

Se observó que para la α 1-antitripsina no hubo ningún valor significativo en la correlación (Figura 9).

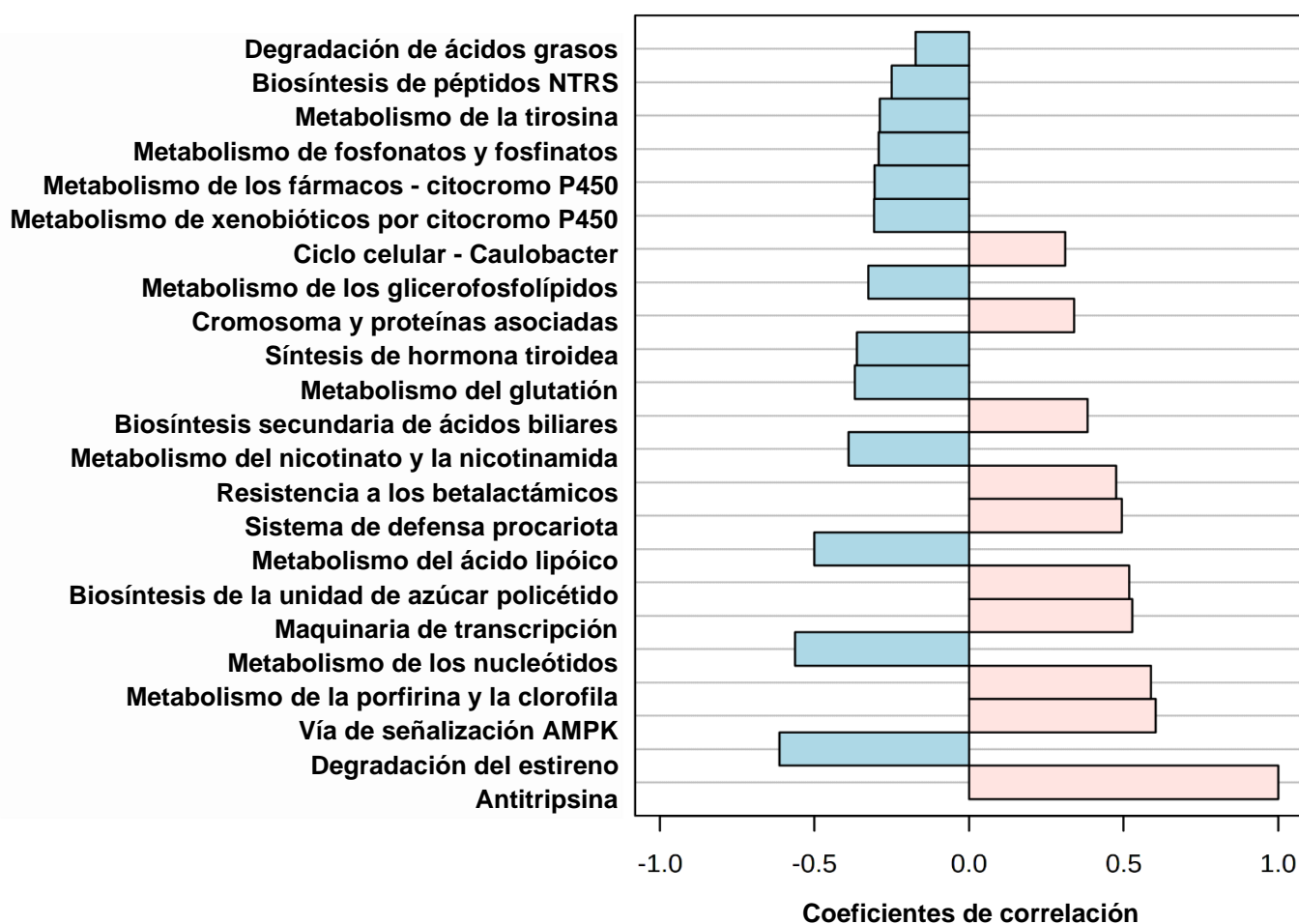


Figura 9. Diagrama de correlación para la α 1-antitripsina. NTRS: no ribosomales del grupo sideróforo. AMPK: proteína cinasa activada por Adenosín Monofosfato cíclico.

Por otro lado, en el análisis de correlación entre las concentraciones de lactoferrina y las 22 rutas metabólicas se obtuvieron 6 rutas significativas, tal y como se observa en la **Figura 10**.

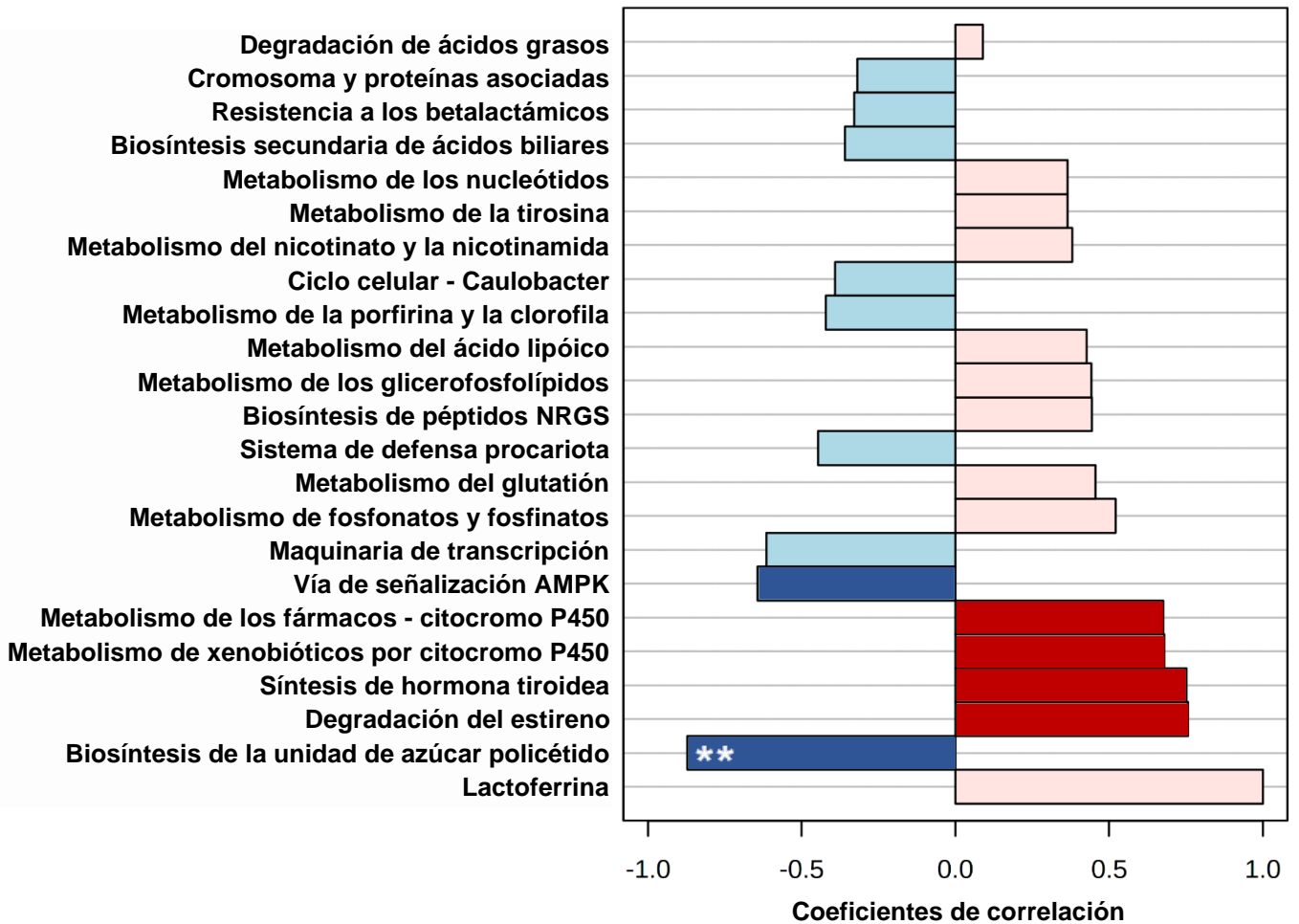


Figura 10. Diagrama de correlación para la lactoferrina. NRGs: no ribosomales del grupo sideróforo. En oscuro los p valores significativos ($p < 0,05$). * p valor $< 0,01$. ** p valor $< 0,005$. AMPK: proteína cinasa activada por Adenosín Monofosfato cíclico.

Por último, se realizó el análisis de correlación de la calprotectina fecal en el que se obtuvieron 6 rutas metabólicas significativas, teniendo 3 de ellas un p valor inferior a 0,005 (**Figura 11**).

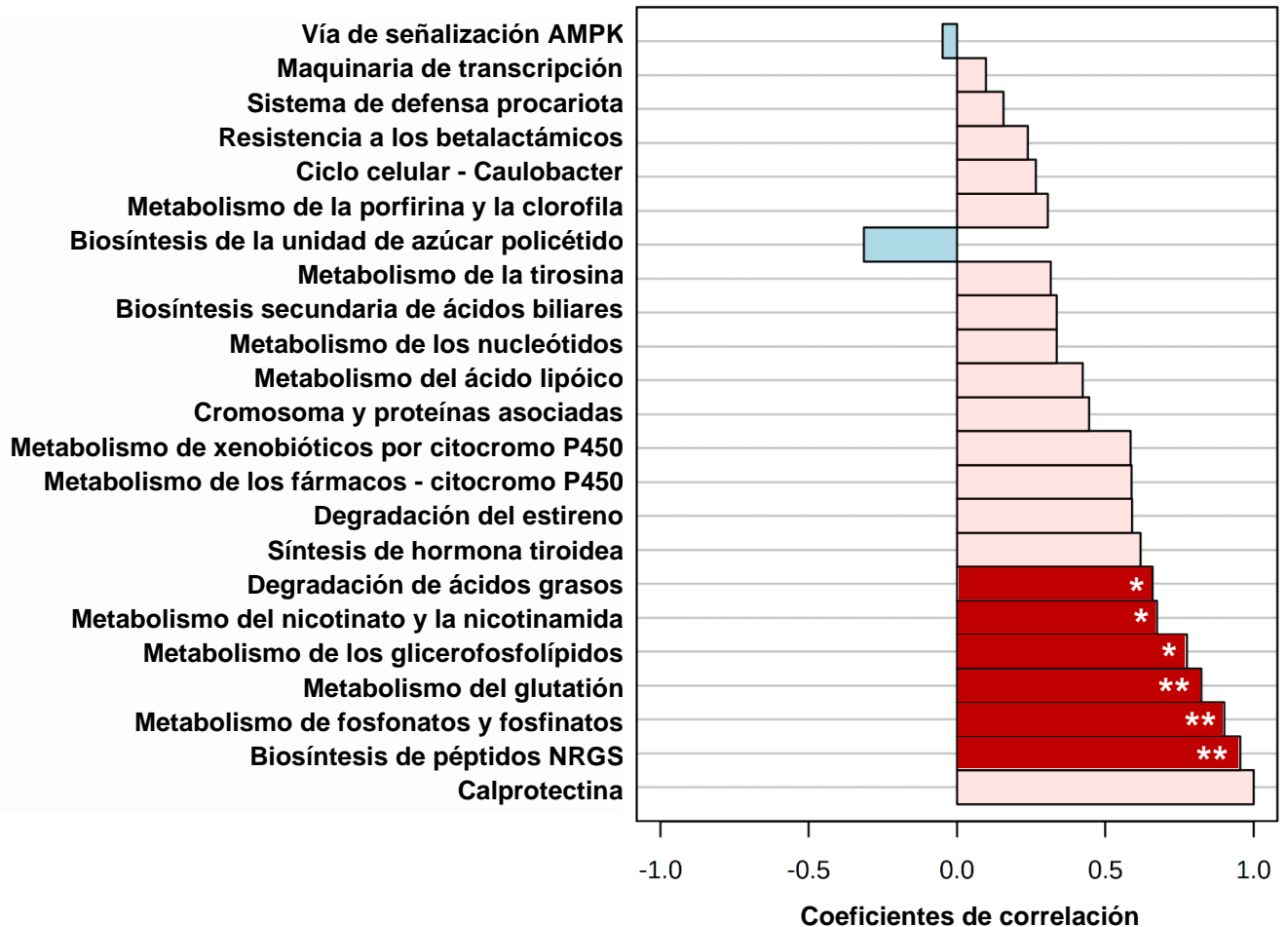


Figura 11. Diagrama de correlación para la calprotectina fecal. NRGs: no ribosomales del grupo sideróforo. En oscuro los p valores significativos ($p < 0,05$). * p valor $< 0,01$. ** p valor $< 0,005$. AMPK: proteína cinasa activada por Adenosín Monofosfato cíclico.

6. Discusión

La microbiota intestinal constituye un ecosistema muy complejo en el que las bacterias juegan un papel esencial. Alrededor del 70% de la colonización de la microbiota intestinal en la descendencia procede de la vía materna³². Sin embargo, a pesar de su formación temprana, la composición de la microbiota intestinal es muy dinámica y depende de factores asociados al huésped como pueden ser la dieta, el consumo de antibióticos o el tipo de parto, entre otros⁷⁴. Durante los últimos años, el estudio de la relación de la microbiota y la alergia ha cobrado mucha importancia, ya que se ha descrito que esta juega un papel crucial en el desarrollo y la regulación del sistema inmune, existiendo una relación simbiótica entre el huésped sano y los microorganismos que conforman la microbiota^{52,258}. Por otro lado, existe la hipótesis de que alteraciones en los niveles o la diversidad bacteriana del intestino (disbiosis) pueden alterar la tolerancia inmunológica de la mucosa, lo que da lugar a enfermedades alérgicas. Sin embargo, actualmente existe mucha controversia sobre si es la disbiosis la que causa la alergia o es la alergia la que termina produciendo una alteración en la microbiota^{43,289}. Diversos estudios han demostrado que existe una relación entre la microbiota pulmonar y la alergia respiratoria, así como la microbiota cutánea y el desarrollo de dermatitis atópica y la microbiota intestinal y la alergia alimentaria^{66,289–291}.

En este estudio, se reclutaron lactantes para investigar el efecto de la microbiota en el desarrollo de la alergia desde un punto de vista novedoso, implicando la inmunodetección de proteínas fecales y la metagenómica *shotgun*. Las fortalezas de este estudio son la determinación rigurosa de la alergia a proteínas de leche de vaca en los hospitales y centros de salud implicados y el uso de técnicas de alto rendimiento independientes del cultivo para la identificación de la microbiota y las rutas implicadas. Como limitaciones encontramos la relación entre la dieta y el estado alérgico de los lactantes, ya que en el momento de diagnosticarse la alergia a proteínas de leche de vaca en lactantes alimentados con fórmula a base de leche de

vaca (exclusivamente o como complemento de la lactancia materna), su alimentación era cambiada a otras alternativas como la fórmula parcialmente hidrolizada, la fórmula extensamente hidrolizada o la fórmula hidrolizada de soja^{292,293}. Por otro lado, las muestras fecales se recolectaron solo una vez por lo que los cambios en la microbiota a lo largo del tiempo (por ejemplo, antes y después del desarrollo de la alergia) no fueron estudiados. Asimismo, la microbiota en lactantes de corta edad varía rápidamente y la heterogeneidad de sus edades (**Anexo I**) pudo dificultar la identificación de diferencias entre los grupos experimentales.

En cuanto a los resultados de este estudio, el análisis metagenómico permitió obtener 15 rutas metabólicas significativas, entre las que destacan por su posible relación con la alergia a proteínas de leche de vaca, los metabolismos de los glicerofosfolípidos, el fosfatidilinositol, los glicerolípidos y el sistema de señalización de fosfatidilinositol. Cambios en el metabolismo de los lípidos a nivel de las mucosas pueden conducir a la pérdida de integridad de la barrera epitelial y disbiosis²³⁹. Estos cambios y las respuestas inmunitarias que tienen lugar en las membranas mucosas están relacionados con una liberación específica y sistémica de metabolitos, con la correspondiente alteración de sus rutas metabólicas. En este estudio, 4 rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo lipídico aparecen aumentadas en el grupo LA en comparación con LC. Este dato podría indicar que existe una inflamación y disrupción de barrera intestinal producida por la alergia alimentaria.

Por otro lado, se observaron claras diferencias entre los grupos LA y LC en la inmunodetección de proteínas fecales. En primer lugar, la α 1-antitripsina resultó estar disminuida significativamente en LA. La α 1-antitripsina es una proteína sérica no dietética sintetizada en el hígado²⁹⁴. Es resistente a la degradación digestiva y, en consecuencia, puede utilizarse de forma fiable para evaluar las excesivas pérdidas de proteínas gastrointestinales^{273,295}. Kalsheker *et al.*²⁹⁶ observaron que el alérgeno de los ácaros del polvo doméstico Der p1 inactiva catalíticamente la α 1-antitripsina mediante un mecanismo dependiente del tiol, que puede promover la inflamación de las

vías respiratorias y el asma. Sin embargo, en relación con la alergia a proteínas de leche de vaca hay muy pocos datos y los resultados no son concluyentes. Majamaa *et al.*²⁹⁷ observaron que el aumento de la concentración de α 1-antitripsina fecal se asocia a la alergia a la leche de vaca en lactantes con eczema atópico. Por otro lado, otros autores analizaron los niveles de α 1-antitripsina, junto con un panel de otros marcadores, y no encontraron diferencias significativas para esta proteína^{273,298}.

En este estudio se encontraron elevadas significativamente la lactoferrina y la calprotectina en el grupo LA. La lactoferrina es una proteína globular perteneciente a la familia de las transferrinas, glicoproteínas de unión de hierro no hemo²⁹⁹. La lactoferrina se encuentra en la superficie de la mucosa, donde funciona como un componente destacado de la primera línea de defensa del huésped contra la infección y la inflamación³⁰⁰⁻³⁰². Esta proteína también es un componente abundante de los gránulos específicos de los neutrófilos y puede liberarse en el suero tras la desgranulación de estos³⁰¹. Niveles aumentados de lactoferrina fecal, se han relacionado con enfermedades caracterizadas por la inflamación crónica del tracto gastrointestinal^{301,303}. Borkowska *et al.*³⁰³ describieron que niños diagnosticados de enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa moderada presentaban concentraciones fecales de lactoferrina significativamente más altas que aquellos con la enfermedad leve o inactiva. Por otro lado, la calprotectina es una proteína inmunomoduladora, antimicrobiana y antiproliferativa que está presente en el citoplasma de los neutrófilos, en las membranas de los macrófagos, en los monocitos activados y en las células epiteliales de la mucosa^{81,304}. La medición de calprotectina ha sido evaluada como un marcador no invasivo de inflamación gastrointestinal, ya que se sabe que sus concentraciones están correlacionadas con el nivel de inflamación de la mucosa intestinal^{305,306}. Sobre la base de este hecho, se ha utilizado para el seguimiento de afecciones intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal^{124,307}. En relación con la alergia a proteínas de leche de vaca, un ejemplo notable es el estudio de Qiu *et al.*²⁷¹,

en el que vieron que el nivel de calprotectina fecal en lactantes con alergia a las proteínas de la leche disminuyó tras la intervención dietética, por lo que parece ser un indicador biológico prometedor para controlar las alergias que afectan al intestino. Asimismo, Beşer *et al.*³⁰⁸ observaron niveles de calprotectina elevados en niños alérgicos a proteínas de leche de vaca, a partir de lo cual sugieren su uso como biomarcador. Sin embargo, la evidencia es contradictoria, ya que otros autores no encontraron diferencias significativas^{272,309}. Tanto la lactoferrina como la calprotectina, son liberadas por el tracto gastrointestinal en respuesta a la infección y la inflamación de la mucosa y numerosos estudios han analizado ambas^{269,270,310–312}. En general, se ha comprobado que los marcadores fecales son más precisos que los séricos. De esta manera, la calprotectina y la lactoferrina pueden diferenciar la enfermedad inflamatoria de los trastornos funcionales del intestino. Un ejemplo de esto es un estudio realizado con pacientes con infección por *Clostridium difficile*, donde se observó que tanto la calprotectina fecal como la lactoferrina eran más altas en los infectados, especialmente en aquellos con toxina detectable en las heces³¹². Por lo tanto, el aumento de ambas proteínas en las heces de LA en comparación a los LC confirma el daño en la mucosa y la inflamación intestinal producidas por la alergia alimentaria.

En el análisis de correlación, no se identificó ninguna ruta metabólica significativa que correlacionase con la α 1-antitripsina, pero si se identificaron varias rutas para la lactoferrina y la calprotectina. En primer lugar, la lactoferrina se correlacionó inversamente con la vía de señalización proteína cinasa activada por adenosín monofosfato cíclico (AMPK). Se ha descrito en la bibliografía, que la lactoferrina puede activar la AMPK y, de esta forma, la fosforilación mediada por esta cinasa cambia de consumir adenosín trifosfato (ATP) en forma activa (para la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol) a la producción activa de ATP (para la oxidación de ácidos grasos y glucosa)³¹³. Asimismo, la lactoferrina se correlacionó de manera inversa con la biosíntesis de la unidad de azúcar policétido. Los policétidos son metabolitos secundarios de bacterias, y se

ha descrito que los ácidos grasos saturados se pueden considerar el producto final más reducido de la vía de los policétidos³¹⁴. Los resultados sugieren que la lactoferrina juega un papel en la biosíntesis de ácidos grasos durante el desarrollo de la alergia. Estos hallazgos proporcionan una nueva visión del papel fisiológico de la lactoferrina para el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular. Por otro lado, metabolismo mediado por el citocromo P450 resultó estar correlacionado positivamente con la lactoferrina. Este dato es relevante, al haberse descrito la formación de radicales de oxígeno mediada por la lactoferrina mediante el sistema NADPH-citocromo P-450 reductasa³¹⁵. Por último, en relación con la inmunidad, se observó una correlación directa con la síntesis de hormona tiroidea. Se ha descrito que la hormona tiroidea desempeña un papel importante en la capacidad de eliminación de bacterias de los neutrófilos³¹⁶. A su vez, estas importantes células efectoras del sistema inmunitario innato poseen gránulos específicos que contienen lactoferrina. Sin embargo, mientras que la correlación sérica se ha descrito, no existen datos de dicha correlación con lactoferrina fecal³¹⁷.

La calprotectina fecal tuvo una correlación significativa positiva con varias rutas metabólicas. La primera correlación observada fue con la ruta de la degradación de ácidos grasos. Se ha descrito que la calprotectina tiene un papel esencial en el proceso de inflamación, al tener la capacidad de unirse a los ácidos grasos insaturados, incluyendo el ácido araquidónico, el ácido oleico, etc³¹⁸. Esta unión conduce a cambios estructurales que podrían ser beneficiosos para su participación en el proceso inflamatorio. Por otro lado, los ácidos grasos, en particular los AGCC, son metabolitos relacionados con la microbiota intestinal al ser la principal fuente de energía para los colonocitos³¹⁹. Además, se ha descrito que los AGCC son capaces de favorecer la diferenciación de las Tregs del colon²⁵². Estudios previos han reportado que la microbiota intestinal, la permeabilidad, los AGCC y la inflamación están alterados en las enfermedades alérgicas²⁵². La correlación entre la calprotectina fecal y la degradación de los ácidos grasos se ha estudiado también en otras enfermedades como el estrés

crónico³²⁰ y el Parkinson³²¹. Todos los resultados describen asociaciones positivas entre la calprotectina fecal y la degradación de ácidos grasos. Otra ruta metabólica con correlación positiva fue la del metabolismo del glutatión. La alergia alimentaria se asocia a la disfunción de la barrera epitelial intestinal, que puede verse afectada por el estrés oxidativo. Algunos estudios sugieren que las concentraciones de catalasa y glutatión peroxidasa se correlacionan significativamente con el nivel de calprotectina fecal en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal^{322,323}. Esta correlación significativa observada, puede deberse al potencial prooxidante de la calprotectina o a su función antioxidante. Por otro lado, destaca la correlación de la calprotectina con el metabolismo de los glicerofosfolípidos, siendo de especial importancia al ser la ruta con un *p* valor ajustado significativo en el análisis metagenómico. Recientemente Schwarz *et al.*³²⁴ han observado niveles de calprotectina fecal significativamente mayores en pacientes con enfermedad de Crohn que en sujetos sanos. La mayoría de los cambios se observaron en los fosfolípidos plasmáticos, como un mayor contenido de n-3 y cambios en los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-6. Asimismo, se ha asociado el aumento de la calprotectina con la obesidad en niños y se ha sugerido la utilidad potencial de este biomarcador en el seguimiento de sus complicaciones metabólicas³²⁵. Por último, se han correlacionado positivamente los niveles de calprotectina con la agregación y activación de las plaquetas³²⁶. Este dato es de gran interés ya que se ha descrito que los pacientes con un fenotipo alérgico respiratorio grave, con o sin alergia alimentaria, presentan una alteración de las funciones plaquetarias tales como la agregación, adhesión, activación y la liberación de gránulos en comparación con fenotipos alérgicos moderados y sujetos no alérgicos⁷⁸.

7. Conclusiones

En este trabajo hemos confirmado que hay diferencias, tanto en el análisis metagenómico como en los niveles de proteínas fecales, entre los grupos

LA y LC. Además, nuestros resultados muestran una alteración en los metabolismos de los lípidos y los ácidos grasos, así como un aumento de lactoferrina y calprotectina en el grupo LA. Lo que podría indicar que existe una inflamación y disrupción de barrera intestinal producida por la alergia alimentaria. Trabajos anteriores de nuestro grupo han demostrado que la integridad de la barrera epitelial está comprometida en los fenotipos alérgicos graves, independientemente del alérgeno desencadenante, y que esto tiene consecuencias sistémicas^{327,328}. En nuestro estudio, la integridad de la barrera epitelial de los lactantes alérgicos podría estar comprometida de antemano debido a las alteraciones metabólicas que ayudan a establecer el fenotipo alérgico. La disbiosis podría ser, por tanto, una consecuencia de la enfermedad. Sin embargo, serían necesarios estudios prospectivos en este sentido para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, puesto que los factores alergia y dieta estaban relacionados en LA y LC, son necesarios estudios prospectivos que incluyan distintos intervalos de tiempo durante los primeros meses de vida de los lactantes para entender el papel de las diferencias a nivel de microbiota intestinal entre LA y LC en el desarrollo de la alergia. Por último, la identificación mediante técnicas ómicas de las vías metabólicas alteradas y de los metabolitos implicados, como los mediadores lipídicos, complementaría nuestros hallazgos y ayudaría a descubrir mecanismos adicionales por los que el microambiente intestinal de los primeros años de vida influye en el riesgo de alergia alimentaria.

8. Anexos

I. Características demográficas y clínicas de los lactantes incluidos en el estudio. H: Hombre; M: Mujer; LM: Leche Materna; F: Fórmula; H: Hidrolizado.

Muestra	Edad (meses)	Sexo	Clasificación	Tipo de parto	Antibióticos en el parto	Alimentación
LA_001	4	H	Alérgico	Cesárea	Sí	LM+H
LA_002	5	M	Alérgico	Cesárea	No	LM
LA_003	5	H	Alérgico	Vaginal	No	LM+H

LA_004	4	H	Alérgico	Cesárea	No	LM+H
LA_005	5	M	Alérgico	Vaginal	Sí	LM+H
LA_006	3	M	Alérgico	Vaginal	No	LM+H
LA_007	2	H	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_008	6	M	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_009	6	H	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_010	3	M	Alérgico	Cesárea	Sí	LM+F
LA_011	5	H	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_012	6	M	Alérgico	Vaginal	No	LM
LA_013	5	H	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_014	5	M	Alérgico	Vaginal	No	LM+F
LA_015	3	H	Alérgico	Vaginal	No	LM+H
LA_016	4	M	Alérgico	Vaginal	Sí	LM
LA_017	5	M	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_019	5	M	Alérgico	Vaginal	No	LM+H
LA_020	7	H	Alérgico	Vaginal	No	LM
LA_021	6	M	Alérgico	Vaginal	No	LM+F
LA_022	6	M	Alérgico	Cesárea	No	LM
LA_023	6	M	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_024	6	M	Alérgico	Vaginal	No	LM+H
LA_026	8	M	Alérgico	Vaginal	No	LM+H
LA_027	5	H	Alérgico	Vaginal	No	LM+H
LA_028	7	H	Alérgico	Vaginal	Sí	LM
LA_029	5	M	Alérgico	Vaginal	Sí	LM+H
LA_030	6	H	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_031	4	M	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_032	6	H	Alérgico	Cesárea	No	H
LA_033	4	M	Alérgico	Vaginal	No	LM+H
LA_034	3	H	Alérgico	Vaginal	No	LM+H
LA_035	6	H	Alérgico	Vaginal	No	H
LA_036	1	M	Alérgico	Vaginal	No	H
LC_001	6	H	No alérgico	Vaginal	No	LM
LC_002	7	H	No alérgico	Vaginal	No	LM+F
LC_003	6	M	No alérgico	Vaginal	No	LM+F
LC_004	6	M	No alérgico	Vaginal	Sí	LM+F
LC_005	6	H	No alérgico	Vaginal	No	F
LC_006	6	H	No alérgico	Vaginal	No	F
LC_007	8	H	No alérgico	Vaginal	No	LM+F
LC_008	5	M	No alérgico	Vaginal	No	F
LC_009	5	M	No alérgico	Cesárea	No	F
LC_010	5	M	No alérgico	Cesárea	No	F
LC_011	5	M	No alérgico	Vaginal	No	LM
LC_012	4	H	No alérgico	Vaginal	No	F
LC_013	3	M	No alérgico	Vaginal	No	F
LC_014	4	M	No alérgico	Vaginal	No	LM+F
LC_015	1	M	No alérgico	Vaginal	No	LM+F
LC_016	3	M	No alérgico	Cesárea	Sí	LM+F

II. Cuestionario de antecedentes. Información sobre los datos personales y los posibles factores de riesgo de alergia en lactantes.

CRD VISITA Lactantes - Hª CLÍNICA ANTECEDENTES	
Iniciales investigador:	Código paciente:
<u>Identificación del paciente:</u>	<u>Identificación del investigador:</u>
Nombre:	Nombre:
Iniciales: ___	Iniciales: ___
Código: __ - ____	
NHC:	
Teléfono:	
Dirección:	
Código:	
Las siglas del centro: NJ (Niño Jesús); EG (Eloy Gonzalo); GM (Gregorio Marañón); CEU.	
Grupo de estudio al que pertenece: LA (lactante alérgica); MA (madre de bebé alérgica); AA (Abuela de bebé alérgica); LC (lactante control); MC (madre de bebé control); AC (abuela de bebé control)	
Los tres últimos dígitos: número correlativo al grupo de bebé-madre-abuela al que pertenece de 001 a 050	
<ul style="list-style-type: none">• La información de esta hoja es para uso interno de los centros participantes en la investigación, y debe ser guardada aparte del resto de la documentación clínica del estudio.• Rellene la información solicitada en el encabezamiento de cada página.• El código será la única identificación del paciente que se incluirá en la base de datos.	
- 1 -	

CRD VISITA Lactantes - Hª CLÍNICA ANTECEDENTES

Iniciales investigador: Código paciente:

Fecha de inclusión en el estudio (dd/mm/aaaa):

Fecha de la firma del Consentimiento Informado del padre o tutor legal (dd/mm/aaaa):

1. Datos demográficos del paciente:

- Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa):
- Edad (meses):
- Lugar de nacimiento: (Ciudad/Pueblo) (Provincia)
(Código postal) (País).....
- Reside actualmente en su país de nacimiento: Sí No
- Si la respuesta es "No", residió en su país de nacimiento hasta la edad de:.....
- Raza: caucasiano hispano negro asiático magrebí
- Lugar de residencia:
 Urbano Rural
- ¿Tiene hermanos?
 No
 Sí, ¿cuántos hermanos mayores?
- Sí, ¿cuántos hermanos menores?
- ¿Hay mascota en casa?
 No
 Sí, después del nacimiento
 Sí, antes del nacimiento
- ¿Ha realizado la vacunación según el calendario oficial?
- No, pendiente de vacunación:
- Sí

2. Tipo de nacimiento

- Parto vaginal
- Cesárea
- ¿Recibió antibióticos durante el parto?
 Sí
 No
 No lo recuerda

3. ¿Lactancia materna?

- Sí
- No

CRD VISITA Lactantes - Hª CLÍNICA ANTECEDENTES

Iniciales investigador:

Código paciente:

- Si la respuesta es "Si",
 - Hasta que mes de vida realizó lactancia materna exclusiva: (meses)
 - Posterior a la lactancia materna exclusiva, realizó lactancia mixta: No/Si (..... meses)

4. Fecha de introducción de la leche de fórmula (mm/aaaa):.....

Marca:

5.- Fecha de la última manifestación alérgica (solo aplicable a casos): (mm/aaaa):.....

6. Síntomas (señalar los síntomas que presentó en la reacción **más grave** tras la ingesta de leche) **(solo aplicable a casos):**

A. Síntomas orofaríngeos:

- Síndrome de alergia oral (incluyendo eritema perioral)

B. Síntomas cutáneos:

- Urticaria
- Angioedema
- Eritema/ rubor
- Picor

C. Síntomas digestivos:

- Náuseas
- Vómitos
- Dolor abdominal
- Retortijones
- Diarrea
- Disfagia

D. Síntomas respiratorios:

- Asma (disnea, sibilancias, tos, opresión torácica)
- Rinitis
- Disfonía
- Ocupación faríngea

E. Síntomas oculares:

- Conjuntivitis

F. Síntomas cardiovasculares:

- Taquicardia
- Isquemia miocárdica (angina, infarto)
- Hipotensión

G. Síntomas neurológicos:

- Desorientación, confusión
- Mareo
- Convulsiones

CRD VISITA Lactantes - Hª CLÍNICA ANTECEDENTES

Iniciales investigador: Código paciente:

- Incontinencia
- Letargia
- Pérdida de conocimiento

H. Anafilaxia (marcar todo lo aplicable)

- con broncoespasmo grave
- con edema de glotis grave
- con hipotensión (shock anafiláctico)
- anafilaxia inducida por ejercicio

I. Otros síntomas

J. Clasificación de los síntomas: Locales, Sistémicos, Locales + Sistémicos

7. Tiempo desde la ingesta de leche hasta la aparición de los síntomas (solo aplicable a casos):

- < 5 minutos
- 5 a 15 minutos
- 15 a 30 minutos
- 30 a 60 minutos
- 1 a 2 horas
- se desconoce (pero < 2 horas)

8. ¿Precisó tratamiento para el control de la reacción? (solo aplicable a casos):

- Sí: antihistamínicos corticoides adrenalina sueroterapia
- beta2 agonistas inhalados oxígeno drogas vasoactivas
- ventilación mecánica desconocido
- No
- Se desconoce

9. Antecedentes familiares de atopia:

- Madre:** Sí alergia pólenes No
- Sí alergia alimentos
 - Sí alergia fármacos
 - Sí alergia a himenópteros
 - Sí alergia látex
 - Sí, dermatitis atópica

- Abuela:** Sí alergia pólenes No
- Sí alergia alimentos
 - Sí alergia fármacos
 - Sí alergia a himenópteros
 - Sí alergia látex
 - Sí, dermatitis atópica

- Padre:** Sí No Desconocido
- Hermanos:** Sí No Desconocido NP (no procede)

CRD VISITA Lactantes - Hª CLÍNICA ANTECEDENTES

Iniciales investigador:

Código paciente:

10. Episodios de enfermedad respiratoria asociada (presente o pasada):

Asma: Sí No Desconocida

Bronquiolitis: Sí No Desconocida

Rinitis: Sí No Desconocida

Otitis serosa: Sí No Desconocida

Otros:

11. Dermatitis atópica: Sí No Desconocido

12. Otras sensibilizaciones alérgicas conocidas:

Conclusiones generales

1. Es necesaria la estandarización en el manejo de pacientes y condiciones previas al análisis de heces mediante técnicas ómicas, ya que proporcionaría precisión y reproducibilidad y mejoraría la calidad general de los resultados de este tipo de estudios. Se ha realizado una propuesta de protocolo estandarizado, que incluye el diseño de un kit de recogida de heces que facilita al paciente la recogida de la muestra y su transporte al hospital.
2. La recopilación de información de los pacientes mediante cuestionarios detallados incluyendo preguntas sobre dieta y alimentos funcionales, así como sobre otros factores intrínsecos, es de gran ayuda para conocer y potencialmente eliminar los sesgos interindividuales en el tratamiento de datos.
3. El perfil metabolómico de los grupos murinos experimentales estudiados ha permitido establecer un nuevo modelo experimental de referencia, en el que se ha demostrado la correlación entre la enteritis alérgica y los niveles de IgE.
4. El incremento de IgE promueve alteraciones del metabolismo lipídico y genera productos lipídicos proinflamatorios en las etapas de inflamación leve y moderada, mientras que la presencia de IgE en la etapa de inflamación grave altera un mayor número de procesos fisiológicos, incluidos los relacionados con el microbioma intestinal (e.g. metabolismo del butanoato) y las rutas energéticas (e.g. ciclo de Krebs).
5. La N-tau-metilhistamina se confirma como metabolito biomarcador de la activación de los mastocitos en la enteritis alérgica, así como potencial marcador de la gravedad de la enfermedad.
6. La IgE está involucrada en la enteritis alérgica, no solo por causar la disrupción de barrera y el empeoramiento de la inflamación, sino también porque se produce la alteración de metabolitos intestinales,

que a su vez podrían modificar la inducción de respuestas inmunes reguladoras.

7. Existen diferencias en la microbiota intestinal, tanto en el análisis metagenómico como en los niveles de proteínas fecales, entre los lactantes alérgicos a proteínas de leche de vaca y los lactantes control.
8. En los lactantes alérgicos a proteínas de la leche de la vaca se observa el aumento de lactoferrina, calprotectina y la alteración del metabolismo de los lípidos y los ácidos grasos. Lo que sugiere la presencia de inflamación y de la disrupción de barrera intestinal producida por la alergia alimentaria.
9. Existe una correlación significativa de la calprotectina fecal con el metabolismo de los glicerofosfolípidos, que se relaciona a su vez con la alergia alimentaria.
10. Los estudios multiómicos permiten mejorar la comprensión de un sistema biológico en su conjunto. Esta Tesis Doctoral en particular, ha permitido avanzar en la comprensión de la interacción de la microbiota con la alergia alimentaria y en la integración de datos procedentes de diferentes ómicas.

General conclusions

1. Standardization in the management of patients and conditions prior to faecal analysis using omic techniques is necessary, as it would provide accuracy and reproducibility and improve the overall quality of the results of these studies. A standardized protocol proposal has been made, which includes the design of a stool collection kit that facilitates the patient to collect the sample and transport it to the hospital.
2. The collection of information from patients through detailed questionnaires including questions about diet and functional foods, as well as other intrinsic factors, is of great help to know and potentially eliminate interindividual biases in data processing.
3. The metabolomic profile of the experimental murine groups studied has allowed the establishment of a new experimental reference model, in which the correlation between allergic enteritis and IgE levels has been demonstrated.
4. The increase in IgE promotes alterations of lipid metabolism and generates pro-inflammatory lipid products in the stages of mild and moderate inflammation, while the presence of IgE in the stage of severe inflammation alters a greater number of physiological processes, including those related to the intestinal microbiome (e.g. butanoate metabolism) and energy pathways (e.g. Krebs cycle).
5. N-tau-methylhistamine is confirmed as a biomarker metabolite of mast cell activation in allergic enteritis, as well as a potential marker of disease severity.
6. IgE is involved in allergic enteritis, not only because it causes barrier disruption and worsening of inflammation, but also because the alteration of intestinal metabolites occurs, which in turn could modify the induction of regulatory immune responses.

7. There are differences in gut microbiota, both in metagenomic analysis and in fecal protein levels, between infants allergic to cow's milk proteins and control infants.
8. In infants allergic to cow's milk proteins, increased lactoferrin, calprotectin and impaired metabolism of lipids and fatty acids are observed. This suggests the presence of inflammation and disruption of the intestinal barrier caused by food allergy.
9. There is a significant correlation of fecal calprotectin with glycerophospholipid metabolism, which is in turn related to food allergy.
10. Multiomic studies allow to improve the understanding of a biological system as a whole. This Doctoral Thesis in particular, has allowed to advance in the understanding of the interaction of the microbiota with food allergy and in the integration of data from different omics.

Anexos

1. Publicaciones derivadas del trabajo de Tesis

- **Artículos**

- **Zubeldia-Varela E.**, Blanco-Pérez F., Barker-Tejeda T.C., Rojo D., Villaseñor A., Gonzalez-Menendez I., Laiño J., Krause M., Martella M., Quintanilla-Martinez L., Yu P., Barbas C., Barber D., Vieths S., Perez-Gordo M., Toda M. (2022). *The impact of IgE in gut and serum metabolomes in a murine experimental model of allergic enteritis*. In progress.
- Mera-Berriatua L.*, **Zubeldia-Varela E.***, Martín-Antoniano I.A., López de Maturana E., Rojo D., Bazire R., Cabrera-Freitag P., Barker-Tejeda T.C., Ubeda C., Barber D., Francino M.P., Ibáñez-Sandín M.D., Pérez-Gordo M. (2022). *Unravelling the gut microbiota of cow's milk allergic infants, their mothers and grandmothers*. JIACI. 32 [5], 2023. DOI 10.18176/jiaci.0781.

- **Revisiones y capítulos de libro**

- **Zubeldia-Varela E.**, Barker-Tejeda T.C., Obeso D., Villaseñor A., Barber D., Pérez-Gordo M. (2022). *Microbiome and Allergy. New insights and perspectives*. JIACI. Under review.
- Barker-Tejeda T.C.*, **Zubeldia-Varela E.***, Obeso D. (2022). *A step closer to understanding the relationship between host and gut microbiota metabolism*. Allergy. PMID: 35122270.
- **Zubeldia-Varela, E.**, Barker-Tejeda, T. C., Blanco-Pérez, F., Infante, S., Zubeldia, J. M., Pérez-Gordo, M. (2021). *Non-IgE-Mediated Gastrointestinal Food Protein-Induced Allergic Disorders. Clinical Perspectives and Analytical Approaches*. Foods (Basel, Switzerland). 10(11), 2662.
- Obeso D.*, **Zubeldia-Varela E.***, Villaseñor A. (2021). *Uncovering the influence of diet and gut microbiota in human*

serum metabolome. Allergy. 4;76(7):2306-2308. PMID: 33570758.

- **Zubeldia-Varela E.**, Barber D., Barbas C., Perez-Gordo M., Rojo D. (2020). *Sample pre-treatment procedures for the omics analysis of human gut microbiota: Turning points, tips and tricks for gene sequencing and metabolomics*. J Pharm Biomed Anal. 30;191:113592.
- **Zubeldia-Varela, E.**, Raczkowska B.A., Ferrer M., Perez-Gordo M., Rojo D. (2019). *Techniques for Phenotyping the Gut Microbiota Metabolome Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications*. Elsevier. 4, pp.33-41. ISBN 9780128152492.

2. Publicaciones no directamente relacionadas con el trabajo de Tesis

• Artículos

- Sanchez-Carrillo S., Ciordia S., Rojo D., **Zubeldia-Varela E.**, Méndez-García C., Martínez-Martínez M., Barbas C., Ruiz-Ruiz S., Moya A., Garriga M., Salazar N., Botella-Carretero J.I., Vega-Piñero B., de Los Reyes-Gavilán C.G., Del Campo R., Ferrer M. (2020). *A body weight loss- and health-promoting gut microbiota is established after bariatric surgery in individuals with severe obesity*. J Pharm Biomed Anal. 6;193:113747.
- Ruiz-Ruiz S., Sanchez-Carrillo S., Ciordia S., Mena M. C., Méndez-García C., Rojo D., Bargiela R., **Zubeldia-Varela E.**, Martínez-Martínez M., Barbas C., Ferrer M., Moya A. (2020). *Functional microbiome deficits associated with ageing: Chronological age threshold*. Aging cell, 19(1), e13063.

3. Congresos

- **Elisa Zubeldia Varela**; Frank Blanco; Tomas Clive Barker; David Rojo; Alma Villaseñor; Laino Joao; Stefan Vieths; Coral Barbas; Masako Toda; Domingo Barber; Marina Perez Gordo. *Biological interpretation of the metabolic alterations detected in a murine model of Allergic Enteritis*. EAACI Congress 2021. Madrid/Cracovia, España/Polonia. 10/07/2021-12/07/2021. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI).
- **Elisa Zubeldia Varela**; Frank Blanco; Tomas Clive Barker; David Rojo; Alma Villaseñor; Laino Joao; Stefan Vieths; Coral Barbas; Marina Perez Gordo; Masako Toda; Domingo Barber. *Metabolic alterations in allergic enteritis*. 19th Immunology Winter School on Basic Immunology Research in Allergy and Clinical Immunology. Online. 22/01/2021-24/01/2021. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). Oral communication.
- **Elisa Zubeldia Varela**; Frank Blanco; Tomas Clive Barker; David Rojo; Alma Villaseñor; Laino Joao; Stefan Vieths; Marina Perez Gordo; Masako Toda; Domingo Barber; Coral Barbas. *Metabolic alterations in IgE-mediated allergic enteritis*. Metabolomics 2020. Online. 27/10/2020-29/10/2020. Metabolomics society.
- **Elisa Zubeldia Varela**; Frank Blanco; Tomas Clive Barker; David Rojo; Alma Villaseñor; Laino Joao; Stefan Vieths; Coral Barbas; Marina Perez Gordo; Masako Toda; Domingo Barber. *Metabolomics in the study of allergic enteritis*. EAACI Congress 2020. Londres, Reino Unido. 06/06/2020-08/06/2020. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI).
- **Elisa Zubeldia Varela**; Frank Blanco; Tomas Clive Barker; David Rojo; Alma Villaseñor; Laino Joao; Stefan Vieths; Coral Barbas; Marina Perez Gordo; Masako Toda; Domingo Barber. *Metabolic profile of a murine model of allergic enteritis*. EAACI Congress 2019. Lisboa, Portugal. 02/06/2019-04/06/2019. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI).

- Raquel Burdallo; **Elisa Zubeldia Varela**; David Roca. *La formulación magistral como pieza clave en la cobertura terapéutica del Hospital General Rural de Gambo, Etiopía*. INFARMA Barcelona 2019. Barcelona, España. 21/03/2019. INTERALIA.
- **Elisa Zubeldia Varela**; David Rojo; Manuel Ferrer; Coral Barbas; Domingo Barber; Marina Perez Gordo. *Food allergy and gut microbiota: optimization of faeces sampling protocol for metabolomic studies*. EAACI Congress 2018. Munich, Alemania. 26/05/2018-30/05/2018. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI).
- **Elisa Zubeldia Varela**. *Estudio de la microbiota intestinal en enfermedades alérgicas*. Jornada de evaluación de los investigadores en formación de la CEINDO. Madrid, España. 26/06/2020. Escuela internacional de doctorado CEU.
- **Elisa Zubeldia Varela**. *Estudio de la microbiota intestinal en enfermedades alérgicas*. Jornada de evaluación de los investigadores en formación de la CEINDO. Valencia, España. 26/06/2019. Escuela internacional de doctorado CEU.
- **Elisa Zubeldia Varela**. *Estudio de la microbiota intestinal en lactantes con alergia a leche de vaca, sus madres y sus abuelas*. Jornada de evaluación de los investigadores en formación de la CEINDO. Madrid, España. 22/06/2018. Escuela internacional de doctorado CEU.

4. Divulgación

- Divulgación científica en la **Semana de la Ciencia**
 - Universidad San Pablo CEU. Madrid, España. 15/11/2020.
 - Universidad San Pablo CEU. Madrid, España. 16/11/2019.
 - Universidad San Pablo CEU. Madrid, España. 21/11/2018.
- Divulgación científica en la **Noche de los Investigadores**
 - Fundación MADRIMASD para el conocimiento. Madrid, España. 27/09/2020.

- Fundación MADRIMASD para el conocimiento. Madrid, España. 27/09/2019.
 - Fundación MADRIMASD para el conocimiento. Madrid, España. 28/09/2018.
 - Fundación MADRIMASD para el conocimiento. Madrid, España. 30/09/2016.
 - Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, España. 23/09/2015.
 - Fundación MADRIMASD para el conocimiento. Madrid, España. 24/09/2014.
 - Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, España. 25/09/2013.
 - Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, España. 26/09/2012.
 - Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, España. 30/09/2008.
- **Artículos divulgativos** escritos. Encargada de la sección de divulgación de la Red de Investigación de Reacciones Adversas a Alérgenos y Fármacos (ARADyAL) del Instituto de Salud Carlos III.
 - *Alergia y vacunas de mRNA frente al virus SARS-CoV-2. Un estudio del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.* 2021.
 - *COVID-19. Profundizando en la pandemia.* 2021.
 - *¿Qué sabes sobre la alergia?.* 2020.
 - Creación e impartición de talleres divulgativos para la mejora de la Salud Comunitaria en **Makeni, Sierra Leona**. 2018-2022. ONG ¡Viva Makeni! y cooperación internacional CEU.
 - Divulgación científica con el **Instituto Cervantes y la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular**. Praga (30/03/2017), Palermo (21/02/2017) y Burdeos (14/02/2017).

Bibliografía

1. Perez Pimiento AJ. Fundamentos de Alergia e Inmunología Clínica. Sánchez Sain-Trápaga C, ed. *McGraw-Hill Interamericana de España SL*. 2019;1:872.
2. Zubeldia JM, Baeza ML, Chivato T, Jáuregui I, Senent C. Libro de las enfermedades alérgicas. In: 2nd ed. ; 2021:0-580. www.fbbva.es
3. *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Advocacy Manifesto Tackling the Allergy Crisis in Europe-Concerted Policy Action Needed.*; 2015.
4. Ojeda P, Sastre J, Olaguibel J, Chivato T. Alergológica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Adult Spanish Population. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2018;28(3):151-164. doi:10.18176/jiaci.0264
5. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ : British Medical Journal*. 1989;299(6710):1259. doi:10.1136/BMJ.299.6710.1259
6. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, et al. Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*. 2021;44(7):519-535. doi:10.1016/J.GASTROHEP.2021.01.009
7. Rook GAW, Martinelli R, Brunet LR. Innate immune responses to mycobacteria and the downregulation of atopic responses. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2003;3(5):337-342. doi:10.1097/00130832-200310000-00003
8. Dimitrov I, Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. *Bioinformatics*. 2014;30(6):846-851. doi:10.1093/bioinformatics/btt619
9. Escribese M, Gómez-Casado C, Barber D, Diaz-Perales A. Immune Polarization in Allergic Patients: Role of the Innate Immune System. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* . 2015;25(4):8-251. Accessed November 1, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26310039/>
10. Veen W, Akdis M. Global Atlas of Allergy. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI)*. Published online 2014. doi:10.5167/uzh-140934
11. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Inc.; 2016. Accessed November 1, 2021. <https://www.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-47978-3>
12. Bertha G, Robledo V. *Inmunología Para El Médico General. La Respuesta Inmune*. Vol 51.; 2008. www.medigraphic.com
13. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the Tissue-Specific Migration of Lymphocytes. *Immunity*. 2002;16(1):1-4. doi:10.1016/S1074-7613(01)00261-8

14. Filella X, Molina R, Ballesta A. Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*. 2002;39(2):63-71.
15. Mercado LF, Alfaro BM, Cano JM. Linfopoyetina Estromal Tímica y su relación con las enfermedades alérgicas. *Ciencia y Salud Virtual*. 2015;7(1):59-70. doi:10.22519/21455333.514
16. Rodriguez-Coira J, Villaseñor A, Izquierdo E, et al. The Importance of Metabolism for Immune Homeostasis in Allergic Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.692004
17. Tan HTT, Hagner S, Ruchti F, et al. Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice. *Allergy*. 2019;74(2):294-307. doi:10.1111/ALL.13619
18. Reglamento (UE) N o 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo.
19. Cianferoni A. Food protein-induced enterocolitis syndrome epidemiology. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2021;126(5):469-477. doi:10.1016/j.anai.2021.02.006
20. Ruffner MA, Ruymann K, Barni S, Cianferoni A, Brown-Whitehorn T, Spergel JM. Food Protein-induced Enterocolitis Syndrome: Insights from Review of a Large Referral Population. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2013;1(4):343-349. doi:10.1016/j.jaip.2013.05.011
21. Katz Y, Goldberg MR, Rajuan N, Cohen A, Leshno M. The prevalence and natural course of food protein-induced enterocolitis syndrome to cow's milk: A large-scale, prospective population-based study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;127(3):647-653.e3. doi:10.1016/j.jaci.2010.12.1105
22. Hwang JB, Sohn SM, Kim AS. Prospective follow-up oral food challenge in food protein-induced enterocolitis syndrome. *Archives of Disease in Childhood*. 2009;94(6):425-428. doi:10.1136/adc.2008.143289
23. Ishige T, Yagi H, Tatsuki M, et al. Endoscopic findings in the acute phase of food protein-induced enterocolitis syndromae. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2015;26(1):90-91. doi:10.1111/pai.12327
24. Caubet JC, Ford LS, Sickles L, et al. Clinical features and resolution of food protein-induced enterocolitis syndrome: 10-year experience. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;134(2):382-389.e4. doi:10.1016/j.jaci.2014.04.008
25. Hoffmann N v, Ahmed A, Fortunato JE. Food protein-induced enterocolitis syndrome: Dynamic relationship among gastrointestinal symptoms, immune response, and the autonomic nervous system. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2021;126(5):498-505. doi:10.1016/j.anai.2021.02.004

26. Hsieh M.H. The microbiome. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2014;124(10):8-11. doi:10.1172/JCI78366.The
27. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science (New York, NY)*. 2006;312(5778):1355. doi:10.1126/SCIENCE.1124234
28. Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1972;25(12):1292-1294. doi:10.1093/ajcn/25.12.1292
29. Clarke G, Sandhu K v., Griffin BT, Dinan TG, Cryan JF, Hyland NP. Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic-Microbiome Interactions. *Pharmacological reviews*. 2019;71(2):198-224. doi:10.1124/PR.118.015768
30. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352(6285):560-564. doi:10.1126/science.aad3503
31. Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal immunology*. 2021;14(4):793-802. doi:10.1038/s41385-021-00389-4
32. Gomez de Agüero M, Ganal-Vonarburg SC, Fuhrer T, et al. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science*. 2016;351(6279):1296-1302. doi:10.1126/science.aad2571
33. Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2014;25(5):428-438. doi:10.1111/pai.12232
34. Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012 486:7402. 2012;486(7402):222-227. doi:10.1038/nature11053
35. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(4):219-232. doi:10.1038/NRI.2017.7
36. Wang HX, Wang YP. Gut microbiota-brain axis. *Chinese Medical Journal*. 2016;129(19):2373-2380. doi:10.4103/0366-6999.190667
37. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*. 2016;8(1):42. doi:10.1186/s13073-016-0303-2
38. Sanchez-Carrillo S, Ciordia S, Rojo D, et al. A body weight loss- and health-promoting gut microbiota is established after bariatric surgery in individuals with severe obesity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113747. doi:10.1016/j.jpba.2020.113747
39. Jansson J, Willing B, Lucio M, et al. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. Bereswill S, ed. *PLoS ONE*. 2009;4(7):e6386. doi:10.1371/journal.pone.0006386

40. Bjerrum JT, Wang Y, Hao F, et al. Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals. *Metabolomics*. 2015;11(1):122-133. doi:10.1007/s11306-014-0677-3
41. Delzenne NM, Cani PD, Everard A, Neyrinck AM, Bindels LB. Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2015;58(10):2206-2217. doi:10.1007/s00125-015-3712-7
42. Peng S, Zhang J, Liu L, et al. Newborn meconium and urinary metabolome response to maternal gestational diabetes mellitus: A preliminary case-control study. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(4):1799-1809. doi:10.1021/pr5011857
43. Pascal M, Perez-Gordo M, Caballero T, et al. Microbiome and Allergic Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(JUL):1584. doi:10.3389/fimmu.2018.01584
44. Yadav M, Kumar Verma M, Singh Chauhan N. A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Archives of Microbiology*. 2018;200(2):203-217. doi:10.1007/S00203-017-1459-X
45. Zhu L, Wu Q, Dai J, Zhang S, Wei F. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(43):17714-17719. doi:10.1073/PNAS.1017956108
46. Villena J, Kitazawa H. Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Frontiers in Immunology*. 2014;4:1-12. Accessed November 1, 2021. <http://www.sciepub.com/reference/118822>
47. McBurney MI, Davis C, Fraser CM, et al. Establishing What Constitutes a Healthy Human Gut Microbiome: State of the Science, Regulatory Considerations, and Future Directions. *The Journal of nutrition*. 2019;149(11):1882-1895. doi:10.1093/JN/NXZ154
48. Mardinoglu A, Wu H, Bjornson E, et al. An Integrated Understanding of the Rapid Metabolic Benefits of a Carbohydrate-Restricted Diet on Hepatic Steatosis in Humans. *Cell metabolism*. 2018;27(3):559-571.e5. doi:10.1016/J.CMET.2018.01.005
49. Álvarez Calatayud G, Guarner F, Requena T, et al. Dieta y microbiota. Impacto en la salud. *Nutrición Hospitalaria*. 2018;35(SPE6):11-15. doi:10.20960/NH.2280
50. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Medicine* 2016 8:1. 2016;8(1):1-11. doi:10.1186/S13073-016-0307-Y
51. Natividad JMM, Verdu EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacological research*. 2013;69(1):42-51. doi:10.1016/J.PHRS.2012.10.007

52. Mao K, Baptista AP, Tamoutounour S, et al. Innate and adaptive lymphocytes sequentially shape the gut microbiota and lipid metabolism. *Nature*. 2018;554(7691):255-259. doi:10.1038/NATURE25437
53. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature reviews Microbiology*. 2017;15(10):630-638. doi:10.1038/NRMICRO.2017.58
54. Fraccascia L, Giannoccaro I, Albino V. Resilience of complex systems: State of the art and directions for future research. *Complexity*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/3421529
55. Ingrisch J, Bahn M. Towards a Comparable Quantification of Resilience. *Trends in ecology & evolution*. 2018;33(4):251-259. doi:10.1016/J.TREE.2018.01.013
56. Gilbert JA, Lynch S v. Community ecology as a framework for human microbiome research. *Nature medicine*. 2019;25(6):884-889. doi:10.1038/S41591-019-0464-9
57. Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science (New York, NY)*. 2015;350(6261):663-666. doi:10.1126/SCIENCE.AAD2602
58. Hooks K, O'Malley M. Dysbiosis and its discontents. *Am Soc Microbiol*. 2017;8(5).
59. Moya A, Ferrer M. Functional redundancy-induced stability of gut microbiota subjected to disturbance. *Trends in Microbiology*. 2016;24(5):402-413. doi:10.1016/j.tim.2016.02.002
60. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(5):313-323. doi:10.1038/NRI2515
61. Östman S, Rask C, Wold AE, Hultkrantz S, Telemo E. Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *European journal of immunology*. 2006;36(9):2336-2346. doi:10.1002/EJI.200535244
62. Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell host & microbe*. 2008;4(4):337-349. doi:10.1016/J.CHOM.2008.09.009
63. O'Mahony C, Scully P, O'Mahony D, et al. Commensal-Induced Regulatory T Cells Mediate Protection against Pathogen-Stimulated NF-κB Activation. *PLOS Pathogens*. 2008;4(8):e1000112. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1000112
64. Furness JB, Kunze WAA, Clerc N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *The American journal of physiology*. 1999;277(5). doi:10.1152/AJPGI.1999.277.5.G922
65. Dong P, Feng J jing, Yan D yong, Lyu Y jing, Xu X. Early-life gut microbiome and cow's milk allergy- a prospective case - control 6-month follow-up study. *Saudi*

- journal of biological sciences*. 2018;25(5):875-880.
doi:10.1016/J.SJBS.2017.11.051
66. Aitoro R, Paparo L, Amoroso A, et al. Gut Microbiota as a Target for Preventive and Therapeutic Intervention against Food Allergy. *Nutrients*. 2017;9(7). doi:10.3390/NU9070672
 67. Muir AB, Benitez AJ, Dods K, Spergel JM, Fillon SA. Microbiome and its impact on gastrointestinal atopy. *Allergy*. 2016;71(9):1256-1263. doi:10.1111/ALL.12943
 68. Prioult G, Nagler-Anderson C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunological reviews*. 2005;206:204-218. doi:10.1111/J.0105-2896.2005.00277.X
 69. Cao S, Feehley TJ, Nagler CR. The role of commensal bacteria in the regulation of sensitization to food allergens. *FEBS letters*. 2014;588(22):4258. doi:10.1016/J.FEBSLET.2014.04.026
 70. Castellazzi A, Valsecchi C, Caimmi S, et al. Probiotics and food allergy. *Italian Journal of Pediatrics*. 2013;39(1):47. doi:10.1186/1824-7288-39-47
 71. Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, et al. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(36):13145-13150. doi:10.1073/PNAS.1412008111
 72. Berni Canani R, de Filippis F, Nocerino R, et al. Gut microbiota composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Scientific Reports*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-30428-3
 73. Blaser MJ. The microbiome revolution. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(10):4162-4165. doi:10.1172/JCI78366
 74. Rojo D, Méndez-García C, Raczowska BA, et al. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017;41(4):453-478. doi:10.1093/femsre/fuw046
 75. Holmes E, Li J v., Athanasiou T, Ashrafian H, Nicholson JK. Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in Microbiology*. 2011;19(7):349-359. doi:10.1016/j.tim.2011.05.006
 76. Goodacre R. Metabolomics of a superorganism. *The Journal of nutrition*. 2007;137:259S-266S. doi:137/1/259S
 77. Manes N, Shulzhenko N, Nuccio A, Azeem S, Morgun A, Nita-Lazar A. Multi-omics comparative analysis reveals multiple layers of host signaling pathway regulation by the gut microbiota. *mSystems*. 2017;2(5):e00107-17.
 78. Obeso D, Mera-Berriatua L, Rodríguez-Coira J, et al. Multi-omics analysis points to altered platelet functions in severe food-associated respiratory allergy. *Allergy*. 2018;73(11):2137-2149. doi:10.1111/ALL.13563

79. Abu-Asab MS, Chaouchi M, Alesci S, et al. Biomarkers in the Age of Omics: Time for a Systems Biology Approach. *OMICS : a Journal of Integrative Biology*. 2011;15(3):105. doi:10.1089/OMI.2010.0023
80. Quezada H, Guzmán-Ortiz AL, Díaz-Sánchez H, Valle-Rios R, Aguirre-Hernández J. Omics-based biomarkers: current status and potential use in the clinic. *Boletín medico del Hospital Infantil de Mexico*. 2017;74(3):219-226. doi:10.1016/J.BMHIMX.2017.03.003
81. Zubeldia-Varela E, Barker-Tejeda TC, Blanco-Pérez F, Infante S, Zubeldia JM, Pérez-Gordo M. Non-IgE-Mediated Gastrointestinal Food Protein-Induced Allergic Disorders. Clinical Perspectives and Analytical Approaches. *Foods*. 2021;10(11):2662. doi:10.3390/foods10112662
82. Horgan RP, Kenny LC. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2011;13(3):189-195. doi:10.1576/TOAG.13.3.189.27672
83. Serrano-Villar S, Moreno S, Ferrer M. The functional consequences of the microbiome in Hiv: insights from metabolomic studies. *Curr Opin HIV AIDS*. 2017;1.
84. Ferrer M, Martins dos Santos VAP, Ott SJ, Moya A. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: A multi-omic approach. *Gut Microbes*. 2014;5(1):64-70. doi:10.4161/gmic.27128
85. Karczewski KJ, Snyder MP. Integrative omics for health and disease. *Nature Reviews Genetics*. 2018;19(5):299-310. doi:10.1038/nrg.2018.4
86. Zubeldia-Varela E, Barber D, Barbas C, Perez-Gordo M, Rojo D. Sample pre-treatment procedures for the omics analysis of human gut microbiota: Turning points, tips and tricks for gene sequencing and metabolomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;191:113592. doi:10.1016/j.jpba.2020.113592
87. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS computational biology*. 2012;8(12). doi:10.1371/JOURNAL.PCBI.1002808
88. Fredericks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clinical microbiology reviews*. 1996;9(1):18-33. doi:10.1128/CMR.9.1.18
89. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17(4):840-862. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004
90. Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5(JUN):209. doi:10.3389/FPLS.2014.00209/BIBTEX

91. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2011;27(6):863-864. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTR026
92. Garcia-Garcerà M, Garcia-Etxebarria K, Coscollà M, Latorre A, Calafell F. A New Method for Extracting Skin Microbes Allows Metagenomic Analysis of Whole-Deep Skin. *PLoS ONE*. 2013;8(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0074914
93. Kunin V, Copeland A, Lapidus A, Mavromatis K, Hugenholtz P. A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2008;72(4):557-578. doi:10.1128/MMBR.00009-08
94. Schmieder R, Edwards R. Fast Identification and Removal of Sequence Contamination from Genomic and Metagenomic Datasets. *PLOS ONE*. 2011;6(3):e17288. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0017288
95. Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015;113:108-120. doi:10.1016/J.JPBA.2014.12.017
96. Nicholson J, Lindon J, Holmes E. "Metabonomics": Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181-1189.
97. Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 2002;48:155-171. doi:https://doi.org/10.1007/978-94-010-0448-0_11
98. Priori R, Scrivo R, Brandt J, et al. Metabolomics in rheumatic diseases: The potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis, and treatment efficacy. *Autoimmunity Reviews*. 2013;12(10):1022-1030. doi:10.1016/j.autrev.2013.04.002
99. González-Riano C, Dudzik D, Garcia A, et al. Recent Developments along the Analytical Process for Metabolomics Workflows. *Analytical Chemistry*. 2020;92(1):203-226. doi:10.1021/acs.analchem.9b04553
100. David A, Rostkowski P. Analytical techniques in metabolomics. *Environmental Metabolomics*. Published online January 1, 2020:35-64. doi:10.1016/B978-0-12-818196-6.00002-9
101. Zubeldia-Varela E, Raczkowska BA, Ferrer M, Perez-Gordo M, Rojo D. Techniques for Phenotyping the Gut Microbiota Metabolome. In: *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and Other Strategic Applications*. Elsevier; 2019:33-41. doi:10.1016/b978-0-12-815249-2.00004-x
102. Dudzik D, Barbas-Bernardos C, García A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147:149-173. doi:10.1016/j.jpba.2017.07.044

103. Melnik A v., da Silva RR, Hyde ER, et al. Coupling Targeted and Untargeted Mass Spectrometry for Metabolome-Microbiome-Wide Association Studies of Human Fecal Samples. *Analytical Chemistry*. 2017;89(14):7549-7559. doi:10.1021/acs.analchem.7b01381
104. Hou W, Zhong D, Zhang P, et al. A strategy for the targeted metabolomics analysis of 11 gut microbiota-host co-metabolites in rat serum, urine and feces by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2016;1429:207-217. doi:10.1016/j.chroma.2015.12.031
105. Rojo D, Hevia A, Bargiela R, et al. Ranking the impact of human health disorders on gut metabolism: Systemic lupus erythematosus and obesity as study cases. *Scientific Reports*. 2015;5:1-9. doi:10.1038/srep08310
106. Weingarden AR, Chen C, Bobr A, et al. Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2014;306(4):G310-G319. doi:10.1152/ajpgi.00282.2013
107. Jiménez-Girón A, Ibáñez C, Cifuentes A, et al. Faecal metabolomic fingerprint after moderate consumption of red wine by healthy subjects. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(2):897-905. doi:10.1021/pr500960g
108. Ferrer M, Raczkowska BA, Martínez-Martínez M, Barbas C, Rojo D. Phenotyping of gut microbiota: Focus on capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*. 2017;38(18):2275-2286. doi:10.1002/elps.201700056
109. Martin FPJ, Lichti P, Bosco N, et al. Metabolic phenotyping of an adoptive transfer mouse model of experimental colitis and impact of dietary fish oil intake. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(4):1911-1919. doi:10.1021/pr501299m
110. Chai Y, Wang J, Wang T, et al. Application of ¹H NMR spectroscopy-based metabonomics to feces of cervical cancer patients with radiation-induced acute intestinal symptoms. *Radiotherapy and Oncology*. 2015;117:294-301. doi:10.1016/j.radonc.2015.07.037
111. Yang Y, Wang L, Wang S, et al. An integrated metabonomic approach to studying metabolic profiles in rat models with insulin resistance induced by high fructose. *Molecular bioSystems*. 2014;10(7):1803-1811. doi:10.1039/c3mb70618d
112. Godzien J, Alonso-Herranz V, Barbas C, Armitage EG. Controlling the quality of metabolomics data: new strategies to get the best out of the QC sample. *Metabolomics*. 2015;11(3):518-528. doi:10.1007/s11306-014-0712-4
113. Gil de la Fuente A, Grace Armitage E, Otero A, Barbas C, Godzien J. Differentiating signals to make biological sense - A guide through databases for MS-based non-targeted metabolomics. *ELECTROPHORESIS*. 2017;38(18):2242-2256. doi:10.1002/elps.201700070

114. Gagnebin Y, Tonoli D, Lescuyer P, et al. Metabolomic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: Impact of normalization strategies. *Analytica Chimica Acta*. 2017;955:27-35.
115. Smolinska A, Blanchet L, Buydens LMC, Wijmenga SS. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2012;750:82-97. doi:10.1016/j.aca.2012.05.049
116. Poste G. Bring on the biomarkers. *Nature*. 2011;469(7329):156-157. doi:10.1038/469156A
117. Strimbu K, Tavel J a. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;5(6):463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177.What
118. Villaseñor A, Rosace D, Obeso D, et al. Allergic asthma: an overview of metabolomic strategies leading to the identification of biomarkers in the field. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2017;47(4):442-456. doi:10.1111/CEA.12902
119. Eguiluz-Gracia I, Tay TR, Hew M, et al. Recent developments and highlights in biomarkers in allergic diseases and asthma. *Allergy*. 2018;73(12):2290-2305. doi:10.1111/ALL.13628
120. Lisset M, Regal L, Borges AA, et al. Inflammatory acute response. Biochemical and cellular considerations. *Revista de Enfermedades no Transmisibles Finlay*. 2015;5(1):47-62. Accessed January 7, 2022. <http://revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/329>
121. Devlin TM. *Bioquímica Con Aplicaciones Clínicas*. 978th-84th-291st-7213th-3rd ed. REVERTÉ, S. A.; 2015. Accessed January 7, 2022. [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=4YTgDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR2&dq=Devlin,+T.+Bioqu%C3%ADmica,+4%C2%AA+edici%C3%B3n.+Revert%C3%A9,+Barcelona.+editar%5D+V%C3%A9ase+tambi%C3%A9n+\(2004\).&ots=-LBMQJDGSE&sig=p-2jOyJ3ymhArzqQF3-i0EkUrvE#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=4YTgDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR2&dq=Devlin,+T.+Bioqu%C3%ADmica,+4%C2%AA+edici%C3%B3n.+Revert%C3%A9,+Barcelona.+editar%5D+V%C3%A9ase+tambi%C3%A9n+(2004).&ots=-LBMQJDGSE&sig=p-2jOyJ3ymhArzqQF3-i0EkUrvE#v=onepage&q&f=false)
122. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg; 2001. doi:10.1007/978-3-662-08289-8
123. Villanueva-Pájaro DJ, Marrugo-Cano JA. Influence of dietary polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids and from its metabolites in the immune allergic response. *Revista Facultad de Medicina*. 2015;63(2):301-313. doi:10.15446/REVFACMED.V63N2.48055
124. Calvani M, Anania C, Cuomo B, et al. Non-IgE- or Mixed IgE/Non-IgE-Mediated Gastrointestinal Food Allergies in the First Years of Life: Old and New Tools for Diagnosis. *Nutrients*. 2021;13(1):1-31. doi:10.3390/NU13010226
125. Xiong LJ, Xie XL, Li Y, Deng XZ. Current status of fecal calprotectin as a diagnostic or monitoring biomarker for cow's milk protein allergy in children: a scoping

- review. *World journal of pediatrics : WJP*. 2021;17(1):63-70. doi:10.1007/S12519-020-00364-2
126. Ohno H. Host-gut microbiota metabolic interactions by integrated-omics analysis. *Therapeutic Research*. Published online 2014. doi:10.1126/science.1223813
 127. Theriot C, Bowman A, Young V. Antibiotic-induced alterations of the gut microbiota alter secondary bile acid production and allow for *Clostridium difficile* spore germination and outgrowth in the large intestine. *MSphere*. 2016;1(1):e00045-15. doi:10.1128/mSphere.00045-15
 128. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. Published online 2007. doi:10.1038/nature06244
 129. Marchesi J, Shanahan F. The normal intestinal microbiota. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2007;20(5):508-513. doi:10.1097/QCO.0b013e3282a56a99
 130. Sartor R. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-594. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.059
 131. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*. 2016;14(8):e1002533. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.1002533
 132. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;14(1):20-32. doi:10.1038/nrmicro3552
 133. Shi X, Wei X, Yin X, et al. Hepatic and fecal metabolomic analysis of the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(2):1174-1182. doi:10.1021/pr501121c
 134. Zhang L, Nichols RG, Correll J, et al. Persistent organic pollutants modify gut microbiota–host metabolic homeostasis in mice through aryl hydrocarbon receptor activation. *Environmental Health Perspectives*. 2015;123(7):679-688. doi:10.1289/ehp.1409055
 135. Alarcón Cavero T, D’Auria G, Delgado Palacio S, del Campo Moreno R, Ferrer M. Microbiota. In: *Procedimientos En Microbiología Clínica*. ; 2016.
 136. Dior M, Delagrèverie H, Duboc H, et al. Interplay between bile acid metabolism and microbiota in IBS. *Neurogastroenterology and Motility*. Published online 2016.
 137. Gratton J, Phetcharaburanin J, Mullish BH, et al. Optimized Sample Handling Strategy for Metabolic Profiling of Human Feces. *Analytical Chemistry*. 2016;88(9):4661-4668. doi:10.1021/acs.analchem.5b04159
 138. Yen S, McDonald JAK, Schroeter K, et al. Metabolomic analysis of human fecal microbiota: A comparison of feces-derived communities and defined mixed communities. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(3). doi:10.1021/pr5011247

139. Korpela K. Diet, Microbiota, and Metabolic Health: Trade-Off Between Saccharolytic and Proteolytic Fermentation. Published online 2018. doi:10.1146/annurev-food-030117
140. Quigley EMM. Nutraceuticals as modulators of gut microbiota: Role in therapy. *British Journal of Pharmacology*. 2019;177(6):1351-1362. doi:10.1111/bph.14902
141. Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell host & microbe*. 2018;23(6):705-715. doi:10.1016/J.CHOM.2018.05.012
142. Rivera-Chávez F, Lopez CA, Bäumlér AJ. Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;105:93-101. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.09.022
143. Chaudhari DS, Dhotre DP, Agarwal DM, et al. Gut, oral and skin microbiome of Indian patrilineal families reveal perceptible association with age. *Scientific Reports*. 2020;10(1):5685. doi:10.1038/s41598-020-62195-5
144. Ruiz-Ruiz S, Sanchez-Carrillo S, Ciordia S, et al. Functional microbiome deficits associated with ageing: Chronological age threshold. *Aging Cell*. 2020;19(1):e13063. doi:10.1111/accel.13063
145. Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The Human Microbiome and Child Growth - First 1000 Days and Beyond. *Trends in microbiology*. 2019;27(2):131-147. doi:10.1016/J.TIM.2018.09.008
146. Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hämäläinen A maaria, Hamalainen A, Al E. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatments on strain-level diversity and stability. *Sci Trans Med*. 2016;8(343):1173-1178. doi:10.1126/scitranslmed.aad0917.Natural
147. Pérez-Cobas AE, Artacho A, Knecht H, et al. Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e80201. doi:10.1371/journal.pone.0080201
148. Reyman M, van Houten MA, van Baarle D, et al. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nature Communications*. 2019;10(1):1-12. doi:10.1038/s41467-019-13014-7
149. Liu K, Zhang Y, Li Q, et al. Ethnic Differences Shape the Alpha but Not Beta Diversity of Gut Microbiota from School Children in the Absence of Environmental Differences. *Microorganisms*. 2020;8(2):254. doi:10.3390/microorganisms8020254
150. Kates AE, Jarrett O, Skarlupka JH, et al. Household Pet Ownership and the Microbial Diversity of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10(February). doi:10.3389/fcimb.2020.00073

151. Houghton D, Stewart CJ, Day CP, Trenell M. Gut microbiota and lifestyle interventions in NAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(4):1-29. doi:10.3390/ijms17040447
152. Borewicz K, Gu F, Saccenti E, Hechler C. The association between breastmilk oligosaccharides and faecal microbiota in healthy breastfed infants at two , six , and twelve weeks of age. *Scientific Reports*. Published online 2020:1-12. doi:10.1038/s41598-020-61024-z
153. de Leoz MLA, Kalanetra KM, Bokulich NA, et al. Human milk glycomics and gut microbial genomics in infant feces show a correlation between human milk oligosaccharides and gut microbiota: a proof-of-concept study. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(1):491-502. doi:10.1021/pr500759e
154. Gupta S, Allen-Vercoe E, Petrof EO. Fecal microbiota transplantation: In perspective. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. Published online 2016. doi:10.1177/1756283X15607414
155. Mullish BH, Nabil Quraishi M, Segal JP, et al. The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection and other potential indications: joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines. *Gut*. 2018;67(11):1920-1941. doi:10.1136/gutjnl-2018-316818
156. Núñez F. P, Quera R, Bay C, Thomson P. Fecal microbiota transplant, its usefulness beyond *Clostridioides difficile* in gastrointestinal diseases. *Gastroenterologia y hepatologia*. Published online 2021. doi:10.1016/J.GASTROHEP.2021.05.009
157. Papanicolas LE, Choo JM, Wang Y, et al. Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? *EBioMedicine*. 2019;41:509-516. doi:10.1016/j.ebiom.2019.02.023
158. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017;9(9). doi:10.3390/nu9091021
159. Sanders ME. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(s2):S58-S61. doi:10.1086/523341
160. Williams N. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacists*. 2010;67(6):449-458.
161. Wosinska L, Cotter PD, O'Sullivan O, Guinane C. The potential impact of probiotics on the gut microbiome of athletes. *Nutrients*. 2019;11(10). doi:10.3390/nu11102270
162. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2017 14:8. 2017;14(8):491-502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75

163. Umu ÖCO, Rudi K, Diep DB. Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2017;28(1):1348886. doi:10.1080/16512235.2017.1348886
164. Michail S. The role of Probiotics in allergic diseases. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*. 2009;5(1):1-7. doi:10.1186/1710-1492-5-5/TABLES/2
165. Kirjavainen P v., Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut*. 2002;51(1):51-55. doi:10.1136/GUT.51.1.51
166. Fiocchi A, Pawankar R, Cuello-Garcia C, et al. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *The World Allergy Organization journal*. 2015;8(1). doi:10.1186/S40413-015-0055-2
167. Cade JE, Burley VJ, Warm DL, Thompson RL, Margetts BM. Food-frequency questionnaires: a review of their design, validation and utilisation. *Nutrition Research Reviews*. 2004;17(1):5-22. doi:10.1079/nrr200370
168. Proctor LM. The integrative human microbiome project: Dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease corresponding author. *Cell Host and Microbe*. 2014;16(3):276-289. doi:10.1016/j.chom.2014.08.014
169. Proctor LM, Creasy HH, Fettweis JM, et al. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019;569(7758):641-648. doi:10.1038/s41586-019-1238-8
170. Wang Z, Zolnik CP, Qiu Y, et al. Comparison of fecal collection methods for microbiome and metabolomics studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018;8(AUG):1-10. doi:10.3389/fcimb.2018.00301
171. Loftfield E, Vogtmann E, Sampson JN, et al. Comparison of collection methods for fecal samples for discovery metabolomics in epidemiologic studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2016;25(11):1483-1490. doi:10.1158/1055-9965.EPI-16-0409
172. Yeoh YK, Chen Z, Hui M, et al. Impact of inter- and intra-individual variation, sample storage and sampling fraction on human stool microbial community profiles. *PeerJ*. 2019;2019(1). doi:10.7717/peerj.6172
173. Vogtmann E, Chen J, Amir A, et al. Comparison of Collection Methods for Fecal Samples in Microbiome Studies. *American Journal of Epidemiology*. 2017;185(2):115-123. doi:10.1093/aje/kww177
174. Song SJ, Amir A, Metcalf JL, et al. Preservation Methods Differ in Fecal Microbiome Stability. *mSystems*. 2016;1(3):e00021-16. doi:10.1128/mSystems.00021-16.Editor

175. Monleón D, Morales JM, Barrasa A, López JA, Vázquez C, Celda B. Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR in Biomedicine*. 2009;22(3):342-348. doi:10.1002/nbm.1345
176. Al KF, Bisanz JE, Gloor GB, Reid G, Burton JP. Evaluation of sampling and storage procedures on preserving the community structure of stool microbiota: A simple at-home toilet-paper collection method. *Journal of microbiological methods*. 2018;144:117-121. doi:10.1016/j.mimet.2017.11.014
177. Wan JY, Wang CZ, Liu Z, et al. Determination of American ginseng saponins and their metabolites in human plasma, urine and feces samples by liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2016;1015-1016:62-73. doi:10.1016/j.jchromb.2016.02.008
178. Abrahamson M, Hooker E, Ajami NJ, Petrosino JF, Orwoll ES. Successful collection of stool samples for microbiome analyses from a large community-based population of elderly men. *Contemporary Clinical Trials Communications*. 2017;7:158-162. doi:10.1016/j.conctc.2017.07.002
179. Hickl O, Heintz-Buschart A, Trautwein-Schult A, et al. Sample preservation and storage significantly impact taxonomic and functional profiles in metaproteomics studies of the human gut microbiome. *Microorganisms*. 2019;7(9). doi:10.3390/microorganisms7090367
180. Gorzelak MA, Gill SK, Tasnim N, Ahmadi-Vand Z, Jay M, Gibson DL. Methods for improving human gut microbiome data by reducing variability through sample processing and storage of stool. *PLoS ONE*. 2015;10(8):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0134802
181. Choo JM, Leong LEX, Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Scientific Reports*. 2015;5:1-10. doi:10.1038/srep16350
182. de Spiegeleer M, de Graeve M, Huysman S, Vanderbeke A, van Meulebroek L, Vanhaecke L. Impact of storage conditions on the human stool metabolome and lipidome: Preserving the most accurate fingerprint. *Analytica Chimica Acta*. 2020;1108:79-88. doi:10.1016/j.aca.2020.02.046
183. Wu WK, Chen CC, Panyod S, et al. Optimization of fecal sample processing for microbiome study — The journey from bathroom to bench. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2019;118(2):545-555. doi:10.1016/j.jfma.2018.02.005
184. Tap J, Cools-Portier S, Pavan S, et al. Effects of the long-term storage of human fecal microbiota samples collected in RNAlater. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-018-36953-5

185. Flores R, Shi J, Yu G, et al. Collection media and delayed freezing effects on microbial composition of human stool. *Microbiome*. 2015;3:33. doi:10.1186/s40168-015-0092-7
186. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nature Biotechnology*. 2017;35(11):1069-1076. doi:10.1038/nbt.3960
187. Fujiwara K, Doi N. Biochemical preparation of cell extract for cell-free protein synthesis without physical disruption. *PLoS ONE*. 2016;11(4):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0154614
188. Mathieson W, Sanchez I, Mommaerts K, Frasquilho S, Betsou F. An Independent Evaluation of the CryoXtract Instruments' CXT350 Frozen Sample Aliquotter Using Tissue and Fecal Biospecimens. *Biopreservation and Biobanking*. 2016;14(1):2-8. doi:10.1089/bio.2015.0016
189. Franzosa EA, Morgan XC, Segata N, et al. Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(22). doi:10.1073/pnas.1319284111
190. Moosmang S, Pitscheider M, Sturm S, et al. Metabolomic analysis-addressing NMR and LC-MS related problems in human feces sample preparation. *Clinica Chimica Acta*. Published online 2017. doi:10.1016/j.cca.2017.10.029
191. Rojo D, Gosalbes MJ, Ferrari R, et al. Clostridium difficile heterogeneously impacts intestinal community architecture but drives stable metabolome responses. *ISME Journal*. 2015;9(10):2206-2220. doi:10.1038/ismej.2015.32
192. Serrano-Villar S, Rojo D, Martinez-Martinez M, et al. HIV infection results in metabolic alterations in the gut microbiota different from those induced by other diseases. *Nature Scientific Reports*. 2016;6:1-10. doi:10.1038/srep26192
193. Serrano-Villar S, Rojo D, Martínez-Martínez M, et al. Gut Bacteria Metabolism Impacts Immune Recovery in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine*. 2016;8:203-216. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.033
194. Underwood MA, Gaerlan S, de Leoz MLA, et al. Human milk oligosaccharides in premature infants: Absorption, excretion, and influence on the intestinal microbiota. *Pediatric Research*. 2015;78(6):670-677. doi:10.1038/pr.2015.162
195. Xu W, Chen D, Wang N, et al. Development of high-performance chemical isotope labeling LC-MS for profiling the human fecal metabolome. *Analytical Chemistry*. 2015;87(2):829-836. doi:10.1021/ac503619q
196. Tanca A, Palomba A, Pisanu S, Addis MF, Uzzau S. Enrichment or depletion? The impact of stool pretreatment on metaproteomic characterization of the human gut microbiota. *PROTEOMICS*. 2015;15(20):3474-3485. doi:10.1002/pmic.201400573

197. Yu M, Jia H, Zhou C, et al. Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;138:231-239. doi:10.1016/j.jpba.2017.02.008
198. O'Sullivan V, Madrid-Gambin F, Alegra T, Gibbons H, Brennan L. Impact of Sample Storage on the NMR Fecal Water Metabolome. *ACS Omega*. 2018;3(12):16585-16590. doi:10.1021/acsomega.8b01761
199. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1997;32(9):920-924. doi:10.3109/00365529709011203
200. Saric J, Wang Y, Li J, et al. Species variation in the fecal metabolome gives insight into differential gastrointestinal function. *Journal of Proteome Research*. 2008;7(1):352-360. doi:10.1021/pr070340k
201. Phua LC, Koh PK, Cheah PY, Ho HK, Chan ECY. Global gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry (GC/TOFMS)-based metabonomic profiling of lyophilized human feces. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2013;937:103-113. doi:10.1016/j.jchromb.2013.08.025
202. vanden Bussche J, Marzorati M, Laukens D, Vanhaecke L. Validated High Resolution Mass Spectrometry-Based Approach for Metabolomic Fingerprinting of the Human Gut Phenotype. *Analytical chemistry*. 2015;87(21):10927-10934. doi:10.1021/acs.analchem.5b02688
203. Su X, Wang N, Chen D, et al. Dansylation isotope labeling liquid chromatography mass spectrometry for parallel profiling of human urinary and fecal submetabolomes. *Analytica Chimica Acta*. 2016;903:100-109. doi:10.1016/j.aca.2015.11.027
204. Fundación FSA: Prevención de Alergias Alimentarias Fundación FSA. Accessed January 8, 2022. <https://funsapa.org/>
205. Rona RJ, Keil T, Summers C, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(3):638-646. doi:10.1016/J.JACI.2007.05.026
206. Loh W, Tang MLK. The Epidemiology of Food Allergy in the Global Context. *International journal of environmental research and public health*. 2018;15(9). doi:10.3390/IJERPH15092043
207. Laffleur B, Debeaupuis O, Dalloul Z, Cogné M. B cell intrinsic mechanisms constraining IgE memory. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(NOV):1277. doi:10.3389/FIMMU.2017.01277/BIBTEX
208. Ho MHK, Wong WHS, Chang C. Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2014;46(3):225-240. doi:10.1007/S12016-012-8339-6

209. Burks AW, Tang M, Sicherer S, et al. ICON: food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(4):906-920. doi:10.1016/J.JACI.2012.02.001
210. Renz H, Allen KJ, Sicherer SH, et al. Food allergy. *Nature reviews Disease primers*. 2018;4. doi:10.1038/NRDP.2017.98
211. Nowak-Węgrzyn A, Katz Y, Mehr SS, Koletzko S. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;135(5):1114-1124. doi:10.1016/j.jaci.2015.03.025
212. Czerwionka-Szaflarska M, Lol-Rycharska E, Gawryjolek J. Allergic enteritis in children. *Przegląd gastroenterologiczny*. 2017;12(1):1-5. doi:10.5114/PG.2017.65677
213. Savage J, Johns CB. Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2015;35(1):45-59. doi:10.1016/J.IAC.2014.09.004
214. Burggraf M, Nakajima-Adachi H, Hachimura S, et al. Oral tolerance induction does not resolve gastrointestinal inflammation in a mouse model of food allergy. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2011;55(10):1475-1483. doi:10.1002/MNFR.201000634
215. de Chambrun GP, Gonzalez F, Canva JY, et al. Natural history of eosinophilic gastroenteritis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2011;9(11). doi:10.1016/J.CGH.2011.07.017
216. Gonsalves N. Eosinophilic Gastrointestinal Disorders. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2019;57(2):272-285. doi:10.1007/S12016-019-08732-1
217. Caldwell JM, Collins MH, Stucke EM, et al. Histologic eosinophilic gastritis is a systemic disorder associated with blood and extragastric eosinophilia, TH2 immunity, and a unique gastric transcriptome. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;134(5):1114-1124. doi:10.1016/J.JACI.2014.07.026
218. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;141(1):41-58. doi:10.1016/J.JACI.2017.11.003
219. Blanco-Pérez F, Gonzalez-Menendez I, Stassen M, et al. Mast cells partly contribute to allergic enteritis development: Findings in two different mast cell-deficient mice. *Allergy*. Published online 2021. doi:10.1111/ALL.15182
220. Lübben W, Turqueti-Neves A, Okhrimenko A, et al. IgE knock-in mice suggest a role for high levels of IgE in basophil-mediated active systemic anaphylaxis. *European Journal of Immunology*. 2013;43(5):1231-1242. doi:10.1002/EJI.201242675

221. Binek A, Rojo D, Godzien J, et al. Flow Cytometry Has a Significant Impact on the Cellular Metabolome. *Journal of proteome research*. 2019;18(1):169-181. doi:10.1021/ACS.JPROTEOME.8B00472
222. Mamani-Huanca M, de la Fuente AG, Otero A, et al. Enhancing confidence of metabolite annotation in Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry untargeted metabolomics with relative migration time and in-source fragmentation. *Journal of chromatography A*. 2021;1635. doi:10.1016/J.CHROMA.2020.461758
223. Mamani-Huanca M, Gradillas A, Gil De La Fuente A, Lopez-Gonzalvez A, Barbas C. Unveiling the Fragmentation Mechanisms of Modified Amino Acids as the Key for Their Targeted Identification. *Analytical Chemistry*. 2020;92(7):4848-4857. doi:10.1021/ACS.ANALCHEM.9B04313/SUPPL_FILE/AC9B04313_SI_001.PDF
224. Muxel SM, Mamani-Huanca M, Aoki JI, et al. Metabolomic Profile of BALB/c Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*: Deciphering L-Arginine Metabolism. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(24). doi:10.3390/IJMS20246248
225. Garcia A, Barbas C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2011;708:191-204. doi:10.1007/978-1-61737-985-7_11
226. Rey-Stolle F, Dudzik D, Gonzalez-Riano C, et al. Low and high resolution gas chromatography-mass spectrometry for untargeted metabolomics: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. Published online 2021. doi:10.1016/J.ACA.2021.339043
227. Gil-De-La-Fuente A, Godzien J, Saugar S, et al. CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *Journal of proteome research*. 2019;18(2):797-802. doi:10.1021/ACS.JPROTEOME.8B00720
228. Kuligowski J, Sánchez-Illana Á, Sanjuán-Herráez D, Vento M, Quintás G. Intra-batch effect correction in liquid chromatography-mass spectrometry using quality control samples and support vector regression (QC-SVRC). *Analyst*. 2015;140(22):7810-7817. doi:10.1039/C5AN01638J
229. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic acids research*. 2018;46(D1):D608-D617. doi:10.1093/NAR/GKX1089
230. Armitage EG, Godzien J, Alonso-Herranz V, López-González Á, Barbas C. Missing value imputation strategies for metabolomics data. *Electrophoresis*. 2015;36(24):3050-3060. doi:10.1002/ELPS.201500352
231. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2001;58(2):109-130. doi:10.1016/S0169-7439(01)00155-1

232. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current protocols in bioinformatics*. 2019;68(1). doi:10.1002/CPBI.86
233. Cambiaghi A, Ferrario M, Masseroli M. Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Briefings in bioinformatics*. 2017;18(3):498-510. doi:10.1093/BIB/BBW031
234. Blanco-Pérez F. CCR8 leads to eosinophil migration and regulates neutrophil migration in murine allergic enteritis. *Scientific Reports*. 2019;9(1).
235. Lee-Sarwar K, Kelly RS, Lasky-Su J, et al. Intestinal microbial-derived sphingolipids are inversely associated with childhood food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;142(1):335-338.e9. doi:10.1016/J.JACI.2018.04.016
236. Pité H, Morais-Almeida M, Rocha S. Metabolomics in asthma: where do we stand? *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2018;24(1):94-103.
237. Checkley W, Deza M, Klawitter J, et al. Identifying biomarkers for asthma diagnosis using targeted metabolomics approaches. *Respiratory Medicine*. 2016;121:59-66.
238. Sinha R, Ahn J, Sampson JN, et al. Fecal microbiota, fecal metabolome, and colorectal cancer interrelations. *PLoS one*. 2016;11(3):e0152126. doi:10.1371/journal.pone.0152126
239. Murakami M. Lipid mediators in life science. *Experimental animals*. 2011;60(1):7-20. doi:10.1538/EXANIM.60.7
240. Huang YS, Huang WC, Li CW, Chuang L te. Eicosadienoic acid differentially modulates production of pro-inflammatory modulators in murine macrophages. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;358(1-2):85-94. doi:10.1007/S11010-011-0924-0
241. Berghoff N, Hill S, Parnell NK, Mansell J, Suchodolski JS, Steiner JM. Fecal and urinary N-methylhistamine concentrations in dogs with chronic gastrointestinal disease. *The Veterinary Journal*. 2014;201(3):289-294. doi:10.1016/J.TVJL.2014.05.016
242. Weiler CR. Mast Cell Activation Syndrome: Tools for Diagnosis and Differential Diagnosis. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2020;8(2):498-506. doi:10.1016/J.JAIP.2019.08.022
243. Wu X, Wu Y, He L, Wu L, Wang X, Liu Z. Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer. *Journal of Cancer*. 2018;9(14):2510-2517. doi:10.7150/jca.25324
244. Canani R, Sangwan N, Stefka A, et al. Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME Journal*. 2016;10(3):742-750.

245. Machiels K, Joossens M, Sabino J, et al. A decrease of the butyrate-producing species *roseburia hominis* and *faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(8):1275-1283. doi:10.1136/gutjnl-2013-304833
246. Demehri FR, Frykman PK, Cheng Z, et al. Altered fecal short chain fatty acid composition in children with a history of Hirschsprung-associated enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*. 2016;51(1):81-86. doi:10.1016/j.jpedsurg.2015.10.012
247. Kim M, Kim CH. Regulation of humoral immunity by gut microbial products. *Gut Microbes*. 2017;8(4):392. doi:10.1080/19490976.2017.1299311
248. Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*. 2009;139(9):1619-1625. doi:10.3945/JN.109.104638
249. Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*. 2015;7(4):2839-2849. doi:10.3390/NU7042839
250. Siddiqui MT, Cresci GAM. The Immunomodulatory Functions of Butyrate. *Journal of Inflammation Research*. 2021;14:6025. doi:10.2147/JIR.S300989
251. Jacob N, Jaiswal S, Maheshwari D, et al. Butyrate induced Tregs are capable of migration from the GALT to the pancreas to restore immunological tolerance during type-1 diabetes. *Scientific reports*. 2020;10(1). doi:10.1038/S41598-020-76109-Y
252. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science (New York, NY)*. 2013;341(6145):569-573. doi:10.1126/SCIENCE.1241165
253. Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013;504(7480):451-455. doi:10.1038/NATURE12726
254. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, de Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(JUN):979. doi:10.3389/FMICB.2016.00979/BIBTEX
255. Ta LDH, Chan JCY, Yap GC, et al. A compromised developmental trajectory of the infant gut microbiome and metabolome in atopic eczema. *Gut microbes*. 2020;12(1):1-21. doi:10.1080/19490976.2020.1801964
256. Nguyen M, Sharma A, Wu W, et al. The fermentation product 2,3-butanediol alters *P. aeruginosa* clearance, cytokine response and the lung microbiome. *The ISME Journal*. 2016;10(12):2978. doi:10.1038/ISMEJ.2016.76

257. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64(12):1471-1483. doi:10.1007/S00018-007-6497-0
258. Hooper L v, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions Between the Microbiota and the Immune System The Gut Microbiota Interactions Between the Microbiota and the Immune System. 2012;336(6086):1268-1273. doi:10.1126/science.1223490
259. Lozano-Ojalvo D, Berin C, Tordesillas L. Immune Basis of Allergic Reactions to Food. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2019;29(1):1-14. doi:10.18176/JIACI.0355
260. Moles L, Gómez M, Heilig H, et al. Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. *PLOS ONE*. 2013;8(6):e66986. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0066986
261. Christian Milani, Sabrina Duranti, Francesca Bottacini B, Eoghan Casey B, Francesca Turroni, Jennifer Mahony B, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *microbiology and molecular Biology reviews*. 2017;81(4):1-67. doi:10.1128/MMBR.00036-17
262. Rakoff-Nahoum S, Foster KR, Comstock LE. The evolution of cooperation within the gut microbiota. *Nature*. 2016;533. doi:10.1038/nature17626
263. Simonyté Sjödin K, Hammarström ML, Rydén P, et al. Temporal and long-term gut microbiota variation in allergic disease: A prospective study from infancy to school age. *Allergy*. Published online 2018. doi:10.1111/all.13485
264. Penders J, Stobberingh EE, Brandt PAV den, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*. 2007;62(11):1223-1236. doi:10.1111/J.1398-9995.2007.01462.X
265. Martín R, Jiménez E, Heilig H, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(4):965-969. doi:10.1128/AEM.02063-08
266. Zeiger RS, Heller S, Mellon MH, Halsey JF, Hamburger RN, Sampson HA. Genetic and environmental factors affecting the development of atopy through age 4 in children of atopic parents: a prospective randomized study of food allergen avoidance. *undefined*. 1992;3(3):110-127. doi:10.1111/J.1399-3038.1992.TB00035.X
267. Dong C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annual review of immunology*. 2021;39:51-76. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-061020-053702
268. Wang WL, Xu SY, Ren ZG, Tao L, Jiang JW, Zheng S sen. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(3):803-814. doi:10.3748/WJG.V21.I3.803

269. Abraham BP, Kane S. Fecal markers: calprotectin and lactoferrin. *Gastroenterology clinics of North America*. 2012;41(2):483-495. doi:10.1016/J.GTC.2012.01.007
270. Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: Performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *American Journal of Gastroenterology*. 2008;103(1):162-169. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01556.x
271. Qiu L, Wang J, Ren F, Shen L, Li F. Can fecal calprotectin levels be used to monitor infant milk protein allergies? *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2021;17(1). doi:10.1186/S13223-021-00636-0
272. Ataee P, Zoghali M, Nikkhoo B, et al. Diagnostic Value of Fecal Calprotectin in Response to Mother's Diet in Breast-Fed Infants with Cow's Milk Allergy Colitis. *Iranian Journal of Pediatrics* 2018 28:4. 2018;28(4). doi:10.5812/IJP.66172
273. Singer AAM. Food protein-induced enterocolitis and alpha-1-antitrypsin deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2020;145(1):444. doi:10.1016/J.JACI.2019.09.027
274. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-2194. doi:10.1001/JAMA.2013.281053
275. Dreborg S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy*. 1993;48(7):473-475. doi:10.1111/J.1398-9995.1993.TB01102.X
276. Thompson JA, Oliveira RA, Djukovic A, Ubeda C, Xavier KB. Manipulation of the quorum sensing signal AI-2 affects the antibiotic-treated gut microbiota. *Cell reports*. 2015;10(11):1861-1871. doi:10.1016/J.CELREP.2015.02.049
277. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2011;27(21):2957-2963. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTR507
278. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012 9:4. 2012;9(4):357-359. doi:10.1038/nmeth.1923
279. Li D, Luo R, Liu CM, et al. MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods (San Diego, Calif)*. 2016;102:3-11. doi:10.1016/J.YMETH.2016.02.020
280. Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*. 2010;11(1):1-11. doi:10.1186/1471-2105-11-119/TABLES/5

281. Durbin R, Eddy SR, Krogh A, Mitchison G. Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids. *Biological Sequence Analysis*. Published online April 23, 1998. doi:10.1017/CBO9780511790492
282. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*. 2000;28(1):27-30. doi:10.1093/NAR/28.1.27
283. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990;215(3):403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
284. Lawrence M, Huber W, Pagès H, et al. Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLOS Computational Biology*. 2013;9(8):e1003118. doi:10.1371/JOURNAL.PCBI.1003118
285. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Accessed February 10, 2022. <http://www.gnu.org/copyleft/gpl.html>.
286. Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications 2016 7:1*. 2016;7(1):1-9. doi:10.1038/ncomms11257
287. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 2014;15(12):1-21. doi:10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9
288. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, et al. Package “vegan” Title Community Ecology Package Version 2.5-7. Published online 2020.
289. Chiu CY, Chan YL, Tsai MH, Wang CJ, Chiang MH, Chiu CC. Gut microbial dysbiosis is associated with allergen-specific IgE responses in young children with airway allergies. *The World Allergy Organization journal*. 2019;12(3). doi:10.1016/J.WAOJOU.2019.100021
290. Koh LF, Ong RY, Common JE. Skin microbiome of atopic dermatitis. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2022;71(1):31-39. doi:10.1016/J.ALIT.2021.11.001
291. Thorsen J, Rasmussen MA, Waage J, et al. Infant airway microbiota and topical immune perturbations in the origins of childhood asthma. *Nature communications*. 2019;10(1). doi:10.1038/S41467-019-12989-7
292. Vandenplas Y, Brueton M, Dupont C, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow’s milk protein allergy in infants. *Archives of disease in childhood*. 2007;92(10):902-908. doi:10.1136/ADC.2006.110999
293. Kemp AS, Hill DJ, Allen KJ, et al. Guidelines for the use of infant formulas to treat cows milk protein allergy: an Australian consensus panel opinion. *The Medical journal of Australia*. 2008;188(2):109-112. doi:10.5694/J.1326-5377.2008.TB01534.X

294. Carrell RW, Jeppsson JO, Laurell CB, et al. Structure and variation of human alpha 1-antitrypsin. *Nature*. 1982;298(5872):329-334. doi:10.1038/298329A0
295. Elli L, Topa M, Rimondi A. Protein-losing enteropathy. *Current opinion in gastroenterology*. 2020;36(3):238-244. doi:10.1097/MOG.0000000000000629
296. Kalsheker NA, Deam S, Chambers L, Sreedharan S, Brocklehurst K, Lomas DA. The house dust mite allergen Der p1 catalytically inactivates alpha 1-antitrypsin by specific reactive centre loop cleavage: a mechanism that promotes airway inflammation and asthma. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;221(1):59-61. doi:10.1006/BBRC.1996.0544
297. Majamaa H, Aittoniemi J, Miettinen A. Increased concentration of fecal alpha1-antitrypsin is associated with cow's milk allergy in infants with atopic eczema. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2001;31(4):590-592. doi:10.1046/J.1365-2222.2001.01035.X
298. Kalach N, Kapel N, Waligora-Dupriet AJ, et al. Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2013;51(2):351-361. doi:10.1515/CCLM-2012-0083
299. Kanwar JR, Roy K, Patel Y, et al. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions. *Molecules*. 2015;20(6):9703-9731. doi:10.3390/molecules20069703
300. Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM. Lactoferrin and host defense. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2002;80(1):95-102. doi:10.1139/O01-214
301. Conneely OM. Antiinflammatory Activities of Lactoferrin. *Journal of the American College of Nutrition*. 2001;20:389S-395S. doi:10.1080/07315724.2001.10719173
302. Ward PP, Conneely OM. Lactoferrin: Role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *BioMetals*. 2004;17(3):203-208. doi:10.1023/B:BIOM.0000027693.60932.26
303. Borkowska A, Liberek A, Łuczak G, et al. Fecal lactoferrin, a marker of intestinal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Acta biochimica Polonica*. 2015;62(3):541-545. doi:10.18388/ABP.2015_982
304. Koszewicz M, Mulak A, Dziadkowiak E, Budrewicz S. Is Fecal Calprotectin an Applicable Biomarker of Gut Immune System Activation in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy? - A Pilot Study. *Frontiers in human neuroscience*. 2021;15:733070. doi:10.3389/fnhum.2021.733070
305. Berni Canani R, Terrin G, Rapacciuolo L, et al. Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*. 2008;40(7):547-553. doi:10.1016/j.dld.2008.01.017

306. Canani RB, Rapacciuolo L, Romano MT, et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2004;36(7):467-470. doi:10.1016/J.DLD.2004.02.009
307. Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, Golden BE. Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2001;32(2):171-177. doi:10.1097/00005176-200102000-00015
308. Beşer ÖF, Sancak S, Erkan T, Kutlu T, Çokuğraş H, Cokuğraş FÇ. Can Fecal Calprotectin Level Be Used as a Markers of Inflammation in the Diagnosis and Follow-Up of Cow's Milk Protein Allergy? *Allergy, asthma & immunology research*. 2014;6(1):33-38. doi:10.4168/AAIR.2014.6.1.33
309. Díaz M, Guadamuro L, Espinosa-Martos I, et al. Microbiota and Derived Parameters in Fecal Samples of Infants with Non-IgE Cow's Milk Protein Allergy under a Restricted Diet. *Nutrients*. 2018;10(10). doi:10.3390/NU10101481
310. Otten CMT, Kok L, Witteman BJM, et al. Diagnostic performance of rapid tests for detection of fecal calprotectin and lactoferrin and their ability to discriminate inflammatory from irritable bowel syndrome. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2008;46(9):1275-1280. doi:10.1515/CCLM.2008.246
311. Menees SB, Powell C, Kurlander J, Goel A, Chey WD. A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *The American journal of gastroenterology*. 2015;110(3):444-454. doi:10.1038/AJG.2015.6
312. Barbut F, Gouot C, Lapidus N, et al. Faecal lactoferrin and calprotectin in patients with *Clostridium difficile* infection: a case-control study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2017;36(12):2423-2430. doi:10.1007/S10096-017-3080-Y
313. Aizawa S, Hoki M, Yamamuro Y. Lactoferrin promotes autophagy via AMP-activated protein kinase activation through low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;493(1):509-513. doi:10.1016/J.BBRC.2017.08.160
314. Wang J, Zhang R, Chen X, et al. Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. *Microbial cell factories*. 2020;19(1). doi:10.1186/S12934-020-01367-4
315. Nakamura M. Lactoferrin-mediated formation of oxygen radicals by NADPH-cytochrome P-450 reductase system. *Journal of biochemistry*. 1990;107(3):395-399. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A123056

316. van der Spek AH, Bloise FF, Tigchelaar W, et al. The Thyroid Hormone Inactivating Enzyme Type 3 Deiodinase is Present in Bactericidal Granules and the Cytoplasm of Human Neutrophils. *Endocrinology*. 2016;157(8):3293-3305. doi:10.1210/EN.2016-1103
317. Liu L, Guo Q, Cui M, et al. Impact of maternal nutrition during early pregnancy and diet during lactation on lactoferrin in mature breast milk. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2022;93. doi:10.1016/J.NUT.2021.111500
318. Gheibi N, Ghorbani M, Shariatifar H, Farasat A. Effects of unsaturated fatty acids (Arachidonic/Oleic Acids) on stability and structural properties of Calprotectin using molecular docking and molecular dynamics simulation approach. *PloS one*. 2020;15(3). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0230780
319. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature reviews Microbiology*. 2021;19(1):55-71. doi:10.1038/S41579-020-0433-9
320. Michels N, van de Wiele T, de Henauw S. Chronic Psychosocial Stress and Gut Health in Children: Associations With Calprotectin and Fecal Short-Chain Fatty Acids. *Psychosomatic medicine*. 2017;79(8):927-935. doi:10.1097/PSY.0000000000000413
321. Aho VTE, Houser MC, Pereira PAB, et al. Relationships of gut microbiota, short-chain fatty acids, inflammation, and the gut barrier in Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration*. 2021;16(1). doi:10.1186/S13024-021-00427-6
322. Vaghari-Tabari M, Moein S, Qujeq D, Kashifard M, Hajian-Tilaki K. Positive Correlation of Fecal Calprotectin With Serum Antioxidant Enzymes in Patients With Inflammatory Bowel Disease: Accidental Numerical Correlation or a New Finding? *The American journal of the medical sciences*. 2018;355(5):449-455. doi:10.1016/J.AMJMS.2017.12.009
323. Pijls KE, Jonkers DMAE, Elizalde M, et al. Is intestinal oxidative stress involved in patients with compensated liver cirrhosis? *Annals of hepatology*. 2016;15(3):402-409. doi:10.5604/16652681.1198816
324. Schwarz J, Vecka M, Stožický F, et al. The assessment of plasma fatty acid profiles in newly diagnosed treatment-naive paediatric Crohn's disease. *Physiological research*. 2021;70(5):799-808. doi:10.33549/PHYSIOLRES.934665
325. Calcaterra V, de Amici M, Leonard MM, et al. Serum Calprotectin Level in Children: Marker of Obesity and its Metabolic Complications. *Annals of nutrition & metabolism*. 2018;73(3):177-183. doi:10.1159/000492579
326. Larsen SB, Grove EL, Pareek M, Kristensen SD, Hvas AM. Calprotectin and platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease. *PloS one*. 2015;10(5). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0125992
327. Sanchez-Solares J, Delgado-Dolset MI, Mera-Berriatua L, et al. Respiratory allergies with no associated food allergy disrupt oral mucosa integrity. *Allergy*. 2019;74(11):2261-2265. doi:10.1111/ALL.13860

328. Rosace D, Gomez-Casado C, Fernandez P, et al. Profilin-mediated food-induced allergic reactions are associated with oral epithelial remodeling. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2019;143(2):681-690.e1.
doi:10.1016/J.JACI.2018.03.013

TESIS DOCTORAL
ELISA ZUBELDIA VARELA
2022