

ANTÍGENOS DERIVADOS DE *LACTOBACILLUS* ESTIMULAN MECANISMOS INMUNOLÓGICOS PROTECTORES FRENTE A ALERGIAS ALIMENTARIAS Y DERMATITIS ATÓPICA

Isabel Hagel (1), Zulay Rivera (2), Ingrid Rivera (3), Andrea Ramos (4),
Franca Puccio (5), María Cristina Di Prisco (6)

Recibido: 14/03/2020
Aceptado: 10/05/2020

Resumen

La pérdida de tolerancia inmune frente a antígenos alimentarios se ha asociado con Dermatitis Atópica (DA). **Objetivo:** evaluar la capacidad de un extracto antigénico preparado a partir de cultivos de las cepas *Lactobacillus reuteri* ATCC55845 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC55826, de estimular *in vitro* la producción de citocinas reguladoras tales como TGF- β e IL-10, así como la influencia de estas citocinas sobre los niveles de IgA secretora total, hiperreactividad cutánea a alérgenos alimentarios y el desarrollo de DA. **Métodos:** Se evaluó la presencia de DA utilizando el índice SCORAD (Severity Scoring Atopic Dermatitis) y se realizaron pruebas cutáneas frente a alérgenos alimentarios. Se midieron los valores de IgAs total en saliva y TGF- β e IL-10 en sobrenadantes de muestras de sangre total, estimuladas con el extracto antigénico de *L. reuteri* y *L. rhamnosus* utilizando ELISA. **Resultados:** 32,25% de los niños presentó signos de DA, de los cuales 35% DA leve (SCORAD <20) y 65% DA moderada (SCORAD >20<55). La positividad a las pruebas cutáneas fue mayor en los niños con DA para huevo ($p < 0.0001$); leche ($p < 0.0001$) y pescados ($p = 0.0048$). Los valores de IgAs se correlacionaron positivamente ($p < 0.0001$) con los de TGF- β e IL-10. Los valores de IgAs, TGF- β e IL-10 se asociaron negativamente ($p < 0.0003$, $p = 0.0362$, $p = 0.0009$ respectivamente) con la severidad de la DA y reactividad cutánea frente a leche ($p = 0.0076$, $p = 0.0225$, $p = 0.0059$), huevos ($p = 0.01$, $p = 0.0249$, $p = 0.0006$) y pescados ($p = 0.003$, $p = 0.002$, $p = 0.005$). **Conclusión:** Antígenos de *Lactobacillus* estimulan mecanismos de tolerancia inmunológica previniendo la sensibilización con antígenos alimentarios y desarrollo de DA.

Palabras clave: *Lactobacillus*, TGF- β , IL-10, IgAs, alergia alimentaria, dermatitis atópica.

Lactobacillus derived antigens stimulate protective immune mechanisms against food allergy and atopic dermatitis

Summary

Loss of immune tolerance towards food antigens has been associated with Atopic Dermatitis (AD) which is common in Venezuela. **Objective:** To evaluate the ability of *Lactobacillus reuteri* ATCC55845 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC55826 derived antigens to stimulate *in vitro* the production of TGF- β and IL-10 and the influence of these cytokines on total sIgA levels, skin hyper-reactivity to food allergens and the development of AD in Venezuelan children. **Methods:** The presence of AD was evaluated using the SCORAD Index (Severity Scoring Atopic Dermatitis). Skin tests towards food allergens were performed. The levels of total sIgA in saliva as well as TGF- β and IL-10 in supernatants of whole blood samples stimulated with *Lactobacillus* antigens were determined by ELISA. **Results:** 32.25% of the children developed AD from which 35% suffered of mild (SCORAD <20) and 65% of moderate (SCORAD > 20 <55) AD. Skin test positivity was higher towards egg ($p < 0.0001$); milk ($p < 0.0001$) and fish ($p = 0.0048$) in children with DA. sIgA values correlated positively ($p < 0.0001$) with those of TGF- β and IL-10 stimulated by *Lactobacillus* antigens. sIgA, TGF- β and IL-10 values were negatively associated ($p < 0.0003$, $p = 0.0362$, $p = 0.0009$ respectively) with the severity of DA and skin reactivity against milk ($p = 0.0076$, $p = 0.0225$, $p = 0.0059$), eggs ($p = 0.01$, $p = 0.0249$, $p = 0.0006$) and fish ($p = 0.003$, $p = 0.002$, $p = 0.005$). **Conclusion:** *Lactobacillus* antigens stimulate immune tolerance preventing food allergen sensitization and AD development.

Key words: *Lactobacillus*, TGF- β , IL-10, sIgA, food allergy, atopic dermatitis.

1. Biólogo, Doctor en Ciencias Básicas, Mención Inmunología. Profesor Investigador, Sección de Inmunología, Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
2. Médico Cirujano, especialista en Medicina Interna y Dermatología. Profesor Investigador, Cátedra de Bioquímica, Escuela de Medicina JM Vargas, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
3. Médico Cirujano, especialista en Pediatría y Puericultura y en Dermatología. Profesor Investigador, Cátedra de Farmacología, Escuela JM Vargas, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
4. Bioanalista, especialista en Bacteriología. Sección de Inmunología, Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
5. Biólogo, Magister en Inmunología. Profesor Investigador, Sección de Inmunopatología, Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
6. Médico Cirujano. Especialista en Pediatría y Puericultura. PhD en Inmunología. Profesor Investigador, Sección de Inmunopatología: Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Autor de correspondencia: Isabel Hagel
isabelhagel@gmail.com; Isabel.hagel@ucv.ve; isabelhagel@yahoo.com
Tel: 04241721699. 02128625326 02129766345.

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de dermatitis atópica (DA) ha venido aumentando en las últimas décadas, considerándose actualmente un problema de salud pública particularmente en la población infantil (1–4). En Venezuela se han descrito prevalencias muy elevadas de DA moderada tanto en niños de poblaciones urbanas (21,18%) (5) como rurales (23%) (6). El desarrollo y severidad de la DA depende de la interrelación entre factores ambientales y los intrínsecos al individuo tales como la susceptibilidad genética, defectos en la barrera cutánea y alteraciones de la respuesta inmune (1). En la población infantil, se ha relacionado estrechamente con la presencia de alergias alimentarias (1,5). La pérdida de la efectividad de los mecanismos de tolerancia inmune en la mucosa intestinal, favorece la sensibilización por macromoléculas alérgicas presentes en distintos alimentos particularmente en niños genéticamente predispuestos al reconocimiento de estos alérgenos (7). Un factor importante en la capacidad de desarrollar mecanismos

de tolerancia inmune, es el establecimiento y diversificación temprana de la microbiota intestinal. La misma, constituye un fuerte estímulo para el desarrollo y maduración del tejido linfoide asociado al intestino (GALT por sus siglas en inglés) (8). El GALT tiene como función primordial la distinción entre microorganismos comensales y patógenos así como la inducción de la tolerancia frente a antígenos inocuos procedentes de la dieta (9,10). El establecimiento de mecanismos de tolerancia frente a los alimentos comienza con la captura de antígenos alimentarios en la mucosa intestinal, llevada a cabo principalmente por células epiteliales especializadas o células M asociadas al paso de antígenos y localizadas principalmente en la base de las vellosidades y sobre las placas de Peyer (7). Estas células transfieren los antígenos a células dendríticas tolerogénicas (CDs) (CD103+CX3CR1-) las cuales capturan antígenos alimentarios para posteriormente migrar por acción de quimiocinas a los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) (7). En los NLM estas CDs promueven la diferenciación específica de células T reguladoras mediante un mecanismo dependiente del Factor Transformador de Crecimiento beta (TGF- β) y ácido retinoico (9). Producen altos niveles de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) involucrada en la inducción de Células T reguladoras (Tregs) Foxp3 + productoras de interleucina 10 (IL-10) y TGF- β (9). Los componentes de la microbiota intestinal presentan patrones moleculares de reconocimiento que continuamente inducen la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas (11,12) contribuyendo así al perfil inmunológico tolerante en el GALT (9,10). Las células T reguladoras en la mucosa intestinal, producen constantemente TGF- β que estimula selectivamente la producción de anticuerpos IgA. Los anticuerpos IgA tienen la capacidad de inactivar los factores de virulencia bacteriana, influir en la composición de la microbiota (13), y promover el transporte de antígenos a través del epitelio intestinal (14). Además por medio de mecanismos de exclusión, pueden eliminar macromoléculas pro-alérgicas (15) evitando así la sensibilización frente a alérgenos alimentarios y el consecuente desarrollo de Dermatitis Atópica (DA). De hecho, se ha demostrado que niños con deficiencia selectiva de IgA secretora (IgAs), tienen un mayor riesgo de desarrollar alergia alimentaria (16,17). También, pacientes con DA muestran niveles de IgAs, medidos en muestras de sudor de la piel, significativamente más bajos que individuos sanos (18).

La composición cuantitativa y cualitativa de la microbiota es esencial para el mantenimiento de los mecanismos de tolerancia alimentaria. La colonización temprana por bacterias del género *Lactobacillus* favorece el desarrollo de tolerancia inmune y se ha relacionado con una menor frecuencia de alergias alimentarias en niños lactantes y preescolares (19). La adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una fórmula láctea hipoalérgica es capaz de acelerar la adquisición de tolerancia inmune frente a la leche de vaca en niños potencialmente alérgicos (20). También se ha reportado que el suministro de *Lactobacillus reuteri* como probiótico, a madres embarazadas

y luego a los respectivos lactantes hasta los 12 meses, previene el desarrollo de eczema asociado a IgE en lactantes hasta los dos años (21). Así el propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad de un extracto antigénico, preparado a partir de cultivos de las cepas *Lactobacillus reuteri* ATCC55845 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC55826, de estimular in vitro la producción de citocinas reguladoras tales como TGF- β e IL-10 así como la influencia de estas citocinas sobre los niveles de IgAs total, la hiperreactividad cutánea a alérgenos alimentarios comerciales y el desarrollo de DA.

METODOLOGÍA

Población a estudiar

Se realizó un estudio descriptivo trasversal en un grupo de 62 niños en edades comprendidas entre los 4 a 6 años, de una comunidad de los suburbios de Caracas (Parroquia 23 de Enero), donde previamente se ha reportado una alta prevalencia de DA (5). Se evaluaron todos los niños cuyos padres y representantes estuvieron de acuerdo en participar en el programa y que firmaron el consentimiento informado. El trabajo fue aprobado por la Comisión de Bioética del Instituto de Biomedicina de la Facultad de Medicina en la Universidad Central de Venezuela. Se excluyeron del estudio niños desnutridos y pacientes inmunocomprometidos o que sufrían de algún tipo de cáncer. También se excluyeron aquellos niños que en el momento de la evaluación sufrían de diarrea o infección respiratoria aguda, recibiendo estos niños atención médica oportuna y tratamiento dependiendo de la condición clínica. Ninguno de los niños había recibido probióticos como terapia o complemento.

Evaluación clínica

El examen físico de la piel se realizó siguiendo los lineamientos para diagnóstico de DA establecidos por Hanifin y Rajka (22) y la valoración de la severidad según el índice de SCORAD (23).

Evaluación inmunológica

Reactividad alérgica frente a antígenos alimentarios.

Se realizaron pruebas de hiperreactividad cutánea frente a extractos alérgicos comerciales: leche, huevo, soya, carne de cerdo, de vacuno, pescados, naranja, tomate, harina de trigo y cacao (ALK Abelló, España) según protocolo descrito anteriormente (5,24). Las pruebas de hiperreactividad cutánea se consideraron positivas cuando la pápula fue mayor o igual a 3 mm.

Recolección de muestras:

Con el fin de medir los valores de IgAs, se recolectaron muestras de saliva. Para ello se colocó una torunda de algodón estéril entre la encía superior y la mejilla por 5 minutos y se retiró con ayuda de un aplicador de madera. Luego la torunda se exprimió utilizando el émbolo de una inyectora (5 mL) en un tubo estéril conteniendo un coctel de inhibidores de proteasas (11836170001 Roche, Sigma Aldrich). Las muestras fueron trasladadas en frío y centrifugadas por 10 min a 3000

rpm. Los sobrenadantes se conservaron a una temperatura de -20°C . Las muestras de sangre (3 ml), para cultivo con extractos de *Lactobacillus* y posterior medición de citocinas en sobrenadantes de cultivo, se recolectaron en tubos Vacutainer conteniendo heparina de Sodio (Becton Dickinson, USA). Fueron trasladadas a temperatura ambiente y procesadas antes de 24 horas posterior a la toma de muestra.

Preparación del extracto de cultivos de *Lactobacillus*.

Se preparó un extracto antigénico conteniendo proteínas derivadas de cepas comerciales de lactobacilos inactivos. Las cepas *Lactobacillus reuteri* ATCC55845 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC55826 se cultivaron en medio Man Rogosa Sharpe (BD DIFCO™ Lactobacilli MRS Broth, USA) en ambiente microaeróbico (GasPak EZ Campy Container System, BD, USA) a 37°C y 10% de CO_2 hasta alcanzar 1×10^9 UFC/ml. Posteriormente los cultivos se suspendieron en PBS ($\text{pH} = 7,4$), centrifugaron (10000 rpm durante 10 min a 4°C) y filtraron (filtros de $0,20 \mu\text{m}$, Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos celulares se guardaron a -20°C . Posteriormente, se lavaron los sedimentos celulares con 1 ml de PBS, se descartaron los sobrenadantes y se suspendieron nuevamente los sedimentos en 750 μl de PBS. Luego se sometieron a 5 ciclos de sonicación a 20000 GERTZ por 30 segundos en frío y en presencia de inhibidores de proteasas (11836170001 Roche, Sigma Aldrich). Las suspensiones obtenidas se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se conservaron a una temperatura de -20°C hasta el momento de su uso. La concentración de proteínas en el extracto fue medida utilizando un ensayo comercial (Bio-Rad Protein Assay Kit, USA).

Determinación de los niveles de IgA secretora en saliva

Los niveles de IgAs total en saliva se determinaron por el método de ELISA descrito previamente (25). En cada ensayo se incluyó una curva de calibración utilizando IgA humana de calostro como estándar (I-1010, Sigma Aldrich). Los resultados fueron expresados en ng/mL .

Cultivos de sangre total y determinaciones de citocinas:

Los cultivos de sangre total se realizaron siguiendo la metodología descrita en trabajos anteriores (6,26). El extracto de cultivos de *Lactobacillus* se utilizó a una concentración óptima, previamente determinada, de 8,5 ng/mL y la fitohemaglutinina (PHA) (SIGMA) a una concentración de 5 ng/mL . Para la determinación de TGF- $\beta 1$ e IL-10 en los sobrenadantes de sangre total estimula-

dos, se utilizó un ensayo comercial (Quantikine, R&D Systems, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante para cada caso.

Análisis estadístico

La población estudiada se clasificó de acuerdo a la presencia y severidad de la DA según el SCORAD en: niños sanos sin DA, niños con DA leve ($\text{SCORAD} < 20$) y niños con DA moderada ($\text{SCORAD} \geq 20 \leq 55$) y los datos fueron analizados de acuerdo a esa clasificación. Se realizó un análisis estadístico no paramétrico utilizando GraphPad Prism, versión 5.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA). La positividad de las pruebas cutáneas entre los distintos grupos se comparó mediante la prueba exacta de Fisher. En la comparación de citocinas y anticuerpos entre los distintos grupos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn. Se utilizó la prueba de correlación de Spearman, para determinar la asociación de los niveles IL-10 y TGF- β con los valores IgAs total, así como la influencia de estos parámetros sobre la reactividad alérgica y la severidad de la DA.

RESULTADOS

La población de 62 niños estuvo conformada por 30 varones y 32 niñas con una media de edad de $4,3 \pm 1,7$ años. El 32,25% de los niños evaluados presentó signos y síntomas de DA. De acuerdo a la clasificación de SCORAD, se encontró que 7 de los niños presentaron signos leves ($\text{SCORAD} < 20$); 13 presentaron DA moderada ($\text{SCORAD} \geq 20 \leq 55$) mientras que ningún niño resultó sufrir de DA severa ($\text{SCORAD} > 55$). En la tabla 1, se observa la positividad a las pruebas de reactividad cutánea frente a distintos alérgenos alimentarios, de acuerdo a la severidad de la DA. La misma, fue significativamente mayor en el grupo total de niños con DA para los extractos alérgenos de huevo ($p < 0,0001$); leche ($p < 0,0001$) y pescados ($p = 0,0048$) mientras que no hubo diferencias significativas para los extractos de cacao o naranjas. No se observó reactividad cutánea positiva frente a alérgenos alimentarios

Tabla 1 PROPORCIÓN (%) DE NIÑOS CON PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD CUTÁNEA POSITIVAS (pápula $\geq 3\text{mm}$) FRENTE A ALIMENTOS SEGÚN PRESENCIA Y SEVERIDAD DE LA DERMATITIS ATÓPICA							
	Sin DA	SCORAD Leve	SCORAD moderado	Total con DA	*Prueba exacta de Fischer	95% Intervalo de Confianza	Razón de probabilidades
	(n=42)	(n=7)	(n=13)	(n=20)			
Leche	14.2%	57.1%	76,9%	70%	$p < 0,0001$	3.85 - 50.83	14
Huevo	14.2%	57.1%	69,2%	65%	$p < 0,0001$	3.15 - 39.35	11.14
Pescados	11.9%	28.5%	30,7%	30%	$p < 0,0048$	0.83 - 12.08	9,563
Naranja	4,7%	14,2%	7,6%	10%	$p = 0,5624$	0.28 - 17.05	2.222
Cacao	4,7%	14,2%	15,3%	15%	$p = 0,1488$	0.53 - 23.07	3.529

*Comparación de la positividad en pruebas de hipersensibilidad cutánea entre el grupo total con Dermatitis atópica y el grupo de niños sin signos o síntomas de DA. (n= número total de niños en cada grupo).

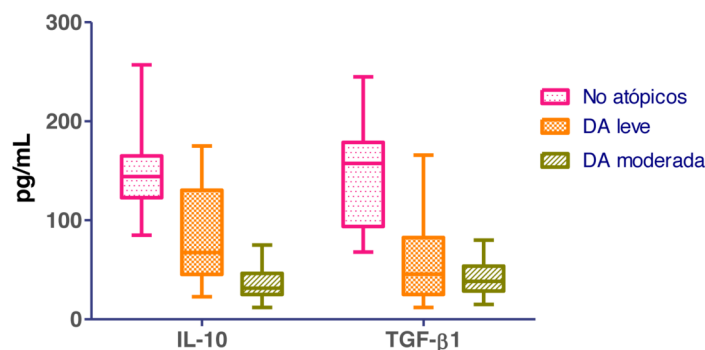


Figura 1
valores de citocinas reguladoras medidas en sobrenadantes de cultivo de sangre total estimulados con extracto antigénico de *Lactobacillus* según severidad de la DA.
 $p < 0,0001$ en los valores de IL-10 y TGF- β entre niños no atópicos y niños con DA moderada.
 $p < 0,05$ en los valores de TGF- β entre niños no atópicos y niños con DA leve.

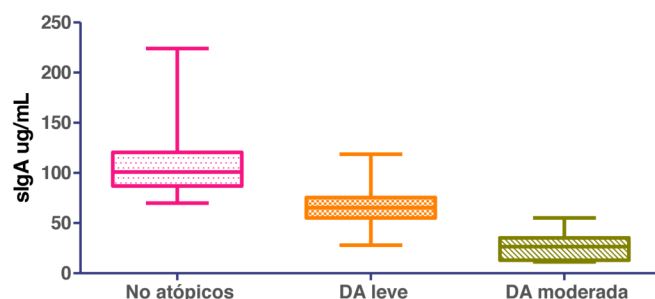


Figura 2
Niveles de IgAs total según severidad de la DA en un grupo de niños pre-escolares Venezolanos
 $p < 0,05$ entre niños no atópicos y niños con DA leve y entre niños con DA moderada y DA leve.
 $p < 0,0001$ entre niños no atópicos y niños con DA moderada

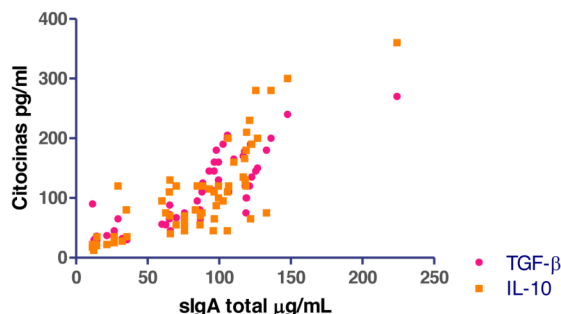


Figura 3
Correlación de Spearman entre niveles de citocinas medidas en muestras de sobrenadantes de cultivo de sangre total estimulados con extracto antigénico de cepas de *Lactobacillus* y niveles de IgAs medida en saliva.
IgAs vs TGF- β : $r = 0,805$; 95% CI: 0.757-0.909; $p < 0,0001$.
IgAs vs IL-10: $r = 0,7902$; 95% CI: 0.666-0.8715; $p < 0,0001$

comunes tales como carne de cerdo, carne de vacuno, tomate y harina de trigo en ninguno de los niños evaluados. No hubo diferencias significativas en la positividad a las pruebas de reactividad cutánea entre el grupo de niños con DA leve y el grupo de niños con DA moderada.

Se compararon los valores de TGF- β e IL-10 medidos en sobrenadantes de cultivo de sangre total, estimulados con el extracto derivado de cepas de *Lactobacillus*, entre niños sanos, niños con DA leve y niños

con DA moderada. En la figura 1, se muestra que la mediana de los valores de IL-10 y TGF- β varió significativamente entre los distintos grupos de niños: Kruskal-Wallis-statistic: 61,43 ($p < 0,0001$), siendo estos valores significativamente menores ($p < 0,0001$) en los niños con SCORAD moderado. Además, se encontró una asociación inversa estadísticamente significativa entre los niveles de TGF- β ($p < 0,0003$) e IL-10 ($p = 0,0362$) con la severidad de la dermatitis atópica (SCORAD) en el grupo de niños que presentaron signos y síntomas de DA (Tabla 2).

En la figura 2, se grafican las medianas de los valores de IgAs total medidos en muestras de saliva en los grupos de niños clasificados de acuerdo a la presencia y severidad de la DA. Las diferencias fueron significativas (Kruskal-Wallis-statistic: 36,86; $p < 0,0001$) para los valores de IgAs total entre los distintos grupos. Siendo estos valores más elevados en los niños sanos comparado con los niños con DA leve ($p < 0,05$) o moderada ($p < 0,0001$). Los valores observados en los niños con DA leve fueron estadísticamente más elevados ($p < 0,05$) que los observados en el grupo con DA moderada. En la figura 3 se observa, que los valores de TGF- β , así como con los niveles de IL-10 medidos en muestras de sobrenadantes de sangre estimulada con el extracto de *Lactobacillus* correlacionaron positivamente con los niveles de IgAs total medidos en saliva con una $p < 0,0001$.

Los niveles de TGF- β e IL-10 se asociaron negativamente con la positividad en pruebas de reactividad cutánea (tamaño de la pápula) frente a leche ($p = 0,0225$ y $p = 0,0059$ respectivamente), huevo ($p = 0,0249$ y $p = 0,0006$ respectivamente), pescado ($p = 0,002$ y $p = 0,005$ respectivamente), soya ($p = 0,009$ y $p = 0,01$ respectivamente) y cacao ($p = 0,0017$ y $p = 0,0096$) (Tabla 2). También los niveles de IgAs total correlacionaron significativa e inversamente con el SCORAD ($p = 0,0009$) y el tamaño de la pápula en pruebas de reactividad cutánea: leche ($p = 0,0076$), huevos ($p = 0,01$), pescados ($p = 0,003$), soya ($p = 0,0003$) y cacao ($p < 0,0001$) en el grupo de niños con DA (Tabla 2).

DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró una prevalencia de DA de 32,25%. La misma fue más elevada que la reportada previamente (21% -23%) en niños venezolanos (5,6,27), y en grupos similares de otros países la cual varía desde 10% hasta 22,5% (2,3,28-30). Aunque la DA es una patología multifactorial en donde alteraciones de la barrera epidérmica fa-

TABLA 2
CORRELACION DE SPEARMAN ENTRE CITOCINAS REGULADORAS Y NIVELES DE IgAs TOTAL, SOBRE LA REACTIVIDAD CUTÁNEA FRENTE A ALÉRGENOS ALIMENTARIOS Y LA SEVERIDAD DE LA DA.

Prueba cutánea positiva						
	SCORAD	Leche	Huevos	Pescados	Soya	Cacao
(n)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
sIgA total						
r Spearman	-0,632	-0,531	-0,506	-0,578	-0,675	-0,782
95% IC		-0.77 a -0.15	-0.77 a -0.11	-0.80 a -0.21	-0.85 a -0.36	-0.90 a -0.54
p (dos colas)	0,0009	0,0076	0,0115	0,0031	0,0003	< 0.0001
TGF-β						
r Spearman	-0,677	-0,463	-0,456	-0,452	-0,519	-0,606
95% IC	-0.85 a -0.36	-0.73 a -0.06	-0.73 a -0.05	-0.72 a -0.05	-0.76 a -0.13	-0.82 a -0.25
p (dos colas)	0.0003	0,0225	0,0249	0,0266	0,0093	0,0017
IL-10						
r Spearman	-0,443	-0,555	-0,662	-0,563	-0,484	-0,517
95% IC	-0.72 a -0.01	-0.79 a -0.17	-0.84 a -0.33	-0.79 a -0.18	-0.74 a -0.08	-0.76 a -0.13
p (dos colas)	0,0362	0,0059	0,0006	0,0051	0,0165	0,0096

cilitan la activación de mecanismos proinflamatorios en la piel (5,31), la pérdida de tolerancia frente a antígenos alimentarios en la mucosa intestinal (9) es también un componente importante en el desarrollo de esta patología. La presencia y severidad de la DA en la población evaluada se relacionó estrechamente con la hipersensibilidad cutánea frente a antígenos alimentarios tales como leche de vaca, huevos, soya y pescado coincidiendo con resultados de estudios previos realizados en otros países (32).

Como se señaló en la introducción, componentes de la microbiota tienen un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia alimentaria. Así, en este trabajo, la capacidad de producir IL-10 y TGF-β, como respuesta a la estimulación *in vitro* con un extracto antigénico derivado de cepas de *L. reuteri* y *L. rhamnosus*, mostró ser un factor protector frente a la reactividad cutánea a alimentos y a la manifestación de signos y síntomas de DA en la población evaluada. En este sentido, estudios previos realizados en grupos de donantes voluntarios sanos, demostraron que la adición de extractos de distintas cepas de *Lactobacillus* a cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) estimuladas con PHA, aumenta la producción de IL-10 a la vez que disminuye la producción de IL-13, involucrada en el desarrollo de procesos alérgicos (33). En otro trabajo realizado en niños con alergia alimentaria, la adición de una mezcla de probióticos comerciales (*L. casei* W56, *L. lactis* W58, *L. acidophilus* W55, *L. salivarius* W57, *B. infantis* W52, *B. lactis* W18 y *B. longum* W51) al cultivo de CMSP estimuladas con extracto crudo de maní, re-

sultó en un aumento en los niveles de IL-10, TNF-α e IL-6 y una marcada disminución en la producción de IgE (34). También, evidencias de trabajos realizados en CMSP de donadores sanos y pacientes con trastornos autoinmunes han mostrado que cepas de *Lactobacillus* estimulan *in vitro* preferencialmente la diferenciación de monocitos a células dendríticas CD103+, productoras de IL-10 en ambos grupos (11).

Por otra parte, se ha reportado que el suministro de fórmulas de leche hidrolizadas enriquecidas con *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) a niños alérgicos a la leche de vaca, expande la diversidad de la microbiota intestinal, favoreciendo la presencia de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta como butirato que previenen el desarrollo de alergia a proteínas lácteas (35). El butirato actúa como mediador de la respuesta inmune, estimulando la diferenciación selectiva de células dendríticas tolerogénicas, la producción de ácido retinoico así como la de elevados niveles de IgAs (36). En concordancia, en este estudio se observó que los niveles de TGF-β e IL-10 medidos en sobrenadantes de sangre total estimulada con el extracto de *Lactobacillus*, se asociaron estrechamente de forma positiva a los niveles de IgAs medidos en saliva. Similarmente, otros estudios han demostrado que el suplemento con *Lactobacillus plantarum* IS-10506 en niños menores de dos años se asocia positivamente con un aumento de los niveles de TGF-β plasmáticos y consecuentemente a mayores niveles de sIgA en muestras de heces (37). Más aún, trabajos realizados en modelos experimentales han demostrado que *Lactobacillus rhamnosus*,

unido a través de receptores de superficie a moléculas de IgA, estimula la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas (12), promoviendo la producción de TGF- β e IL-10, generando así un mecanismo de retroalimentación positiva para la producción de esta inmunoglobulina, que a su vez contribuye activamente a la eliminación de macromoléculas alergénicas en la mucosa intestinal. En concordancia con estas evidencias experimentales, en este trabajo los niveles de IgAs total se asociaron inversamente a la positividad en pruebas cutáneas frente a alérgenos alimentarios en la población infantil evaluada.

La disminución significativa en la capacidad de establecer mecanismos de tolerancia alimentaria en el grupo de niños con DA, particularmente en el grupo con DA moderada, podría deberse a diferentes causas. Aunque en este trabajo no fue posible medir y comparar la composición de la microbiota intestinal entre los distintos grupos, otros estudios si han demostrado una relación entre la disbiosis intestinal con el desarrollo de alergias alimentarias y la severidad de la DA (19,38,39). Se ha propuesto que factores extrínsecos como el tipo de parto, la duración de la lactancia materna y la forma en que se inicia la alimentación complementaria en el infante, influyen posteriormente en el perfil cualitativo y cuantitativo de la microbiota y por ende en el establecimiento adecuado de mecanismos de tolerancia del sistema inmune local en el intestino durante la infancia (36,40). Además, la presencia de polimorfismos en los genes para IL-10 y TGF- β que influyen en la capacidad intrínseca de establecer mecanismos de tolerancia inmune, se ha relacionado también a la presencia de DA en poblaciones infantiles (41). Por otra parte, en trabajos anteriores realizados en niños de la misma comunidad (5) se reportó que la presencia de parásitos intestinales como *G. duodenalis* que afectan la permeabilidad de la mucosa intestinal, favorece también la sensibilización por macromoléculas alergénicas y podrían contribuir a la elevada prevalencia de DA que se observó en la población infantil estudiada.

Los resultados de este trabajo permiten concluir que antígenos derivados de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus rhamnosus* estimulan la producción de citocinas reguladoras, contribuyendo así al mantenimiento de un ambiente inmunológico tolerante en el intestino, que previene el desarrollo de alergias alimentarias asociadas a la DA. Así, el suplemento con probióticos conteniendo estas cepas de *Lactobacillus*, es recomendable para tratar alergias alimentarias por su capacidad para restaurar el equilibrio en los mecanismos de tolerancia en la mucosa intestinal. Sin embargo, la interacción de la microbiota con el sistema inmune es muy compleja, con la participación de distintos géneros de bacterias. Estudios más profundos sobre los mecanismos mediante los cuales la microbiota influye en el sistema inmune en poblaciones humanas aún están por venir y constituyen un campo de investigación importante en la comprensión de las enfermedades alérgicas particularmente en poblaciones infantiles.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Bacteriología del Hospital Vargas de Caracas por la colaboración prestada. Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH- PG-09-8680) y por la Comisión de Investigación de la Facultad de Medicina, UCV.

REFERENCIAS

1. Pols DHJ, Wartna JB, Moed H, van Alphen EI, Bohnen AM, Bindels PJE. Atopic dermatitis, asthma and allergic rhinitis in general practice and the open population: a systematic review. *Scand J Prim Health Care* 2016;34(2):143–150 [citado 21/2/2019]. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02813432.2016.1160629>
2. Kowalska-Oleđzka E, Czamecka M, Baran A. Epidemiology of atopic dermatitis in Europe. *J Drug Assess* 2019; 8 (1): 126–128. [citado 14/12/2020 disponible en: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ijda20>
3. Barroso B, Vera-Berrios RN, Rial JM, Fariña-Sabaris MC, Santos LC, Sastre J. Prevalence of severe atopic dermatitis in adults and children in a health area of Madrid, Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2019; 29 (1): 77–79 [citado junio 14, 2019]. Disponible en <http://search.proquest.com/openview/0442e277526faad4fa27eeb481621408/1?pq-origsite=gscholar&cbl=105664>
4. Ha J, Lee SW, Yon DK. Ten-year trends and prevalence of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis among the Korean population, 2008–2017. *Korean J Pediatr* 2020; 63 (7): 278–283 [citado Dic 14, 2020]. Disponible en: <https://www.kjp.or.kr/journal/view.php?number=201255536>
5. Rivera Z, Bravo N, Rivera I, Venezolana MDP. 2015 U. Influencia de la alergia alimentaria y la infección por *Giardia duodenalis* en la prevalencia y severidad de la dermatitis atópica en niños preescolares. *Dermatol Venez* 2015; 53 (2): 19–25. [citado Feb 21, 2019] Disponible en: <http://svderma.org/revista/index.php/ojs/article/viewFile/1350/1327>
6. Hagel I, Puccio F, López E, Lugo D, Cabrera M, Di Prisco MC. Intestinal parasitic infections and atopic dermatitis among Venezuelan Warao Amerindian pre-school children. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25 (3): 276–282. [citado Oct 6, 2016] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24417507>
7. Satitsuksanoa P, Jansen K, Głobińska A, van de Veen W, Akdis M. Regulatory Immune Mechanisms in Tolerance to Food Allergy. *Front Immunol*. 2018; 9: 2939 [citado 2019 Jun 13]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30619299>
8. Neish A S. Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology*. 2010; 136 (1): 65–80 [citado 2019 Feb 21]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508508019781>
9. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol* 2018; 55 (2): 107–17 [citado 5/5/2019]. Disponible en <http://link.springer.com/10.1007/s12016-018-8680-5>
10. Zhao Q, Elson CO. Adaptive immune education by gut microbiota antigens. *Immunology* 2018; 154 (1): 28–37 [citado 5/5/2019] Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12896>
11. Esmaeili S-A, Mahmoudi M, Rezaieyazdi Z, Sahebari M, Tabasi N, Sahebkar A, et al. Generation of tolerogenic dendritic cells using *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus del-*

- brueckii* as tolerogenic probiotics. J Cell Biochem 2018; 119 (9): 7865–7865-7862. [citado 14/6/2019] Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.27203>
12. Mikulic J, Longet S, Favre L, Benyacoub J, Corthesy B. Secretory IgA in complex with *Lactobacillus rhamnosus* potentiates mucosal dendritic cell-mediated Treg cell differentiation via TLR regulatory proteins, RALDH2 and secretion of IL-10 and TGF- β . Cell Mol Immunol 2017;14(6):546–556 [Citado 21/2/2019] Disponible en: <http://www.nature.com/doi-finder/10.1038/cmi.2015.110>
13. Bunker JJ, Bendelac A. IgA Responses to Microbiota. Immunity 2018; 49 (2): 211–224 [citado 16/11/2018]. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761318303510>
14. Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. Immunol Rev 2014; 260 (1): 76–85. [citado 2/4/2017] Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12189>
15. Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. Annu Rev Immunol 2011; 29 (1):273–293. [citado 2/4/ 2017] Disponible en <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101317>
16. Szczawińska-Popłonyk A, Breborowicz A, Ossowska L. Food allergy in children with hypogammaglobulinemia. Pediatr Pol 2012;87(5):444–448. [citado 9/12/ 2020] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031393912000467>
17. Shahin RY, Abo Ali FH, Nour Melek NA, Abd Elateef IA, Attia MY. Study of selective immunoglobulin A deficiency among Egyptian patients with food allergy. Cent Eur J Immunol 2020;45(2):184–188. [citado 9/12/2020] Disponible en: <http://search.proquest.com/openview/2353c279d0b8d3d5b87afb73688f48a8/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2028857>
18. Imayama, Shimozone, Hoashi, Yasumoto, Ohta, Yoneyama, et al. Reduced secretion of IgA to skin surface of patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 1994;94(2):195–200.
19. Sjögren YM, Jenmalm MC, Böttcher MF, Björkstén B, Sverremark-Ekström E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. Clin Exp Allergy 2009;39(4):518–526 [citado 5/5/2019]. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2222.2008.03156.x>
20. Berni Canani R, Di Costanzo M, Bedogni G, Amoroso A, Cosenza L, Di Scala C, et al. Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial. J Allergy Clin Immunol 2017;139(6):1906–1913.e4. [citado 18/6/2019] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674916324873>
21. Forsberg A. *Lactobacillus reuteri*, Infant Allergy Prevention and Childhood Immune Maturation. En: Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health. Ed. do por V Rao, L Rao 2016; pp 59-82, Intech Open Sciences Limited, Londres, Inglaterra [citado 2019 Aug 16]. Disponible en: https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=fG-QDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA59&dq=lactobacillus+reuteri+and+food+allergy+in+children&ots=vRZ1KAnKl8&sig=t7ZKCEcl980kFbE_YmbN9nV6M34.
22. Hanifin J, Rajka G. Diagnostic features of atopic eczema. Acta Dermatol Venereol 1980;92:44–47. [citado 2019 Feb 20]; Disponible en: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10005197286/>
23. Oranje AP, Glazenburg EJ, Wolkerstorfer A, de Waard-van der Spek FB. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. Br J Dermatol 2007;157(4):645–648. [citado 2019 feb 20] Disponible en <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.2007.08112.x>
24. Puccio FA, Lynch NR, Noya O, Noga O, Noda A, Hagel I, et al. Importance of including *Blomia tropicalis* in the routine diagnosis of Venezuelan patients with persistent allergic symptoms. Allergy 2004;59 (7):753–757. [citado 2016 oct 6] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180763>
25. Rodríguez OL, Hagel I, González Y, Roque ME, Vásquez N, López E, et al. Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. J Trop Pediatr 2004;50 (2):68–72. [citado 2016 oct 6] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15088793>
26. Turner JD, Faulkner H, Kamgno J, Cormont F, Van Snick J, Else KJ, et al. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. J Infect Dis 2003; 188 (11): 1768–1775. [citado 2016 dec 8] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14639550>
27. Overeem MMA, Verhagen LM, Hermans PWM, del Nogal B, Sánchez AM, Acevedo NM, et al. Recurrent wheezing is associated with intestinal protozoan infections in Warao Amerindian children in Venezuela: A cross-sectional survey. BMC Infect Dis 2014; 14: 293.
28. Al-Herz W. A systematic review of the prevalence of atopic diseases in children on the arabian peninsula. Med Princ Pract.2018; 27 (5): 436–442. [citado 2019 jun 14] Disponible en: <https://www.karger.com/Article/Abstract/493267>
29. Guo Y, Li P, Tang J, Han X, Zou X, Xu G, et al. Prevalence of atopic dermatitis in chinese children aged 1–7 ys. Sci Rep 2016; 6:29751. [citado 2019 jun 14]; Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep29751>
30. Lopez Carrera YI, Al Hammadi A, Huang YH, Llamado LJ, Mahgoub E, Tallman AM. Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Atopic Dermatitis in the Developing Countries of Asia, Africa, Latin America, and the Middle East: A Review. Dermatology and Therapy. Springer Healthcare 2019; 9: 685–705.
31. Zhu TH, Zhu TR, Tran KA, Sivamani RK, Shi VY. Epithelial barrier dysfunctions in atopic dermatitis: a skin-gut-lung model linking microbiome alteration and immune dysregulation. Br J Dermatol 2018; 179 (3): 570–581. [citado 2019 jun 18] Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjd.16734>
32. Tsakok T, Marrs T, Mohsin M, Baron S, du Toit G, Till S, et al. Does atopic dermatitis cause food allergy? A systematic review. J Allergy Clin Immunol 2016; 137 (4): 1071–1078. [citado 2019 agosto 5] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674915031656>
33. Niers LEM, Timmerman HM, Rijkers GT, Van Bleek GM, Van Uden NOP, Knol EF, et al. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. Clin Exp Allergy 2005; 35 (11): 1481–1489. [citado 2019 jun 16] Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2222.2005.02375.x>
34. Flinterman AE, Knol EF, van Leperen-van Dijk AG, Timmerman HM, Knulst AC, Bruijnzeel-Koomen CAFM, et al. Probiotics Have a Different Immunomodulatory Potential in vitro versus ex vivo upon Oral Administration in Children with Food Allergy. Int Arch Allergy Immunol 2007; 143 (3): 237–244. [citado 2019 jun 13] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17290150>
35. Canani RB, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. ISME J 2016; 10 (3): 742–50. [citado 2019 jun 18]

- Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ismej2015151>
36. Berni Canani R, Paparo L, Nocerino R, Di Scala C, Della Gatta G, Maddalena Y, et al. Gut Microbiome as Target for Innovative Strategies Against Food Allergy. *Front Immunol* 2019; 10: 191. [citado 2019 jun 13] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30828329>
 37. Bela B, Munasir Z, Surono IS, Kusumo PD, Wibowo H. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 supplementation increases faecal sIgA and immune response in children younger than two years. *Benef Microbes* 2019; 1–8. [citado 2019 feb 21] Disponible en: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2017.0178>
 38. Kourosh A, Luna RA, Balderas M, Nance C, Anagnostou A, Devaraj S, et al. Fecal microbiome signatures are different in food-allergic children compared to siblings and healthy children. *Pediatr Allergy Immunol* 2018; 29 (5): 545–54. [citado 2019 mayo 5] Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/pai.12904>
 39. Reddel S, Del Chierico F, Quagliarello A, Giancristoforo S, Vernocchi P, Russo A, et al. Gut microbiota profile in children affected by atopic dermatitis and evaluation of intestinal persistence of a probiotic mixture. *Sci Rep* 9,4996 (2019). [citado 2019 mayo 5] Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41149-6>
 40. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 2016; 352 (6285): 539–544. [citado 2019 abril 29] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27126036>
 41. Behniafard N, Amirzargar AA, Gharagozlou M, Delavari F, Hosseini-verdi S, Sotoudeh S, et al. Single nucleotide polymorphisms of the genes encoding IL-10 and TGF- β 1 in Iranian children with atopic dermatitis. *Allergol Immunopathol* 2018; 46 (2): 155–159. [citado 2019 Jun 18] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301054617301003>