



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

Doctorado en ciencias biológicas (modalidad directo)

Título de TESIS:

Estudio del efecto de la inulina de agave azul en un modelo preclínico de dermatitis atópica.

PRESENTA:

María Marcela Ríos Carlos

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CÓMITE TUTORAL:

Director: Dra. Eva María Salinas Miralles

Co-Director: Dr. Luis G. Bermúdez Humarán

Asesor: Dr. Daniel Cervantes García

10 de mayo del 2026

Aguascalientes, Ags.

Autorizaciones

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

MTRO. GUILLERMO DOMÍNGUEZ AGUILAR
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

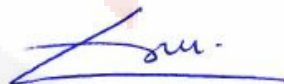
PRESENTE

Por medio del presente como **DIRECTOR** designado del estudiante **MARÍA MARCELA RÍOS CARLOS** con ID 308527 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INULINA DE AGAVE AZUL EN UN MODELO PRECLÍNICO DE DERMATITIS ATÓPICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 05 de febrero de 2026



Dra. Eva María Salinas Miralles
Director de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

MTRO. GUILLERMO DOMÍNGUEZ AGUILAR
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como CO-DIRECTOR designado del estudiante **MARÍA MARCELA RÍOS CARLOS** con ID 308527 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INULINA DE AGAVE AZUL EN UN MODELO PRECLÍNICO DE DERMATITIS ATÓPICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 05 de febrero de 2026

Dr. Luis G. Bermúdez Humarán
Co-Director de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

**MTRO. GUILLERMO DOMÍNGUEZ AGUILAR
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

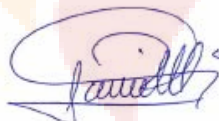
PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **MARÍA MARCELA RÍOS CARLOS** con ID 308527 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INULINA DE AGAVE AZUL EN UN MODELO PRECLÍNICO DE DERMATITIS ATÓPICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 05 de febrero de 2026



Dr. Daniel Cervantes García
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

MTRO. GUILLERMO DOMÍNGUEZ AGUILAR
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE


Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **MARÍA MARCELA RÍOS CARLOS** con ID 308527 quien realizó la tesis titulado: **ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INULINA DE AGAVE AZUL EN UN MODELO PRECLÍNICO DE DERMATITIS ATÓPICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 05 de febrero de 2026



Dra. Eva María Salinas Miralles
Director de tesis



Dr. Luis G. Bermúdez Humarán
Co-Director de tesis



Dr. Daniel Cervantes García
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA
PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación (dd/mm/aaaa): 10/04/2026

NOMBRE: María Marzala Rios Carlos ID: 308527

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Directa IGAC (del posgrado): Estudio de proteínas en sistemas biológicos

MODALIDAD DEL PROYECTO DE GRADO: Tesis (X) Tradicional *Tesis por artículos () científicos **Tesis por Patente () Trabajo Práctico ()

TITULO: Estudio del efecto de la insulina de agave azul en un modelo preclínico de dermatitis atópica

La dermatitis atópica representa un problema de salud pública creciente en México y en el mundo, con una alta carga económica, social y emocional para los pacientes y sus familias, especialmente en comunidades con acceso limitado a atención dermatológica especializada. El desarrollo de alternativas terapéuticas seguras, accesibles y de origen natural es fundamental para disminuir esta brecha. En este contexto, los resultados de esta tesis aportan evidencia científica sobre el potencial inmunomodulador y antiinflamatorio de la insulina de Agave tequilano Weber var. azul, un recurso vegetal de gran relevancia agroindustrial para México. El uso de este compuesto natural como coadyuvante en el manejo de la dermatitis atópica podría favorecer estrategias de tratamiento más accesibles, reducir la dependencia de fármacos de alto costo y mejorar la calidad de vida de los pacientes, al tiempo que impulsa el aprovechamiento sustentable de una planta emblemática para el país. De esta manera, la investigación contribuye tanto al avance del conocimiento biomédico como al fortalecimiento de alternativas terapéuticas innovadoras con impacto directo en la salud y bienestar de la población.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR SEGÚN CORRESPONDA: SI, NO, NA (No Aplica)

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:	
SI	El trabajo es congruente con los IGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a los aspectos de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Posgrados
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc.)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral
N.A.	Cuenta con la carta de satisfacción del usuario (En caso de que corresponda)
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU de la SECHTI actualizado
SI	Tiene el o los artículos aceptados o publicados y cumple con los requisitos instruccionales (en caso de que proceda)
**En caso de Tesis por artículos científicos publicados (completar solo si la tesis fue por artículos)	
	Aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto según el nivel del programa
	El (la) estudiante es el primer autor(a)
	El (la) autor(a) de correspondencia es el Director (a) del Núcleo Académico
	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
**En caso de Tesis por Patente	
	Cuenta con la evidencia de solicitud de patente en el Departamento de Investigación (anexarla al presente formato)

Con base en estos criterios, se autoriza continuar con los trámites de situación y programación del examen de grado: Sí X
No

Elaboró: 
 *NOMBRE Y FIRMA DEL(A) CONSEJERO(A) SEGÚN LA IGAC DE ADSCRIPCIÓN: Dr. Daniel Cervantes García
 * En caso de conflicto de intereses, deberá ser revisado por los miembros del IGAU correspondiente al área o director o miembro del comité tutoral, designado por el Decano.
 NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE POSGRADO: 
 Dr. Gilberto Alejandro Ocasio Acosta
 Revisó: 
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dra. Ilana Ernestina Medina Ramirez
 Autorizó: 
 NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: Mtro. Guillermo Domínguez Aguiar

Nota: procedé el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
 Es competencia de los Art. 24, 25 inciso V del Reglamento General de Posgrado, que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Proponer criterios y mecanismos de selección, certificación, ingreso y titulación de estudiantes para asegurar la eficiencia de estos trámites y el Art. 28 fracción II, señalar, seleccionar y dar el seguimiento del estudiantado desde su ingreso hasta su titulación.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Marina Ramal Sánchez,
University of Teramo, Italy

REVIEWED BY
Francisco Jose Roig,
Universidad San Jorge, Spain
Helena Vidaurri De La Cruz,
General Hospital of Mexico, Mexico

*CORRESPONDENCE
Eva Salinas
✉ maria.salinas@edu.uaa.mx
✉ ersain1204@gmail.com

RECEIVED 05 September 2025
REVISED 12 November 2025
ACCEPTED 17 November 2025
PUBLISHED 02 December 2025

CITATION
Rios-Carlos M, Jiménez M, Cervantes-
García D, Córdova-Dávalos LE, Verduzco LE,
Enríquez-Medrano FJ, Fabela-Sánchez O,
Bermúdez-Humarán LG and Salinas E (2025)
Immunomodulatory and anti-inflammatory
effects of agave fructans in atopic
dermatitis: gut microbiota and
short-chain fatty acid implication.
Front. Immunol. 16:1700023.
doi: 10.3389/fimmu.2025.1700023

COPYRIGHT
© 2025 Rios-Carlos, Jiménez, Cervantes-
García, Córdova-Dávalos, Verduzco,
Enríquez-Medrano, Fabela-Sánchez,
Bermúdez-Humarán and Salinas. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
The use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of agave fructans in atopic dermatitis: gut microbiota and short-chain fatty acid implication

Marcela Rios-Carlos¹, Mariela Jiménez¹,
Daniel Cervantes-García^{1,2}, Laura Elena Córdova-Dávalos¹,
Lidia E. Verduzco³, Francisco Javier Enríquez-Medrano⁴,
Omar Fabela-Sánchez^{2,4}, Luis G. Bermúdez-
Humarán⁵ and Eva Salinas^{1*}






¹Laboratory of Immunology, Department of Microbiology, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ²Secretariat of Science, Humanities, Technologies and Innovation (SECIHTI), Mexico City, Mexico, ³Department of Sustainable and Protected Agriculture, Technological University of Northern Aguascalientes, La Estación Rincón, Rincón de Romos, Aguascalientes, Mexico, ⁴Department of Macromolecular Chemistry and Nanomaterials, Center for Research in Applied Chemistry (CICQA), Saltillo, Mexico, ⁵Micalis Institute, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Jouy-en-Josas, France

Introduction: Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disorder resulting from the interplay of genetic and environmental factors, with a dysregulated type-2 immune response. The association between AD onset and intestinal dysbiosis supports research into nutritional interventions such as fermentable fibers intake. Agave-derived fructans (AFs) display prebiotic activity, modulating gut microbial communities that may positively influence immune functions. In this study, we evaluated the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of oral AFs in a rat AD model.

Methods: AD-like lesions were induced in the ear of Wistar rats by frequent application of 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). AFs (0.1, 1, 5 g/kg) from *Agave tequilana* Weber var. azul were orally administered for 13 days. Inflammation, pruritus, gene expression of transcriptional factors of immune response, and staphylococcal colonization were evaluated in lesional skin. Cytokine expression, relative abundance of the main bacterial phyla and genera, and levels of short-chain fatty acids were analyzed in the intestinal milieu.

Results: Treatment with AFs at 0.1 g/kg significantly reduced ear thickness at 1- and 6-hours post-DNCB application. Similarly, ear edema at 1 hour was attenuated, and inhibition of the NF- κ B inflammatory pathway was detected. After AFs treatment at 0.1 g/kg, serum IgE levels were normalized to those of control animals. All AFs significantly decreased dermal mast cell and eosinophil counts, as well as epidermal thickening, with greater efficacy observed at lower doses. The scratching behavior remained unchanged across groups. AFs reduced *Staphylococcus aureus* abundance in lesional skin and restored *Staphylococcus epidermidis* levels to baseline. In lesional tissue, AFs downregulated *Gata3*, *Rorc*, *Il4*, and *Il17a* mRNA expression, while promoting a regulatory immune profile in mesenteric lymph nodes, characterized by increased *Foxp3*, *Il10*, and *Tgfb1* expression. Administration of AFs at 0.1 and 1 g/kg promoted fecal abundance of *Bifidobacterium* and cecal acetic acid concentrations, whereas doses of 1 and 5 g/kg upregulated Firmicutes,

Unraveling the gut-skin axis in atopic dermatitis: exploiting insights for therapeutic strategies

Marcela Ríos-Carlos ^a, Daniel Cervantes-García ^{a,b}, Laura E. Córdova-Dávalos ^a,
Luis G. Bermúdez-Humarán ^c, and Eva Salinas ^a

^aDepartment of Microbiology, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, Aguascalientes, Mexico; ^bConsejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías, Ciudad de México, México; ^cINRAE, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France

ABSTRACT

Gut microbiota exert functions of high importance in the intestine. Furthermore, there is increasing evidence for its role in immune regulation and maintenance of homeostasis in many physiological processes taking place in distant tissues. In particular, in this review, we explore the impact of metabolites produced by the gut microbiota on the development of atopic dermatitis (AD). Probiotics and prebiotics balance the microbiota and promote the generation of bacterial metabolites, such as short-chain fatty acids and tryptophan derivatives, which promote the regulation of the exacerbated AD immune response through regulatory T cells and IL-10 and TGF- β cytokines. Metabolites also have a direct action on keratinocytes once they reach the bloodstream. Besides, probiotics decrease the levels of metabolites associated with AD onset, such as phenols. Understanding all these crosstalk processes between the gut and the skin reveals a number of possibilities, mainly through the manipulation of the gut microbiome, which may represent therapeutic strategies that can contribute to the standard treatments of AD patients to improve their quality of life.

ARTICLE HISTORY

Received 11 April 2024
Revised 14 August 2024
Accepted 12 November 2024

KEYWORDS



Atopic dermatitis; gut-skin axis; gut microbiome; prebiotics; probiotics; tryptophan metabolites; short-chain fatty acids; phenols

Introduction

Atopic dermatitis (AD) represents a chronic inflammatory skin disorder, characterized by dry skin, persistent pruritus, and recurrent eczematous lesions. Worldwide studies have described prevalence of up to 30% in children and 17% in adults, with significant variations both between and within countries.^{1,2} AD is a complex and multifactorial pathology that involves a combination of genetic, environmental and immune factors.³ It is initiated through a compromised epidermal structure and function, which subsequently lead to inflammation with dysregulation of lymphocyte T-helper (Th) response that promotes immunoglobulin (Ig)E production, and skin microbiota alteration.^{4–7} (Explained in detail in Figure 1). Thus, elevated serum levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, IL-23, tumor necrosis factor (TNF)- α , thymic stromal lymphopoietin (TSLP), thymus and activation

regulated chemokine (TARC; CCL17), and macrophage derived chemokine (MDC; CCL22) are detected in AD patients. In contrast, levels of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, IL-35, and transforming growth factor (TGF)- β are reduced in these patients.^{8–13} This altered cytokine and chemokine profile has gained clinical significance, as it is implicated in the development of itch and skin inflammation in AD.^{14,15}

AD is a condition that typically manifests in the early years of life, a critical period during which the microbiota begins to establish in infants.^{16,17} The balance of this microbial environment is crucial, and disruptions may contribute to its pathogenesis. Comparisons between individuals with AD and healthy controls reveal distinct alterations in both skin and gut microbiota, with the common signature of decreased bacterial diversity.^{18,19} In the skin microbiota of AD patients, there is an overabundance of *Staphylococcus aureus* (correlated with AD

CONTACT Eva Salinas  maria.salinas@edu.uaa.mx  Department of Microbiology, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, Aguascalientes 20100, Mexico

© 2024 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado a través de la beca número 811277, para la realización de mis estudios de doctorado y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por brindarme el espacio académico, la infraestructura y el acompañamiento institucional necesarios para mi formación.

A la Dra. Consolación Martínez y a la L.A.Q.B. Sonia Cruz Muñoz, del Departamento de Histología, por su apoyo durante el desarrollo del trabajo experimental.

A la Dra. Eva Salinas Miralles, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme desde el primer momento, todo su apoyo para el desarrollo de este trabajo. Agradezco profundamente su confianza, la guía constante, la paciencia y la disposición para compartir sus conocimientos. Su acompañamiento académico y humano y su calidad como persona ha sido de gran motivación.

Al Dr. Daniel Cervantes García por su siempre excelente disposición para explicar cualquier tema, escuchar con atención y ayudar a resolver los problemas que se presentaron durante el desarrollo del doctorado. Valoro especialmente su interés por el bienestar de los alumnos y su compromiso con la formación integral de quienes tuvimos la oportunidad de aprender de él.

A la Dra. Laura Córdova Dávalos, por ser siempre una gran ayuda, por tender su mano sin dudarle y por su sencillez y humildad. Su apoyo constante y desinteresado fue muy importante en distintos momentos de este camino, convirtiéndose en un respaldo tanto a nivel académico como personal.

A la Dra. Mariela Jiménez, por su disposición para apoyar y colaborar cuando fue necesario, así como su apertura y amabilidad durante el desarrollo de este trabajo.

A mi Co-Tutor el Dr. Luis G. Bermúdez Humarán, agradezco el tiempo dedicado, las observaciones y sugerencias, los cuales contribuyeron de manera significativa a enriquecer y fortalecer esta investigación.

A Pam, gracias por estar siempre a mi lado y no dejarme sola en ningún momento. Gracias por enseñarme, con el ejemplo y la perseverancia y por recordarme que con esfuerzo y constancia todo es posible. Su compañía incondicional fue fundamental durante este proyecto.

A mis amigos del doctorado, Brenda, Alberto, Fernando y Alicia por la motivación, las risas compartidas y el apoyo mutuo, que hicieron de esta etapa una experiencia más llevadera y significativa.

Al Sr. Carlos y Sra. Maricela, por su apoyo constante, su cercanía y su disposición para brindarme su ayuda.

A mis tías Raquel y María, por estar siempre presentes, por su apoyo incondicional, acompañamiento y cariño.

Finalmente, a mi familia, en especial a mis padres, por estar siempre a mi lado, apoyarme incondicionalmente y no dejarme sola nunca, por brindarme todo lo necesario para seguir adelante y creer siempre en mí. A mis hermanas, Lucía, Saraí y Maricela, por celebrar cada uno de mis logros como propios, y a Juan Pablo, por estar siempre presente y acompañarme durante tantos desvelos. Su amor y apoyo fue fundamental para hacer posible la culminación de este proyecto.

Dedicatoria

Quiero dedicar este proyecto doctoral a mis padres porque sin ellos nada de esto, ni ninguno de mis logros en la vida, habría sido posible. Gracias por confiar siempre en mí, por creer en mis capacidades incluso cuando yo dudaba, y por apoyarme, impulsarme y motivarme a perseguir cada uno de mis sueños. Su ejemplo, su amor incondicional y su constante guía me han enseñado a dar siempre lo mejor de mí. Todo lo que soy y todo lo que he alcanzado se lo debo a ustedes.



Índice General

Índice de tablas	4
Índice de figuras	4
Acrónimos y Abreviaturas.....	7
Resumen	8
Abstract.....	10
1. Introducción	12
1.1 La piel	12
1.2 Microbiota cutánea	13
1.2.1 Estafilococos en la microbiota cutánea	13
1.2.2 Principales especies de <i>Staphylococcus</i> en la piel	13
1.2.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	14
1.2.4 Otras especies comensales	14
1.2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.2.6 Interacciones, control microbiano e implicaciones terapéuticas	15
1.3 Péptidos de defensa del hospedero (HDP).....	16
1.4 Dermatitis atópica (DA).....	16
1.4.1 Fenotipos de la DA	17
1.4.2 Patogenia de la DA	18
1.5 Disbiosis intestinal en la DA	20
1.6 Tratamientos para la dermatitis atópica	22
1.7 Prebióticos.....	24
1.7.1 Efectos benéficos de los prebióticos	25
1.7.2 Clasificación	25
1.8 Inulina de agave azul (IAA): estructura y actividades prebiótica e inmunomoduladora	26
1.9 Actividad anti-alérgica de algunos fructanos.....	32
2. Justificación	33
3. Hipótesis.....	33
4. Objetivo general	33
5. Objetivos particulares	33
6. Metodología	34

6.1 Inulinas de agave azul	34
6.2 Cepas bacterianas.....	34
6.3 Cultivos bacterianos.....	35
6.4 Análisis de crecimiento bacteriano por espectrofotometría	36
6.5 Animales.....	37
6.6 Protocolo de Inducción de Dermatitis Atópica Experimental	37
6.7 Diseño experimental.....	38
6.8 Peso de los animales.....	38
6.9 Evaluación del grosor de las orejas	38
6.10 Evaluación de los eventos de rascado	38
6.11 Obtención de muestras	39
6.12 Evaluación del grosor de las orejas	41
6.13 Evaluación de los eventos de rascado.....	41
6.14 Preparación de muestras para histología	41
6.15 Técnicas histoquímicas.	42
6.15.1 Azul de toluidina	42
6.15.2 Hematoxilina y eritrosina B	42
6.15.3 Tinción de H&E	43
6.16 Conteo de mastocitos	43
6.17 Conteo de eosinófilos	43
6.18 Medición de grosor de epidermis.....	44
6.19 Análisis de la expresión de filagrina e involucrina en tejido lesionado	45
6.20 Western Blot.....	46
6.21 Purificación de DNA del tejido cutáneo y cuantificación de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	46
6.22 Cuantificación de Histamina sérica	47
6.23 Cuantificación de Histamina en tejido de oreja	48
6.24 Cuantificación de IgE sérica	49
6.25 Análisis de la expresión de factores de transcripción y citocinas en tejido de oreja y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM)	50
6.26 Purificación de DNA de heces y cuantificación de Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota y Actinomycetota	52
6. 27 Análisis estadístico de los resultados	56
7. Resultados	57

7.1 Efecto prebiótico *in vitro* de las inulinas sobre diferentes LAB en condiciones de anaerobiosis57

7.2 Efecto de las inulinas sobre la acidez del medio de crecimiento de diferentes LAB en condiciones de anaerobiosis.....59

En cuanto al pH de los medios tras 16 horas de incubación, se observó que la mayor acidificación se produjo en presencia de glucosa para todas las cepas evaluadas. En el caso de *L. rhamnosus* (Hansen) y *L. rhamnosus* LM07 cultivados en medios suplementados con inulinas (Figuras 18A, B), el descenso más pronunciado y significativo del pH se presentó en el medio con IAA1. En contraste, el medio adicionado con lac no mostró cambios significativos, presentando un comportamiento semejante al control negativo.59

7.3 Efecto de la IAA administrada vía oral sobre los signos clínicos de la DA experimental.....63

7.4 Efecto de los tratamientos con IAA sobre el prurito de los animales66

7.5 Efecto de los tratamientos con IAA sobre el grosor de la epidermis en las lesiones de DA67

7.6 Efecto de los tratamientos con IAA sobre la cantidad de mastocitos y eosinófilos en la dermis.68

7.7 Histamina sérica en animales controles y con DA70

7.8 Efecto de los tratamientos sobre los niveles de histamina en suero y tejido lesionado de animales con DA70

7.9 Efecto de los tratamientos con IAA sobre los niveles de IgE en suero71

7.10 Identificación de filagrina e involucrina en tejido de oreja de rata Wistar72

7.11 Efecto de los tratamientos con IAA sobre el nivel de expresión de filagrina e involucrina en las lesiones de DA73

7.12 Efecto de los tratamientos con IAA sobre la disbiosis en la microbiota cutánea en zonas lesionadas.....74

7.13 Efecto de los tratamientos con IAA sobre la expresión génica de factores de transcripción relacionados con la polarización de células inmunes hacia perfiles inflamatorios en oreja y NML75

7.14 Efecto de los tratamientos con IAA sobre los principales filos bacterianos de la microbiota fecal.....77

8. Discusión78

9. Conclusiones.....84

10. Referencias86

11. Anexo110

Índice de tablas

Tabla 1. Composición porcentual de las inulinas.....	34
Tabla 2. Composición de los diferentes medios MRS.	36
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para la evaluación de la microbiota cutánea.	47
Tabla 4. Oligonucleótidos para la cuantificación de factores reguladores de la transcripción y citocinas.	51
Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos para la evaluación de la microbiota fecal.	52
Tabla 6. Tasa de crecimiento y tiempo de generación.	61
Tabla 7. Tasa de crecimiento y tiempo de generación de <i>L. rhamnosus</i> (Hansen) y <i>L. plantarum</i> LP-115 en medio MRS comercial suplementado con IAA 1 a diferentes concentraciones.	62

Índice de figuras

Figura 1. Desarrollo y patogenia de la dermatitis atópica, donde la disfunción de la barrera epidérmica, mediada por citocinas epiteliales y una respuesta inmunitaria tipo Th2, induce inflamación, prurito y colonización por bacterias oportunistas como <i>Staphylococcus aureus</i> , contribuyendo a la cronicidad del proceso inflamatorio cutáneo (Th: linfocitos T cooperadores, ILC: Células Linfoides Innatas, Ig: Inmunoglobulina, IL: Interleucina, TSLP: Linfopoyetina estromal tímica, TNF: Factor de Necrosis Tumoral, IFN: Interferón, TGF: Factor de Crecimiento Transformante.)	19
Figura 2. Principales fructanos, en base a el tipo uniones de las cadenas lineales de fructosa y el residuo al que se anclan en la sacarosa: a) Inulina, b) Neo-inulina, c) Levanos y d) neolevanos Fructanos propuestos para las especies de Agave (Ritsema & Smeekens, 2003)	27
Figura 3. Identificación de los trisacáridos kestosa y neokestosa en los diferentes tipos de fructanos (Modificada de (Ritsema & Smeekens, 2003)	28
Figura 4. Fructanos propuestos para las especies de Agave (Mancilla-Margalli & López, 2006).....	30
Figura 5. Diagrama esquemático del protocolo de inducción de dermatitis atópica experimental y obtención de muestras (C: Cutánea, SC: Subcutánea, IM: Intramuscular, A-AO: Acetona-Aceite de Oliva; NLM: nódulos linfáticos mesentéricos, H&E: Hematoxilina y Eosina, H&EB: Hematoxilina y eritrosina B).....	40
Figura 6. Secciones realizadas en las orejas extirpadas de los animales a las 24 horas de la aplicación del DNCB	41
Figura 7. Corte de oreja completa con cada una de las secciones en donde se tomó fotografía.....	44
Figura 8. Mediciones realizadas en cada una de las fotos tomadas	45
Figura 9. Curva con los estándares de histamina.	48
Figura 10. Curva estándar para cuantificar IgE total de rata	50
Figura 11. Curva estándar de Bacillota.....	53
Figura 12. Curva estándar de Bacteroidota.....	54
Figura 13. Curva estándar de Pseudomonadota.	55
Figura 14. Curva estándar de Actinomycetota.	56
Figura 15. Fases de crecimiento de los lactobacilos.	57

Figura 16. Crecimiento de *L. rhamnosus* (Hansen) (A) y *L. rhamnosus* LM07 (B) con diferentes fuentes de carbono. Diferentes letras indican diferencia significativa entre los grupos.58

Figura 17. Crecimiento de *L. plantarum* LP-115 (A), LM17 (B) y LBH 1075 (C) con diferentes fuentes de carbono.59

Figura 18. Cambio de pH en el medio de crecimiento de *L. rhamnosus* (Hansen) (A) y LM07 (B) después de 16 hrs de inoculación.60

Figura 19. Cambio de pH en el medio de crecimiento de *L. plantarum* LP-115 (A), LM17 (B) y LBH 1075 (C) después de 16 hrs de inoculación.61

Figura 20. Crecimiento de *L. rhamnosus* (Hansen) (A) y *L. plantarum* LP-115 (B) en medio MRS adicionado con IAA1.62

Figura 21. Peso de los animales los días 7, 14, 22, 28 y 36 del protocolo de inducción de DA experimental.63

Figura 22. Incremento en el grosor de las orejas de las ratas Wistar con DA inducida por DNCB y tratadas con IAA. La evaluación se realizó en los días 0, 7 (A), 14 (B), 22 (C), 28 (D) y 36 (E). +p<0.0001 vs Control, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.0001 vs DA, post hoc Dunnett.65

Figura 23. Peso de orejas a la hora de haber aplicado el DNCNB (A), peso de orejas a las 24 horas de haber aplicado el DNCNB (B); +p<0.001, ++p<0.0001 vs control, *p<0.05 vs DA, post hoc Dunnett.65

Figura 24. Peso del bazo respecto al peso de las ratas post hoc Dunnett.66

Figura 25. Eventos de rascado de los animales en los días 22 y 36 del protocolo experimental. ANOVA una vía post hoc Tukey. + P<0.0001 y * p<0.01.67

Figura 26. Grosor de epidermis en las lesiones de DA a las 24 horas de aplicar el alérgeno. A) Imágenes representativas de cortes de las orejas de los animales teñidos con H&E; B) Análisis del grosor de la epidermis. +p<0.0001 vs control, *p<0.0001 vs DA, post hoc Dunnett.68

Figura 27. Células inflamatorias en dermis. A. Imágenes representativas de los cortes histológicos de tejido lesionado de orejas de los animales teñidos con azul de Toluidina (AT) y con Hematoxilina y Eritrosina B (H & EB). B. Conteo de mastocitos en tejido teñido con azul de toluidina 24h después de aplicar DNCB. C. Conteo de eosinófilos en tejido teñido con hematoxilina y eritrosina B 24h después de aplicar DNCB. +p<0.0001 vs Control, *p<0.001, ** p<0.0001 vs DA, post hoc Dunnett.69

Figura 28. Nivel de histamina sérica del día 36 a la hora de haber aplicado el DNCB70

Figura 29. Cuantificación de histamina. A) en suero (ng/μL), B) por gramo de tejido de la oreja, C) por concentración de proteína total de la muestra.71

Figura 30. Nivel de IgE sérica el día 36, a las 24 hora de haber aplicado el DNCB. +p<0.05 vs Control, *p<0.05 vs DA post hoc Dunnett.72

Figura 31. Estandarización de diluciones de anticuerpos óptimas para la detección de A) GAPDH, B) filagrina, C) involucrina.73

Figura 32. Expresión relativa de A) involucrina y B) filagrina en muestras de piel de animales con DA y tratados con IAA.74

Figura 33. Cantidad de *S. aureus* y *S. epidermidis*. +++p<0.001 vs control, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs DA, post hoc Dunnett.75

Figura 34. A) Expresión de factores de transcripción, B) de IL-4 y C) de IL-17 en tejido de oreja. +p<0.001, ++ p<0.0001 vs C; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs DA post hoc Dunnett.76

Figura 35. A) Expresión de factores de transcripción, B) de IL-10 y C) de TGF- β en NLM. +p<0.01 vs C; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs DA, post hoc Dunnett.77

Figura 36. Abundancia relativa de cantidad de bacterias en muestras fecales pertenecientes a los filos Bacillota, Bacteroidota, Pseudomonadota, y Actinomycetota. *p<0.05, **p<0.0001 vs AD, post hoc Dunnett.78



Acrónimos y Abreviaturas

IAA: Inulina de Agave Azul

Iac: Inulina de achicoria

HDP: Péptidos de defensa del hospedero

Agr: accessory gene regulator

CoNs: Coagulasa-negativas

PSMs: Phenol-soluble modulins

TLR: Receptores tipo Toll

hBD: β -defensinas humanas

DA: Dermatitis atópica

IgE: Inmunoglobulina E

FLG: Filagrina

TSLP: Linfopoyetina estromal tímica

AGCCs: Ácidos grasos de cadena corta

GOS: Galactooligosacáridos

FOS: Frucooligosacáridos

GP: Grado de polimerización

Treg: Células T reguladoras

GC-MS: Cromatografía de gases-masas

MALDI-TOF-MS: Espectrometría de masas con detección por tiempo de vuelo y desorción/ionización láser asistida por matriz

AT: Azul de toluidina

H&EB: hematoxilina y eritrosina B

H&E: Hematoxilina y eosina

PVDF: Difluoruro de polivinilideno

Resumen

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad inflamatoria crónica y recurrente de la piel, caracterizada por disfunción de la barrera cutánea, intensa respuesta inmune tipo Th2 y niveles elevados de inmunoglobulina E (IgE). Su fisiopatología involucra una compleja interacción entre factores genéticos, inmunológicos, ambientales y microbianos, en la que la disbiosis del microbioma cutáneo e intestinal juega un papel determinante en el mantenimiento de la inflamación. En este contexto, los prebióticos de origen vegetal, como la inulina de agave azul (IAA, producida en el *Agave tequilana* Weber var. azul), han cobrado relevancia por su capacidad de modular la microbiota y ejercer efectos inmunorreguladores.

En este estudio se evaluó el efecto terapéutico de la inulina de agave azul administrada por vía oral en un modelo experimental de DA extrínseca inducida por 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) en rata. Se analizaron parámetros clínicos como el grosor y edema de oreja, eventos de rascado y niveles séricos de IgE total, parámetros moleculares, como factores de transcripción y citocinas inflamatorias en intestino y piel, así como también cambios en el microbiota cutáneo e intestinal. Los resultados mostraron que la administración de inulina de agave redujo significativamente la inflamación auricular aguda, el engrosamiento epidérmico, la hiperplasia de mastocitos y la eosinofilia en la dermis de la piel lesionada y la concentración de IgE total el suero. En tejido lesionado se redujeron los niveles de expresión de GATA-3, ROR γ t, IL-4 e IL-17, mientras que se aumentó la expresión del mensajero para Foxp3, IL-10 y TGF- β en intestino. Asimismo, se observó una mejora en la composición bacteriana tanto en piel como en intestino, con un aumento en piel de *Staphylococcus epidermidis* y una reducción de *Staphylococcus aureus*, aunado a un incremento en heces de la cantidad de bacterias de los géneros Bacillota y una reducción de bacterias potencialmente patógenas del filo Pseudomonadota.

Estos hallazgos sugieren que la IAA ejerce un efecto inmunomodulador y antiinflamatorio, posiblemente mediado por la restauración de la homeostasis microbiana intestinal y cutánea. Por lo tanto, este compuesto natural representa una prometedora alternativa

terapéutica complementaria en el manejo de la dermatitis atópica extrínseca y en la prevención de su recurrencia a través de la modulación del eje intestino-piel.

Palabras clave: dermatitis atópica, inulina de agave azul, microbiota cutánea, microbiota intestinal, inflamación, prebióticos.



Abstract

Atopic dermatitis (AD) is a chronic, recurrent inflammatory skin disorder characterized by barrier dysfunction, an enhanced Th2-type immune response, and elevated immunoglobulin E (IgE) levels. Its pathophysiology involves a complex interaction of genetic, immunological, environmental, and microbial factors, where dysbiosis of both the skin and gut microbiome plays a key role in perpetuating inflammation. In this context, plant-derived prebiotics such as blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) inulin have gained attention due to their ability to modulate the microbiota and exert immunoregulatory effects.

In this study, we evaluated the therapeutic effect of orally administered blue agave inulin in an experimental model of extrinsic AD induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in rats. Clinical parameters such as ear thickness and edema, scratching behavior, and total serum IgE levels were analyzed, along with molecular parameters including transcription factors and inflammatory cytokines in the intestine and skin, as well as changes in the cutaneous and intestinal microbiota. The results showed that agave inulin administration significantly reduced acute auricular inflammation, epidermal thickening, mast cell hyperplasia, eosinophilia in lesioned skin, and total serum IgE concentration. In lesioned tissue, the expression levels of GATA-3, ROR γ t, IL-4, and IL-17 were reduced, whereas intestinal expression of Foxp3, IL-10, and TGF- β mRNA was increased. Additionally, improvements in bacterial composition were observed in both skin and intestine, with an increase in *Staphylococcus epidermidis* and a reduction in *Staphylococcus aureus* on the skin, together with an increase in fecal bacillota and a reduction of potentially pathogenic Pseudomonadota.

These findings suggest that blue agave inulin exerts immunomodulatory and anti-inflammatory effects likely mediated by the restoration of gut-skin microbial homeostasis. Therefore, this natural compound represents a promising complementary therapeutic strategy for managing extrinsic atopic dermatitis and preventing its recurrence through modulation of the gut-skin axis.

Keywords: atopic dermatitis, blue agave inulin, skin microbiota, gut microbiota, inflammation, prebiotics.



1. Introducción

1.1 La piel

La piel es un órgano complejo que actúa como barrera física, química e inmunológica, al mismo tiempo que hospeda comunidades microbianas que participan en la homeostasis y en la protección contra patógenos. Está conformada por epidermis, dermis e hipodermis, cada una con funciones específicas en la defensa y la comunicación con el sistema inmunológico (Simmons and Gallo., 2024).

La epidermis es un epitelio queratinizado estratificado compuesto por los estratos basal, espinoso, granular, córneo y, en regiones acrales, el lúcido. Su principal célula es el queratinocito, que forma la barrera cutánea y participa activamente en la inmunidad mediante la producción de citocinas, quimiocinas, neuropéptidos y péptidos de defensa del hospedero (HDP) (antes conocidos como péptidos antimicrobianos Bin Hafeez *et al.*, 2021). Además, interactúa con células inmunes como linfocitos T residentes, células de Langerhans, mastocitos y células de Merkel, integrando así respuestas neuroinmunes (Chen *et al.*, 2023; Szabo *et al.*, 2019).

La dermis provee soporte mecánico y flexibilidad gracias a su matriz extracelular rica en colágeno y fibras elásticas. Se divide en dermis papilar (superficial), con fibras delgadas y onduladas, y dermis reticular (profunda), con haces de colágeno más gruesos y organizados. Esta diferenciación está determinada por subpoblaciones de fibroblastos con funciones distintas en cicatrización, envejecimiento y remodelación tisular (Ueda *et al.*, 2019; Haydont *et al.*, 2020; Iriyama *et al.*, 2022).

La hipodermis o tejido subcutáneo contiene adipocitos, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales. Más allá de su función de aislamiento, se reconoce que los adipocitos asociados a la piel participan en la inmunidad innata a través de la producción de HDP como la catelicidina (LL-37) durante infecciones bacterianas, además de secretar adipocinas que regulan inflamación y cicatrización (Guan *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2024).

1.2 Microbiota cutánea

La piel alberga bacterias, hongos y virus que forman la microbiota cutánea, con una distribución influida por el microambiente: sebáceo, húmedo o seco. Con relación a las bacterias, en sitios sebáceos predominan especies lipofílicas de *Cutibacterium* (antes *Propionibacterium*); en áreas húmedas, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*; mientras que en zonas secas la diversidad bacteriana es mayor (Ito *et al.*, 2023; Skowron *et al.*, 2021).

La microbiota está dominada por especies hongos como *Malassezia* en la mayoría de los sitios corporales, pero en los pies se observa mayor diversidad con presencia de *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Epicoccum*. Actualmente se reconoce que *Malassezia* puede comportarse como comensal, patógeno o protector, dependiendo del contexto inmunológico del huésped (Nguyen *et al.*, 2022; Vijaya Chandra *et al.*, 2021).

1.2.1 Estafilococos en la microbiota cutánea

La piel humana alberga una comunidad microbiana diversa en la que los estafilococos tienen un papel fundamental en la homeostasis y defensa cutánea. Dentro de este grupo, las especies coagulasa-negativas (CoNS) y *Staphylococcus aureus* son las más representativas. Aunque pertenecen al mismo género, difieren notablemente en su comportamiento: algunas especies contribuyen a la protección y equilibrio del ecosistema cutáneo, mientras que otras pueden asociarse con procesos inflamatorios o infecciosos (Brown & Horswill, 2020; Sabaté Brescó *et al.*, 2017).

1.2.2 Principales especies de *Staphylococcus* en la piel

Entre las CoNS más frecuentes en piel sana se encuentran *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus* y *S. lugdunensis*. En contraste, *S. aureus* es menos común en piel sana, pero tiende a predominar en condiciones inflamatorias como la DA (Brown & Horswill, 2020; Ogonowska *et*

al., 2021; Heilbronner & Foster, 2020). La abundancia de estas especies varía según el tipo de microambiente cutáneo (húmedo, seco o sebáceo) y entre individuos, lo que explica diferencias en sus funciones y efectos sobre la salud de la piel (Brown & Horswill, 2020).

1.2.3 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis es una de las especies más estudiadas y cumple un papel dual. Por un lado, participa en la maduración del sistema inmune cutáneo y en la inhibición de microorganismos patógenos mediante la producción de péptidos antimicrobianos como las modulinas solubles en fenol (PSMs), ácido lipoteicoico y otros metabolitos que refuerzan la acción antimicrobiana de la piel. Además, algunas de sus cepas favorecen la reparación tisular y modulan la respuesta inflamatoria local (Brown & Horswill, 2020; Sabaté Brescó *et al.*, 2017; Foster, 2020).

1.2.4 Otras especies comensales

Diversas CoNS como *S. hominis* y *S. capitis* también desempeñan funciones protectoras al producir sustancias con actividad antagonista frente a *S. aureus*, reduciendo su colonización y virulencia (Peng *et al.*, 2019; Brown & Horswill, 2020). En el caso de *S. haemolyticus*, aunque forma parte de la microbiota normal, puede comportarse como oportunista en condiciones de inmunosupresión o daño cutáneo.

Por su parte, *S. lugdunensis* ha sido reconocida como una especie comensal con un notable potencial protector, debido a su capacidad de producir lugdunin, un antibiótico peptídico no ribosomal que inhibe el crecimiento de *S. aureus* y otros gram-positivos. Además, lugdunin puede inducir la expresión de HDPs y fortalecer la inmunidad innata cutánea (Zipperer *et al.*, 2016; Bitschar *et al.*, 2019; Chang *et al.*, 2023).

1.2.5 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es el principal patógeno oportunista en la piel humana y su sobrecrecimiento se asocia con diversas enfermedades inflamatorias, especialmente la DA. Las cepas de *S. aureus* producen toxinas, superantígenos y proteasas que dañan la barrera epidérmica, inducen inflamación y

agravan la disfunción de la piel. Además, su capacidad para desarrollar resistencia antimicrobiana (como las cepas MRSA) complica su manejo clínico (Ogonowska *et al.*, 2021; Brescó *et al.*, 2017). En pacientes con DA, la abundancia de *S. aureus* se correlaciona directamente con la severidad de las lesiones, y su eliminación suele asociarse con mejoría clínica (Ogonowska *et al.*, 2021).

1.2.6 Interacciones, control microbiano e implicaciones terapéuticas

Las especies comensales del género *Staphylococcus* desempeñan un papel clave en la regulación del ecosistema cutáneo y en la prevención del crecimiento excesivo de patógenos oportunistas. Estas bacterias ejercen su efecto protector mediante distintos mecanismos complementarios. Uno de ellos es la producción de compuestos antimicrobianos como lugdunin o diversos péptidos ribosomales, que inhiben directamente la proliferación de *S. aureus* y limitan su capacidad de colonización (Zipperer *et al.*, 2016; Bitschar *et al.*, 2019; Chang *et al.*, 2023).

Otro mecanismo importante es la interferencia en los sistemas de comunicación bacteriana, particularmente en el sistema agr (accessory gene regulator) de *S. aureus*, responsable de regular su virulencia. Al bloquear estas señales, las CoNS reducen la expresión de toxinas y enzimas destructivas, disminuyendo el daño a la barrera epidérmica (Brown & Horswill, 2020; Sabaté Brescó *et al.*, 2017).

Asimismo, las CoNS actúan de manera sinérgica con los HDPs, potenciando su eficacia y reforzando la inmunidad innata local. De forma paralela, pueden modular la respuesta inmune al activar receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en queratinocitos, estimulando defensas sin provocar inflamación excesiva (Brown & Horswill, 2020; Bitschar *et al.*, 2019).

Estas interacciones reflejan una red dinámica en la que la presencia equilibrada de estafilococos comensales mantiene la resistencia natural de la piel a la colonización por patógenos. Cuando ocurre una alteración o disbiosis, las especies protectoras disminuyen y *S. aureus* prolifera, lo que desencadena inflamación y daño tisular, como ocurre en la DA (Ogonowska *et al.*, 2021; Brown & Horswill, 2020).

Los estudios recientes plantean estrategias terapéuticas basadas en el uso de cepas comensales como probióticos tópicos, o en la aplicación directa de compuestos bacterianos como lugdunin, con el fin de restaurar la microbiota protectora y reforzar la barrera cutánea. Sin embargo, la variabilidad genética entre cepas y los posibles efectos adversos subrayan la necesidad de evaluar cuidadosamente la seguridad y mecanismos de acción antes de su aplicación clínica (Brown & Horswill, 2020; Heilbronner & Foster, 2020).

Desde la perspectiva de este trabajo, el análisis de las variaciones en las poblaciones de *Staphylococcus* particularmente la relación entre *S. aureus* y algún CoNS protectoras, como *S. epidermidis*, puede aportar información valiosa sobre cómo los tratamientos moduladores de la microbiota, como la administración de inulina de agave, influyen en la integridad de la barrera cutánea y en la respuesta inmunológica local.

1.3 Péptidos de defensa del hospedero (HDP)

La piel es una fuente importante de HDPs, entre los que destacan las β -defensinas humanas (hBD), la catelicidina LL-37 y la dermicidina secretada por glándulas sudoríparas. Más allá de su acción antimicrobiana, estos péptidos cumplen funciones inmunomoduladoras como quimioatracción de células inmunes, regulación de receptores tipo Toll (TLR) y estimulación de la cicatrización (Hancock, 1997; Lehrer & Ganz, 1999; Nizet *et al.*, 2001; Zasloff, 2002).

La expresión de HDPs es inducida por citocinas como IL-17 e IL-22, vitamina D y señales derivadas de la microbiota. Su desregulación se ha relacionado con enfermedades inflamatorias de la piel, incluyendo DA y psoriasis (Balaji *et al.*, 2025; Whitmore *et al.*, 2024).

1.4 Dermatitis atópica (DA)

La DA es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel caracterizada por disfunción de la barrera epidérmica, desregulación inmunológica y alteraciones de la microbiota cutánea, lo que se traduce en prurito intenso, eccema recurrente e inflamación sistémica asociada (Silverberg & Guttman-Yassky, 2021). Su prevalencia es alta a nivel mundial, con cifras que alcanzan hasta 20% en la infancia y entre 7-10% en adultos, siendo una de las enfermedades cutáneas más comunes

(Langan *et al.*, 2020; Weidinger *et al.*, 2023). Aunque la mayoría de los casos comienzan en la niñez, hasta un 40% persiste o recurre en la edad adulta (Chiesa Fuxench *et al.*, 2019).

1.4.1 Fenotipos de la DA

En la literatura sobre la DA se reconocen dos fenotipos principales: el extrínseco (o alérgico) y el intrínseco (o no alérgico). El fenotipo extrínseco representa aproximadamente entre el 70 % y el 85 % de los casos clínicos y se caracteriza por niveles elevados de inmunoglobulina E (IgE) total, sensibilización a alérgenos alimentarios o ambientales (IgE específica positiva), antecedentes personales o familiares de atopia como asma o rinitis alérgica, además de alteraciones estructurales de la barrera epidérmica, comúnmente asociadas con mutaciones en el gen filagrina (FLG). Inmunológicamente, este fenotipo muestra una clara polarización hacia la respuesta Th2, con sobreexpresión de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales estimulan la producción de IgE por los linfocitos B y la activación de mastocitos y eosinófilos (Suárez-Fariñas *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2022).

Por otro lado, el fenotipo intrínseco que comprende alrededor del 15-30 % de los pacientes con DA presenta niveles séricos normales o ligeramente elevados de IgE, ausencia de sensibilización alérgica evidente, menor frecuencia de comorbilidades atópicas, inicio más tardío de la enfermedad y una barrera cutánea menos deteriorada. Desde el punto de vista inmunológico, aunque puede existir una participación del eje Th2, se observa una activación más marcada de Th17, Th22 e incluso Th1, lo que indica un patrón inflamatorio más heterogéneo (Suárez-Fariñas *et al.*, 2013; Akdis & Akdis., 2003).

La DA extrínseca se encuentra íntimamente relacionada con los mecanismos de hipersensibilidad tipo I, también conocida como hipersensibilidad inmediata o mediada por IgE, una respuesta inmunológica característica de las enfermedades alérgicas. Este tipo de hipersensibilidad se desarrolla en dos fases: la fase de sensibilización y la fase efectora. En la fase de sensibilización, la exposición inicial a un alérgeno induce la activación de linfocitos Th2, que secretan IL-4 e IL-13, promoviendo el cambio de isotipo en los linfocitos B para la producción de IgE específica contra dicho alérgeno. Esta IgE se une a los receptores de alta afinidad (FcεRI) en la superficie de los mastocitos y basófilos, quedando estos sensibilizados (Galli & Tsai, 2012; Valenta *et al.*, 2018).

Durante una exposición posterior al mismo alérgeno ocurre la fase efectora, en la cual el alérgeno se une a las moléculas de IgE fijadas en los mastocitos, provocando su activación y desgranulación. Esto conduce a la liberación de mediadores preformados como histamina, triptasa y heparina, así como de mediadores lipídicos (prostaglandinas y leucotrienos) y citocinas proinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y TNF- α), generando vasodilatación, prurito, edema y eritema característicos de la inflamación cutánea alérgica (Galli & Tsai, 2012; Liu *et al.*, 2011; Kawakami *et al.*, 2009). Además, esta respuesta temprana se amplifica por el reclutamiento de eosinófilos, linfocitos Th2 y células dendríticas, perpetuando la inflamación crónica observada en la DA extrínseca (Fan *et al.*, 2025).

En particular el modelo de esta investigación corresponde precisamente al fenotipo extrínseco de DA, caracterizado por altos niveles séricos de IgE total y sensibilización alérgica, lo que lo asocia directamente con los mecanismos de hipersensibilidad tipo I. Este fenotipo refleja una disfunción de la barrera epidérmica que facilita la penetración de alérgenos y microorganismos, activando una cascada inmunológica dominada por citocinas Th2. La comprensión de este tipo de respuesta no solo es esencial para el entendimiento fisiopatológico de la enfermedad, sino también para el diseño de estrategias terapéuticas más específicas dirigidas a modular la producción de IgE, bloquear la señalización de IL-4/IL-13 o restaurar la función barrera de la piel. A continuación, se explica la patogenia de la DA.

1.4.2 Patogenia de la DA

La patogenia de la DA (figura 1) resulta de la interacción entre factores genéticos, ambientales, inmunológicos y microbianos. La mutación en el gen FLG, proteína esencial en la formación de la barrera epidérmica, se reconoce como uno de los principales factores de riesgo, ya que predispone a mayor permeabilidad cutánea y sensibilización a alérgenos (Sandilands *et al.*, 2020). Además, la activación epitelial por alérgenos, irritantes o infecciones induce la producción de citocinas como linfopoyetina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33, que promueven respuestas inmunes tipo 2 mediante la activación de células dendríticas, células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) y linfocitos Th2 (Brunner *et al.*, 2022; Guttman-Yassky & Krueger, 2021).

En la fase aguda de la DA predominan respuestas mediadas por linfocitos Th2 y Th22, con secreción de IL-4, IL-5, IL-13, IL-31 e IL-22, responsables del reclutamiento de eosinófilos, aumento

de IgE sérica, prurito y daño epitelial (Bieber, 2020; Puar *et al.*, 2021). En la fase crónica, la infiltración de linfocitos Th1 y la producción de IFN- γ se asocian con hiperplasia epidérmica y fibrosis dérmica (Kikuchi *et al.*, 2022).

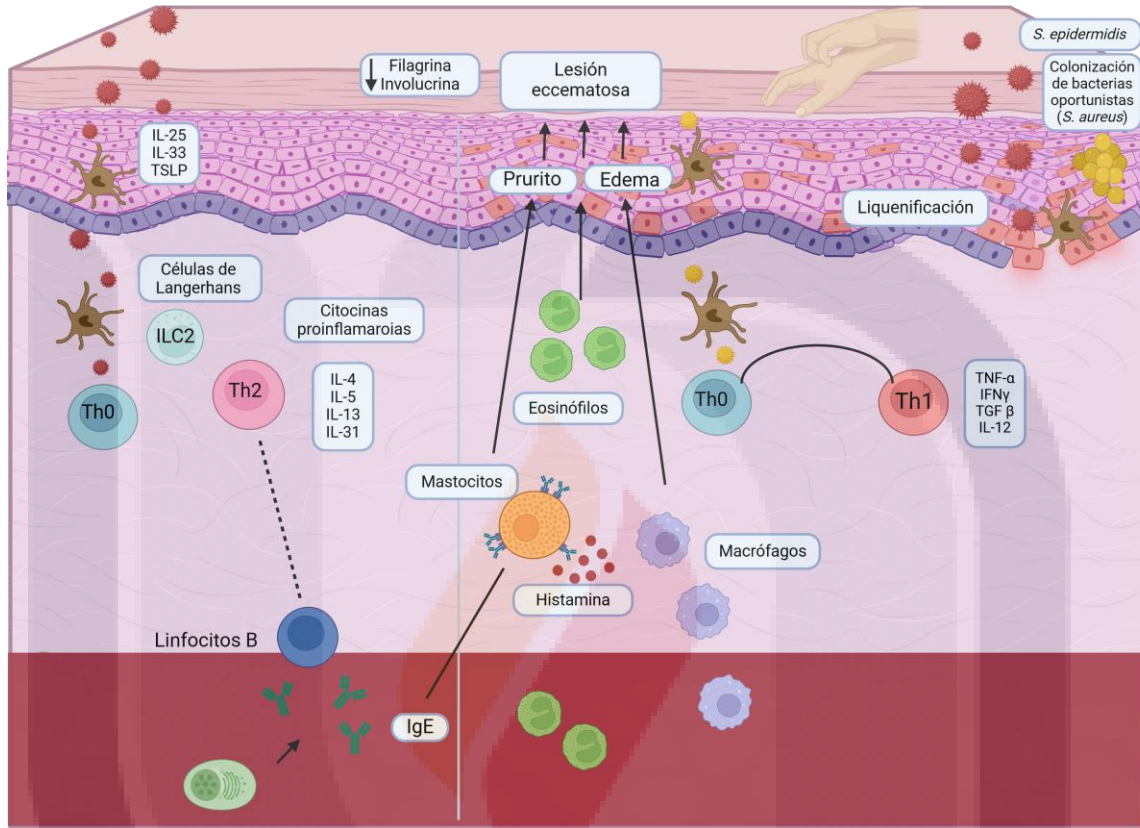


Figura 1. Desarrollo y patogénesis de la dermatitis atópica, donde la disfunción de la barrera epidérmica, mediada por citocinas epiteliales y una respuesta inmunitaria tipo Th2, induce inflamación, prurito y colonización por bacterias oportunistas como *Staphylococcus aureus*, contribuyendo a la cronicidad del proceso inflamatorio cutáneo (Th: linfocitos T cooperadores, ILC: Células Linfoides Innatas, Ig: Inmunoglobulina, IL: Interleucina, TSLP: Linfopoyetina estromal tímica, TNF: Factor de Necrosis Tumoral, IFN: Interferón, TGF: Factor de Crecimiento Transformante.)

Otros subconjuntos celulares también participan en la enfermedad. Las células Th17, aunque menos predominantes que en psoriasis, contribuyen a la defensa antimicrobiana a través de la inducción de péptidos antimicrobianos (β -defensinas) en queratinocitos (Noda *et al.*, 2015). Asimismo, las ILC2 representan una fuente importante de IL-5 e IL-13 en la piel atópica, contribuyendo a la inflamación crónica y al remodelado tisular (Salimi *et al.*, 2023).

A nivel celular, los mastocitos y eosinófilos juegan un papel clave en la perpetuación de la inflamación y el prurito. Los mastocitos liberan histamina, triptasa y citocinas proinflamatorias,

mientras que los eosinófilos producen mediadores que amplifican la respuesta tipo 2 e incluso pueden actuar como células presentadoras de antígenos (Ong *et al.*, 2019; Simon *et al.*, 2020).

En conjunto, la DA refleja un desequilibrio inmunológico multifactorial, donde la interacción entre la disfunción epitelial, la respuesta inmune tipo 2 exacerbada y la microbiota cutánea alterada (en especial por el sobrecrecimiento de *S. aureus*) favorecen la inflamación crónica, la susceptibilidad a infecciones y la recurrencia de brotes (Paller *et al.*, 2023).

El desequilibrio inmunológico característico de la DA extrínseca, dominado por la hiperactivación de la respuesta Th2 y la sobreproducción de IgE, no se limita únicamente al entorno cutáneo, sino que refleja una desregulación sistémica del eje inmuno-microbiano que involucra al intestino como órgano inmunorregulador fundamental. Diversos estudios han demostrado que la microbiota intestinal desempeña un papel esencial en la maduración del sistema inmunitario y en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, por lo que un estado de disbiosis intestinal definido como un desequilibrio en la composición y función de las comunidades microbianas intestinales puede favorecer la polarización hacia una respuesta Th2 exacerbada y contribuir al desarrollo o agravamiento de enfermedades alérgicas como la DA (Fujimura & Lynch, 2015; Pascal *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018). En este sentido, la disminución de bacterias comensales con funciones inmunomoduladoras, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y el incremento de microorganismos proinflamatorios como *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidota* y *Pseudomonadota*, alteran la producción de metabolitos beneficiosos como los ácidos grasos de cadena corta (AGCCs), comprometiendo la integridad epitelial y favoreciendo una respuesta inflamatoria sistémica que se refleja en la piel a través del llamado eje intestino-piel (Kamada *et al.*, 2013). De esta manera, la DA no puede entenderse únicamente como una enfermedad cutánea, sino como una manifestación periférica de un desequilibrio inmunometabólico de origen intestinal, donde la disbiosis actúa como un modulador clave de la inflamación y la sensibilidad inmunológica.

1.5 Disbiosis intestinal en la DA

La microbiota intestinal está compuesta por bacterias, virus, hongos y arqueas que habitan en el intestino humano y desempeñan funciones clave en la digestión, síntesis de vitaminas,

metabolismo de biomoléculas y en la modulación de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo (Petersen *et al.*, 2019; Lee & Lee, 2014; Selber-Hnatiw *et al.*, 2017). Su establecimiento inicia desde el nacimiento y alcanza una composición estable hacia los 3-5 años de vida, momento en el que puede llegar a incluir 50 filos bacterianos y entre 100 y 1000 especies bacterianas diferentes, con predominio entre 150 y 170 especies (Adak & Khan, 2018). Factores como el tipo de parto, la lactancia, la genética y la dieta influyen en esta colonización inicial, mientras que infecciones, antibióticos o cambios en el estilo de vida pueden alterar su equilibrio en la vida adulta (Rodríguez *et al.*, 2015).

La disbiosis intestinal, entendida como una alteración en la diversidad, composición y función de la microbiota, se ha asociado con diversas patologías como enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, diabetes, asma, alergias, cáncer y enfermedades dermatológicas como la DA, psoriasis y alopecia areata (Lloyd-Price *et al.*, 2016; Opazo *et al.*, 2018). En la DA, la disbiosis intestinal puede modificar la respuesta inmune cutánea, promoviendo la activación de células Th2 y la liberación de citocinas inflamatorias relacionadas con la aparición de los síntomas clínicos (Rodarte-Acosta & Morales-Sánchez, 2021).

Entre los factores que predisponen a una disbiosis, se encuentran el nacimiento por cesárea, el uso de fórmulas lácteas, los antibióticos tempranos y dietas altas en carbohidratos refinados. Estos cambios reducen la producción AGCCs, metabolitos fundamentales para la inducción de células Treg e IL-10, lo que incrementa la inflamación intestinal y la permeabilidad epitelial (Biedermann *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2018). La pérdida de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Coprococcus eutactus* favorece respuestas Th2 exacerbadas, reduciendo la capacidad de la piel para tolerar alérgenos (Park *et al.*, 2020).

En adultos con DA se han observado alteraciones en la composición de la microbiota intestinal, caracterizadas principalmente por un aumento en bacterias pertenecientes a los órdenes *Bacteroidales*, la familia *Enterobacteriaceae* y el género *Clostridium* (especialmente *C. perfringens*), las cuales se asocian con procesos inflamatorios y disbiosis. En contraste, los individuos sanos presentan una mayor proporción de especies productoras de AGCCs y

poliaminas, metabolitos que contribuyen a mantener la integridad de la barrera intestinal y la homeostasis inmunológica. Además, se ha reportado que el consumo de probióticos de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, así como los trasplantes de microbiota fecal, pueden modificar favorablemente la composición intestinal y mejorar el control clínico de la enfermedad (Diéz-Madueño *et al.*, 2024)

Diversos estudios han evidenciado que los niños con DA presentan alteraciones características en la composición de su microbiota intestinal. Se han identificado patrones comunes en los principales filos y géneros bacterianos. A nivel de filos, los niños con DA suelen mostrar un aumento en Pseudomonadota y una disminución en Actinomycetota especialmente del género *Bifidobacterium* así como de algunos miembros de Bacillota, en comparación con los niños sanos. En cuanto al nivel de género, los estudios reportan una mayor abundancia de *Bacteroides*, *Parabacteroides* y *Faecalibacterium* en niños con DA, mientras que los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Coprococcus* y *Blautia* aparecen reducidos, lo que refleja una menor presencia de bacterias productoras de AGCCs y con potencial inmunomodulador (Petersen *et al.*, 2019; Reddel *et al.*, 2019).

Intervenciones con probióticos y prebióticos han mostrado resultados prometedores. El uso de *Bifidobacterium longum* y galactooligosacáridos (GOS) incrementa la expresión de proteínas de barrera cutánea como filagrina y loricrina, reduciendo la inflamación y la pérdida transepidérmica de agua en modelos murinos (Kim *et al.*, 2022). De manera similar, la administración de 3'-Sialyllactosa (3'-SL) promovió la expansión de *Bifidobacterium* y la actividad de células Treg, disminuyendo los niveles séricos de IgE y la infiltración de mastocitos (Kang *et al.*, 2020). Otros estudios destacan que los prebióticos pueden modular la proporción de Bacillota/Pseudomonadota y favorecer un equilibrio inmunológico beneficioso en la DA (Kim *et al.*, 2020).

1.6 Tratamientos para la dermatitis atópica

En el tratamiento de la DA, existen varias alternativas que actúan sobre distintos mecanismos de la enfermedad y dependen de la gravedad del cuadro. Aunque la mayoría de los pacientes

responde a tratamientos tópicos, cerca del 10% requiere múltiples estrategias para lograr un control adecuado de la enfermedad (Montes-Torres *et al.*, 2015). Ninguno de los tratamientos disponibles cura la enfermedad, pero permiten controlar los síntomas y mejorar la calidad de vida.

Entre los tratamientos más empleados se encuentran:

- Humectantes: constituyen la primera línea de tratamiento en casos leves, mejorando la función de barrera cutánea y reduciendo la pérdida de agua transepidérmica. Su uso regular ha demostrado eficacia significativa en la reducción de brotes (Cork *et al.*, 2003; Gutman *et al.*, 2005).
- Corticosteroides tópicos: se emplean cuando los emolientes no son suficientes para controlar la inflamación y el prurito. Son altamente efectivos, aunque su uso prolongado puede provocar efectos secundarios como atrofia cutánea (Berth-Jones *et al.*, n.d.).
- Inhibidores tópicos de la calcineurina: como tacrolimus y pimecrolimus, bloquean la activación de células T, dendríticas y mastocitos sin inducir atrofia cutánea, lo que los hace especialmente útiles en áreas sensibles como la cara y párpados (Frankel & Qureshi, 2012; Wollenberg *et al.*, 2008).
- Inhibidores de la fosfodiesterasa 4, como el Crisaborole, ha demostrado eficacia en formas leves a moderadas de DA, al elevar los niveles de AMPc intracelular e inhibir vías de señalización inflamatoria, con mejoras en prurito e inflamación tras su aplicación dos veces al día en adultos y niños (Paton., 2019).
- Antihistamínicos: aunque son ampliamente prescritos para el control del prurito y la inflamación, la evidencia sobre su eficacia regulando otros parámetros inmunológicos es limitada (Klein & Clark, 1999).
- Inmunosupresores sistémico: en casos moderados a graves, se emplean fármacos como ciclosporina, metotrexato, azatioprina y micofenolato mofetilo, reservados para pacientes que no responden a tratamientos tópicos (Simon & Biber, 2014; Schmitt *et al.*, 2007).

Por otro lado, la fototerapia ultravioleta (principalmente UV B de banda estrecha y UVA1) es una estrategia establecida para formas moderadas a graves de DA, con efecto inmunomodulador,

reducción de células T cutáneas y alivio del prurito, aunque la evidencia muestra variabilidad y riesgo asociado que requiere seguimiento controlado (Pérez-Ferriols *et al.*, 2015). Finalmente, los inmunomoduladores biológicos como Dupilumab, anticuerpo que bloquea el receptor de IL-4 e IL-13, representan una terapia de alto nivel para DA moderada-grave: los estudios muestran mejoras significativas en la severidad, el área de afectación, el prurito y la calidad de vida, al modular directamente la respuesta Th2 que domina en la DA extrínseca (Eshtiaghti & Gooderham, 2018). Estas opciones terapéuticas amplían la diversidad de tratamientos más allá de los corticoides y los inhibidores de calcineurina, y permiten una intervención más específica del proceso fisiopatológico de la DA. Sin embargo, recientemente, ha incrementado el interés en explorar intervenciones con prebióticos, y modificaciones dietéticas como terapias adyuvantes. (Lee *et al.*, 2018; Nole *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2021).

1.7 Prebióticos

Definición

El concepto de prebióticos fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995, quienes los definieron como sustratos no digeribles capaces de estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de bacterias beneficiosas en el intestino humano, generando un efecto positivo en la salud del huésped (Gibson & Roberfroid, 1995). Actualmente, se entiende a los prebióticos como compuestos utilizados selectivamente por microorganismos, cuya fermentación produce metabolitos como los AGCCs, que ejercen efectos benéficos en la salud, tanto locales y sistémicos al modular la respuesta inmunitaria, la función de barrera y la homeostasis metabólica (Gibson *et al.*, 2017; Davani-Davari *et al.*, 2019).

A diferencia de otras fibras dietéticas (pectinas, celulosa, xilanos), los prebióticos promueven el crecimiento específico de cepas probióticas y microorganismos residentes beneficiosos, como bifidobacterias y lactobacilos (Gibson *et al.*, 2017; Goubeyre *et al.*, 2011). De este modo, se convierten en nutrientes clave para la microbiota intestinal, la cual participa en procesos metabólicos, inmunológicos y de protección de la barrera epitelial (Rezende *et al.*, 2021).

1.7.1 Efectos benéficos de los prebióticos

El consumo de prebióticos se asocia con múltiples efectos positivos:

Incremento en la producción de AGCCs como acetato, propionato y butirato, con reconocida acción antiinflamatoria (Maslowski *et al.*, 2009).

Reducción de productos tóxicos derivados de la fermentación proteica (de Preter *et al.*, 2004).

Modulación de la respuesta inmune, favoreciendo el equilibrio Th1/Th2, el incremento de linfocitos Treg y el aumento de la secreción de IgA en la mucosa intestinal (Kang *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2022).

Mejoras en la absorción de minerales como calcio y magnesio, así como reducción del riesgo de cáncer colorrectal (Al-Sheraji *et al.*, 2013).

Además de sus beneficios fisiológicos, los prebióticos tienen un interés tecnológico creciente, ya que su incorporación en alimentos funcionales mejora características sensoriales como el sabor y la textura, además de favorecer la estabilidad de emulsiones y espumas en productos lácteos y panificación (Al-Sheraji *et al.*, 2013).

1.7.2 Clasificación

La mayoría de los prebióticos pertenecen al grupo de los carbohidratos oligosacáridos (Davani-Davari *et al.*, 2019). Entre los más estudiados se encuentran:

- Fructanos: comprenden la inulina y los fructooligosacáridos (FOS). Aquellos con grado de polimerización (GP) >10 se clasifican como inulina, mientras que los de GP <10 se consideran FOS. La longitud de cadena determina qué bacterias pueden utilizarlos, siendo las bifidobacterias las principales consumidoras (Scott *et al.*, 2014).
- Galactooligosacáridos (GOS): derivados de la lactosa, pueden estimular bifidobacterias y lactobacilos, dependiendo de su estructura (Macfarlane *et al.*, 2008; Gibson *et al.*, 2010).

- Oligosacáridos derivados de almidón y glucosa: como el almidón resistente (RS), reconocido por su capacidad de generar butirato, y la polidextrosa, un glucano ramificado con efectos prebióticos (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011; Costabile *et al.*, 2012).

- Oligosacáridos pécticos (POS): derivados de la pectina, que han mostrado efectos beneficiosos en la microbiota (Yoo *et al.*, 2012).

- Prebióticos no carbohidratos: como los flavonoides del cacao o el glicomacropéptido del suero de quesería, que pueden modular LAB (Tzounis *et al.*, 2011; Rackerby *et al.*, 2024).

1.8 Inulina de agave azul (IAA): estructura y actividades prebiótica e inmunomoduladora

La inulina de agave es una mezcla de oligosacáridos naturales conocidos como fructanos, cuya unidad repetitiva es la fructosa. Estos fructanos están formados por unidades de fructofuranosilo unidas mediante enlaces β a una molécula de sacarosa, y se clasifican en cinco tipos principales (Figura 2): a) inulina, con cadenas lineales de fructosas unidas por enlaces $\beta(2-1)$ y ancladas al residuo fructosilo de la sacarosa; b) neo-inulina o inulina neo-serie, con dos cadenas lineales de fructosa unidas por enlaces $\beta(2-1)$, una al residuo fructosilo y otra al glucosilo de la sacarosa; c) levanos, que presentan cadenas lineales de fructosas unidas por enlaces $\beta(2-6)$ al residuo fructosilo; d) neo-levanos, que son fructanos ramificados con cadenas $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$, cuya ramificación puede ocurrir en cualquier residuo fructosilo (López *et al.*, 2003).

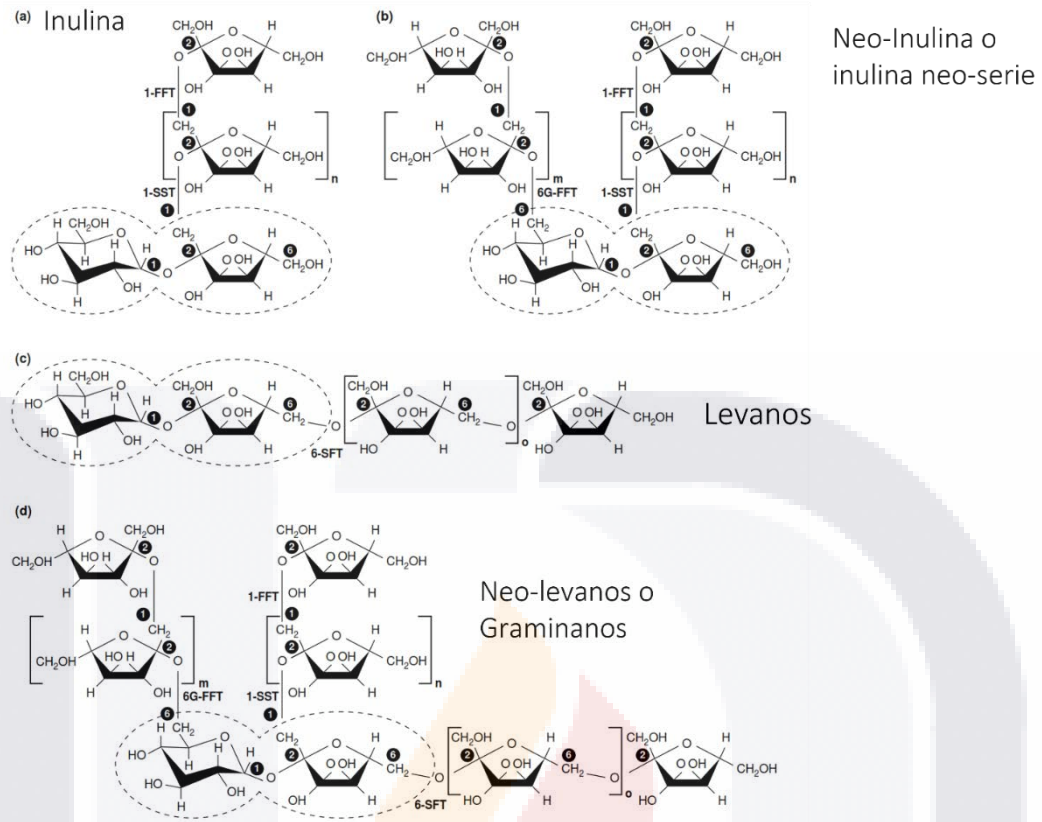


Figura 2. Principales fructanos, en base a el tipo uniones de las cadenas lineales de fructosa y el residuo al que se anclan en la sacarosa: a) Inulina, b) Neo-inulina, c) Levanos y d) neolevanos Fructanos propuestos para las especies de Agave (Ritsem & Smeekens, 2003)

El DP, es decir, la longitud de la cadena y su complejidad, es decir su ramificación, determina la variabilidad de estas moléculas. En el caso del agave azul, sus fructanos presentan un DP medio mayor a 10, razón por la cual se denominan inulina de agave. Dentro de esta mezcla, los fructanos de bajo peso molecular (DP 3-5) representan cerca del 9%, mientras que los monosacáridos y disacáridos no superan el 10% (Toriz *et al.*, 2007). El rango de DP de la inulina de agave es comparable con otras inulinas de consumo humano, como la obtenida de la raíz de achicoria, ampliamente estudiada y utilizada por sus beneficios nutricionales y tecnológicos, con un DP promedio de 10-20 y un rango de 2 a 60 (Roberfroid & Delzenne, 1998).

Las subunidades de trisacárido en los fructanos del agave son 1-kestosa, similar a la de la raíz de achicoria, y neokestosa. Los fructanos que incluyen neokestosa corresponden a los de tipo neo-inulina y neo-levano (Figura 3), presentes también en avena, espárragos y *Lolium* sp., además del agave (Ende, 2013; Pavis *et al.*, 2001).

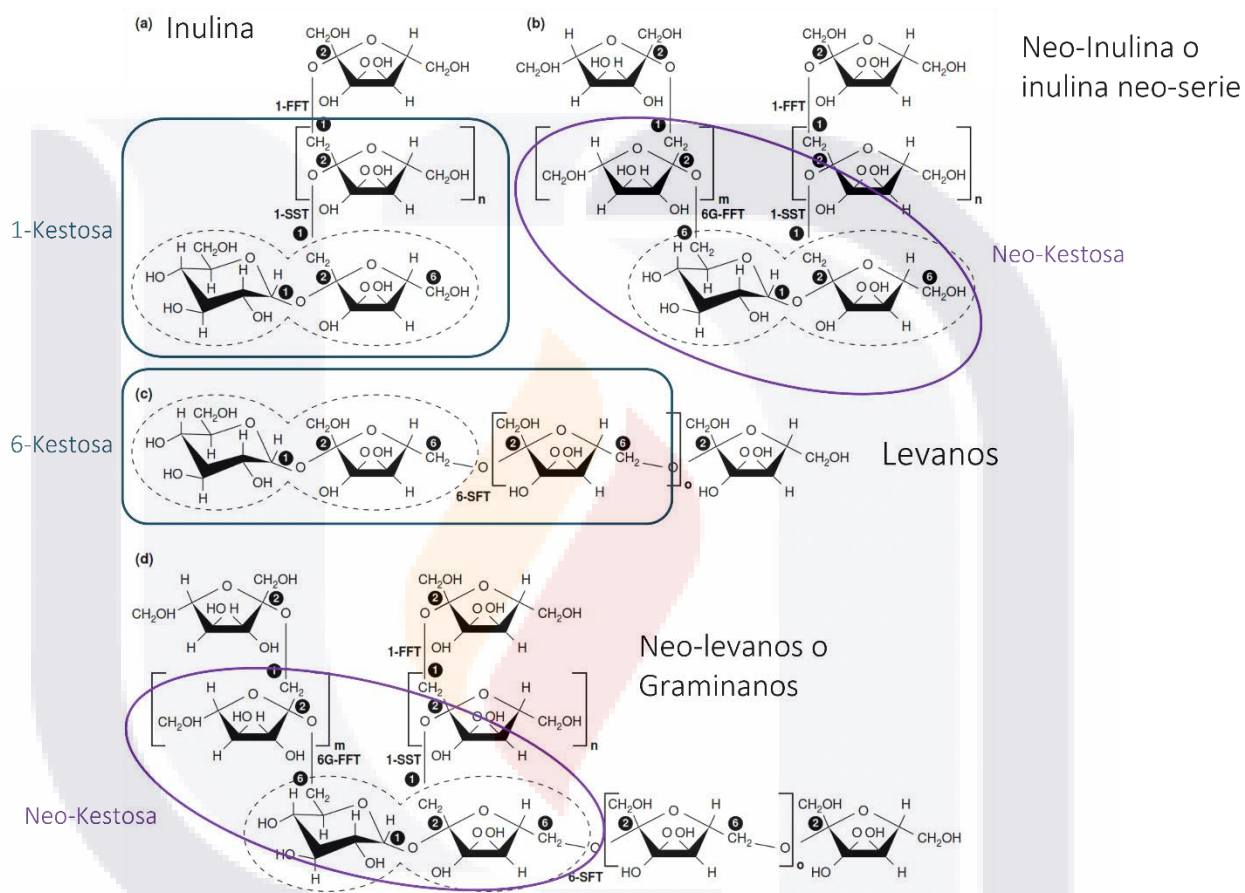


Figura 3. Identificación de los trisacáridos kestosa y neokestosa en los diferentes tipos de fructanos (Modificada de (Ritsema & Smeekens, 2003))

En cuanto a su origen botánico, las dicotiledóneas suelen contener unidades lineales $\beta(2-1)$ (inulina), mientras que las monocotiledóneas, como las de la familia Agavaceae, presentan fructanos más complejos y ramificados (Kaur & Gupta, 2002; Ritsema & Smeekens, 2003; Vijn & Smeekens, 1999). Estas diferencias estructurales se asocian con variaciones en la intensidad de sus actividades biológicas. Tanto la inulina de achicoria (IAC) como la de agave azul ejercen efectos prebióticos frente a bacterias del género *Lactobacillus*, aunque la magnitud del efecto depende del tipo de inulina y de la especie bacteriana (Ayala Monter *et al.*, 2018). En el caso del

agave azul, su mayor actividad prebiótica se relaciona con la facilidad de degradación de sus cadenas ramificadas. Además, el DP influye en su aprovechamiento, siendo más eficaces aquellas con menor DP (Ayala Monter *et al.*, 2018). Este parámetro también varía según factores como la especie vegetal, la región de cultivo, la composición del suelo, el régimen de riego y el tiempo de cosecha (Arrizon *et al.*, 2010; Mancilla-Margalli & López, 2006; Pinal *et al.*, 2009).

En el *Agave tequilana* Weber var. azul, el DP promedio de sus fructanos varía de 6 a 23, con cadenas lineales y ramificadas de fructosa enlazadas por uniones $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$, y con unidades de glucosa en posiciones terminales o internas (Mellado-Mojica & López, 2012). Su estructura molecular, analizada mediante cromatografía de gases-masas (GC-MS), resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas con detección por tiempo de vuelo y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS), confirma que se trata de mezclas estructuralmente diversas de fructanos lineales y ramificados, denominados agavinas y graminanos (Figura 4) (López *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli & López, 2006; Mellado-Mojica & López, 2012).

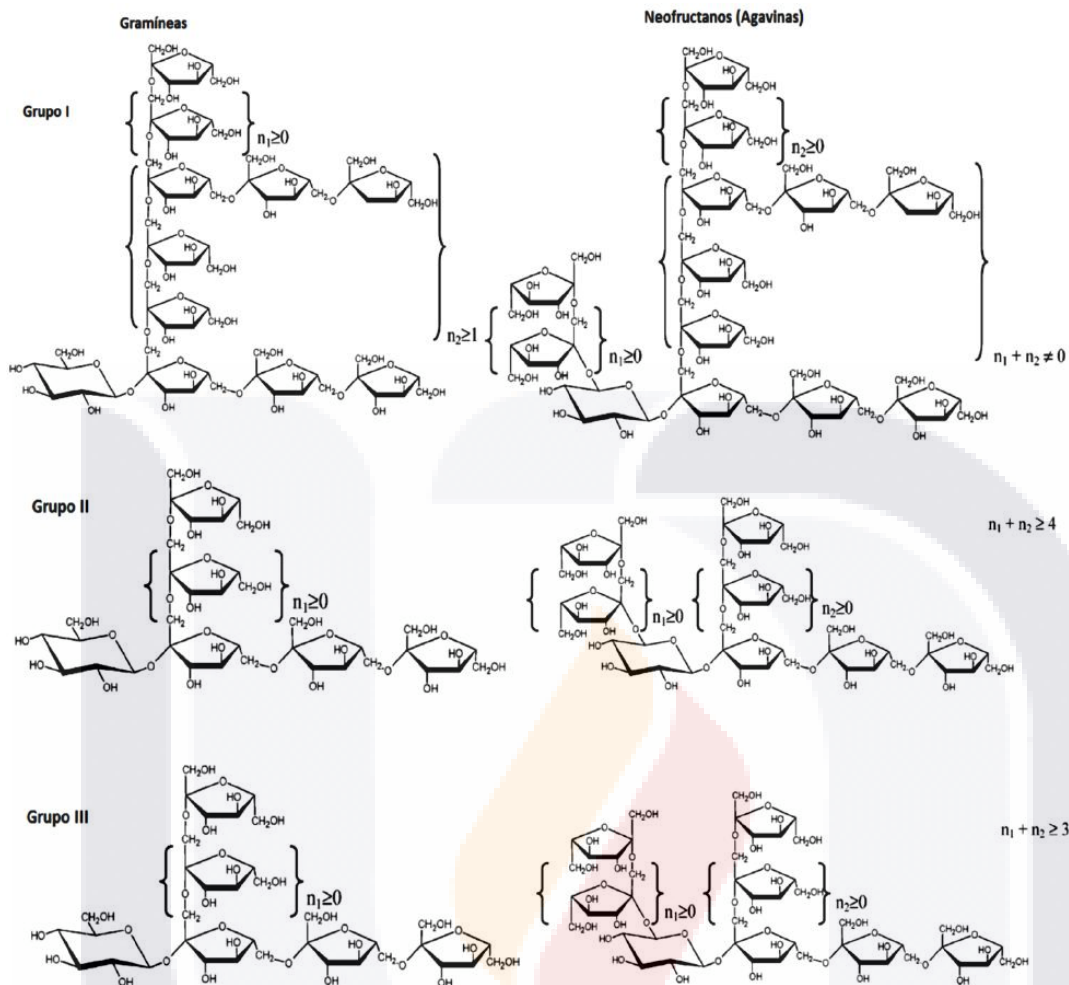


Figura 4. Fructanos propuestos para las especies de Agave (Mancilla-Margalli & López, 2006)

Desde el punto de vista funcional, se ha observado que las inulinas de grado molecular favorecen el crecimiento de especies de *Lactobacillus* debido a su mayor pureza, mientras que las de grado reactivo, al contener otros azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, permiten una mayor producción de biomasa bacteriana (James *et al.*, 2017; Kunová *et al.*, 2012). En general, los fructanos de tipo inulina estimulan de manera selectiva el crecimiento de bifidobacterias tanto *in vitro* como *in vivo* (Cummins *et al.*, 2001; Gibson *et al.*, 1995; Roberfroid *et al.*, 2009). Esto ocurre porque no se digieren en el tracto gastrointestinal —dado que las enzimas humanas son específicas para uniones alfa-glucosídicas— y llegan intactos al colon, donde son fermentados por bacterias endógenas productoras de AGCCs como acetato,

propionato, butirato (Gibson & Roberfroid, 1995; Roberfroid, 1993, 2005; Hidaka *et al.*, 1986; Kruse *et al.*, 1999).

Diversos estudios han confirmado el efecto prebiótico de los fructanos de agave. López y Urías-Silvas (2007), al evaluar el crecimiento bacteriano de *Bifidobacterium breve* y *Lactocaseibacillus casei* con fructanos de distintas especies de Agave y Dasyliion, observaron que dichos compuestos favorecen la fermentación, el descenso del pH y la producción de AGCCs (Holscher, 2017; Norio *et al.*, 2007). De forma complementaria, Ayala Monter *et al.* (2018) demostraron que la inulina de agave posee mayor efecto prebiótico que la IAc en el crecimiento de *Ligilactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*. Otros estudios confirman resultados similares en fructanos de distintas especies vegetales, como *Codonopsis pilosula* (Fu *et al.*, 2018).

En investigaciones clínicas, el consumo de inulina de agave en adultos sanos incrementó las poblaciones de actinomycetota y bifidobacterias fecales, además de modificar la composición y actividad de la microbiota intestinal (Holscher *et al.*, 2015). En paralelo, se han documentado beneficios sobre la salud en diversas patologías asociadas con disbiosis y estados inflamatorios, tales como obesidad (Márquez-Aguirre *et al.*, 2013; Padilla-Camberos *et al.*, 2018; Urías-Silvas *et al.*, 2008), cáncer de colon (Rivera-Huerta *et al.*, 2017), daño oxidativo intestinal inducido por lipopolisacáridos (Pasqualetti *et al.*, 2014), e incluso efectos antihipertensivos, antiinflamatorios y antioxidantes en modelos murinos (Herrera-Ruiz *et al.*, 2022).

Aunque los estudios en mamíferos sobre la IAA y la respuesta inmune son escasos, se ha demostrado en peces que una dieta suplementada con *Lactobacillus sakei* e inulina de agave potencia la respuesta inmune innata y humoral. Además, inulinas de otras fuentes vegetales muestran efectos antiinflamatorios e inmunorreguladores tanto locales (intestinales) como sistémicos en modelos animales y humanos (Seifert & Watzl, 2007). Más recientemente, se ha observado que los productos de fermentación de la inulina de achicoria modulan la respuesta de células dendríticas y linfocitos T *in vitro*, incluso bajo condiciones proinflamatorias de tipo Th2 (Akkerman *et al.*, 2021).

1.9 Actividad anti-alérgica de algunos fructanos

Diversos fructanos han mostrado efectos anti-alérgicos en modelos experimentales y en ensayos clínicos, lo que sustenta el interés por su uso como compuestos preventivos o terapéuticos frente a enfermedades atópicas. En humanos, una mezcla de oligosacáridos prebióticos (GOS/FOS) redujo la incidencia de DA en lactantes de alto riesgo durante los primeros meses de vida, evidenciando que la manipulación temprana de la microbiota intestinal puede modular la aparición de manifestaciones alérgicas (Moro *et al.*, 2006). Estudios preclínicos recientes confirman y amplían estos hallazgos: la administración oral combinada de un fructano de cadena corta (1-kestosa) y uno de cadena larga (inulina) redujo la gravedad de un modelo murino de alergia alimentaria, suprimió aumentos de IgE específicos y moduló la expresión de citocinas Th2 (por ejemplo IL-4), además de alterar favorablemente la composición microbiana y aumentar AGCCs (Takahashi *et al.*, 2023). Revisiones y metaanálisis sobre mecanismos de los prebióticos muestran que fructanos e hidrolizados afines inducen respuestas más tolerogénicas (mayor IL-10, Treg, galectina-9) y reducen respuestas Th2, lo que explica en parte los efectos protectores observados en atopia (Brosseau *et al.*, 2019; Roberfroid, 2007). Por otro lado, aunque la inulina de achicoria es la más estudiada en humanos y modelos animales, y recientemente ha mostrado actividad inmunomoduladora en modelos experimentales de DA (Kim *et al.* 2020; Kang *et al.*, 2023), no existe, hasta la fecha, evidencia publicada que evalúe directamente la inulina extraída de *Agave tequilana* Weber var. azul en modelos de DA humana o animal. Esto es relevante porque la inulina de agave presenta diferencias estructurales (grado de polimerización y ramificación) que podrían modificar su fermentación y sus efectos inmunológicos, y además el agave tiene una gran importancia agroeconómica en México, siendo fuente local accesible de fructanos con potencial valor nutracéutico (Álvarez-Chávez *et al.*, 2021; Holscher *et al.*, 2015). En conjunto, la evidencia sugiere que los fructanos pueden ejercer efectos anti-alérgicos mediando la modulación del eje microbiota-inmune; sin embargo, existe una brecha de conocimiento específica sobre la actividad anti-alérgica de la inulina de agave azul, lo que justifica investigar su potencial en modelos experimentales de DA.

2. Justificación

Debido a que ha sido demostrado el efecto prebiótico y la actividad immuno-moduladora de la IAA, y a que la DA es una patología alérgica que se asocia con disbiosis intestinal y una respuesta inmune alterada, la administración vía oral de la IAA podría tener un efecto favorable sobre la DA experimental

3. Hipótesis

La IAA tiene un efecto regulador sobre la respuesta inmune alérgica y protector del daño en la barrera cutánea en la DA experimental.

4. Objetivo general

Estudiar el efecto de la administración vía oral de la IAA en un modelo preclínico de DA.

5. Objetivos particulares

1. Analizar diferentes inulinas comerciales de agave azul *in vitro* para seleccionar aquella con mayor capacidad prebiótica.

En animales con DA y tratados con IAA, evaluar:

2. Los signos clínicos asociados a la patología

3. Los niveles de IgE sistémica y la infiltración de células inflamatorias en tejido lesionado

4. Los perfiles de citocinas y las poblaciones linfocitarias predominantes en tejido lesional

5. La integridad de la barrera cutánea

6. La microbiota cutánea y fecal

6. Metodología

6.1 Inulinas de agave azul

En este estudio se utilizaron 4 IAA de diferentes marcas comerciales y obtenidas en diferentes regiones geográficas de México: IAA1 y IAA2 de Zapopan, Jalisco; IAA3 de Guadalajara, Jalisco; e IAA4 de Monclova, Coahuila. En la tabla 1 se muestra el porcentaje de los hidratos de carbono y fibras que estaban presentes en las inulinas utilizadas en este trabajo, en base a la información nutrimental descrita en las etiquetas comerciales. Ninguna de las inulinas contenía proteínas, grasas o sodio. Además, en algunos ensayos se utilizó la inulina de achicoria (Iac) (Sigma, San Luis, Misuri, EUA).

Tabla 1. Composición porcentual de las inulinas.

Nomenclatura Marca comercial	IAA1 Enature	IAA2 NBF	IAA3 Preventy	IAA4 Vizana
Hidratos de carbono	97%	97%	100%	95%
De los cuales:				
Fibra	89%	89%	100%	89%
Azúcar	8%	8%	0g	6%
Azúcares añadidos	0%	0%	NE	0%
Potasio	NE	NE	100mg	NE
Calcio	11% de VNR	NE	NE	NE

NE = No Especifica; VNR = Valor Nutricio de Referencias

6.2 Cepas bacterianas

Se realizaron estudios *in vitro* de crecimiento bacteriano, evaluando la actividad prebiótica de las IAA sobre cepas de *Lactiseibacillus* y *Lactiplantibacillus*: *Lactiseibacillus rhamnosus* (Hansen) Zeng *et al.* (ATCC 7469) y *Lactiplantibacillus plantarum* LP-115 (ATCC SD5209), cepas

de LAB con propiedades probióticas bien documentadas *in vivo* e *in vitro* (Wang *et al.*, 2024; Shen *et al.*, 2023) y *Lactocaseibacillus rhamnosus* LM07 y *Lactiplantibacillus plantarum* LM17, dos cepas LAB aisladas de la fermentación del agave (mezcal), a las que se le han descrito propiedades antiinflamatorias en modelos experimentales (Hernández-Delgado *et al.*, 2021). También se incluyó en el estudio una tercera cepa bacteriana aislada del agave: *Lactiplantibacillus plantarum* LBH 1075 (Torres-Maravilla *et al.* 2016).

6.3 Cultivos bacterianos

Las bacterias *Lactoplantibacillus* y *Lactocaseibacillus* se cultivaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C. Se puso en crecimiento una alícuota de la bacteria en 30mL de medio MRS (Man-Rogosa and Sharpe; BD Difco™, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EUA) durante 6 horas a 37°C. Posteriormente, se tomó 1mL de este medio ajustado a una densidad óptica de 0.05 a λ de 600 nm (OD₆₀₀), mediante lectura en un espectrofotómetro UV/VIS, SmartSpect Plus Spectrophotometer (Bio-Rad Hércules, Cal, EUA) y se llevó a 40mL de medio MRS. Las condiciones de anaerobiosis se llevaron a cabo por desplazamiento de oxígeno con gas nitrógeno en frascos tapados herméticamente.

Para desarrollar el ensayo se trabajó con medio MRS comercial marca Difco (grupo Glu C), y se preparó medio MRS sustituyendo la glucosa por cada una de las inulinas anteriormente mencionados (grupos IAA1, IAA2, IAA3, IAA4, Iac) (Tabla 2). Se utilizó un medio formulado con glucosa como control positivo (grupo Glu) y un medio sin glucosa como control negativo (Glu -).

g/L ⁻¹	MRS comercial Difco™	MRS Formulado	MRS formulado con inulinas
Proteasa peptona No. 3	10	10	10
Extracto de carne	10	10	10
Extracto de lavadura	5	5	5
Glucosa	20	20	--
Inulina	--	--	20
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	2	2	2

Acetato de sodio (C ₂ H ₃ NaO ₂)	5	5	5
Citrato de amonio (NH ₄) ₃ (C ₆ H ₅ O ₇)	2	2	2
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0.1	0.1	0.1
Sulfato de manganeso (MnSO ₄)	0.05	0.05	0.05
Polisorbato 80	1	1	1
pH	6.5 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.5 ± 0.2

Tabla 2. Composición de los diferentes medios MRS.

6.4 Análisis de crecimiento bacteriano por espectrofotometría

El crecimiento de las bacterias se evaluó mediante lecturas en un espectrofotómetro UV/VIS, SmartSpect Plus Spectrophotometer (Bio-Rad Hércules, Cal, EUA). Para establecer la curva de crecimiento de las cinco bacterias se tomaron lecturas a OD₆₀₀ manualmente cada hora desde las 0 hasta las 20 horas post-inoculación y de esta curva se estableció la fase exponencial de crecimiento de cada cepa bacteriana y los tiempos en los que se harían las lecturas al utilizar las diferentes inulinas. Todos los ensayos se realizaron en triplicado, representando el promedio de las lecturas tomadas cada dos horas por empezando a medir desde la hora 6 hasta la 16 ya que fue la fase exponencial detectada en los ensayos de estandarización (anexo).

Al término de cada ensayo se midió el pH del medio de cultivo usando un potenciómetro Orion 3 star ph benchtop (anexo). El pH del medio de crecimiento de la bacteria sin carbohidratos (MRS sin suplementar) se utilizó como control negativo. Se calculó el cambio de pH de los medios tras 16 horas de crecimiento con la siguiente fórmula: Δ pH = pH inicial – pH final.

Se calculó la tasa de crecimiento (μ , h⁻¹) y el tiempo de generación (t , min) con las siguientes fórmulas

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{T} \quad t = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

N₀ = DO inicial

N = DO final

T = tiempo transcurrido entre N_0 y N

Al término de estos ensayos se hicieron dos más con la misma metodología y características ya mencionadas anteriormente en donde se puso a crecer únicamente a *L. rhamnosus* (Hansen) y *L. plantarum* LP-115 en medio MRS comercial adicionado con la IAA1 en diferentes concentraciones (0.02, 0.2, 2 y 20g/L). En donde también se analizó el crecimiento bacteriano, tasa de crecimiento bacteriano y tiempo de generación.

6.5 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho (80g) de aproximadamente 3 semanas de edad recién destetadas obtenidas del bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Las ratas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22–24°C) e iluminación (ciclo de 12 h) y se alimentaron con Rodent Laboratory Chow 5001 (Purina, Ciudad de México, México) y agua purificada *ad libitum*. Se les administró un tratamiento desparasitante con Febantel 1.5% y Pamoato de Pirantel 1.44% (prantel puppy; PiSA, Guadalajara, Jalisco) a una concentración de 1mL/kg de peso del animal vía oral y posteriormente se dejaron en descanso una semana para el inicio del protocolo experimental. Todos los experimentos se realizaron con estricto apego a las normas éticas establecidas por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de los Animales (Oficio de aprobación: INV 012/2023).

6.6 Protocolo de Inducción de Dermatitis Atópica Experimental

Para las lesiones de tipo DA se generó una reacción cutánea en la oreja de la rata inducida por aplicaciones repetidas de 2,4-dinitroclorobenceno (DNCCB; Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) después de una sensibilización sistémica. Los animales fueron sensibilizados el día 0, con una inyección intramuscular de 10 µg de dinitrofenil-albúmina sérica bovina (DNP-BSA; SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis) preparada en un vehículo de 7.8mg de hidróxido de aluminio (Al (OH)₃; Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA.) disuelto en 1mL de solución salina. Simultáneamente, y como adyuvante, se inyectó por vía subcutánea 0.5mL de vacuna DPT (*Bordetella pertussis* inactivada 4UI, Toxoide

diftérico 30UI, Toxoide tetánico 60UI, DIPERTIX; Biofarma, Bandung, Indonesia). Los días 14, 16, 18, 20, 22 y 36 los animales fueron sensibilizados con una aplicación tópica de 60 μ L de DNCB al 1.5% p/v preparado en un vehículo de acetona-aceite de oliva (A-OO) (4:1) para ambos lados del lóbulo de la oreja derecha de las ratas. Al grupo de control solo se le inyectaron adyuvantes y se le aplicó tópicamente la solución A-OO.

6.7 Diseño experimental

Las ratas se asignaron aleatoriamente a seis grupos diferentes (12 ratas por grupo): control, no sensibilizadas; DA, sensibilizadas con DNCB; IAA0.1, sensibilizadas con DNCB y tratadas con IAA a 0.1g/kg; IAA1, sensibilizadas con DNCB y tratadas con IAA a 1g/kg; IAA5, sensibilizadas con DNCB y tratadas con IAA a 5g/kg. Los tratamientos se administraron vía oral disueltos en agua purificada y al grupo control y DNCB únicamente se le administró agua purificada, utilizando un catéter esofágico, diariamente, una vez al día los días 24 al 36. La IAA utilizada para este ensayo fue la IAA1.

6.8 Peso de los animales

Los animales fueron pesados diariamente en una balanza granataria OHAUS para poder administrar el tratamiento respecto al peso. Los valores obtenidos en los días 0, 7, 14, 22, 28 y 36 se registraron y graficaron para monitorear su evolución y evaluar diferencias derivadas de los tratamientos.

6.9 Evaluación del grosor de las orejas

Se midió tres veces el grosor de las orejas derecha (OD) e izquierda (OI) de cada rata justo a la mitad de ésta, con la ayuda de un vernier digital (POWERFIX), los días 0, 7 y 28 se hizo a un solo tiempo y los días 14, 22 y 36 a las 0, 1, 6 y 24h después de la aplicación de DNCB. El incremento de grosor se calculó mediante la fórmula = grosor OD- grosor OI.

6.10 Evaluación de los eventos de rascado

Las ratas se colocaron en cajas de metacrilato (14cm x 24cm x 26cm; ancho x profundo x alto) posicionando un espejo en la parte de atrás para tener una visión completa de los animales y se grabaron por 10 minutos una vez que los animales se habían recuperado de la anestesia. Se contabilizaron los eventos de rascado, definiéndose como un evento de rascado la serie de 1 o más movimientos de la pata trasera dirigida al sitio de aplicación hasta que se la lame o se coloca nuevamente sobre la superficie de la urna (Nojima & Carstens 2003; Muñoz *et al.*, 2017 CITA). Los eventos de rascado fueron contabilizados por tres investigadores ciegos al grupo al que pertenecía cada animal.

6.11 Obtención de muestras

El día 36 (figura 5), a la hora de la aplicación de DNCB, se sacrificaron aleatoriamente 4 ratas de cada grupo. Se obtuvo 1mL de sangre de la vena caudal para la separación de suero, en donde la sangre extraída se dejó coagular, se separó el coágulo del tubo, se centrifugó 15 min a 1000 xg, se recolectó el suero y se hicieron alícuotas que se mantuvieron a -80 °C hasta su uso para la cuantificación de histamina. Finalmente, la rata se sacrificó por sobredosis de sevoflurano inhalado. Se extirparon las dos orejas desde la base y se extrajeron porciones idénticas de la mitad de las orejas con un sacabocados y se pesaron en una balanza analítica (Precisa, Suiza), para calcular el edema como el incremento del peso de la OD con respecto a la OI, es decir peso OD-OI. Posteriormente, el tejido se procesó para cuantificar histamina.

Ocho ratas de cada grupo se utilizaron para medir el grosor de la oreja (a 0, 1, 6 y 24 horas) y los eventos de rascado. Pasadas las 24h de la última aplicación de DNCB el día 36 y justo después de haber registrado la última medición del grosor de la oreja se tomó muestra de sangre de los animales para cuantificar posteriormente IgE total en suero y se sacrificaron las ratas con sobredosis de sevoflurano inhalado. De 4 ratas aleatorias se obtuvo muestras de contenido fecal para la extracción de DNA y de las otras 4 ratas se extrajeron los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) para la extracción de RNA. De las 12 ratas de cada grupo se

extirpó el bazo de cada animal para obtener su peso y posteriormente descartar el órgano. Se representó peso del bazo/peso del animal (Kim *et al.*, 2020)

Las muestras de oreja fueron destinadas para cuatro técnicas para lo cual de las 8 ratas se seleccionaron aleatoriamente 4 en donde la parte superior de la oreja fue destinada para histología y la parte media junto con la porción que se pesó y la parte inferior para western blot. Para las otras 4 ratas la parte superior en conjunto con una aparte media se destinó a extracción de DNA y la parte media restante en conjunto con la porción que se pesó y la parte inferior se destinó a extracción de RNA (figura 6).

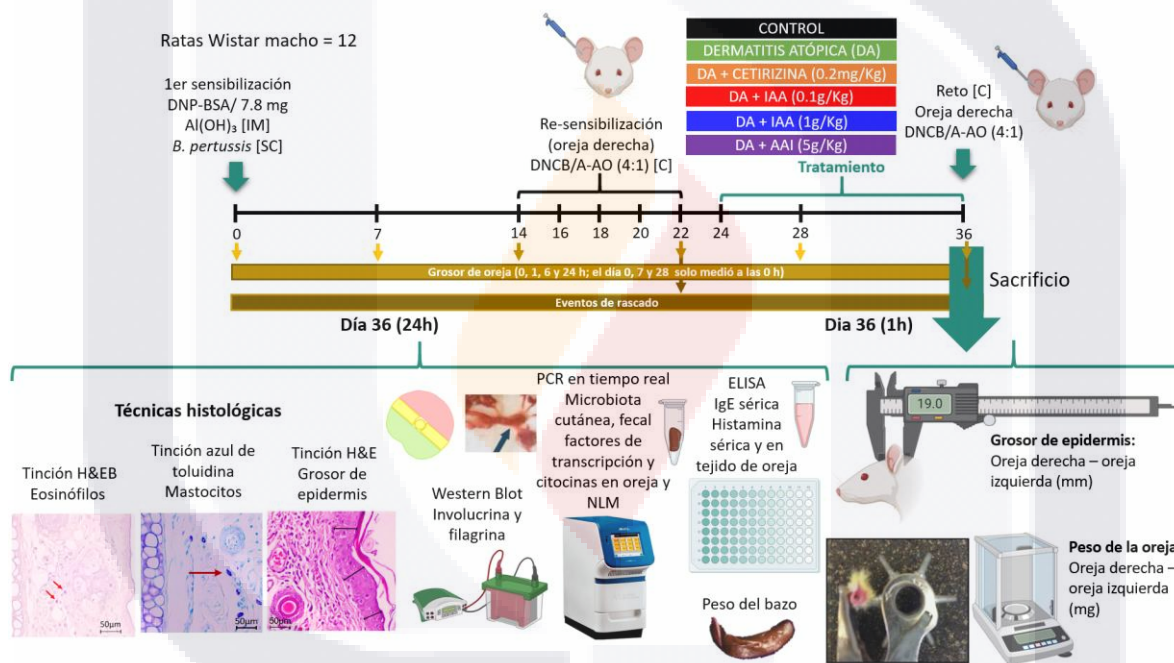


Figura 5. Diagrama esquemático del protocolo de inducción de dermatitis atópica experimental y obtención de muestras (C: Cutánea, SC: Subcutánea, IM: Intramuscular, A-AO: Acetona-Aceite de Oliva; NLM: nódulos linfáticos mesentéricos, H&E: Hematoxilina y Eosina, H&EB: Hematoxilina y eritrosina B)

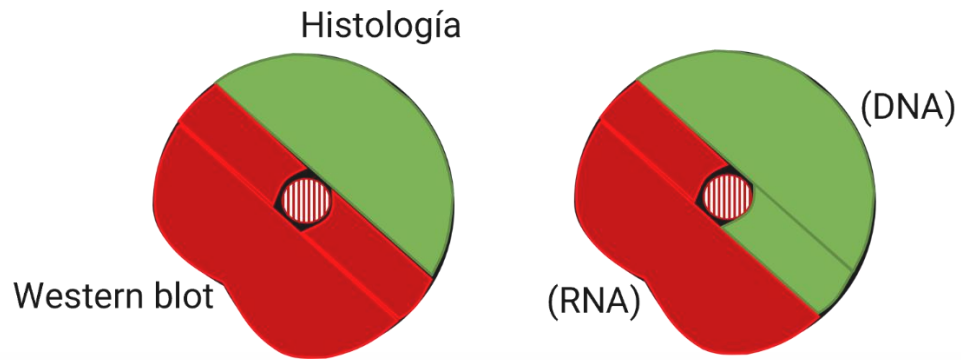


Figura 6. Secciones realizadas en las orejas extirpadas de los animales a las 24 horas de la aplicación del DNCB

6.12 Evaluación del grosor de las orejas

Se midió tres veces el grosor de las derecha e izquierda de cada rata justo a la mitad de ésta, con la ayuda de un vernier digital (POWERFIX), los días 0, 7 y 28 se hizo a las 0h y los días 14, 22 y 36 a las 0, 1, 6 y 24h después de la aplicación de DNCB. El incremento de grosor se calculó mediante la fórmula = grosor OD- grosor OI.

6.13 Evaluación de los eventos de rascado

Las ratas se colocaron en cajas de metacrilato (14cm x 24cm x 26cm; ancho x profundo x alto) posicionando un espejo en la parte de atrás para tener una visión completa de los animales y se grabaron por 10 minutos una vez que los animales se habían recuperado de la anestesia. Se contabilizaron los eventos de rascado, definiéndose como un evento de rascado la serie de 1 o más movimientos de la pata trasera dirigida al sitio de aplicación hasta que se la lame o se coloca nuevamente sobre la superficie de la urna (Nojima & Carstens 2003; Muñoz *et al.*, 2017). Los eventos de rascado fueron contabilizados por tres investigadores ciegos al grupo al que pertenecía cada animal.

6.14 Preparación de muestras para histología

Un fragmento de aproximadamente 1cm de la parte superior de la oreja de cada animal se fijó en formalina neutra, sumergiendo el tejido en un volumen 3 veces mayor a la cantidad de la muestra

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

durante un mínimo de 48 horas. Posteriormente, el tejido se deshidrató sumergiéndolo en soluciones crecientes de alcohol (70%, 80%, 96% y 100%) para remover el fijador y el agua, que de manera gradual se reemplazó por alcohol. El agua se tuvo que quitar ya que el agua y la parafina no son miscibles. Después se llevó a cabo el aclaramiento de la muestra con xilol, con la finalidad de extraer el agente deshidratante del tejido y posteriormente sustituirlo por una sustancia miscible como lo es la parafina. Se hizo la infiltración con parafina, y el tejido se incluyó en el interior de un bloque de parafina y finalmente se realizaron los cortes de 5µm con ayuda de microtomo rotatorio.

6.15 Técnicas histoquímicas.

Se hicieron tres tinciones, azul de toluidina (AT) con el objetivo de identificar mastocitos, hematoxilina y eritrosina B (H&EB) para identificar eosinófilos y hematoxilina y eosina (H&E) para para medir el grosor de epidermis.

6.15.1 Azul de toluidina

Para llevar a cabo la tinción con AT, primeramente, las laminillas con los tejidos se desparafinaron sumergiendo durante 5 minutos en 4 baños de xilol, 2 baños de etanol al 100% y 2 baños de etanol al 95%. Se enjuagó con agua corriente dos veces durante 5 minutos, se colocaron en una solución de azul de toluidina (0.015 M en 0.2 M de ácido cítrico) durante 10 minutos, se enjuagó el exceso de colorante en agua corriente, y se deshidrataron los tejidos enjuagando las laminillas en etanol 95% y etanol 100% y posteriormente se colocaron 3 minutos en dos baños de xilol y finalmente las laminillas fueron montadas utilizando una resina sintética llamada Entellán (MERCK, Darmstadt, Alemania) se dejó secar 24 horas para que la preparación histológica estuviera lista para manipularla sin que se dañe el tejido

6.15.2 Hematoxilina y eritrosina B

Para llevar a cabo la tinción con H&EB se hizo un tren de tinción en donde las laminillas con el tejido se sumergieron en 4 baños de xilol durante un minuto, para la hidratación del tejido y posteriormente dos baños de etanol al 100%, 3 de etanol 96% y uno de agua destilada durante 1 minuto. Las laminillas se colocaron en hematoxilina de Harris durante 8 segundos, después en 2

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

baños de agua corriente de 1 minuto para eliminar el exceso de colorante, 1 minuto en carbonado de litio (Li_2CO_3) al 1%, 1 minuto en agua corriente, 1 minuto en etanol al 96% y 1h en eritrosina B (Anexo). Para la deshidratación del tejido, se realizaron 3 baños de etanol al 96% y 2 baños de etanol al 100%. Para la aclaración del tejido se llevaron a cabo 3 baños de xilol al 100% y finalmente las laminillas fueron montadas con Entellán (MERCK, Darmstadt, Alemania).

6.15.3 Tinción de H&E

Para la tinción de H&E, las laminillas con los tejidos se desparafinaron sumergiendo durante 1 minuto en 4 baños de xilol, se hidrataron en 2 baños de 1min en alcohol al 100%, dos en alcohol al 96% y 1min en agua destilada. Se tiñó con hematoxilina (4 cambios de 50"), después se dieron dos lavados de 1min en agua corriente. En seguida las laminillas se sumergieron en una solución saturada de Carbonato de Litio durante 1min, se dio un lavado en agua corriente, después 1min en Alcohol al 96%, 15" en Eosina, en seguida se deshidrataron los tejidos con contracciones crecientes de alcohol etílico (3 cambios de 1min de alcohol al 96% y 2 cambios al 100%), se hizo el aclaramiento con xilol (3 cambios de 1 min) y por último las laminillas fueron montadas utilizando una resina sintética llamada Entellán (MERCK, Darmstadt, Alemania).

6.16 conteo de mastocitos

Para el recuento de mastocitos se seleccionaron al azar 3 ratas por grupo y 3 cortes por cada rata en donde se tomaron 3 fotos por corte: una de la parte superior, otra de la central y otra de la parte inferior del tejido. Se marcó un área de $40,000\mu\text{m}^2$ en donde se contabilizaron los mastocitos, mismo que fue realizado por dos personas ajenas a los grupos de animales a los que pertenecían las muestras. Para la toma de fotografías y delimitación de área se utilizó un microscopio BA310 (Motic, Hong Kong) con un aumento de 400X y con una cámara acoplada al microscopio C-B10 (OPTIKA, Italia) y el programa LITEVIEW.

6.17 conteo de eosinófilos

Para el recuento de eosinófilos se seleccionaron al azar 3 ratas por grupo y 3 cortes por cada rata. Utilizando un microscopio BA310 (Motic, Hong Kong) y un aumento de 400x, se fueron tomando

fotos con la cámara C-B10 (OPTIKA, Italia) al tejido por secciones hasta completar toda la sección. Se contabilizaron los eosinófilos en la dermis de cada sección histológica completa.

6.18 Medición de grosor de epidermis

Para la medición del grosor de la epidermis se seleccionaron al azar 3 ratas por grupo y 3 cortes por cada rata en donde se tomaron 6 fotos por corte: dos fotos de la parte superior, dos de la central y dos de la parte inferior del tejido, tanto de la epidermis del lado izquierdo al cartílago como de la del lado derecho (Figura 7), y en cada una de esas fotos se hicieron 3 mediciones (Figura 8) del grosor de la epidermis (parte superior, central e inferior de la foto). Para la toma de fotografías se utilizó un microscopio BA310 (Motic, Hong Kong) con una cámara C-B10 (OPTIKA, Italia) acoplada y con ayuda del programa LITEVIEW. La medición del grosor de la epidermis se realizó por dos personas que desconocían el grupo al que pertenecía la rata cuya epidermis se estaba midiendo.

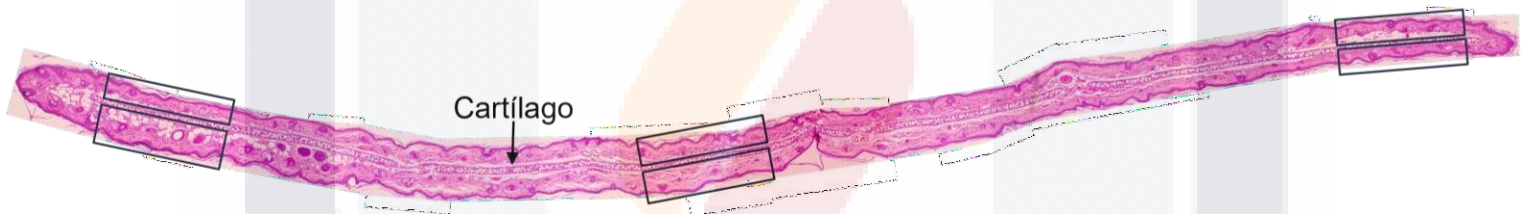


Figura 7. Corte de oreja completa con cada una de las secciones en donde se tomó fotografía.

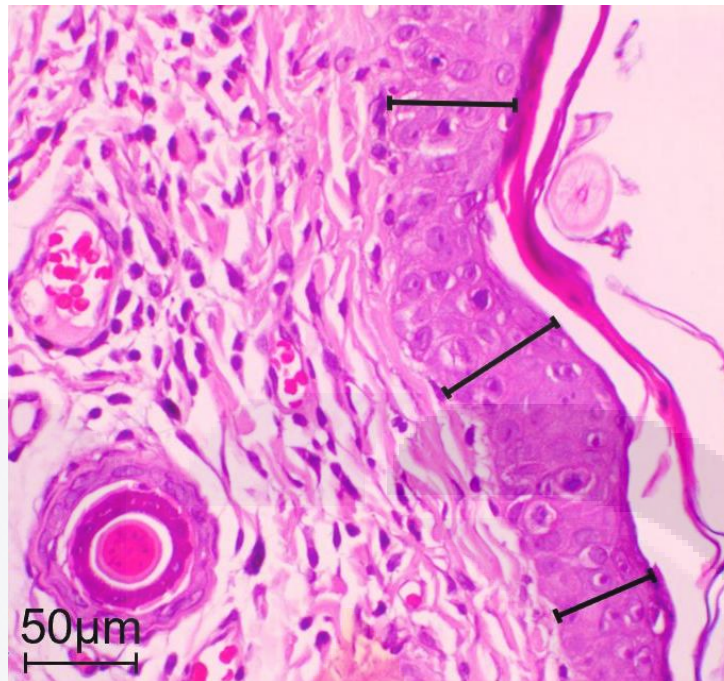


Figura 8. Mediciones realizadas en cada una de las fotos tomadas

6.19 Análisis de la expresión de filagrina e involucrina en tejido lesionado

El día 37, es decir 24h después de haber aplicado el DNCB, se extirpó la OD y se tomó un fragmento el cuál se almaceno a -80°C . Para hacer la extracción de proteínas de la oreja se colocó el tejido (0.1 - 0.3g) en un mortero, se agregó nitrógeno líquido hasta sumergir y triturar (este procedimiento se repitió 5 veces), se re suspendió en 500 μL de PBS y se centrifugó a 417x g por 5 minutos a 4°C , el sobrenadante se desechó y el pellet se re suspendió en 300 μL de solución de lisis RIPA (NaCl 150mM, Tritón X-100 al 1%, Ácido desoxicólico al 0.5%, SDS al 0.1% y Tris 50mM) adicionado con inhibidores de proteasas 1:100 (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), se agitó por 45 minutos a 4°C , posteriormente se centrifugaron las muestras a 16,435x g por 20 minutos y el sobrenadante se recuperó para hacer alícuotas de 20 μL c/u las cuales se almacenaron a -20°C . Se hizo la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, se prepararon las muestras añadiendo Buffer Laemli a 50 μg de proteína total y se calentaron durante 5 minutos a 95°C para la identificación de involucrina y durante 10 minutos para las muestras que se utilizaran en la identificación de filagrina mediante western blot.

6.20 Western Blot

Para la identificación de proteínas filagrina e involucrina, se preparó un gel SDS-PAGE (anexo) al 16% para hacer una electroforesis en donde se cargaron 50µg de las muestras mencionadas anteriormente, y separaron las proteínas aplicando una corriente de 100 volts durante 2 horas. Posteriormente, se realizó una transferencia de las proteínas del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) bajo una corriente de 100 miliamperes durante 2 horas. Para identificar y cuantificar las proteínas de interés se bloqueó la membrana con leche (leche en polvo desnatada) al 5% preparada en TBS (Tris 20mM, NaCl 137mM, pH = 7.4) por 3 horas y en seguida se incubó toda la noche con el anticuerpo primario anti-filagrina FLG GTX37695 1:500 (Gene Tex, Irvine, California, Estados Unidos), anti-involucrina Ab14504 1:500 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) o anti-GAPDH G9545 1:20,000 (SIGMA, San Luis, Misuri, Estados Unidos) el cual se diluyó en TBS al 5% en leche y se mantuvo en agitación a 4°C, durante toda la noche. Al día siguiente se dieron 2 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-TWEEN al 0.1% (TTBS) y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con HRP anti rabbit IgG A0545 1:5000 (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) para filagrina y anti-mouse IgG 1:5000 para involucrina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se realizaron 2 lavados de 15 minutos cada uno y 5 de 5 minutos cada uno con TTBS. En seguida la membrana se colocó en un acetato y se le agregó luminol y peróxido utilizando el kit Clarity Western ECL Substrate (BIO-RAD, Hercules, California, Estados Unidos) y finalmente se reveló la membrana en un equipo MicroChemi 4.2 (DNR Bio-Imaging System, Jerusalén, Israel).

6.21 Purificación de DNA del tejido cutáneo y cuantificación de *S. aureus* y *S. epidermidis*

El día 37, es decir 24h después de haber aplicado el DNCB, se extirpó la oreja derecha y se tomó un fragmento el cuál se almaceno a -80°C en DNA/RNA shield (Zymo research, Irvine, CA, Estados Unidos). Para hacer la cuantificación de *S. aureus* y *S. epidermidis* se hizo el aislamiento de DNA utilizando el kit Zymo QuickDNA fungal bacterial D6005

(Zymo research). Para conocer la concentración de DNA se cuantificó en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), y se consideró una relación de Abs260/280 mayor a 1.8 como adecuada para la calidad de DNA. Después se realizó una PCR en tiempo real con 50 ng de DNA y 0.5 μ M de cada oligo para FemA de *S. aureus* (FemA-SA) y de *S. epidermidis* (FemA-SE) en 1 μ L en volumen (tabla 3) y con el buffer Maxima SYBR Green/ROX k0221 (Thermo Fisher Scientific) en el equipo StepOne (Applied Biosystems, California, Estados Unidos), a un volumen final de 10 μ L. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial 95°C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30s, y 72°C por 3 min. Se hizo la cuantificación absoluta en 50 ng de DNA total y el número de copias del gen se determinó con las curvas estándar de pTZ57R- FemA-SA y pTZ57R-FemA-SE, se graficó el valor de Ct obtenido para cada concentración de estándar y con la ecuación de la recta obtenida se interpolaron los valores de Ct de cada muestra.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para la evaluación de la microbiota cutánea.

Microorganismo	Oligonucleótido	Referencia
<i>S. epidermidis femA</i>	Fw: CAACTCGATGCAAATCAGCAA Rv: GAACCGCATAGCTCCCTGC	(Chung <i>et al.</i> , 2016; Jiménez <i>et al.</i> , 2020)
<i>S. aureus femA</i>	Fw: TGCCTTTACAGATAGCATGCCA Rv: AGTAAGTAAGCAAGCTGCAATGACC	(Chung <i>et al.</i> , 2016; Jiménez <i>et al.</i> , 2020)

6.22 Cuantificación de Histamina sérica

El día 36, una hora después de haber aplicado el DNCB, se extrajo 1mL de sangre de 4 ratas por grupo, muestra que se utilizó para desarrollar un ELISA cuantitativo competitivo comercial (MBS732202, Mybiosource, San Diego, Estados Unidos) y medir la cantidad de histamina en el suero.

Para desarrollar el ELISA se añadieron a los pozos 100 μ L de los estándares (0, 2.5, 5, 10, 25 y 50ng/mL) o de cada una de las muestras o 100 μ L de PBS para el blanco de cromógeno. Después se agregó 50 μ L del conjugado (histamina marcada con HRP) a cada pozo a excepción del blanco, se mezcló bien el contenido de cada pozo, se cubrió la placa

para evitar la luz y se incubó a 37°C durante 1h. Pasada la hora se retiró el contenido de cada pozo y se llenó cada pozo con solución de lavado durante 10 segundos y se retiró la solución invirtiendo la placa y dando pequeños golpes en una toalla absorbente para retirar por completo el líquido. Este procedimiento se repitió 5 veces para llevar a cabo 5 lavados. Posteriormente se agregaron 50µL de sustrato A (peroxidasa) y sustrato B (3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina, TMB) incluido el pozo del blanco, se volvió a cubrir la placa y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Al pasar este tiempo se agregó 50µL de solución de paro (solución ácida proporcionada en el kit) incluyendo el pozo del blanco e inmediatamente después se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 450nm utilizando un espectrofotómetro para placas iMark Microplate reader (BIO RAD, Hercules, California, Estados Unidos). Los datos se reportaron como ng/mL de histamina. La curva utilizada se muestra en la figura 9.

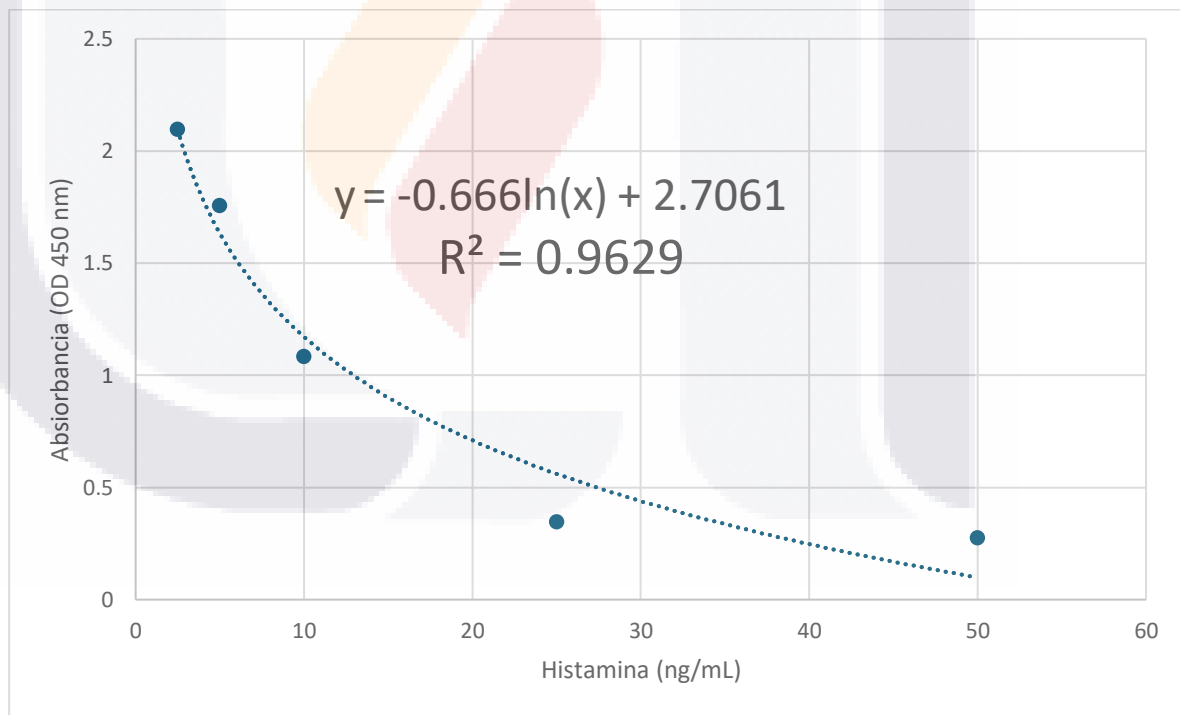


Figura 9. Curva con los estándares de histamina.

6.23 Cuantificación de Histamina en tejido de oreja

El día 36, una hora después de haber aplicado el DNCB, se extirpó la oreja derecha y se

tomó un fragmento para más adelante realizar un ELISA competitivo comercial (Mybiosource, San Diego, Estados Unidos) explicado anteriormente y medir la cantidad de histamina en el tejido. Para extraer la histamina del tejido, un fragmento del tejido de la oreja derecha (0.05 - 0.1g) se colocó en un mortero y se agregó nitrógeno líquido hasta sumergir y triturar (este procedimiento se repitió 4 veces). El triturado se re suspendió en 500µL de PBS y se realizaron 2 ciclos de congelación – descongelación en nitrógeno líquido para romper membranas. La suspensión obtenida se centrifugó durante 15 minutos a 22 xg, 4°C, posteriormente se colectó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 89 xg, 10 minutos, 4°C. Se colectó el sobrenadante y se hicieron alícuotas las cuales se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso para el ELISA. Los datos se reportaron como (ng/mL) de histamina / g de tejido y como (ng/mL) de histamina / (µg/µL) proteína de la muestra. La cantidad total de proteína en la muestra se cuantificó mediante el método de Bradford.

6.24 Cuantificación de IgE sérica

Con el suero obtenido de 4 ratas / grupo 24 horas después de haber aplicado el DNCB, se realizó un ELISA sándwich comercial utilizando un kit ab157736 (abcam, Cambridge, Reino Unido) para medir la cantidad de IgE total en el suero.

Para desarrollar el ELISA se adicionaron 100µL de diluyente al pozo 2 de la curva, 100 µL de estándar según corresponda o 100µL de muestra en el pozo correspondiente, se incubó durante 1h a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Pasado el tiempo de incubación, se tiró el contenido de cada uno de los pozos por aspiración, después se dieron 4 lavados con el buffer de lavado, se cargaron 100µL del conjugado (anti-IgE unido a HRP) en cada pozo excepto el blanco y se incubó nuevamente 1h protegiendo de la luz. Posteriormente, se dieron 4 lavados más, se agregaron 100µL de cromógeno (TMB) y se incubó por 10 minutos. Pasado el tiempo se adicionó la solución de paro (solución ácida proporcionada por el kit) e inmediatamente se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 450nm utilizando un espectrofotómetro para placas iMark Microplate reader

(BIO RAD, Hercules, California, Estados Unidos). La curva utilizada se muestra en la figura 10.

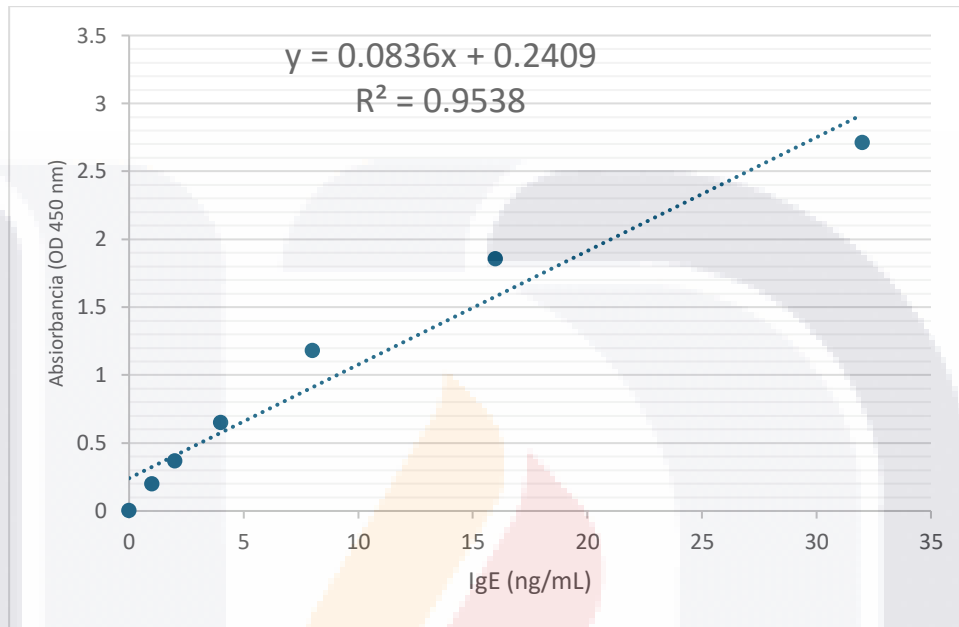


Figura 10. Curva estándar para cuantificar IgE total de rata

6.25 Análisis de la expresión de factores de transcripción y citocinas en tejido de oreja y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM)

El día 37, es decir 24h después de haber aplicado el DNCB, se extirparon los NLM y la oreja derecha y se tomó un fragmento el cuál se almaceno a -80°C en DNA/RNA Shield (Zymo Research). Se realizó extracción de RNA total utilizando el kit Zymo Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research). Para conocer la concentración de RNA se cuantificó en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), y se consideró una relación de Abs260/280 mayor a 1.8 como adecuada para la calidad de RNA. A partir de $1\ \mu\text{g}$ de RNA total se realizó la síntesis de cDNA utilizando el Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Después se realizó una qPCR en tiempo real empleando los siguientes oligonucleótidos (Tabla 4):

Tabla 4. Oligonucleótidos para la cuantificación de factores reguladores de la transcripción y citocinas.

Factor de transcripción o citocina	Secuencia	Número de acceso
<i>Tbx21 (Tbet)</i>	Fw: TCCAAGTTCAACCAGCACCA Rv: ATAAGCGGTTCCCTGGCATA	NM_001107043.1
<i>Gata3</i>	Fw: AGAAGGCAGGGAGTGTGTGA Rv: TTAGCGTTCCTCCTCCAGAG	NM_133293.1
<i>Rorc</i>	Fw: GCAGCAACGGGAACAAGTAG Rv: GGGCTATACTCAAGGTGGCA	NM_001427272.2
<i>Foxp3</i>	Fw: CGGGAGAGTTTCTCAAGCAC Rv: CACAGGTGGAGCTTTTGTCA	NM_001108250.1
<i>Il4</i>	Fw: CACCTTGCTGTCACCCTGTT Rv: ACATCTCGGTGCATGGAGTC	NM_201270.1
<i>Il17a</i>	Fw: CGTGAAGGTCAACCTGAAAG Rv: TCTATCAGGGTCCTCATTGC	NM_001106897.1
<i>Il10</i>	Fw: TGGCTCAGCACTGCTATGTT Rv: TTGTCCAGCTGGTCCTTCTT	NM_012854.2
<i>Tgfb1β</i>	Fw: GACTCTCCACCTGCAAGACCAT Rv: CGGGTGACTTCTTTGGCGTA	NM_021578.2
<i>Actb</i>	Fw: GTCGTACCACTGGCATTGTG Rv: GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	NM_031144.3

Cada reacción fue montada a un volumen final de 10 μ L, que contenían los siguientes componentes: 5 μ L de buffer Maxima SYBR 2x Green/ROXk0221 (Thermo Scientific), 1 μ L de oligonucleotido Fw (concentración final de 0.5 μ M), 1 μ L de oligonucleotido Rv (concentración final de 0.5 μ M), 1 μ L de cDNA (aprox. 50 ng de cDNA), 2 μ L de agua libre de nucleasas. Las reacciones se montaron en el equipo StepOne (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial 95°C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s y 60°C por 30s. Los resultados fueron analizados por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008).

6.26 Purificación de DNA de heces y cuantificación de Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota y Actinomycetota

El día 37, es decir 24 h después de haber aplicado el DNCB, se colectó un pellet de heces de cuatro animales de cada grupo para cuantificar bacterias de los 4 principales filos bacterianos a nivel intestinal en la rata (Liu *et al.* 2023). Para hacer la cuantificación de Bacillota, Bacteroidota, Pseudomonadota y Actinomycetota se hizo el aislamiento de DNA utilizando el kit Zymo QuickDNA fungal bacterial (Zymo Research, Irvine, California, Estados Unidos). Para conocer la concentración de DNA secuenció en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), y se consideró una relación de Abs260/280 mayor a 1.8 como adecuada para la calidad de DNA. Después se realizó una PCR en tiempo real con 20 ng de DNA y empleando los siguientes oligonucleótidos (Tabla 5):

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos para la evaluación de la microbiota fecal.

Filo	Oligonucleótido	Referencia
Bacillota	Fw: GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA Rv: AGCTGACGACAACCATGCAC	Rizzardi <i>et al.</i> , 2021
Bacteroidota	Fw: GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT Rv: AGCTGACGACAACCATGCAG	Rizzardi <i>et al.</i> , 2021
Pseudomonadota	Fw: CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG Rv: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	Murri <i>et al.</i> , 2013
Actinomycetota	Fw: GADACYGCCGGGGTYAACT Rv: TCWGCGATTACTAGCGAC	Pfeiffer <i>et al.</i> , 2014

Cada reacción fue montada a un volumen final de 10 µL, que contenían los siguientes componentes: 5 µL de buffer Maxima SYBR 2x Green/ROXk0221 (Thermo Scientific), 1 µL de oligonucleotido Fw (concentración final de 0.5 µM), 1 µL de oligonucleotido Rv (concentración final de 0.5 µM), 1 µL de DNA (20 ng/µL), 2 µL de agua libre de nucleasas. Las reacciones se montaron en el equipo StepOne (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial 95°C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s y 60°C por 30s. Se hizo la cuantificación absoluta en 20 ng de DNA total y el número de copias del gen se determinó con las curvas estándar

establecidas (figura 12, 13, 14 y 15) con los plásmidos pGEM-Firmicutes, pGEM-Bacteroidetes, pTZ57R-Actinobacterias y pTZ57R-Proteobacterias (Tesina Paz-Jiménez, 2024). Se graficó el valor de Ct obtenido para cada concentración de estándar y con la ecuación de la recta obtenida se interpolaron los valores de Ct de cada muestra. Las curvas utilizadas se muestran en las figuras 11, 12, 13 y 14.

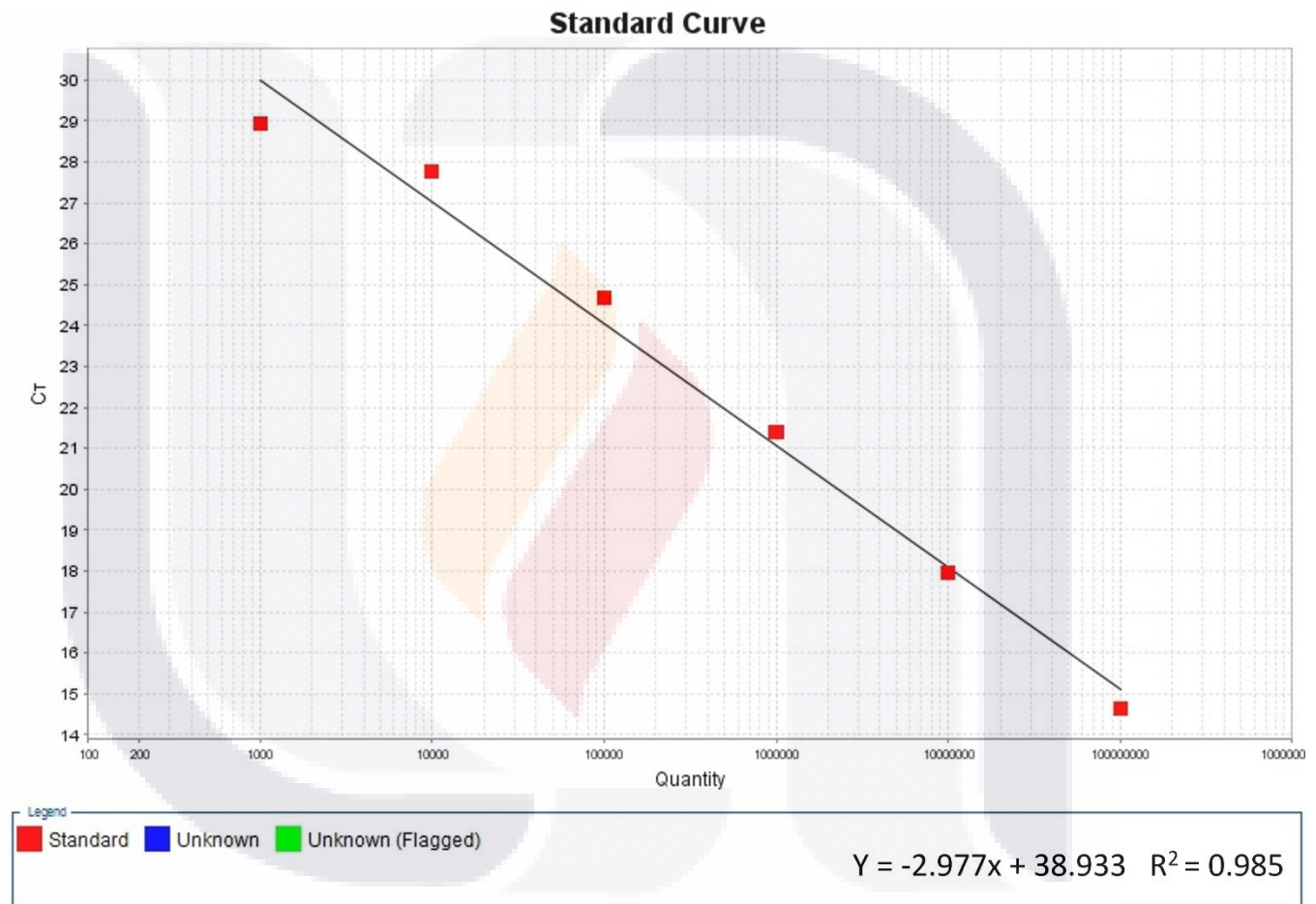


Figura 11. Curva estándar de Bacillota.

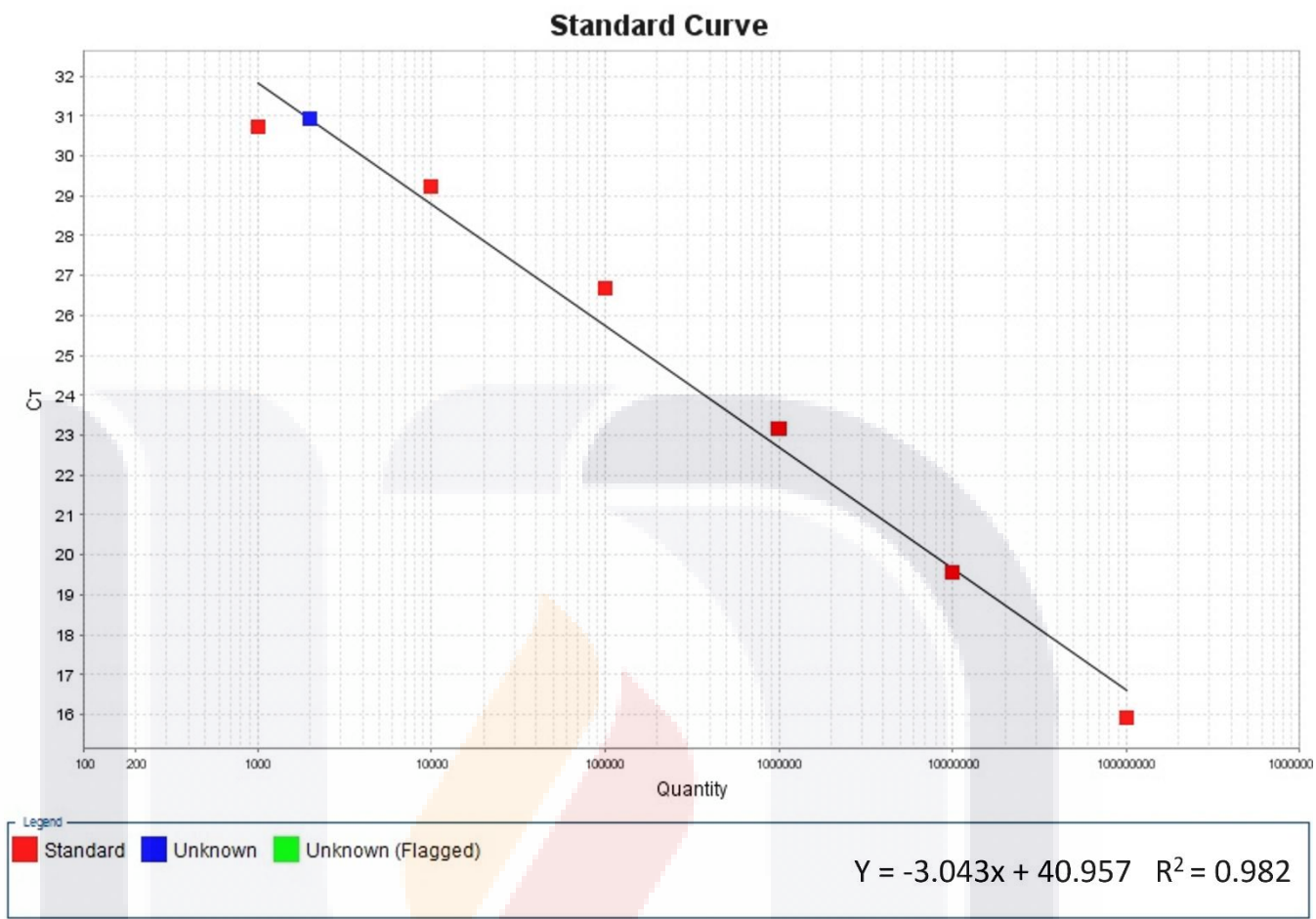


Figura 12. Curva estándar de Bacteroidota.

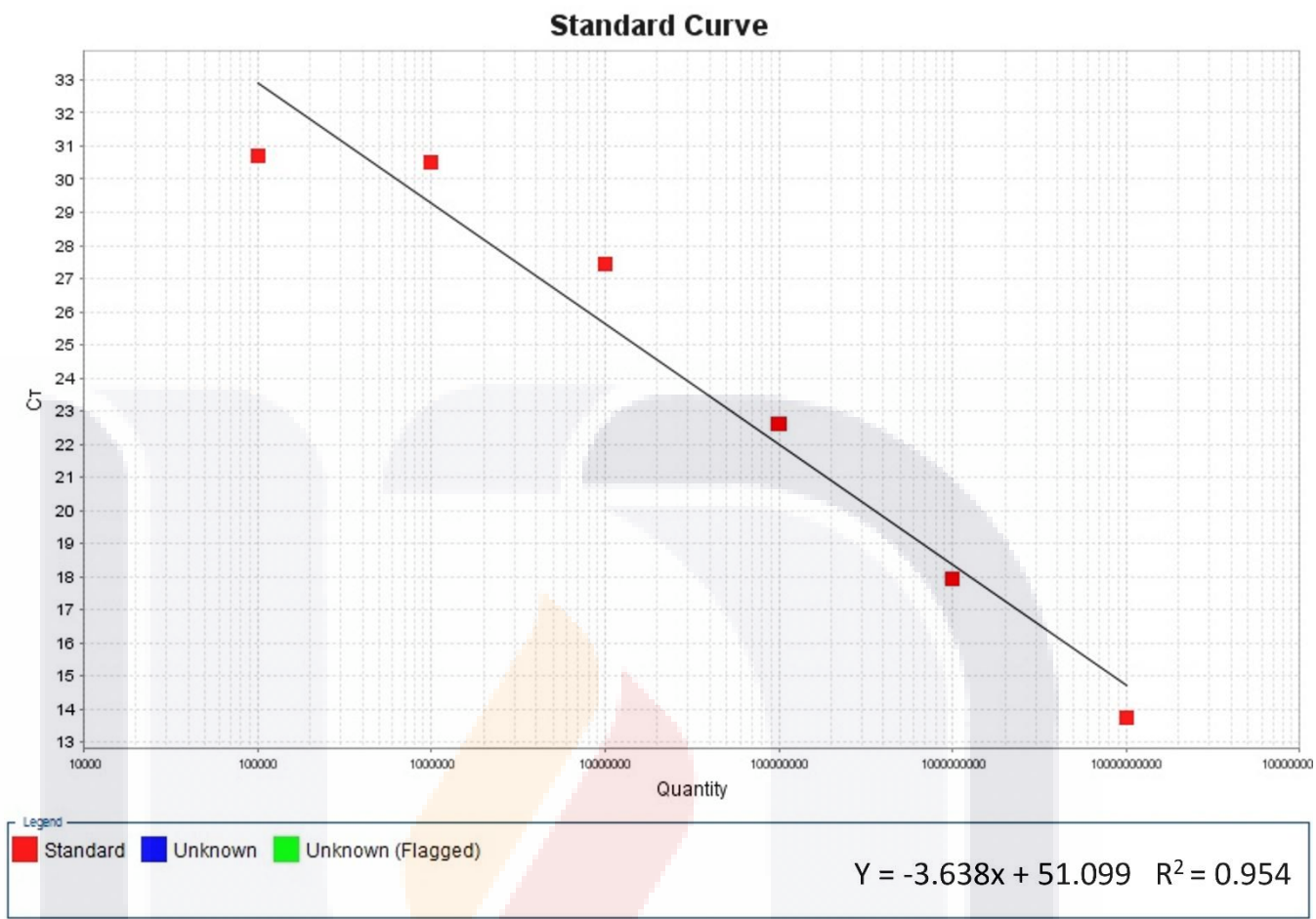


Figura 13. Curva estándar de Pseudomonadota.

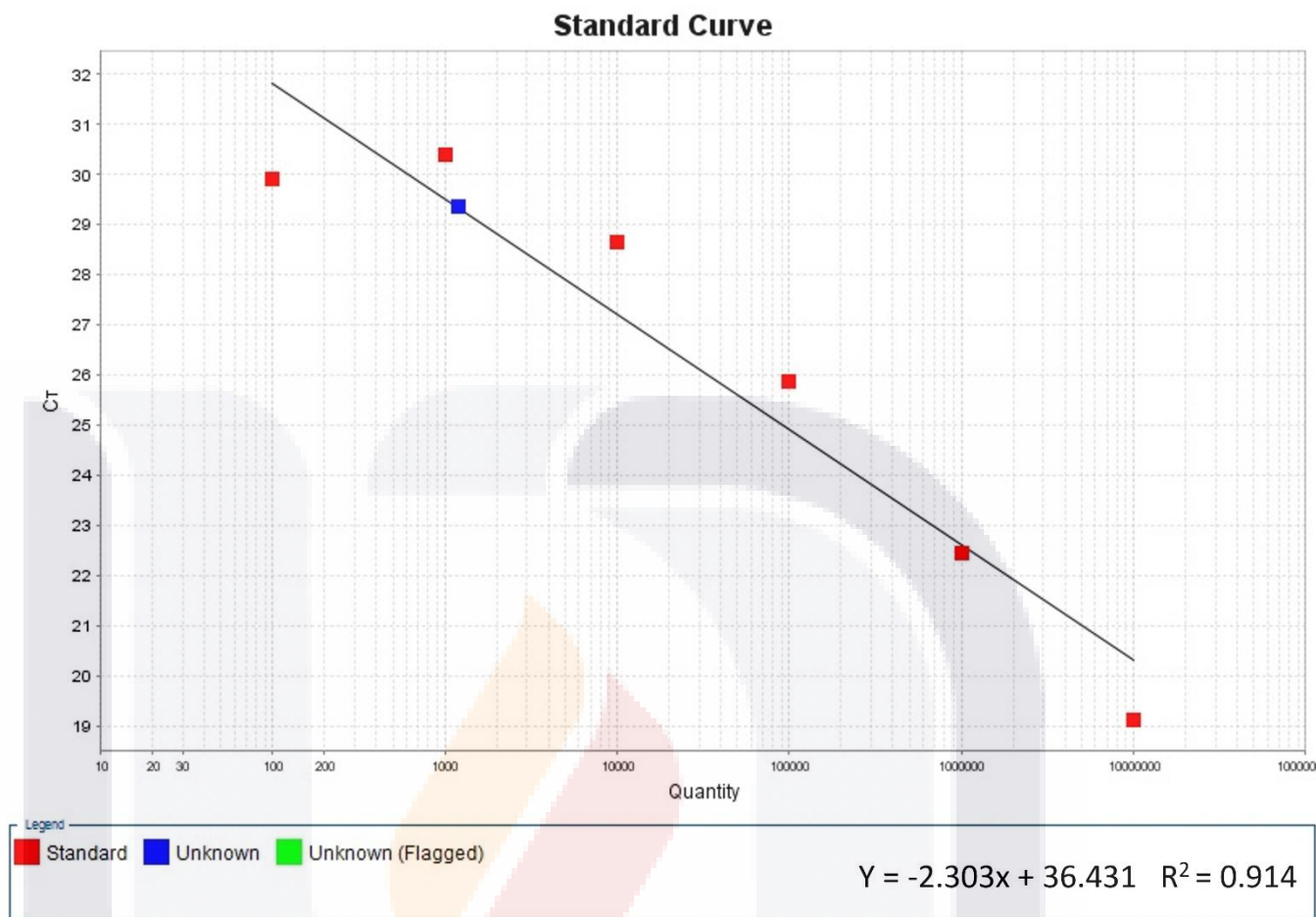


Figura 14. Curva estándar de Actinomycetota.

6. 27 Análisis estadístico de los resultados

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.) mediante ANOVA de una vía al analizar una sola variable o de dos vías cuando se analizaron dos variables independientes, con una prueba *post-hoc* de Tukey para estudios multicomparativos entre grupos o *post-hoc* de Dunnett para análisis multicomparativos respecto al grupo DA. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar (SEM), estableciendo el valor de significancia en $p < 0.05$. Para los ensayos de crecimiento bacteriano *in vitro* diferentes letras indican diferencia significativa entre los grupos. Para las gráficas del tratamiento con IAA en un modelo

en rata de DA, la simbología + hacen referencia a comparación con el grupo C y * con el grupo DA

7. Resultados

7.1 Efecto prebiótico *in vitro* de las inulinas sobre diferentes LAB en condiciones de anaerobiosis

Con el propósito de establecer un punto de referencia para los ensayos con inulinas, se realizaron curvas de crecimiento de las diferentes especies de lactobacilos en medio MRS comercial bajo condiciones de anaerobiosis. Este análisis permitió identificar las fases de adaptación (latencia), crecimiento exponencial y fase estacionaria características de cada cepa. Tal como se observa en la Figura 15, la fase exponencial inició alrededor de las 6 horas tanto en las cepas de *L. rhamnosus* como de *L. plantarum*. La determinación de este parámetro fue fundamental para el diseño experimental, ya que a partir de este tiempo se definió el inicio de las mediciones en los ensayos con inulinas, asegurando así que la evaluación del crecimiento bacteriano coincidiera con la fase de mayor actividad metabólica y división celular.

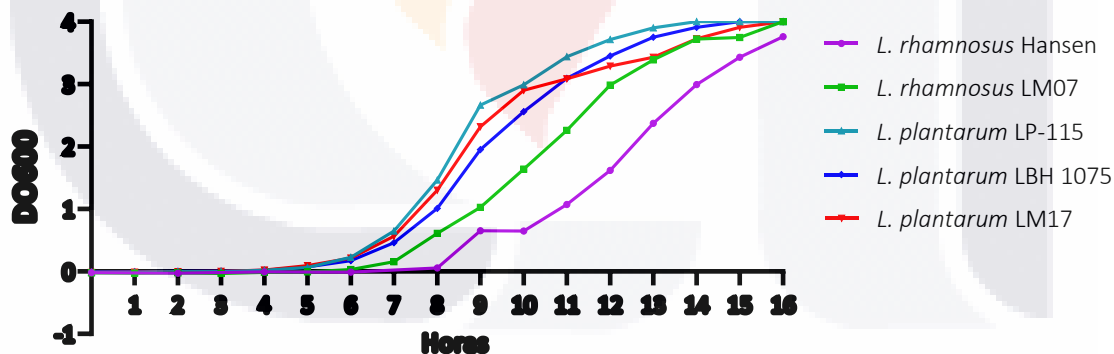


Figura 15. Fases de crecimiento de los lactobacilos.

En cuanto al efecto de los azúcares sobre el crecimiento de *L. rhamnosus* (Hansen) y *L. rhamnosus* LM07 (Figura 16A, B), ambos mostraron un comportamiento similar. Después de 16 horas de incubación no se observaron diferencias relevantes en la biomasa generada entre el medio MRS

comercial y el formulado. En ambos casos, la glucosa promovió el mayor crecimiento bacteriano. Respecto al efecto de las inulinas, la que favoreció un crecimiento más elevado a las 16 horas fue la IAA1. Considerando como 100% la biomasa bacteriana obtenida en el medio MRS suplementado con glucosa, la presencia de IAA1 permitió alcanzar un 65.6% del crecimiento para *L. rhamnosus* (Hansen) y un 58.5% para *L. rhamnosus* LM07. En cuanto a las otras inulinas, en *L. rhamnosus* (Hansen) la biomasa final fue significativamente mayor con IAA2 e IAA4 en comparación con IAA3, mientras que en *L. rhamnosus* LM07 el crecimiento con IAA2 fue superior al observado con IAA3 e IAA4. Finalmente, la inulina lac no resultó un sustrato adecuado para el crecimiento de ambas cepas, ya que la biomasa obtenida fue comparable a la del medio sin glucosa (control negativo).

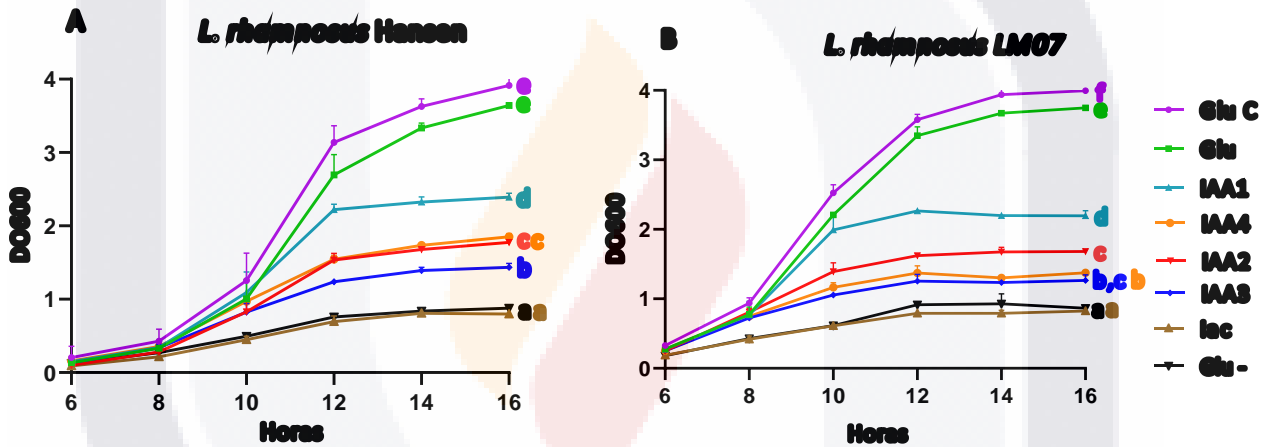


Figura 16. Crecimiento de *L. rhamnosus* (Hansen) (A) y *L. rhamnosus* LM07 (B) con diferentes fuentes de carbono. Diferentes letras indican diferencia significativa entre los grupos.

En relación con el efecto de los azúcares sobre el crecimiento de *L. plantarum* LP-115, *L. plantarum* LM17 y *L. plantarum* LBH 1075 (Figuras 17A, B, C), se observó que tras 16 horas de incubación no existieron diferencias significativas en la biomasa generada en los medios MRS comercial o formulado. En ambos casos, cuando la fuente de carbono fue la glucosa, se registró el mayor crecimiento bacteriano. Respecto al efecto de las inulinas, la IAA1 fue la que promovió una mayor producción de biomasa a las 16 horas, con solo un 15%, 10.2% y 11.6% menos en comparación con los medios suplementados con glucosa (100%), para las cepas LP-115, LM17 y LBH1075, respectivamente. En contraste, los cultivos en medios adicionados con IAA2, IAA3 e IAA4 mostraron

en promedio un 37.3%, 41.5% y 43.8% menos de biomasa que la obtenida con IAA1. Por su parte, la lac no actuó como un sustrato adecuado para el crecimiento de las cepas de *L. plantarum*, ya que la biomasa obtenida fue equivalente a la del medio sin glucosa (control negativo).

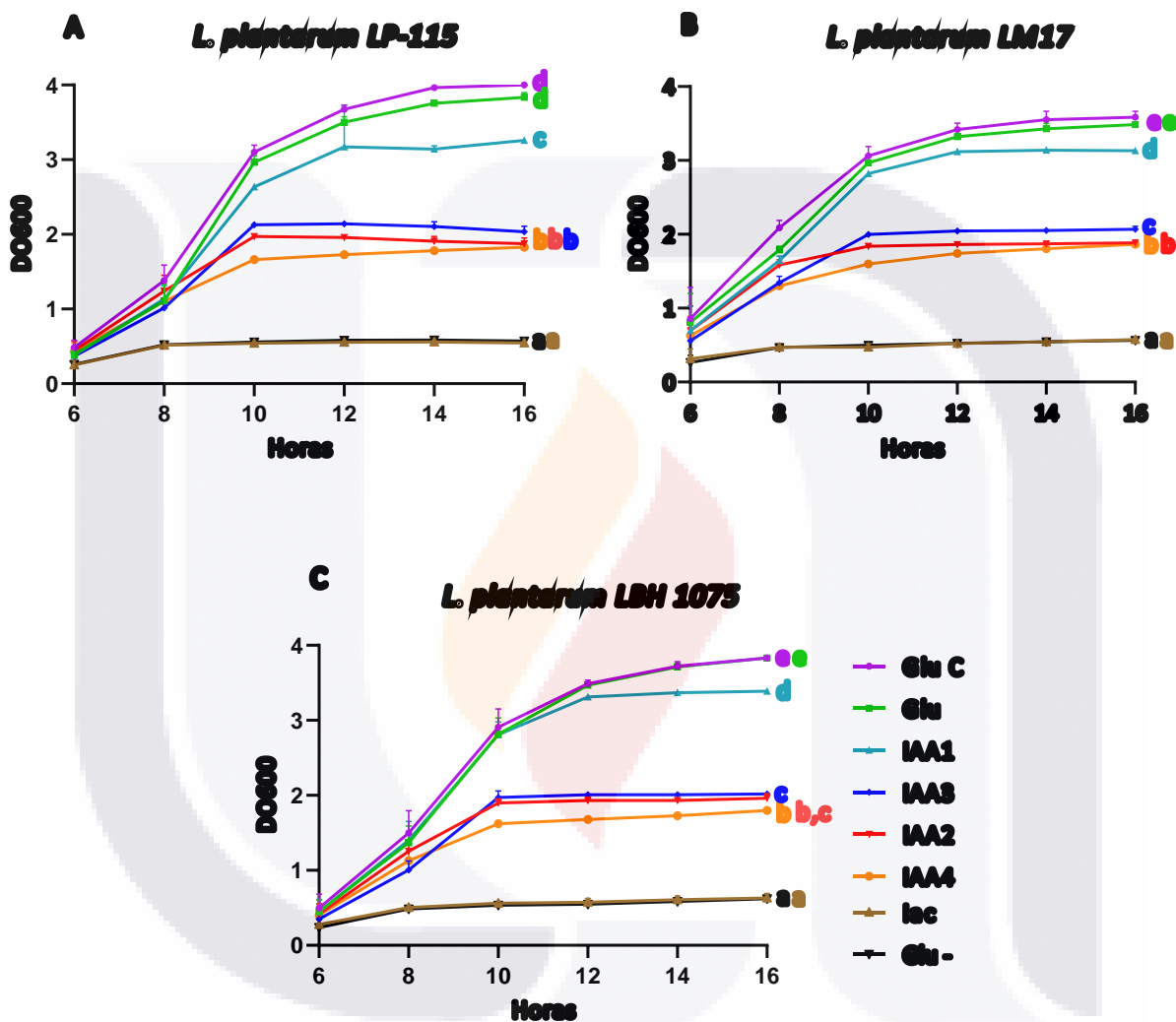


Figura 17. Crecimiento de *L. plantarum* LP-115 (A), LM17 (B) y LBH 1075 (C) con diferentes fuentes de carbono.

7.2 Efecto de las inulinas sobre la acidez del medio de crecimiento de diferentes LAB en condiciones de anaerobiosis

En cuanto al pH de los medios tras 16 horas de incubación, se observó que la mayor acidificación se produjo en presencia de glucosa para todas las cepas evaluadas. En el caso

de *L. rhamnosus* (Hansen) y *L. rhamnosus* LM07 cultivados en medios suplementados con inulinas (Figuras 18A, B), el descenso más pronunciado y significativo del pH se presentó en el medio con IAA1. En contraste, el medio adicionado con lac no mostró cambios significativos, presentando un comportamiento semejante al control negativo.

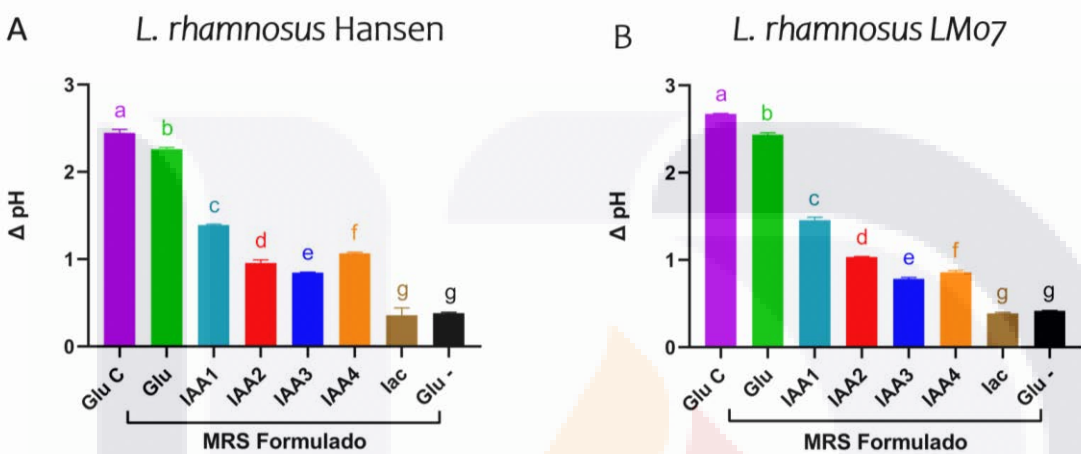


Figura 18. Cambio de pH en el medio de crecimiento de *L. rhamnosus* (Hansen) (A) y LM07 (B) después de 16 hrs de inoculación.

El mismo patrón se observó en el crecimiento de *L. plantarum* LP-115, *L. plantarum* LM17 y *L. plantarum* LBH 1075 (Figuras 19A, B, C). En estas cepas, el medio suplementado con IAA1 presentó el mayor y más significativo descenso del pH. Por el contrario, los medios adicionados con lac no mostraron cambios significativos, con un comportamiento comparable al medio sin glucosa.

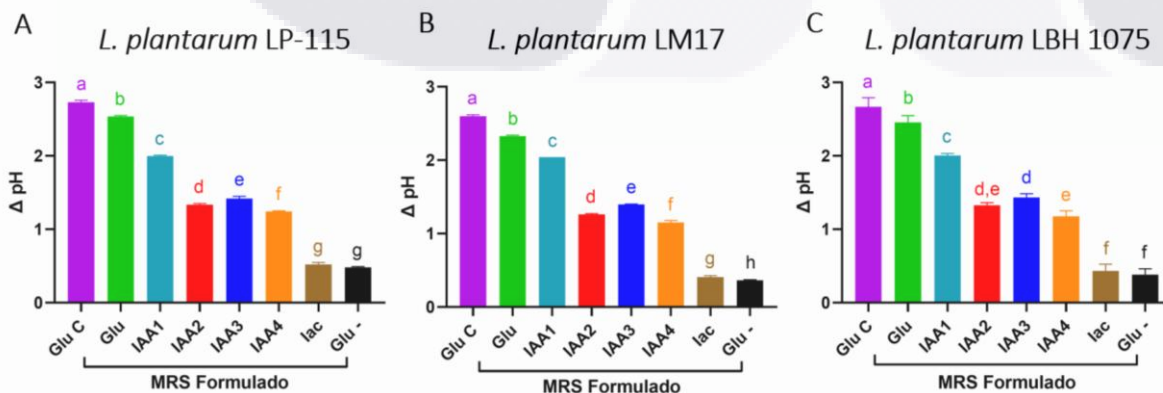


Figura 19. Cambio de pH en el medio de crecimiento de *L. plantarum* LP-115 (A), LM17 (B) y LBH 1075 (C) después de 16 hrs de inoculación.

La Tabla 6 presenta la tasa de crecimiento y el tiempo de generación para cada cepa en los diferentes medios con fuentes de carbono. Se observó que los *L. rhamnosus* mostraron tasas de crecimiento específicas significativamente mayores y tiempos de generación más cortos en el medio suplementado con IAA1, en comparación con el control negativo. En cuanto a las cepas de *L. plantarum*, LP-115 y LBH1075 alcanzaron una mayor tasa de crecimiento y un menor tiempo de generación en presencia de IAA3, mientras que LM17 mostró la mayor tasa de crecimiento con IAA2 y el menor tiempo de generación con IAA1.

Tabla 6. Tasa de crecimiento y tiempo de generación.

		Tasa de crecimiento				
		<i>L. rhamnosus</i> Hansen	<i>L. rhamnosus</i> LM07	<i>L. plantarum</i> LP-115	<i>L. plantarum</i> LM17	<i>L. plantarum</i> LBH 1075
MRS C Formulado	Glu C	0.509 ± 0.044 b	0.310 ± 0.004 a	0.264 ± 0.015 a	0.335 ± 0.064 a b	0.334 ± 0.040 a
	Glu	0.388 ± 0.023 a b c	0.323 ± 0.009 a	0.368 ± 0.022 a	0.343 ± 0.063 a b	0.346 ± 0.035 a
	IAA1	0.468 ± 0.009 c	0.499 ± 0.022 b	0.424 ± 0.044 a	0.365 ± 0.061 a b	0.342 ± 0.038 a
	IAA2	0.462 ± 0.016 a b c	0.312 ± 0.012 a	0.378 ± 0.043 a	0.448 ± 0.137 a	0.389 ± 0.050 a
	IAA3	0.388 ± 0.035 a b c	0.268 ± 0.009 a d	0.444 ± 0.043 a	0.333 ± 0.058 a b	0.440 ± 0.049 a
	IAA4	0.305 ± 0.025 a	0.379 ± 0.016 c	0.342 ± 0.040 a	0.246 ± 0.055 a b	0.358 ± 0.051 a
	lac	0.342 ± 0.028 a c	0.238 ± 0.009 d	0.367 ± 0.065 a	0.000 ± 0.000 b	0.322 ± 0.115 a
	Glu -	0.306 ± 0.027 a	0.268 ± 0.003 a	0.358 ± 0.059 a	0.302 ± 0.102 a b	0.388 ± 0.121 a
		Tiempo de generación				
		<i>L. rhamnosus</i> Hansen	<i>L. rhamnosus</i> LM07	<i>L. plantarum</i> LP-115	<i>L. plantarum</i> LM17	<i>L. plantarum</i> LBH 1075
MRS C Formulado	Glu C	82.98 ± 7.466 a	134.0 ± 1.963 a	158.6 ± 8.895 a	136.2 ± 32.10 a	127.9 ± 13.88 a
	Glu	107.9 ± 6.826 a b	128.7 ± 3.805 a b c	113.8 ± 6.515 a	131.9 ± 29.39 a	122.4 ± 11.34 a
	IAA1	88.95 ± 1.890 a	83.72 ± 3.920 b	100.0 ± 9.719 a	122.3 ± 52.93 a	124.4 ± 13.11 a
	IAA2	97.89 ± 3.702 a b	133.6 ± 5.771 a c	112.8 ± 11.95 a	124.8 ± 52.93 a	110.5 ± 13.91 a
	IAA3	108.9 ± 10.05 a b	155.4 ± 5.558 c d	95.31 ± 9.175 a	134.5 ± 28.08 a	96.61 ± 10.42 a
	IAA4	138.3 ± 11.71 b	110.0 ± 5.136 c	124.5 ± 13.28 a	193.1 ± 54.48 a	121.3 ± 18.00 a
	lac	123 ± 10.01 a b	175.0 ± 7.311 d	121.8 ± 24.75 a	0.000 ± 0.000 a	207.3 ± 111.2 a
	Glu -	138.1 ± 12.63 b	155.1 ± 1.725 a d	122.9 ± 21.02 a	208.2 ± 105.0 a	147.2 ± 65.04 a

Tal como se indicó en la metodología, se realizaron ensayos adicionales con *L. rhamnosus* (Hansen) y *L. plantarum* LP-115 en medio MRS comercial suplementado con diferentes concentraciones de IAA1 (0.02, 0.2, 2 y 20 g/L), dado que esta inulina

promovió el mayor crecimiento bacteriano al utilizarse como única fuente de carbono. Los resultados mostraron que, tras 16 horas de incubación, no existieron diferencias significativas en la biomasa generada entre las distintas concentraciones de IAA1 y el medio MRS sin suplementar, observándose un crecimiento similar en todos los casos (Figuras 20A, B).

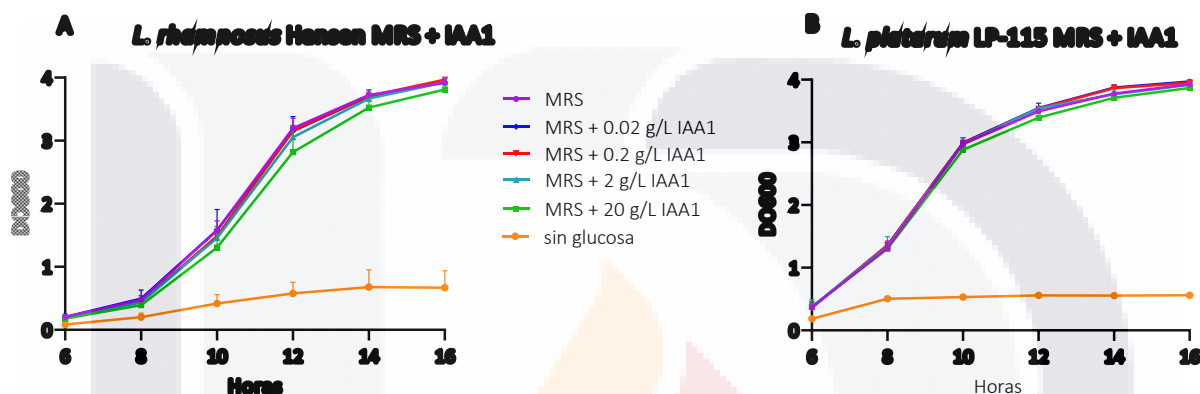


Figura 20. Crecimiento de *L. rhamnosus* (Hansen) (A) y *L. plantarum* LP-115 (B) en medio MRS adicionado con IAA1.

Finalmente, al analizar los parámetros de crecimiento, se encontró que *L. rhamnosus* (Hansen) presentó la mayor tasa de crecimiento bacteriano y el menor tiempo de generación cuando el medio fue suplementado con 0.02 g/L de IAA1. En contraste, *L. plantarum* LP-115 alcanzó sus valores más altos de tasa de crecimiento y menores tiempos de generación cuando el medio fue suplementado con 2 g/L de IAA1 (tabla 7).

Tabla 7. Tasa de crecimiento y tiempo de generación de *L. rhamnosus* (Hansen) y *L. plantarum* LP-115 en medio MRS comercial suplementado con IAA 1 a diferentes concentraciones.

		Tasa de crecimiento	
		<i>L. rhamnosus</i> Hansen	<i>L. plantarum</i> LP-115
MRS + IAA 1	MRS	0.363 ± 0.008 a	0.293 ± 0.017 a
	0.02 g/L	0.485 ± 0.018 b	0.296 ± 0.010 a
	0.2 g/L	0.306 ± 0.002 a	0.296 ± 0.011 a
	2 g/L	0.356 ± 0.012 a	0.377 ± 0.026 a
	20 g/L	0.37 ± 0.023 a	0.234 ± 0.011 a
	sin glucosa	0 ± 0 c	0 ± 0 b

Tiempo de generación

		<i>L. rhamnosus</i> Hansen	<i>L. plantarum</i> LP-115
MRS + IAA 1	MRS	114.7 ± 2.835 a	142.6 ± 8.827 a
	0.02 g/L	85.96 ± 3.373 b	140.6 ± 5.145 a
	0.2 g/L	135.6 ± 0.951 c	140.9 ± 5.69 a
	2 g/L	117.1 ± 4.034 a	111.3 ± 8.351 a b
	20 g/L	113.3 ± 7.201 a	178.4 ± 8.846 a
	sin glucosa	0 ± 0 d	0 ± 0 c

7.3 Efecto de la IAA administrada vía oral sobre los signos clínicos de la DA experimental

En relación con el peso de los animales, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, lo que indica que los tratamientos administrados no influyeron en este parámetro (Figura 21).

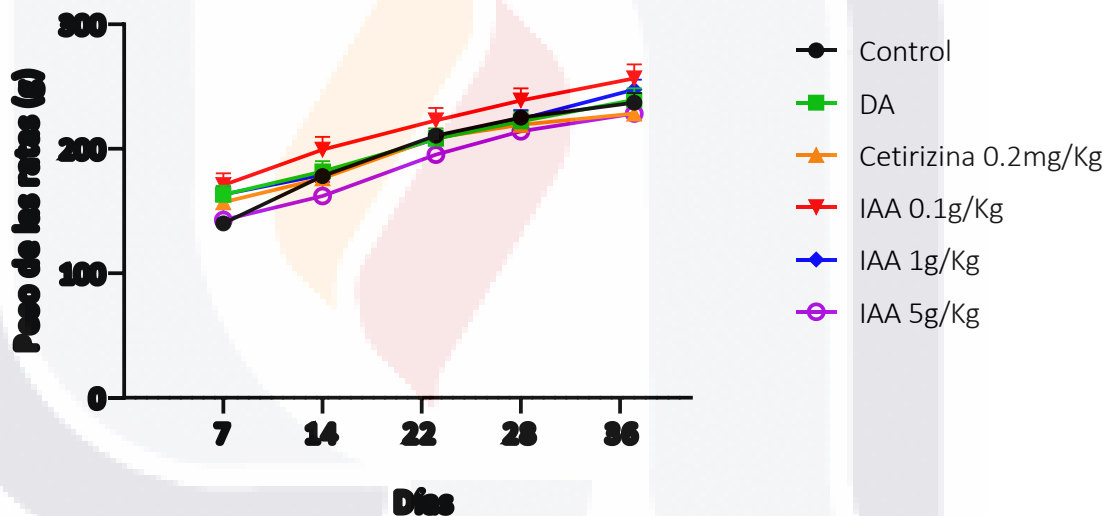


Figura 21. Peso de los animales los días 7, 14, 22, 28 y 36 del protocolo de inducción de DA experimental.

Respecto al grosor de la OD en comparación con OI, empleado como indicador del proceso inflamatorio inducido por DNCB, no se encontraron diferencias entre los seis grupos experimentales en el día 7, es decir, una semana después de la sensibilización (Figura 22A). Sin embargo, en el día 14, tras la primera sensibilización tópica (Figura 22B), se evidenció un incremento en el grosor de las orejas en los animales con DA respecto al grupo control, particularmente a la hora de haber aplicado el alérgeno. De manera interesante, los grupos destinados a recibir IAA a 1 g/Kg y 5 g/Kg

mostraron un proceso inflamatorio ligeramente mayor al del grupo DA en ese mismo tiempo. Es importante remarcarque aún no se había iniciado la administración del tratamiento.

En el día 22 (Figura 22C), los cuatro grupos con DA mostraron un incremento inflamatorio más pronunciado que el grupo control, con aumentos promedio del grosor cutáneo que oscilaron entre 0.30-0.33 mm, 0.46-0.56 mm, 0.35-0.42 mm y 0.31-0.38 mm a las 0, 1, 6 y 24 horas posteriores a la quinta sensibilización tópica, respectivamente. Posteriormente, en el día 28 (Figura 22D), se registró una diferencia significativa entre el grupo DA y el grupo control, con valores promedio de 0.23 mm y 0.01 mm, respectivamente. Finalmente, en el día 36, tras el último reto con DNCB (Figura 22E), los animales con DA alcanzaron incrementos promedio de 0.41 mm, 0.28 mm y 0.25 mm a las 1, 6 y 24 horas, mientras que los controles mostraron 0.057 mm, 0.084 mm y 0.022 mm, respectivamente. En este punto, el grupo tratado con IAA a 0.1 g/Kg presentó una reducción en el grosor de la oreja del 35% y 31% a la 1 y 6 horas, respectivamente, mientras que el grupo tratado con cetirizina (0.2 mg/Kg) mostró una reducción del 50% a la hora de la aplicación del reto, en comparación con los animales con DA sin tratamiento.

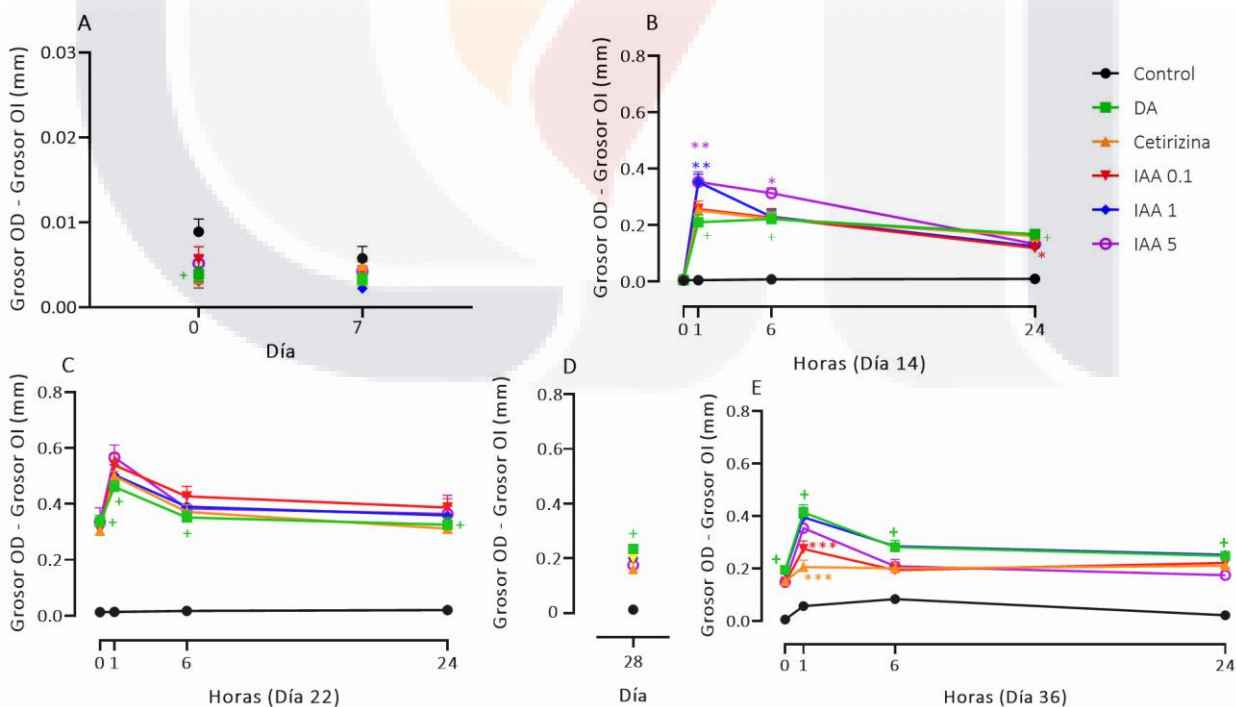


Figura 22. Incremento en el grosor de las orejas de las ratas Wistar con DA inducida por DNCB y tratadas con IAA. La evaluación se realizó en los días 0, 7 (A), 14 (B), 22 (C), 28 (D) y 36 (E). + $p < 0.0001$ vs Control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs DA, *post hoc* Dunnett.

En cuanto al edema en las orejas (Figura 23A), a la hora del reto con DNCB en el día 36, el grupo DA presentó un valor 3.5 veces mayor al control, mientras que el grupo tratado con IAA a 0.1 g/Kg mostró una reducción de 1.7 veces respecto al grupo DA. No obstante, a las 24 horas posteriores al reto (Figura 23B), el edema en el grupo DA fue 5.5 veces mayor al del grupo control, y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con la IAA o cetirizina respecto al grupo DA.

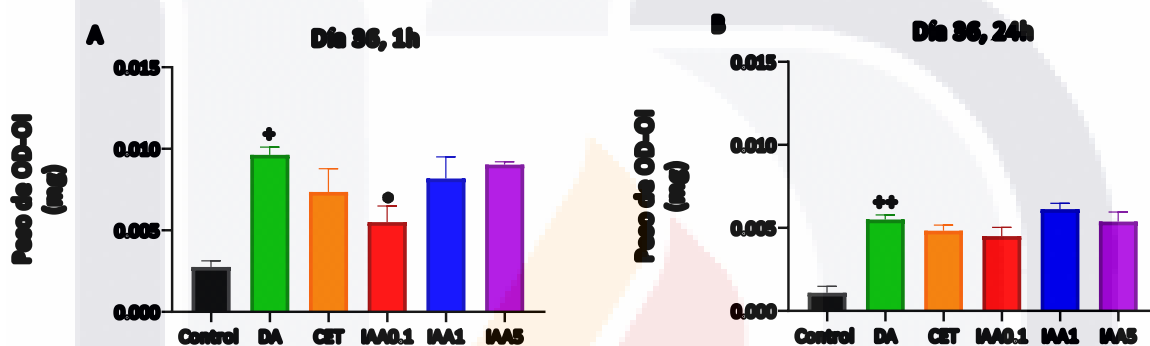


Figura 23. Peso de orejas a la hora de haber aplicado el DNCB (A), peso de orejas a las 24 horas de haber aplicado el DNCB (B); + $p < 0.001$, ++ $p < 0.0001$ vs control, * $p < 0.05$ vs DA, *post hoc* Dunnett

Finalmente, al analizar el peso del bazo (Figura 24) de los animales, parámetro utilizado por algunos autores para evaluar respuesta inflamatoria en modelos experimentales (Kim *et al.*, 2020), no se observaron diferencias entre los grupos experimentales.

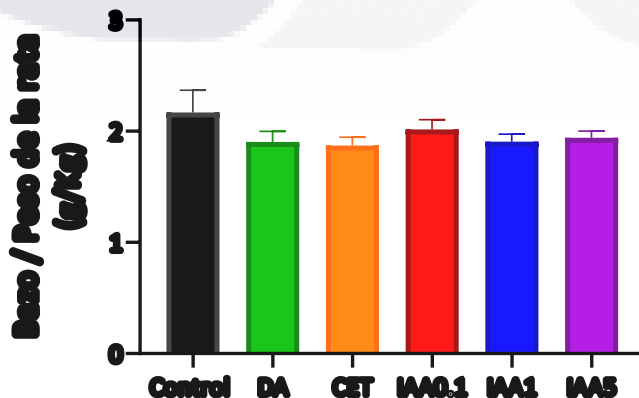


Figura 24. Peso del bazo respecto al peso de las ratas *post hoc* Dunnett.

Los resultados muestran que el modelo reproduce fielmente la respuesta bifásica típica de la DA: una inflamación inmediata asociada a la respuesta Th2 en la fase aguda (1-6 horas tras el contacto con el alérgeno) y una respuesta tardía vinculada a la activación Th1 en fases crónicas (a partir de las 24 horas). Es relevante destacar que desde el día 22 y en el tiempo 0 (antes de aplicar el DNCB), los animales con DA ya presentaban un aumento en el grosor de las orejas respecto al grupo control, lo cual refleja la persistencia de un proceso inflamatorio basal generado por la respuesta alérgica subyacente.

7.4 Efecto de los tratamientos con IAA sobre el prurito de los animales

Una de las manifestaciones más relevantes de la DA es el prurito intenso, el cual provoca que los animales se rasquen de manera constante, agravando así el daño cutáneo. Este fenómeno ocurre porque los queratinocitos y las células del sistema inmune activadas liberan citocinas y factores de crecimiento que sensibilizan a las neuronas sensoriales responsables de generar la percepción de picazón (Kim *et al.*, 2018). En nuestro modelo, los animales con DA registraron en promedio 69 y 53 episodios de rascado a los 10 minutos posteriores a la aplicación de DNCB en los días 22 y 36, respectivamente, mientras que los animales control solo presentaron 8 y 2 eventos (Figura 25). Estos datos reflejan un incremento de aproximadamente 7 y 25 veces en la conducta de rascado inducida por la exposición repetida al DNCB. Entre los días 22 y 36 no se observaron variaciones significativas en la frecuencia de rascado dentro de los grupos control y DA, dado que ambos recibieron únicamente agua. En contraste, las ratas tratadas con cetirizina mostraron una disminución del 43 % en los eventos de rascado para el día 26 en comparación con el día 22 ($P < 0,01$), lo que confirma su acción antipruriginosa. Por otro lado, la administración oral de IAA no produjo cambios en la frecuencia de rascado tras 13 días de tratamiento, independientemente de la dosis evaluada.

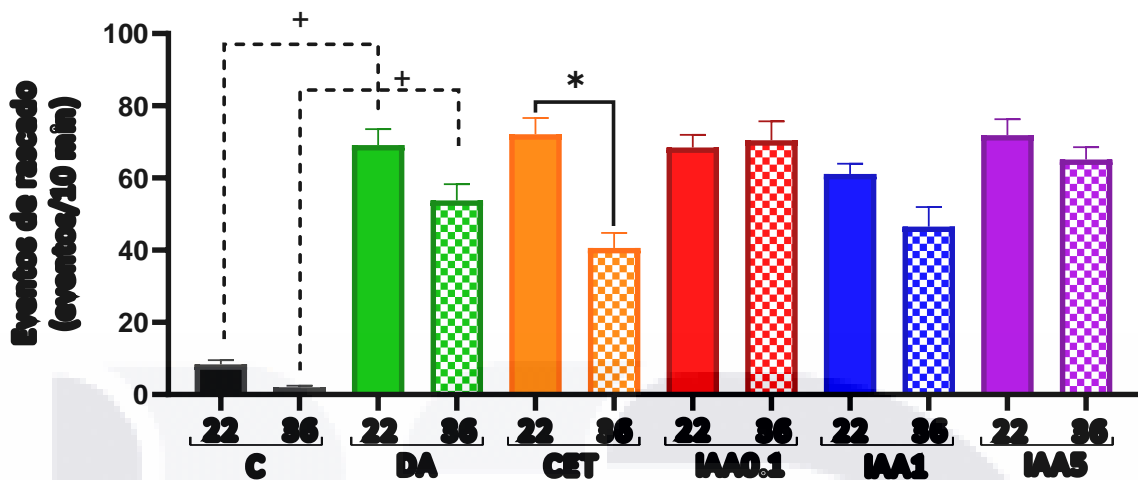


Figura 25. Eventos de rascado de los animales en los días 22 y 36 del protocolo experimental. ANOVA una vía *post hoc* Tukey. + $P < 0.0001$ y * $p < 0.01$.

7.5 Efecto de los tratamientos con IAA sobre el grosor de la epidermis en las lesiones de DA

En la figura 26A se muestran imágenes representativas de los cortes de tejido de las orejas de los animales de los 6 grupos que integran el protocolo y que fueron teñidos con H&E. En ellas podemos observar que en los animales del grupo DA (con DA y sin tratamiento) hubo un engrosamiento de la epidermis, en comparación con los animales controles. Las imágenes de los cortes de tejido de las orejas de los animales que recibieron los tratamientos con IAA y cetirizina, muestran un menor engrosamiento de la epidermis al comparar con el grupo DA. Al realizar el análisis morfométrico (figura 26B) vemos que la epidermis de los animales control tuvo 26 μm de grosor y con el desarrollo de la DA casi se duplicó el grosor, teniendo valores de 46 μm . En los grupos con tratamiento se observó que la cetirizina redujo en un 26% el engrosamiento que se generó como consecuencia del desarrollo de la DA y en el caso de las inulinas la mayor reducción se encontró con la IAA a una dosis de 0.1g/Kg ya que redujo el grosor en un 41%, sin embargo, también fueron significativos los grupos tratados con la inulina a dosis de 1 y 5g/Kg que disminuyó en un 26% y 19% respectivamente en engrosamiento de la epidermis.

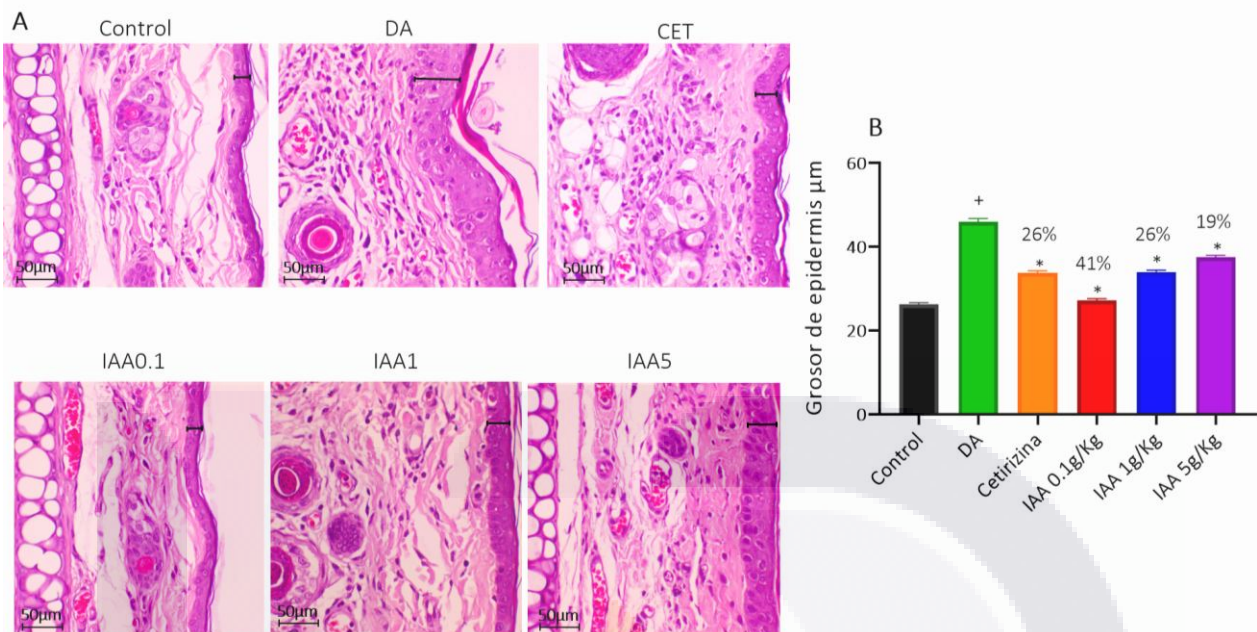


Figura 26. Grosor de epidermis en las lesiones de DA a las 24 horas de aplicar el alérgeno. A) Imágenes representativas de cortes de las orejas de los animales teñidos con H&E; B) Análisis del grosor de la epidermis. + $p < 0.0001$ vs control, * $p < 0.0001$ vs DA, *post hoc* Dunnett.

7.6 Efecto de los tratamientos con IAA sobre la cantidad de mastocitos y eosinófilos en la dermis.

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento con IAA sobre el daño tisular, se realizó la cuantificación de mastocitos y eosinófilos dérmicos en las zonas lesionadas de la piel. Para ello, se emplearon tinciones histológicas con azul de toluidina y hematoxilina/eritrosina B en cortes de oreja obtenidos 24 horas después de la exposición al DNCB.

En relación con las células inflamatorias, se observó que el número de mastocitos presentes en la dermis fue considerablemente mayor que el de eosinófilos (Figura 27A). Por esta razón, los mastocitos se contabilizaron dentro de un área dérmica definida, mientras que los eosinófilos se cuantificaron a lo largo de toda la sección histológica (Figuras 27B y 27C). Las ratas con DA mostraron un incremento significativo en ambos tipos celulares en comparación con los animales control, lo que confirma la activación inflamatoria inducida por la exposición repetida a DNCB.

Sin embargo, la administración oral de cetirizina y de IAA en distintas dosis logró atenuar este efecto. En el caso de la cetirizina, se observó una disminución del 42 % en mastocitos y del 61 % en eosinófilos. De manera similar, el tratamiento con IAA a 0.1 g/kg redujo en un 67 % la cantidad de ambos tipos celulares, mientras que la dosis de 1 g/kg disminuyó los mastocitos en un 32 % y los eosinófilos en un 69 %. Por su parte, la dosis más alta (5 g/kg) solo tuvo un efecto significativo sobre la hiperplasia de mastocitos (42 %). Es importante destacar que los animales tratados con la dosis más baja de IAA presentaron valores de células inflamatorias dérmicas muy similares a los observados en el grupo control, lo que sugiere que no hay un efecto protector dosis-dependiente frente a la respuesta inflamatoria cutánea.

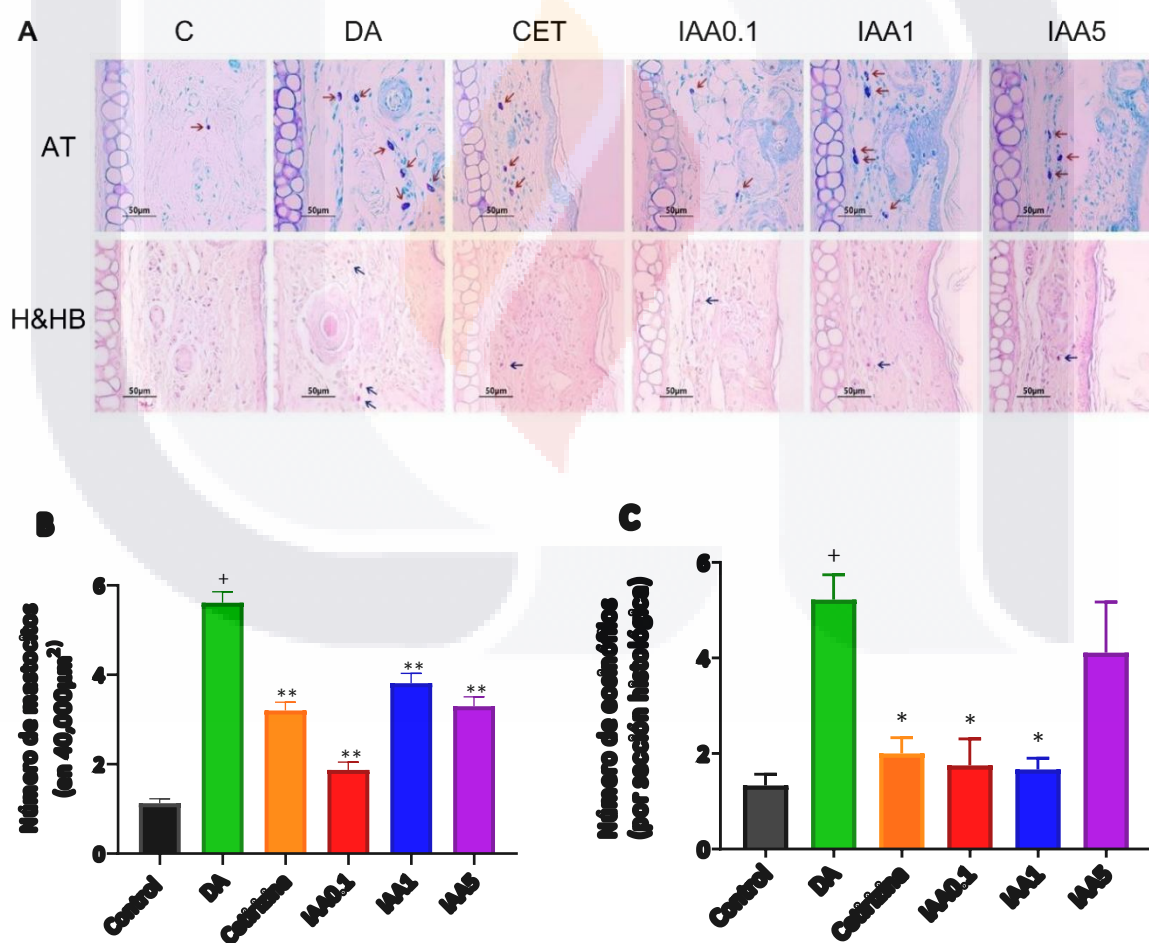


Figura 27. Células inflamatorias en dermis. A. Imágenes representativas de los cortes histológicos de tejido lesionado de orejas de los animales teñidos con azul de Toluidina (AT) y con Hematoxilina y Eritrosina B (H & EB). B. Conteo de

mastocitos en tejido teñido con azul de toluidina 24h después de aplicar DNCB. C. Conteo de eosinófilos en tejido teñido con hematoxilina y eritrosina B 24h después de aplicar DNCB. + $p < 0.0001$ vs Control, * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$ vs DA, *post hoc* Dunnett.

7.7 Histamina sérica en animales controles y con DA

Considerando que la DA es una patología de origen alérgico, se evaluaron los niveles de histamina sérica en animales sin inmunizar (preimmune), control y con DA. Como se muestra en la figura 28, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de histamina en suero de los animales de los tres grupos, lo que indica que la inflamación local inducida por el alérgeno no modificó los niveles sistémicos de histamina en nuestro modelo experimental.

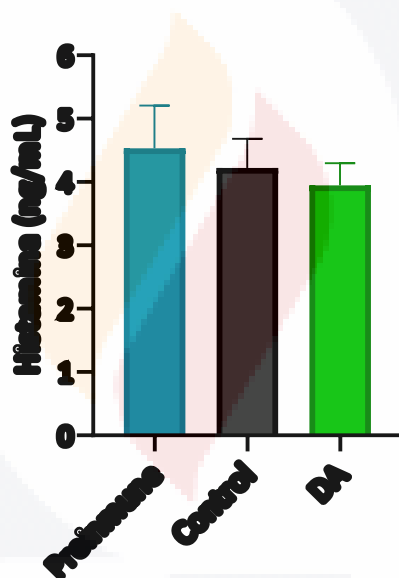


Figura 28. Nivel de histamina sérica del día 36 a la hora de haber aplicado el DNCB

7.8 Efecto de los tratamientos sobre los niveles de histamina en suero y tejido lesionado de animales con DA

Debido a que los tratamientos redujeron la hiperplasia de mastocitos en la dermis y estas células liberan histamina al activarse con el alérgeno, se consideró evaluar cambios en los niveles de histamina sérica en los animales con tratamiento. Inicialmente, se analizó la concentración de histamina en el suero de los animales obtenido una hora después de aplicar el alérgeno en la oreja.

En la figura 39A, podemos observar que no hubo diferencias en la concentración de histamina en suero entre los animales con DA y los animales control, ni entre cualquiera de los grupos de nuestro protocolo. En base a estos resultados y considerando que la reacción alérgica cutánea ocurría en la oreja, se decidió evaluar si había cambios en la concentración de histamina en el tejido afectado. Para ello se homogeneizó el tejido y en el sobrenadante obtenido se cuantificaron los niveles de histamina, reportando los valores por gramo de tejido total procesado (Figura 29B) o bien por concentración total de proteína en la muestra (Figura 29C); esto con la finalidad de normalizar los valores ya que los fragmentos de tejido obtenidos de la oreja de cada animal presentaron pequeñas variaciones en peso y tamaño. Tal y como se muestra en las gráficas 30B y 30C, tampoco hubo cambios en los niveles de histamina en tejido de la oreja entre los animales controles, los animales con DA y los animales con DA y tratados.

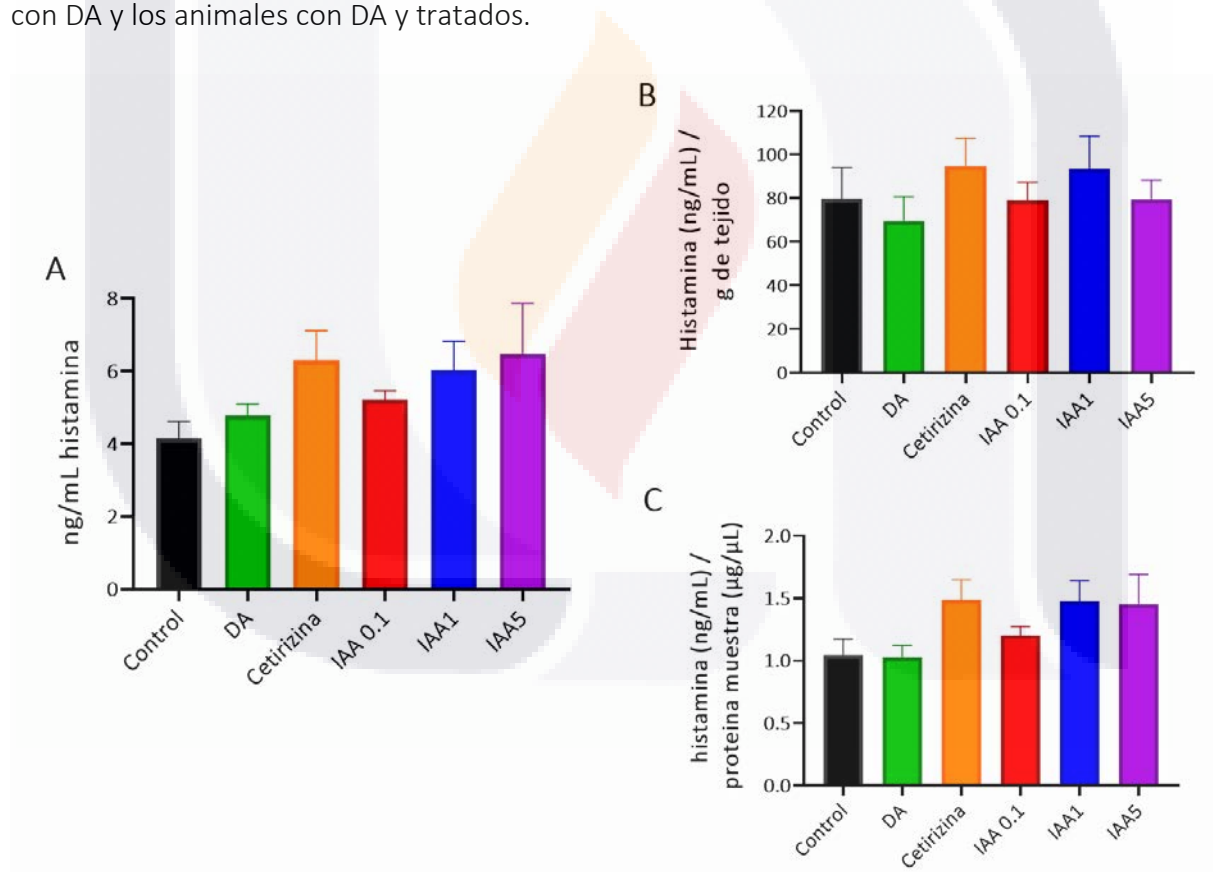


Figura 29. Cuantificación de histamina. A) en suero (ng/μL), B) por gramo de tejido de la oreja, C) por concentración de proteína total de la muestra.

7.9 Efecto de los tratamientos con IAA sobre los niveles de IgE en suero

El análisis de los cambios en las concentraciones de IgE de los sueros obtenidos de los diferentes grupos a las 24 hora de haber aplicado el alérgeno se muestra en la figura 30. En el grupo Control se obtuvo una concentración de IgE de 554 ng/mL, mientras que en el grupo DA se encontró un incremento significativo de casi el triple que el control con una concentración de 1,578 ng/mL como se esperaba en esta patología; en el grupo tratado con Cetirizina se observó una disminución en las concentraciones de IgE, pero no es significativa, la cual corresponde a 1,035 ng/mL. De manera importante, en el grupo tratado con IAA a 0.1 g/Kg hubo una disminución significativa de la concentración de IgE de 54% equivalente a 731 ng/mL lo cual demuestra que la administración vía oral de la IAA a esta concentración tiene un efecto favorable dentro de un cuadro de dermatitis. Por otra parte, en los grupos tratados con IAA a 1 y 5 g/Kg las concentraciones de IgE fueron inferiores a las del grupo DA, aunque la disminución no fue significativa (1,215 y 1,420 ng/mL respectivamente).

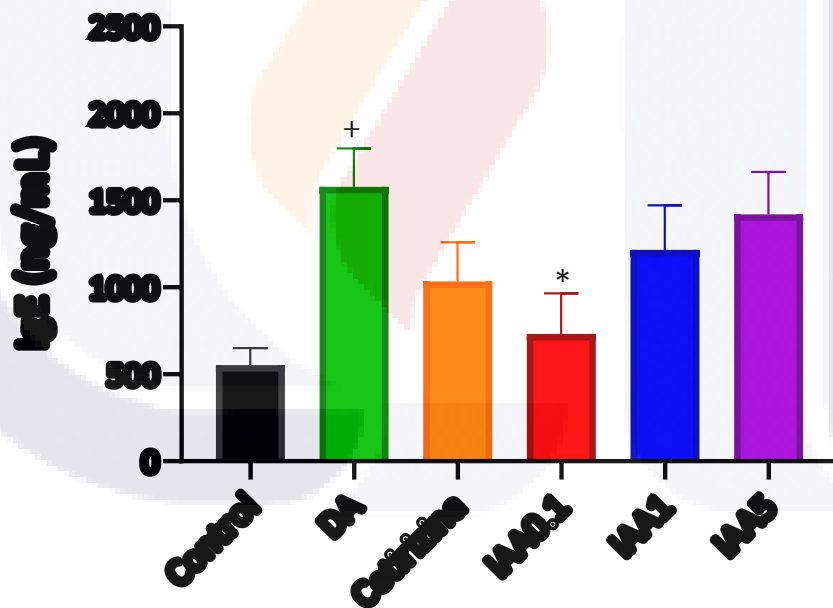


Figura 30. Nivel de IgE sérica el día 36, a las 24 hora de haber aplicado el DNCB. +p<0.05 vs Control, *p<0.05 vs DA *post hoc* Dunnett.

7.10 Identificación de filagrina e involucrina en tejido de oreja de rata Wistar

Se realizó el proceso de estandarización de la detección de las proteínas clave en la integridad de la barrera cutánea filagrina e involucrina mediante la técnica de western blot. Se utilizaron muestras de orejas de ratas Wistar sanas para ajustar las concentraciones óptimas de los anticuerpos. Para realizar la cuantificación relativa se utilizó como proteína constitutiva GAPDH. En la figura 31 se muestran los resultados obtenidos en el proceso de estandarización; en la figura 31A, se muestra el resultado final de la estandarización de la detección de GAPDH. Se detectó una banda proteica con un peso molecular de 36 kDa, correspondiente al reportado para GAPDH, para lo cual se probaron diferentes diluciones del anticuerpo primario y la dilución óptima fue de 1:20,000.

La detección de la proteína filagrina se obtuvo usando anticuerpos específicos a una dilución de 1:500. En la figura 31B se observa la detección de la filagrina la cual tiene un peso molecular de 23 kDa (Kitazawa *et al.*, 2021); sin embargo, también se observan bandas mayores a 23 kDa que pueden deberse a filagrina en diferentes grados de polimerización (Yuki *et al.*, 2013).

Finalmente se estandarizó la identificación de involucrina (figura 31C). Se detectó una banda proteica con un peso molecular de 67 kDa, correspondiente al reportado para la proteína y utilizando el anticuerpo primario a una dilución de 1:500.

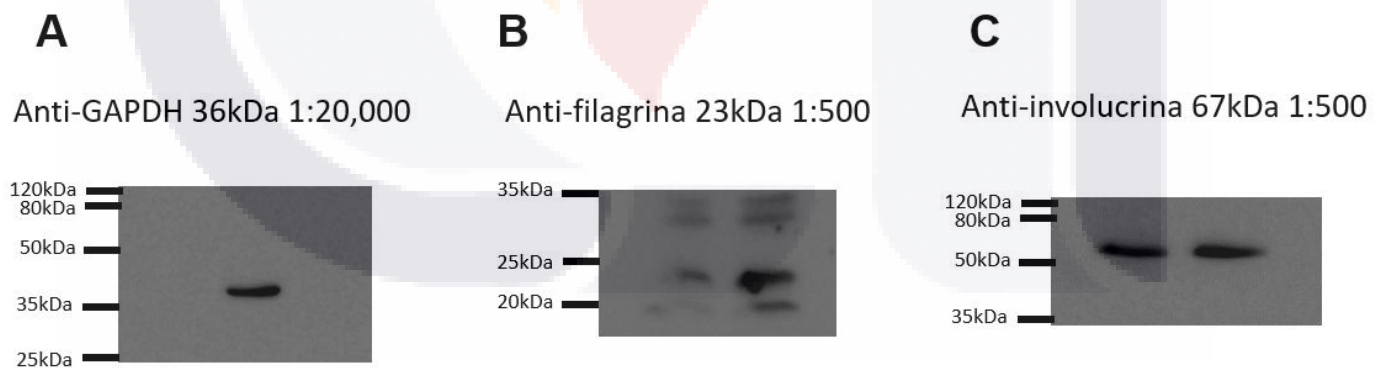


Figura 31. Estandarización de diluciones de anticuerpos óptimas para la detección de A) GAPDH, B) filagrina, C) involucrina.

7.11 Efecto de los tratamientos con IAA sobre el nivel de expresión de filagrina e involucrina en las lesiones de DA

Se realizó la detección de involucrina y filagrina las cuales son dos proteínas muy importantes para la

integridad de la barrera cutánea. Para la cuantificación relativa se utilizó GAPDH como proteína constitutiva. No se observaron cambios significativos en el nivel de expresión de ambas proteínas (figura 32A y 32B) entre los grupos experimentales.

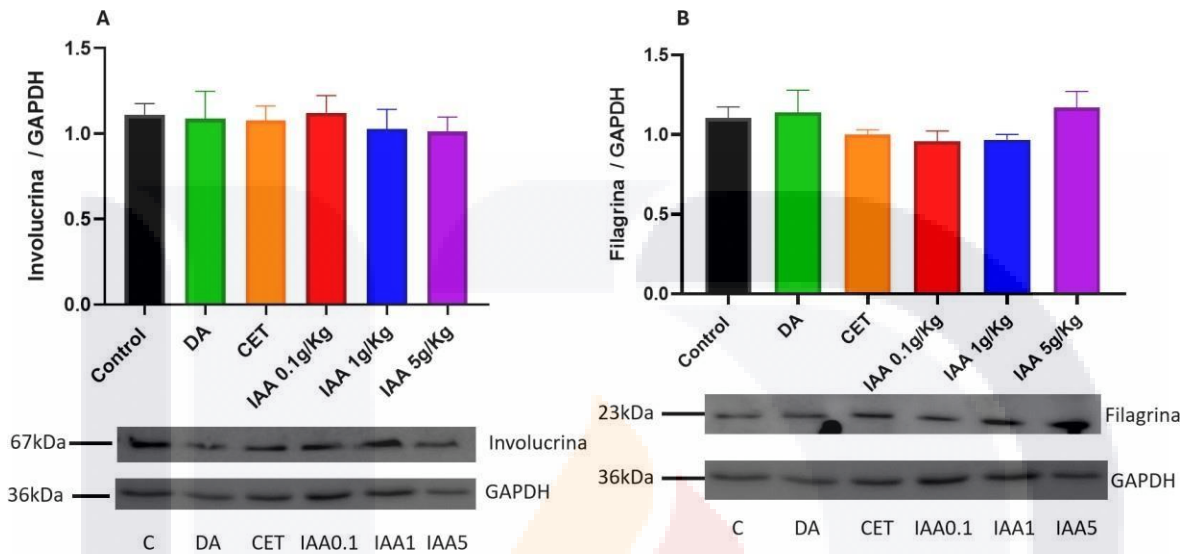


Figura 32. Expresión relativa de A) involucrina y B) filagrina en muestras de piel de animales con DA y tratados con IAA.

7.12 Efecto de los tratamientos con IAA sobre la disbiosis en la microbiota cutánea en zonas lesionadas

La disbiosis cutánea en los pacientes con DA se caracteriza por un incremento en la cantidad de bacterias del género *Staphylococcus*, siendo la colonización de la piel por *S. aureus* uno de los cambios más representativos, patógeno oportunista asociado a complicaciones y severidad en las lesiones; aunado a la disminución de especies benéficas en piel, como *S. epidermidis*, bacteria comensal muy abundante en piel sana que produce sustancias que mantienen la integridad de la barrera cutánea y evita el crecimiento de *S. aureus*. Como podemos observar en la figura 33, *S. epidermidis* estuvo presente en la piel sana de los animales controles en mayor cantidad que *S. aureus*. Sin embargo, esta relación se invirtió en las lesiones de los animales con DA, en los que se incrementó significativamente la cantidad de *S. aureus* y disminuyó la biomasa de *S. epidermidis*. Los tratamientos con IAA generaron una disminución significativa de *S. aureus* en la piel lesionada, acompañado por un aumento en *S. epidermidis*, presentando valores semejantes al grupo control. El tratamiento con cetirizina no modificó la cantidad de *S. aureus* y *S. epidermidis* en la piel de los animales con DA.

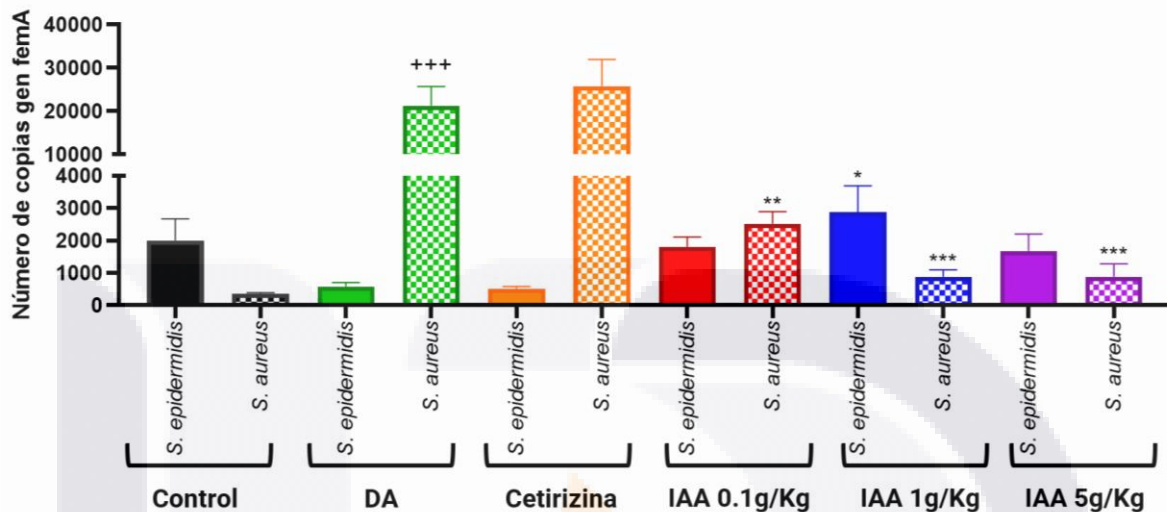


Figura 33. Cantidad de *S. aureus* y *S. epidermidis*. +++p<0.001 vs control, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs DA, *post hoc* Dunnett.

7.13 Efecto de los tratamientos con IAA sobre la expresión génica de factores de transcripción relacionados con la polarización de células inmunes hacia perfiles inflamatorios en oreja y NML

Se analizaron los factores de transcripción T-bet, GATA3, RORγt y Foxp3, los cuales están asociados a los perfiles Th1, Th2, Th17 y T regulador, perfiles celulares que están alterados en enfermedades como la DA. Su expresión se analizó tanto en tejido de oreja (Figura 34) como en NLM (Figura 36). En el tejido lesionado de la oreja de los animales DA (figura 34A), la expresión de T-bet, GATA3 y RORγt aumentó significativamente respecto al grupo control, lo cual indica que la respuesta inmunológica tipo DA se desarrolló adecuadamente en los animales. En cuanto a los grupos con tratamiento, solo se observaron cambios significativos en el nivel de expresión de GATA3 y RORγt. Con relación al factor GATA3, en los grupos tratados con IAA a una concentración de 0.1 y 1g/kg se observó una disminución en la expresión del 11% y 27% respectivamente en comparación con el grupo DA; en relación al factor RORγt, la expresión disminuyó en un 33%, 55% y 27% en los grupos tratados con las tres concentraciones de IAA (0.1, 1 y 5g/kg) respecto al grupo DA. Debido a que estos dos perfiles mostraron disminución significativa de la expresión se decidió analizar una citocina representativa de cada perfil, en el caso del perfil Th2 se analizó la IL-4 (figura 34B) y para el perfil

Th17 la IL-17 (figura 34C), ambas citocinas proinflamatorias. La expresión de IL-4 disminuyó en los grupos tratados con IAA a una concentración de 1 y 5g/Kg en un 56% y 17% respectivamente comparados con el grupo DA. También se observó una disminución de la expresión de IL-17 en todos los grupos que fueron tratados tanto como con cetirizina como con IAA en sus tres concentraciones; en este caso el porcentaje de disminución fue de 16% para los grupos tratados con cetirizina y con IAA a 5g/Kg, de 47% para el grupo tratado con IAA al 0.1g/Kg y de 43% para el grupo al que se le administró IAA a 1g/Kg.

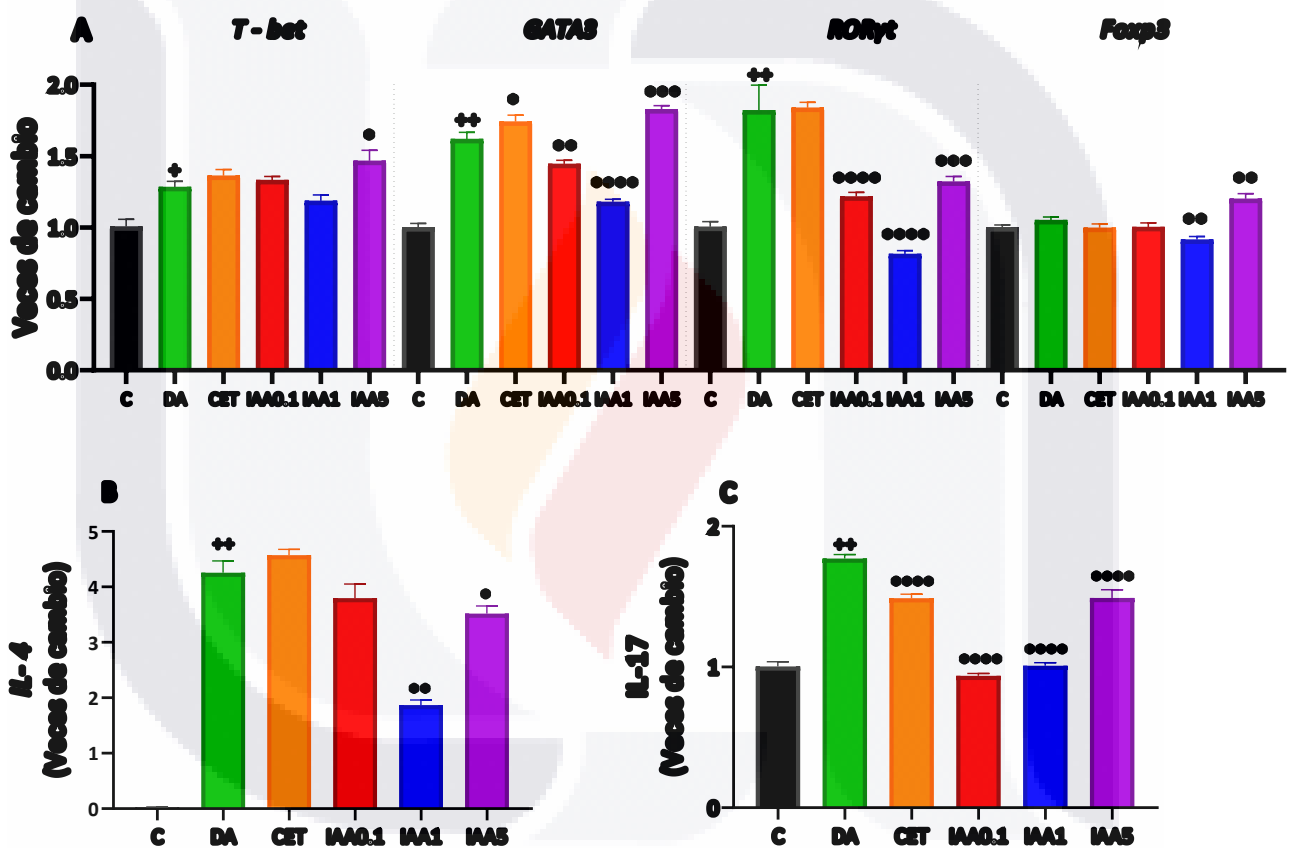


Figura 34. A) Expresión de factores de transcripción, B) de IL-4 y C) de IL-17 en tejido de oreja. +p<0.001, ++ p<0.0001 vs C; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs DA *post hoc* Dunnett.

En los NLM de los animales del grupo DA (figura 35A) solo hubo aumento de la expresión del factor RORγt respecto al grupo control. En los demás factores de transcripción analizados no se presentó cambio entre grupos DA y controles. Con relación a los tratamientos, la expresión del factor regulador Foxp3 se aumentó en los tres grupos tratados con IAA en sus tres concentraciones (0.1, 1 y 5g/Kg), aumentando 2.3, 2.4 y 1.9 veces respectivamente comparados con el grupo DA. También se duplicó

la expresión de T-Bet en los NLM de los animales tratados con 0.1 y 1g/Kg de IAA. Al analizar la expresión de dos citocinas propias del perfil T regulador se observó que en IL-10 (figura 35B) la expresión aumentó 3.4 veces en los grupos en los que se les administró IAA a una concentración de 0.1 y 1g/Kg y al administrar IAAa 5g/Kg aumentó 6 veces la expresión. En cuanto a la expresión de TGF-β (figura 35C) aumentó 12.5 veces en el grupo tratado con IAA a 0.1g/Kg, 11 veces con la IAA a 1g/Kg y 18 veces cuando a los animales se les administró IAA a 5g/Kg, todo esto respecto al grupo DA.

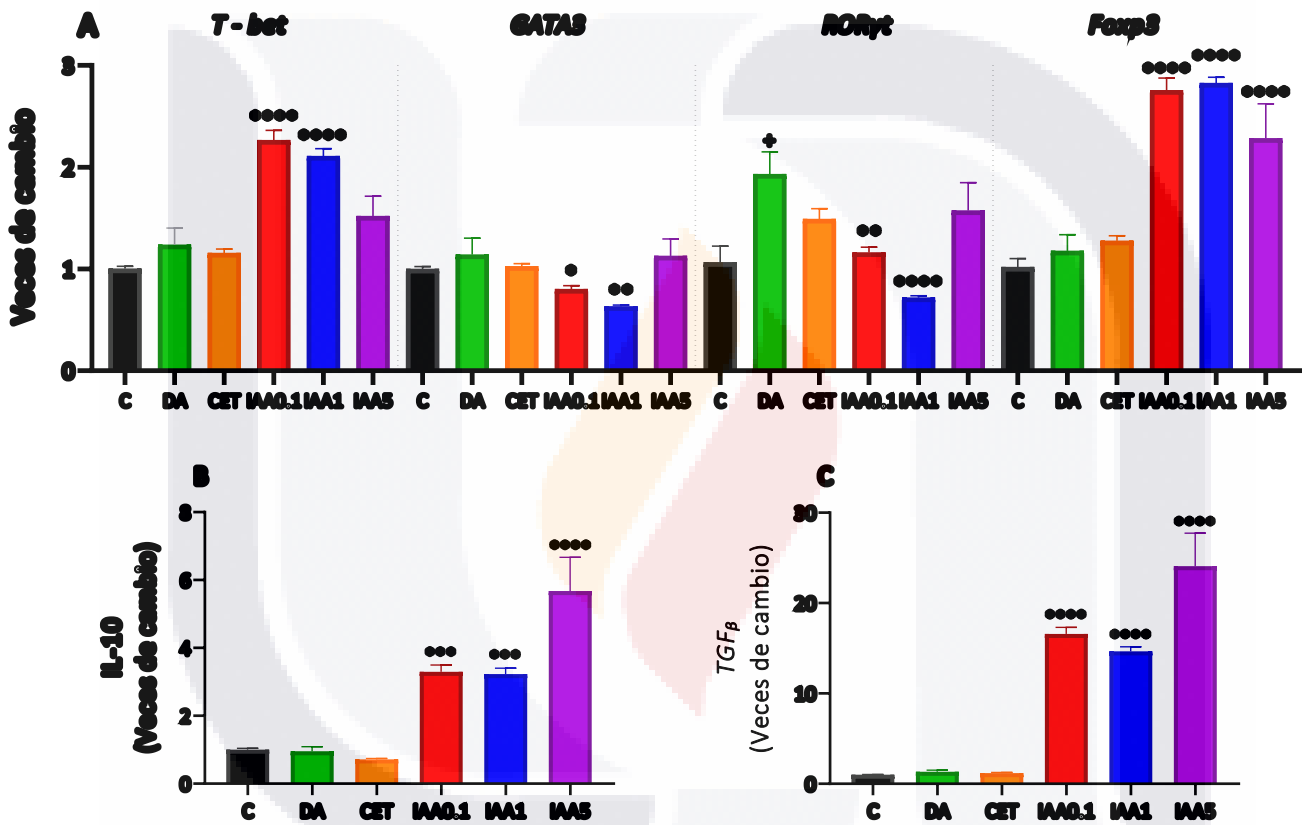


Figura 35. A) Expresión de factores de transcripción, B) de IL-10 y C) de TGF-β en NLM. +p<0.01 vs C; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs DA, *post hoc* Dunnett.

7.14 Efecto de los tratamientos con IAA sobre los principales filos bacterianos de la microbiota fecal

Por una comunidad compleja de microorganismos, donde predominan 4 filos Bacillota, Bacteroidota, Pseudomonadota y Actinomycetota. En individuos sanos, los filos Bacillota y Bacteroidota representan aproximadamente el 90% de la microbiota intestinal total, mientras que

Actinobacteriota y Proteobacteria se encuentran en menor proporción (Rinninella et al., 2019). en donde esta, puede alterarse causando un desequilibrio conocido como disbiosis, la cual es causada por el estilo de vida o bien cuando están presentes algunas enfermedades como es el caso de la DA. En la figura 36 se muestra el análisis de los 4 filos predominantes, en donde no hubo diferencias significativas en el grupo DA respecto al grupo control en ninguno de los filos. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas en Bacillota en los animales que recibieron las inulinas, mostrando un aumento en los grupos tratados con IAA a una concentración de 1 y 5 g/kg. En Bacteroidota no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos. En las Pseudomonadota hubo una disminución significativa en los grupos que fueron tratados con IAA a las tres dosis. Finalmente, las Actinomycetota mostraron un aumento en el grupo tratado con IAA a una concentración de 0.1 g/kg, todo esto respecto al grupo DA.

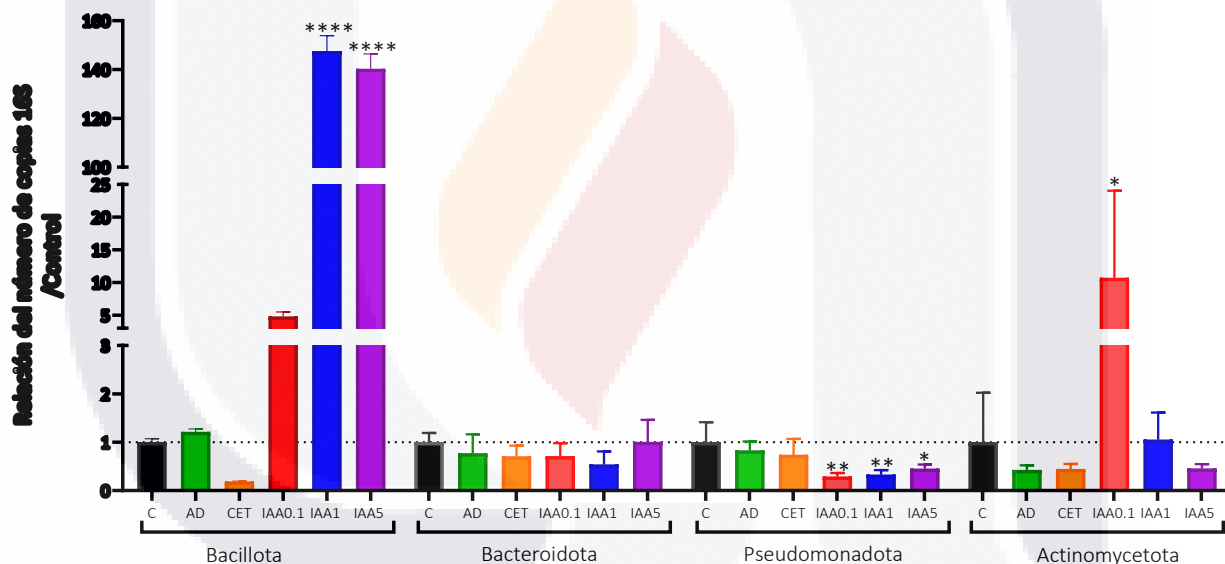


Figura 36. Abundancia relativa de cantidad de bacterias en muestras fecales pertenecientes a los filos Bacillota, Bacteroidota, Pseudomonadota, y Actinomycetota. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ vs AD, *post hoc* Dunnett.

8. Discusión

Actualmente, la comprensión de la DA ha evolucionado hacia un enfoque mucho más amplio, en el que la comunicación entre el intestino y la piel juega un papel central. Cada vez hay más evidencia de que las alteraciones en la microbiota intestinal pueden repercutir directamente en la salud cutánea, favoreciendo la inflamación persistente, la disfunción de la barrera

epidérmica y la colonización por microorganismos oportunistas característicos de la enfermedad (Rios-Carlos *et al.*, 2024, Wrześniewska *et al.*, 2024). Bajo esta perspectiva, la modulación del microbiota ya sea mediante prebióticos, probióticos o intervenciones dietéticas se ha propuesto como una herramienta prometedora para restaurar el equilibrio inmunológico y reducir la severidad de la DA (Zhao *et al.*, 2025). En este estudio se evaluó los efectos de la IAA administrada por vía oral, un prebiótico de origen vegetal con potencial para reestablecer la homeostasis microbiana, en un modelo de DA. Los resultados obtenidos, tanto a nivel clínico como inmunológico y microbiano, nos permiten discutir cómo la intervención sobre la microbiota puede impactar en los mecanismos que sostienen la inflamación atópica y qué implicaciones terapéuticas pueden derivarse de ello.

Los resultados obtenidos sobre el efecto prebiótico *in vitro* de diferentes IAA sobre diferentes cepas de lactobacilos demuestran que las inulinas, particularmente IAA1, promovieron de manera significativa el crecimiento de las cepas de *L. rhamnosus* (Hansen, LM07) y de *L. plantarum* (LP-115, LM17 y LBH 1075) bajo condiciones de anaerobiosis, lo que se asocia con un incremento en la biomasa y una mayor acidificación del medio. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Rivière *et al.* (2016), quienes señalan que la estructura de las inulinas de cadena corta facilita su rápida fermentación por especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, favoreciendo la producción de AGCCs como el butirato. De forma similar, Roberfroid (2007) describió que el efecto prebiótico de las inulinas depende del grado de polimerización y de la capacidad de las bacterias para hidrolizar los enlaces β -(2 \rightarrow 1) fructosídicos. Por otro lado, un estudio más reciente de Falony *et al.* (2009) mostró que las diferencias en la respuesta al consumo de inulina entre cepas de *Lactobacillus* se relacionan con la expresión diferencial de enzimas fructosidasas, lo que podría explicar las variaciones observadas en el crecimiento entre las cepas evaluadas en este trabajo. En el caso de *L. plantarum* se ha demostrado que algunas cepas poseen operones inducibles como el operón fosRABCDXE que codifican β -fructosidasas asociadas a la membrana o extracelulares (familia GH32) y transportadores de azúcares, lo que les permite hidrolizar inulina y FOS enzimáticamente e internalizar los productos para su metabolización. Comparando 28 cepas de *L. plantarum* se identificó

actividad β -fructosidasa en sobrenadante y pared celular de dos cepas aisladas de alimentos fermentados, lo que sugiere una hidrólisis extracelular de inulina con conversión eficaz en unidades fermentables (Buntin *et al.*, 2016). Esto podría explicar por qué en nuestros ensayos las cepas de *L. plantarum* (LP-115, LM17, LBH1075) alcanzaron una biomasa relativamente elevada con la inulina IAA1, comparables a la obtenida con glucosa.

Por el contrario, en *L. rhamnosus* la capacidad para fermentar fructanos es más variable. Estudios donde se utilizaron FOS en diferentes cepas de *Lactobacillus* reportan que algunas, como *L. rhamnosus* y *L. casei*, únicamente hidrolizan oligofruktanos de bajo grado de polimerización; por ejemplo 1-kestosa, y muestran actividad β -fructosidasa detectada en sobrenadantes solo para ciertos FOS, pero no para cadenas más largas. (Endo *et al.*, 2012).

Asimismo, un trabajo de Carlson *et al.* (2018) demostró que la suplementación con inulina estimula selectivamente la expansión de géneros productores de lactato, reforzando su papel como sustrato preferencial para bacterias ácido lácticas. En conjunto, estos resultados confirman que las inulinas, especialmente las de menor grado de polimerización, pueden actuar como sustratos eficientes para *Lactobacillus*, favoreciendo su crecimiento y actividad metabólica, lo que respalda su potencial uso como prebióticos funcionales en formulaciones destinadas a modular el microbioma intestinal o cutáneo.

Respecto a la administración oral de IAA en ratas con lesiones tipo DA produjo una disminución significativa con las tres dosis administradas en el grosor de la oreja y la severidad de la inflamación en los animales con la dosis de 0.1g/kg. Estos hallazgos coinciden con estudios previos donde la suplementación con inulina moduló la respuesta inflamatoria en modelos murinos de enfermedades cutáneas, como la dermatitis y la psoriasis, en los que se reportó una reducción en el engrosamiento de la epidermis y una mejoría en los parámetros clínicos tras la administración de fibra prebiótica (Yoshida *et al.*, 2023; Kang *et al.*, 2023).

Es relevante destacar que en las primeras fases del protocolo experimental se observó un incremento inesperado en el grosor auricular en el grupo con IAA a 5 g/kg antes de iniciar el

tratamiento. Esto puede deberse a variaciones individuales en la respuesta inflamatoria inicial, lo que ha sido descrito previamente en modelos de inducción de dermatitis, donde la sensibilización con DNCB puede generar variabilidad en la magnitud de la respuesta inflamatoria (Kim *et al.*, 2019). Sin embargo, una vez iniciado el tratamiento, los efectos de la IAA fueron consistentes con los reportados en la literatura, mostrando propiedades antiinflamatorias a través de la modulación inmunológica.

Los eventos de rascado son un parámetro clave en la evaluación del prurito asociado a la DA, el cual está mediado principalmente por mastocitos, histamina y citocinas Th2 como la IL-4 (Kim *et al.*, 2019). En nuestro modelo, el tratamiento terapéutico con IAA no redujo significativamente los eventos de rascado, aunque sí se observó una reducción marcada en el conteo de mastocitos. Esto sugiere que, aunque la inulina disminuye la inflamación tisular, no necesariamente bloquea de forma directa las vías pruritogénicas, lo cual ha sido señalado en otros estudios con pre- y probióticos (Kang *et al.*, 2023).

El conteo de mastocitos mostró una reducción significativa en todos los grupos tratados con IAA en comparación con el grupo DA, siendo más notorio en la dosis de 0.1 g/kg. Esto coincide con lo descrito por Naik *et al.* (2015), quienes demostraron que la modulación de la microbiota cutánea puede disminuir la hiperplasia de mastocitos y con ello atenuar la inflamación local.

Respecto a la histamina, ésta ha sido tradicionalmente considerada un mediador clave del prurito y la inflamación en la DA. Los resultados de este trabajo indican que no se observaron incrementos significativos de histamina en suero, aun cuando los animales mostraron prurito y lesiones compatibles con DA. Este hallazgo coincide con observaciones clínicas previas en humanos, donde los niveles séricos de histamina no se correlacionan necesariamente con la severidad del prurito ni con la actividad inflamatoria de la enfermedad, debido a que su liberación es rápida, transitoria y altamente localizada (Kawakami & Galli, 2002, Bharti & Mishra, 2024). De hecho, se ha documentado que, en la DA, el prurito puede mantenerse por vías independientes de la histamina incluyendo IL-31, TSLP, neuropéptidos y mediadores lipídicos, lo

que explica por qué los antihistamínicos poseen beneficios limitados en el control del prurito crónico (Oetjen *et al.*, 2017; Hashimoto *et al.*, 2019).

Por otro lado, en nuestro estudio tampoco se detectó un aumento sostenido de histamina en tejido cutáneo. Esto coincide con informes recientes que discuten que, aunque la histamina puede contribuir a la disfunción de la barrera epidérmica y a la inflamación, su concentración basal en piel atópica no siempre es mayor que en piel sana, sino que su rol sería más relevante en momentos de desgranulación aguda o tras estímulos específicos (Gschwandtner *et al.*, 2012; De Benedetto *et al.*, 2015). De hecho, los estudios en modelos orgánico cutáneos humanos muestran que la histamina puede comprometer la diferenciación de queratinocitos y reducir la expresión de proteínas esenciales de la barrera, como filagrina e involucrina, lo que empobrece la integridad epidérmica aun sin niveles elevados constantes de histamina (Gschwandtner *et al.*, 2012).

En conjunto, estos resultados tanto séricos como tisulares sugieren que la histamina no es el principal mediador responsable del prurito ni de la inflamación crónica en este modelo de DA. Más bien, refuerzan la hipótesis de que otros ejes inflamatorios, tales como las citocinas tipo Th2, IL-31 o los mediadores neuro inmunes, tienen un papel predominante. Este panorama también podría explicar por qué la inulina de agave azul no modificó los niveles de histamina, mientras que sí moduló otros parámetros clínicos y microbianos. Por lo tanto, los hallazgos apoyan la necesidad de explorar un perfil más amplio de mediadores inflamatorios y pruritogénicos en futuras investigaciones, para comprender mejor la compleja red de señalización que sostiene la DA más allá de la histamina.

La concentración de IgE sérica se elevó significativamente en el grupo DA respecto al control, tal como se ha descrito en la literatura como un marcador clásico de DA (Kim *et al.*, 2019). De forma destacada, el grupo tratado con IAA a 0.1 g/kg mostró una disminución significativa del 54% en los niveles de IgE, lo que sugiere que la inulina puede modular la respuesta inmune sistémica. Estos hallazgos son consistentes con Kang y colaboradores (2023), quienes reportaron que la

administración de prebióticos redujo los niveles de IgE y promovió un perfil inmunológico más equilibrado.

El análisis histológico mostró que los grupos tratados con IAA tuvieron una reducción significativa en el grosor epidérmico en comparación con el grupo DA, siendo más notorio en la dosis de 0.1 g/kg. Además, se observó una tendencia hacia una mejor expresión de proteínas clave de la barrera cutánea, como filagrina e involucrina, aunque sin alcanzar diferencias significativas.

La pérdida de filagrina es una de las alteraciones más reportadas en pacientes con DA, lo que genera disfunción en la barrera cutánea (Kim *et al.*, 2019). Nuestros resultados sugieren que la IAA contribuye a restaurar parcialmente la homeostasis de la epidermis. Estudios previos en modelos animales y en humanos han mostrado que intervenciones prebióticas pueden mejorar indirectamente la expresión de proteínas estructurales en la piel a través de la regulación inmunológica y microbiana (Fölster-Holst, 2022).

El análisis de la microbiota cutánea reveló un aumento significativo de *S. aureus* y una disminución de *S. epidermidis* en los animales con DA, lo cual es consistente con lo descrito en pacientes humanos y modelos animales (Williams *et al.*, 2019). La administración de IAA logró revertir parcialmente este desequilibrio, disminuyendo *S. aureus* e incrementando *S. epidermidis*, lo que apoya la hipótesis de que los prebióticos pueden modular la microbiota cutánea de manera indirecta.

En cuanto a la microbiota intestinal, no se observaron cambios significativos entre los grupos control y DA, aunque sí se encontraron aumentos de Bacillota en los grupos IAA1 e IAA5, en Actinomycetota aumento en el grupo IAA0.1 y disminución de Pseudomonadota en los grupos tratados con IAA. Esto es relevante, ya que la microbiota intestinal se ha propuesto como un eje modulador del sistema inmune cutáneo, conocido como el eje intestino-piel (Zhu *et al.*, 2023).

La expresión de GATA3 y ROR γ t, factores transcripcionales clave implicados en la diferenciación de las células Th2 y Th17 y en su capacidad para producir citocinas distintivas, como IL-4 e IL-17, respectivamente (Zheng and Flavell, 1997, Ivanov *et al.*, 2006) disminuyó significativamente en

la piel lesionada de los grupos tratados con IAA, de igual manera las citocinas involucradas en ese perfil IL-4 e IL-17, lo que indica una reducción en las respuestas inflamatorias Th2 y Th17. En paralelo, se observó un aumento en la expresión de Foxp3 y en citocinas reguladoras en el microambiente intestinal, como IL-10 y TGF- β , lo que sugiere un favorecimiento hacia un perfil inmunorregulador. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Li *et al.*, 2024 ya que en su estudio en un modelo animal de enfermedad autoinmune del sistema nervioso central: EAE (por su nombre en inglés Experimental Autoimmune Encephalomyelitis), que corresponde a un modelo de esclerosis múltiple (EM), la administración oral de inulina aislada de *Artemisa Japónica* atenuó la severidad clínica de la EAE y redujo el número de células Th17 en cerebro y bazo. Paralelamente se observaron disminuciones en los niveles séricos de citocinas proinflamatorias como IL-17, IL-6 y TNF- α . Los autores atribuyen estos efectos al cambio en la composición de la microbiota intestinal, con incremento de bacterias beneficiosas y de producción AGCC, los cuales promueven un ambiente inmunorregulador. Esta disminución de la respuesta Th17 y efecto antiinflamatorio mediante modulación microbiana concuerda con nuestros resultados en donde la piel lesionada de animales con DA tratados con IAA se observa una reducción de los factores transcripcionales asociados a Th17 (ROR γ t) y de citocinas como IL-17, y a su vez un aumento de marcadores del perfil regulador (Foxp3, IL-10, TGF- β) en intestino. Por otro lado, en un modelo murino de alergia alimentaria, la ingesta combinada de fructanos de cadena corta y larga moduló la microbiota, aumentó la producción de AGCCs y disminuyó las respuestas alérgicas (Takahashi *et al.*, 2023). Finalmente, en otra revisión sobre los efectos inmunomoduladores de la inulina señalan mecanismos comunes: selección de bacterias productoras de AGCCs, fortalecimiento de la inducción de células T reguladoras (incremento de Foxp3, IL-10 y TGF- β) y supresión de poblaciones proinflamatorias como Th17 y sus citocinas (Sheng *et al.*, 2023). Aunque los modelos patológicos difieren, estos datos coinciden con que los fructanos pueden reorientar la respuesta inmune desde un perfil proinflamatorio hacia uno regulador, lo que podría explicar el beneficio terapéutico observado en nuestro modelo de dermatitis atópica.

9. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la DA inducida en el modelo de rata Wistar se asocia con un marcado proceso inflamatorio caracterizado por un incremento en el número de mastocitos, engrosamiento epidérmico, elevación de IgE sérica, desbalance en la expresión de factores de transcripción proinflamatorios y una alteración significativa de la microbiota cutánea, con predominio de las especies *S. aureus* sobre *S. epidermidis*. Estos hallazgos reproducen de manera consistente la fisiopatología descrita en pacientes con DA, lo que valida la pertinencia del modelo empleado en este trabajo.

La administración oral de la IAA ejerció un efecto inmunomodulador y protector frente a la inflamación cutánea, evidenciado por la disminución en el conteo de mastocitos, la reducción significativa del grosor epidérmico y la atenuación de los niveles de IgE, particularmente a dosis bajas (0.1 g/Kg). Asimismo, IAA moduló la expresión de factores de transcripción asociados a respuestas Th2 y Th17, reduciendo la producción de IL-4 e IL-17, y favoreciendo un perfil regulador a través del incremento de Foxp3 y de las citocinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β . Estos efectos sugieren que la IAA promueve una reprogramación del microambiente inmunológico hacia un estado menos proinflamatorio y con mayor capacidad de regulación.

Por otra parte, el análisis de la microbiota cutánea mostró que el tratamiento con IAA restauró el equilibrio entre *S. aureus* y *S. epidermidis*, en contraste con la cetirizina, que no modificó esta relación. Este efecto es relevante, dado el papel central que juega el desbalance microbiano en la perpetuación de la DA. En cuanto a la microbiota intestinal, se observaron cambios específicos en filos bacterianos que podrían estar relacionados con la capacidad de la IAA de modular la respuesta inmune sistémica.

La expresión de proteínas de la barrera epidérmica como filagrina e involucrina no presentó cambios significativos, lo que indica que los efectos protectores de la IAA podrían estar más relacionados con la modulación inmunológica y microbiana que con la restauración directa de la función barrera epidérmica.

En conjunto, los hallazgos de este trabajo aportan evidencia de que la IAA ejerce efectos benéficos sobre la inflamación, la respuesta inmune y la composición microbiana en un modelo experimental de DA. Estos resultados respaldan el potencial de la IAA como agente terapéutico alternativo o complementario para el manejo de la DA, destacando especialmente su capacidad de inducir un perfil regulador y restaurar el equilibrio microbiano de la piel.

10. Referencias

Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 76(3), 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>

Akdis, C. A., & Akdis, M. (2003). Immunological differences between intrinsic and extrinsic types of atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 33(12), 1618–1621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2003.01803.x>

Akdis, C. A., Arasi, S., & Hellings, P. W. (2023). Allergic inflammation: From phenotypes to endotypes to personalized medicine. *Nature Reviews Immunology*, 23(1), 19–33. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00799-6>

Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542–1553. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.009>

Álvarez-Chávez, J., Villamiel, M., Santos-Zea, L., & Ramírez-Jiménez, A. K. (2021). Agave By-Products: An Overview of Their Nutraceutical Value, Current Applications, and Processing Methods. *Polysaccharides*, 2(3), 720-743. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030044>

Ayala-Monter, M. A., Vázquez, C. V., Aguirre-Rivera, J. R., López, M. G., & Márquez-Aguirre, A. L. (2018). Inulin-type fructans from Agave: Structure, function, and potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 45, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.011>

Balaji, S. K., Balasundarasekar, B., Khuwaja, W. M., Dolan, K. M., & Dong, X. (2025). Antimicrobial Peptide Signaling in Skin Diseases. *JID innovations : skin science from molecules to population health*, 5(3), 100354. <https://doi.org/10.1016/j.xjidi.2025.100354>

Bharti, A., & Mishra, S. (2024). Histamine: Bridging Food and Atopic Dermatitis. *Medical Research Archives*, 12(11). doi:10.18103/mra.v12i11.6144

Bieber, T. (2020). Atopic dermatitis: An expanding therapeutic pipeline for a complex disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(8), 585–602. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0073-9>

Biedermann, L., Rogler, G., & Seibold-Schmid, B. (2015). The intestinal microbiota in inflammatory skin disorders. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 15(4), 390–395. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000180>

Bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P. J., & Zhu, Y. (2021). Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11691. <https://doi.org/10.3390/ijms222111691>

Bitschar, K., Sauer, B., Focken, J., Dehmer, H., Moos, S., Konnerth, M., Schilling, N. A., Grond, S., Kalbacher, H., Kurschus, F. C., Götz, F., Krismer, B., Peschel, A., & Schitteck, B. (2019). Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors. *Nature communications*, 10(1), 2730. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10646-7>

Brosseau, C., Selle, A., Palmer, D. J., Prescott, S. L., Barbarot, S., & Bodinier, M. (2019). Prebiotics: Mechanisms and Preventive Effects in Allergy. *Nutrients*, 11(8), 1841. <https://doi.org/10.3390/nu11081841>

Brown, M. M., & Horswill, A. R. (2020). *Staphylococcus epidermidis*: Skin friend or foe? *PLoS Pathogens*, 16(11), e1009026. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009026>

Brunner, P. M., Silverberg, J. I., Guttman-Yassky, E., Paller, A. S., Kabashima, K., Amagai, M., & Luger, T. (2022). Increasing understanding of the pathophysiology of atopic dermatitis:

Implications for management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 149(1), 47–69.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.11.001>

Buntin, N., Hongpattarakere, T., Ritari, J., Douillard, F. P., Paulin, L., Boeren, S., Shetty, S. A., & de Vos, W. M. (2016). An Inducible Operon Is Involved in Inulin Utilization in *Lactobacillus plantarum* Strains, as Revealed by Comparative Proteogenomics and Metabolic Profiling. *Applied and environmental microbiology*, 83(2), e02402-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02402-16>

Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B., & Slavin, J. L. (2018). Health Effects and Sources of Prebiotic Dietary Fiber. *Current developments in nutrition*, 2(3), nzy005.
<https://doi.org/10.1093/cdn/nzy005>

Cervantes-García, D., Jiménez, M., Rivas-Santiago, C. E., Gallegos-Alcalá, P., Hernández-Mercado, A., Santoyo-Payán, L. S., Loera-Arias, M. J., Saucedo-Cardenas, O., Montes de Oca-Luna, R., & Salinas, E. (2021). *Lactococcus lactis* NZ9000 Prevents Asthmatic Airway Inflammation and Remodelling in Rats through the Improvement of Intestinal Barrier Function and Systemic TGF- β Production. *International archives of allergy and immunology*, 182(4), 277–291.
<https://doi.org/10.1159/000511146>

Chang, S. C., Kao, C. Y., Lin, L. C., Hidrosollo, J. H., & Lu, J. J. (2023). Lugdunin production and activity in *Staphylococcus lugdunensis* isolates are associated with its genotypes. *Microbiology spectrum*, 11(5), e0129823. Advance online publication.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01298-23>

Chen, X. Y., Wang, Z. Y., Zhou, Y., Ye, L. R., & Man, X. Y. (2023). Keratinocyte-neuro-immune-units (KNICUs): collaborative impact on the initiation and maintenance of psoriasis. *Frontiers in medicine*, 10, 1191057. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1191057>

Chiesa Fuxench, Z. C., Block, J. K., Boguniewicz, M., Boyle, J., Fonacier, L., Guttman-Yassky, E., Ong, P. Y., & Paller, A. S. (2019). Atopic dermatitis in America: Prevalence, disease burden, and

treatment update. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 122(4), 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.01.014>

Chung, Y., Kim, T. S., Min, Y. G., Hong, Y. J., Park, J. S., Hwang, S. M., Song, K. H., Kim, E. S., Park, K. U., Kim, H. B., Song, J., & Kim, E. C. (2016). Usefulness of Multiplex Real-Time PCR for Simultaneous Pathogen Detection and Resistance Profiling of Staphylococcal Bacteremia. *BioMed research international*, 2016, 6913860. <https://doi.org/10.1155/2016/6913860>

Cork, M. J., Danby, S., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M., & MacGowan, A. (2003). Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(6), 1307–1314. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12687.x>

Corradini, C., Cavazza, A., & Bignardi, C. (2004). High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate fructooligosaccharides in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.113>

Costabile, A., Fava, F., Röytiö, H., Forssten, S. D., Olli, K., Klievink, J., ... Gibson, G. R. (2012). Impact of polydextrose on the faecal microbiota: A double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, 108(3), 471–481. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005797>

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., ... Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>

De Benedetto, A., Yoshida, T., Fridy, S., Park, J. E., Kuo, I. H., & Beck, L. A. (2015). Histamine and Skin Barrier: Are Histamine Antagonists Useful for the Prevention or Treatment of Atopic Dermatitis?. *Journal of clinical medicine*, 4(4), 741–755. <https://doi.org/10.3390/jcm4040741>

De Preter, V., Vanhoutte, T., Huys, G., Swings, J., Rutgeerts, P., & Verbeke, K. (2004). Effects of *Lactobacillus casei* Shirota, *Bifidobacterium breve*, and oligofructose-enriched inulin on colonic nitrogen-protein metabolism in healthy humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), G358–G368. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00105.2006>

Delgado, G. T. C., Tamashiro, W. M. S. C., & Junior, M. R. M. (2019). Inulin-type fructans: Functional food ingredients to modulate the immune system. *Journal of Functional Foods*, 59, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.021>

Díez-Madueño, K., de la Cueva Dobao, P., Torres-Rojas, I., Fernández-Gosende, M., Hidalgo-Cantabrana, C., & Coto-Segura, P. (2024). Gut Dysbiosis and Adult Atopic Dermatitis: A Systematic Review. *Journal of clinical medicine*, 14(1), 19. <https://doi.org/10.3390/jcm14010019>

Endo, H., Tamura, K., Fukasawa, T., Kanegae, M., & Koga, J. (2012). Comparison of fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus* and *Bacteroides* species. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(1), 176–179. <https://doi.org/10.1271/bbb.110496>

Eshtiaghi, P., & Gooderham, M. J. (2018). Dupilumab: an evidence-based review of its potential in the treatment of atopic dermatitis. *Core evidence*, 13, 13–20. <https://doi.org/10.2147/CE.S133661>

Falony, G., Calmeyn, T., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2009). Coculture fermentations of *Bifidobacterium* species and *Bacteroides thetaiotaomicron* reveal a mechanistic insight into the prebiotic effect of inulin-type fructans. *Applied and environmental microbiology*, 75(8), 2312–2319. <https://doi.org/10.1128/AEM.02649-08>

Fan, X., Liu, Z., Yang, W., Zhang, H., Zhong, H., Pang, Y., Ye, X., Wu, C., & Li, L. (2025). Advances in Atopic Dermatitis Treatment: From Pathogenesis to Natural Product-Based Therapies. *Phytotherapy research: PTR*, 39(10), 4444–4473. <https://doi.org/10.1002/ptr.70056>

Fölster-Holst, R. (2022). The role of the skin microbiome in atopic dermatitis—Correlations and consequences. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 20(10), 1349–1359. <https://doi.org/10.1111/ddg.14709>

Frankel, H. C., & Qureshi, A. A. (2012). Comparative effectiveness of topical calcineurin inhibitors in adult patients with atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(4), 602–610. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.05.032>

Fujimura, K. E., & Lynch, S. V. (2015). Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. *Cell host & microbe*, 17(5), 592–602. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.007>

Galli, S. J., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 18(5), 693–704. <https://doi.org/10.1038/nm.2755>

Galli, S. J., & Tsai, M. (2020). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 26(5), 693–704. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0796-2>

Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. (2020). The development of allergic inflammation. *Nature*, 584(7820), 45–55. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2505-6>

García-Curbelo, Y., Castro-Alves, V. C., & Almeida, C. C. (2022). Prebiotics and the modulation of the gut immune system: Focus on inulin-type fructans. *Nutrients*, 14(18), 3702. <https://doi.org/10.3390/nu14183702>

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... Reid, G. (2017). 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, 14(8), 491–502.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., ... Costabile, A. (2010). Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>

Gourbeyre, P., Denery, S., & Bodinier, M. (2011). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(5), 685–695. <https://doi.org/10.1189/jlb.1109753>

Gschwandtner, M., Mildner, M., Mlitz, V., Gruber, F., Eckhart, L., Werfel, T., Gutzmer, R., Elias, P. M., & Tschachler, E. (2013). Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. *Allergy*, 68(1), 37–47. <https://doi.org/10.1111/all.12051>

Guan, J., Wu, C., He, Y., & Lu, F. (2023). Skin-associated adipocytes in skin barrier immunity: A mini-review. *Frontiers in immunology*, 14, 1116548. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1116548>

Gutman, A. B., Kligman, A. M., & Yeung, J. (2005). Emollient therapy for atopic dermatitis. *Dermatologic Therapy*, 18(4), 298–307. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2005.00053.x>

Guttman-Yassky, E., & Krueger, J. G. (2021). Atopic dermatitis and psoriasis: Two different immune diseases or one spectrum? *Current Opinion in Immunology*, 72, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.03.007>

Hancock, R. E. (1997). Peptide antibiotics. *The Lancet*, 349(9049), 418–422. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80051-7)

Hashimoto, T., Rosen, J. D., Sanders, K. M., & Yosipovitch, G. (2019). Possible roles of basophils in chronic itch. *Experimental dermatology*, 28(12), 1373–1379. <https://doi.org/10.1111/exd.13705>

Haydont, V., Neiveyans, V., Perez, P., Busson, É., Lataillade, J., Asselineau, D., & Fortunel, N. O. (2020). Fibroblasts from the Human Skin Dermo-Hypodermal Junction are Distinct from Dermal Papillary and Reticular Fibroblasts and from Mesenchymal Stem Cells and Exhibit a Specific Molecular Profile Related to Extracellular Matrix Organization and Modeling. *Cells*, 9(2), 368. <https://doi.org/10.3390/cells9020368>

Heilbronner, S., & Foster, T. J. (2020). *Staphylococcus lugdunensis*: A skin commensal with invasive pathogenic potential. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2), e00205-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00205-20>

Herrera-Ruiz, S., García-Bores, A. M., & Zamilpa, A. (2022). Health benefits of agave fructans: Recent data and future perspectives. *Frontiers in Nutrition*, 9, 853593. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.853593>

Holscher, H. D., Bauer, L. L., Gourineni, V., Pelkman, C. L., Fahey, G. C., Jr, & Swanson, K. S. (2015). Agave Inulin Supplementation Affects the Fecal Microbiota of Healthy Adults Participating in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *The Journal of nutrition*, 145(9), 2025–2032. <https://doi.org/10.3945/jn.115.217331>

Iida, S., Nakanishi, T., Momose, F., Ichishi, M., Mizutani, K., Matsushima, Y., Umaoka, A., Kondo, M., Habe, K., Hirokawa, Y., Watanabe, M., Iwakura, Y., Miyahara, Y., Imai, Y., & Yamanaka, K. (2022). IL-17A Is the Critical Cytokine for Liver and Spleen Amyloidosis in Inflammatory Skin Disease. *International journal of molecular sciences*, 23(10), 5726. <https://doi.org/10.3390/ijms23105726>

Iriyama, S., Ogura, Y., Nishikawa, S., Hosoi, J., & Amano, S. (2022). Regeneration of collagen fibrils at the papillary dermis by reconstructing basement membrane at the dermal-epidermal junction. *Scientific reports*, *12*(1), 795. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04856-1>

Ito, Y., & Amagai, M. (2023). Dissecting skin microbiota and microenvironment for the development of therapeutic strategies. *Current opinion in microbiology*, *74*, 102311. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102311>

Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., LaFaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, *126*(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>

Jiménez, M., Muñoz, F. C., Cervantes-García, D., Cervantes, M. M., Hernández-Mercado, A., Barrón-García, B., Moreno Hernández-Duque, J. L., Rodríguez-Carlos, A., Rivas-Santiago, B., & Salinas, E. (2020). Protective Effect of Glycomacropeptide on the Atopic Dermatitis-Like Dysfunctional Skin Barrier in Rats. *Journal of medicinal food*, *23*(11), 1216–1224. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0247>

Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature reviews. Immunology*, *13*(5), 321–335. <https://doi.org/10.1038/nri3430>

Kang, L. J., Lee, H. J., & Kim, J. H. (2020). 3'-Sialyllactose attenuates atopic dermatitis by modulating gut microbiota. *Frontiers in Immunology*, *11*, 571. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00571>

Kang, M., Jung, J. H., Kim, J. Y., Hong, S. H., & Her, Y. (2023). Therapeutic and Preventive Effect of Orally Administered Prebiotics on Atopic Dermatitis in a Mouse Model. *Allergy, asthma & immunology research*, *15*(3), 303–315. <https://doi.org/10.4168/air.2023.15.3.303>

Kang, Y., Cai, Y., & Zhang, X. (2018). Gut microbiota and atopic dermatitis: A comprehensive review. *Allergology International*, 67(4), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.07.004>

Kawakami, T., & Galli, S. J. (2002). Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature reviews. Immunology*, 2(10), 773–786. <https://doi.org/10.1038/nri914>

Kawakami, T., Ando, T., Kimura, M., Wilson, B. S., & Kawakami, Y. (2009). Mast cells in atopic dermatitis. *Current opinion in immunology*, 21(6), 666–678. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.09.006>

Kikuchi, K., Yanaba, K., & Hamaguchi, Y. (2022). Immunological mechanisms of atopic dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2149. <https://doi.org/10.3390/ijms23042149>

Kim, I. S., Lee, S. H., Kim, J. A., Yu, D. Y., Hong, Y. H., Kim, J. Y., Lim, J. M., Lee, S. S., Yun, C. H., Choi, I. S., & Cho, K. K. (2018). Effect of oral administration of β -glucans derived from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 in model mice and rat with atopic dermatitis-like phenotypes. *Food science and biotechnology*, 27(4), 1185–1192. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0322-4>

Kim, J. A., Kim, H. S., & Park, J. H. (2020). Effects of prebiotics on the gut microbiota and atopic dermatitis. *Nutrients*, 12(7), 2079. <https://doi.org/10.3390/nu12072079>

Kim, J. A., Kim, J. S., Kang, L. J., Kim, S. Y., & Kang, Y. (2020). Prebiotic effect of dietary fibers on modulation of gut microbiota and improvement of atopic dermatitis in a mouse model. *Journal of Dermatological Science*, 98(3), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.03.002>

Kim, J. A., Kim, S. H., Kim, I. S., Yu, D. Y., Kim, G. I., Moon, Y. S., Kim, S. C., Lee, S. H., Lee, S. S., Yun, C. H., Choi, I. S., & Cho, K. K. (2020). Galectin-9 Induced by Dietary Prebiotics Regulates Immunomodulation to Reduce Atopic Dermatitis Symptoms in 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene (DNCB)-Treated NC/Nga Mice. *Journal of microbiology and biotechnology*, 30(9), 1343–1354. <https://doi.org/10.4014/jmb.2005.05017>

Kim, J. E., Kim, J. S., Cho, D. H., & Park, H. J. (2016). Molecular Mechanisms of Cutaneous Inflammatory Disorder: Atopic Dermatitis. *International journal of molecular sciences*, 17(8), 1234. <https://doi.org/10.3390/ijms17081234>

Kim, S., Kim, J. H., Jeong, Y., Kim, Y., Lee, J., & Kang, Y. (2022). Extracellular vesicles derived from *Bifidobacterium longum* alleviate atopic dermatitis-like symptoms by modulating skin barrier and immune responses. *Allergy*, 77(4), 1229–1243. <https://doi.org/10.1111/all.15061>

Kim, S., Kim, Y., & Kim, Y. S. (2022). *Bifidobacterium longum* and galactooligosaccharides ameliorate atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Scientific Reports*, 12, 3045. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07037-4>

Klein, P. A., & Clark, R. A. (1999). An evidence-based review of the efficacy of antihistamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. *Archives of Dermatology*, 135(12), 1522–1525. <https://doi.org/10.1001/archderm.135.12.1522>

Langan, S. M., Irvine, A. D., & Weidinger, S. (2020). Atopic dermatitis. *The Lancet*, 396(10247), 345–360. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31286-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31286-1)

Lee, H.-J., & Lee, J. (2014). The role of gut microbiota in the development of atopic dermatitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 6(5), 384–389. <https://doi.org/10.4168/aair.2014.6.5.384>

Lee, S. Y., Lee, E., Park, Y. M., & Hong, S. J. (2018). Microbiome in the Gut-Skin Axis in Atopic Dermatitis. *Allergy, asthma & immunology research*, 10(4), 354–362. <https://doi.org/10.4168/aair.2018.10.4.354>

Lehrer, R. I., & Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinion in Immunology*, 11(1), 23–27. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)80005-3](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)80005-3)

Li, N., Han, X., Ruan, M., Huang, F., Yang, L., Xu, T., Wang, H., Wu, H., Shi, S., Wang, Y., Wu, X., & Wang, S. (2024). Prebiotic inulin controls Th17 cells mediated central nervous system

autoimmunity through modulating the gut microbiota and short chain fatty acids. *Gut microbes*, 16(1), 2402547. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2402547>

Licona-Limón, P., Kim, L. K., Palm, N. W., & Flavell, R. A. (2021). TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nature Reviews Immunology*, 21(6), 421–437. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00515-3>

Liu, F. T., Goodarzi, H., & Chen, H. Y. (2011). IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 41(3), 298–310. <https://doi.org/10.1007/s12016-011-8252-4>

Liu, Lu & Song, Guoxuan & Song, Zhiqiang. (2022). Intrinsic Atopic Dermatitis and Extrinsic Atopic Dermatitis: Similarities and Differences. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 15. 2621-2628. <https://doi.org/10.2147/CCID.S391360>.

Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 585–595. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.90>

López, J. F., Bel Imam, M., Satitsuksanoa, P., Lems, S., Yang, M., Hwang, Y. K., Losol, P., Choi, J. P., Kim, S. H., Chang, Y. S., Akdis, M., Akdis, C. A., & van de Veen, W. (2022). Mechanisms and biomarkers of successful allergen-specific immunotherapy. *Asia Pacific allergy*, 12(4), e45. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2022.12.e45>

López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Díaz, G. (2021). Fructans from Agave tequilana: Structure, metabolism, and potential health benefits. *Food Research International*, 140, 109902. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109902>

López-Molina, D., Navarro, M., & García, E. (2021). Human clinical evidence of agave inulin consumption and its impact on gut microbiota. *Frontiers in Nutrition*, 8, 671. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.671>

Macfarlane, G. T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x>

MacGlashan, D. (2021). IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. *Current Opinion in Immunology*, 72, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.04.007>

Maldonado-Gómez, M. X., Vázquez-Castellanos, J. F., & García-Mena, J. (2020). Agave inulin modulates gut microbiota and reduces allergic airway inflammation in mice. *Nutrients*, 12(6), 1805. <https://doi.org/10.3390/nu12061805>

Márquez-Aguirre, A. L., Camacho-Díaz, B. H., & Campos-Vega, R. (2013). Health benefits of agave fructans as prebiotics. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1091–1100. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.04.011>

Matsumoto, K., Inoue, H., & Fukuda, K. (2020). FcεRI signaling and regulation in health and disease. *Allergy International*, 69(2), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2020.01.002>

Matsuoka, T., Kawano, T., & Saito, H. (2022). Recent advances in the understanding of IgE receptor biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3561. <https://doi.org/10.3390/ijms23073561>

Mellado-Mojica, E., & López, M. G. (2012). Structural differences in fructans from Agave tequilana var. azul during plant development. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1232–1238. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.037>

Mellado-Mojica, E., & López, M. G. (2015). Fructan structure and metabolism in Agave species and their potential health benefits. *Phytochemistry*, 124, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.001>

Montes-Torres, A., Llamas-Velasco, M., Pérez-Plaza, A., Solano-López, G., & Sánchez-Pérez, J. (2015). Biological Treatments in Atopic Dermatitis. *Journal of clinical medicine*, 4(4), 593–613. <https://doi.org/10.3390/jcm4040593>

Moro, G., Arslanoglu, S., Stahl, B., Jelinek, J., Wahn, U., & Boehm, G. (2006). A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Archives of disease in childhood*, 91(10), 814–819. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.098251>

Muñoz, F. C., Cervantes, M. M., Cervantes-García, D., Jiménez, M., Ventura-Juárez, J., & Salinas, E. (2017). Glycomacropptide Attenuates Inflammation, Pruritus, and Th2 Response Associated with Atopic Dermatitis Induced by 2,4-Dinitrochlorobenzene in Rat. *Journal of immunology research*, 2017, 6935402. <https://doi.org/10.1155/2017/6935402>

Murri, M., Leiva, I., Gomez-Zumaquero, J. M., Tinahones, F. J., Cardona, F., Soriguer, F., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC medicine*, 11, 46. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-46>

Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M. J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J. A., Dzutsev, A., Kong, H., Campbell, D. J., Trinchieri, G., Segre, J. A., & Belkaid, Y. (2012). Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), 1115–1119. <https://doi.org/10.1126/science.1225152>

Nguyen, U. T., & Kalan, L. R. (2022). Forgotten fungi: the importance of the skin mycobiome. *Current opinion in microbiology*, 70, 102235. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102235>

Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: What are they? *Journal of Nutrition*, 129(7), 1402S–1406S. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1402S>

Nizet, V., Ohtake²³, T., Lauth²³, X., Trowbridge²³, J., Rudisill²³, J., Dorschner²³, R. A., Pestonjamas²³, V., Piraino, J., Huttner, K., & Gallo, R. L. (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Noda, S., Suarez-Fariñas, M., Ungar, B., Kim, S. J., de Guzman Strong, C., Xu, H., & Guttman-Yassky, E. (2015). The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(5), 1254–1264. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.06.043>

Nole, K. L., Yim, E., & Keri, J. E. (2014). Probiotics and prebiotics in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(4), 814–821. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.03.017>

Norio, T., Toraya, T., & Mori, K. (2007). Prebiotic potential of agave inulin. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(7), 575–582. <https://doi.org/10.1080/09637480701267087>

Oetjen, L. K., Mack, M. R., Feng, J., Whelan, T. M., Niu, H., Guo, C. J., Chen, S., Trier, A. M., Xu, A. Z., Tripathi, S. V., Luo, J., Gao, X., Yang, L., Hamilton, S. L., Wang, P. L., Brestoff, J. R., Council, M. L., Brasington, R., Schaffer, A., Brombacher, F., ... Kim, B. S. (2017). Sensory Neurons Co-opt Classical Immune Signaling Pathways to Mediate Chronic Itch. *Cell*, 171(1), 217–228.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.006>

Ogonowska, P., Gilaberte, Y., Barańska-Rybak, W., & Nakonieczna, J. (2021). Colonization With *Staphylococcus aureus* in Atopic Dermatitis Patients: Attempts to Reveal the Unknown. *Frontiers in microbiology*, 11, 567090. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.567090>

Ong, P. Y., Leung, D. Y. M., & Boguniewicz, M. (2019). Atopic dermatitis. In K. E. Bernstein & T. A. Simon (Eds.), *Middleton’s Allergy: Principles and Practice* (9th ed., pp. 1187–1208). Elsevier.

Opazo, M. C., Ortega-Rocha, E. M., Coronado-Arrázola, I., Bonifaz, L. C., Boudin, H., Neunlist, M., Bueno, S. M., Kalergis, A. M., & Riedel, C. A. (2018). Intestinal Microbiota Influences Non-

intestinal Related Autoimmune Diseases. *Frontiers in microbiology*, *9*, 432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00432>

Paller, A. S., Kabashima, K., & Bieber, T. (2017). Therapeutic pipeline for atopic dermatitis: End of the drought?. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *140*(3), 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.07.006>

Pascal, M., Perez-Gordo, M., Caballero, T., Escribese, M. M., Lopez Longo, M. N., Luengo, O., Manso, L., Matheu, V., Seoane, E., Zamorano, M., Labrador, M., & Mayorga, C. (2018). Microbiome and Allergic Diseases. *Frontiers in immunology*, *9*, 1584. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01584>

Paton D. M. (2017). Crisaborole: Phosphodiesterase inhibitor for treatment of atopic dermatitis. *Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998)*, *53*(4), 239–245. <https://doi.org/10.1358/dot.2017.53.4.2604174>

Peng, P., Baldry, M., Gless, B. H., Bojer, M. S., Espinosa-Gongora, C., Baig, S. J., Andersen, P. S., Olsen, C. A., & Ingmer, H. (2019). Effect of Co-inhabiting Coagulase Negative Staphylococci on *S. aureus agr* Quorum Sensing, Host Factor Binding, and Biofilm Formation. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2212. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02212>

Pérez-Ferriols, A., Aranegui, B., Pujol-Montcusí, J. A., Martín-Gorgojo, A., Campos-Domínguez, M., Feltes, R. A., Gilaberte, Y., Echeverría-García, B., Alvarez-Pérez, A., & García-Doval, I. (2015). Phototherapy in atopic dermatitis: a systematic review of the literature. *Actas dermato-sifiliograficas*, *106*(5), 387–401. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2014.12.017>

Petersen, E. B. M., Skov, L., Thyssen, J. P., & Jensen, P. (2019). Role of the Gut Microbiota in Atopic Dermatitis: A Systematic Review. *Acta dermato-venereologica*, *99*(1), 5–11. <https://doi.org/10.2340/00015555-3008>

Pfeiffer, S., Pastar, M., Mitter, B., Lippert, K., Hackl, E., Lojan, P., Oswald, A., & Sessitsch, A. (2014). Improved group-specific primers based on the full SILVA 16S rRNA gene reference database. *Environmental microbiology*, *16*(8), 2389–2407. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12350>

Puar, Y. R., Chovatiya, R., & Paller, A. S. (2021). New treatments in atopic dermatitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *126*(1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.09.450>

Rackerby, B., Le, H. N. M., Haymowicz, A., Dallas, D. C., & Park, S. H. (2024). Potential Prebiotic Properties of Whey Protein and Glycomacropeptide in Gut Microbiome. *Food science of animal resources*, *44*(2), 299–308. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2024.e12>

Reddel, S., Del Chierico, F., Quagliariello, A., Giancristoforo, S., Vernocchi, P., Russo, A., Fiocchi, A., Rossi, P., Putignani, L., & El Hachem, M. (2019). Gut microbiota profile in children affected by atopic dermatitis and evaluation of intestinal persistence of a probiotic mixture. *Scientific reports*, *9*(1), 4996. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41149-6>

Rezende, R. P., Ribeiro, A. C., & Nascimento, A. M. (2021). Prebiotics, probiotics, and symbiotics in inflammatory bowel disease treatment: A systematic review. *Nutrients*, *13*(9), 3176. <https://doi.org/10.3390/nu13093176>

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, *7*(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>

Rios-Carlos, M., Cervantes-García, D., Córdova-Dávalos, L. E., Bermúdez-Humarán, L. G., & Salinas, E. (2024). Unraveling the gut-skin axis in atopic dermatitis: exploiting insights for therapeutic strategies. *Gut microbes*, *16*(1), 2430420. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2430420>

Rivera, J., Fierro, N. A., Olivera, A., & Suzuki, R. (2021). New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Frontiers in Immunology*, 12, 650702. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.650702>

Rivera-Huerta, M., Gutiérrez-Miceli, F. A., & Montes-Molina, J. A. (2017). Prebiotic effects of agave fructans on gut microbiota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(14), 4778–4784. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8351>

Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in microbiology*, 7, 979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>

Rizzardi, K. F., Indiani, C. M. D. S. P., Mattos-Graner, R. O., de Sousa, E. T., Nobre-Dos-Santos, M., & Parisotto, T. M. (2021). Firmicutes Levels in the Mouth Reflect the Gut Condition With Respect to Obesity and Early Childhood Caries. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 593734. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.593734>

Roberfroid M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition*, 137(3 Suppl 2), 830S–7S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830S>

Roberfroid M. B. (2007). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of nutrition*, 137(11 Suppl), 2493S–2502S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2493S>

Rodarte-Acosta, L., & Morales-Sánchez, M. (2021). Gut-skin axis in atopic dermatitis: The role of microbiota. *Revista Alergia México*, 68(1), 20–29. <https://doi.org/10.29262/ram.v68i1.874>

Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., ... & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26050. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>

Sabaté Brescó, M., Harris, L. G., Thompson, K., Stanic, B., Morgenstern, M., O'Mahony, L., Richards, R. G., & Moriarty, T. F. (2017). Pathogenic Mechanisms and Host Interactions

in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. *Frontiers in microbiology*, 8, 1401. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01401>

Saini, S. S., & Kaplan, A. P. (2021). Mast cell activation and mastocytosis: Emerging role of IgE and FcεRI. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 148(2), 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.05.002>

Salazar-López, N. J., Varela-Chinchilla, C. D., & Escalante, A. (2023). Agave-derived fructans and their prebiotic potential: Clinical and nutritional evidence. *Nutrients*, 15(3), 512. <https://doi.org/10.3390/nu15030512>

Salimi, M., Barlow, J. L., & McKenzie, A. N. J. (2023). Innate lymphoid cells in atopic dermatitis: Emerging roles and therapeutic opportunities. *Frontiers in Immunology*, 14, 1123456. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123456>

Sandilands, A., Terron-Kwiatkowski, A., Hull, P. R., O'Regan, G. M., Clayton, T. H., Watson, R. M., McLean, W. H. I., & Irvine, A. D. (2020). Filaggrin mutations and atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(5), 1083–1091. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.10.006>

Schmitt, J., Schäkel, K., Fölster-Holst, R., & Bauer, A. (2007). Systemic treatment of severe atopic eczema: A systematic review. *Acta Dermato-Venereologica*, 87(2), 100–111. <https://doi.org/10.2340/00015555-0187>

Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2014). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, 69(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>

Shen, S., Ren, F., Qin, H., Bukhari, I., Yang, J., Gao, D., Ouwehand, A. C., Lehtinen, M. J., Zheng, P., & Mi, Y. (2023). *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115 inhibit *Helicobacter pylori* colonization and gastric inflammation in a murine model. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1196084. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1196084>

Sheng, W., Ji, G., & Zhang, L. (2023). Immunomodulatory effects of inulin and its intestinal metabolites. *Frontiers in immunology*, *14*, 1224092. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1224092>

Silverberg, J. I., & Guttman-Yassky, E. (2021). Atopic dermatitis and allergic comorbidities: Epidemiology, pathophysiology, and treatment. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *127*(4), 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2021.05.012>

Simmons, J., & Gallo, R. L. (2024). The Central Roles of Keratinocytes in Coordinating Skin Immunity. *The Journal of investigative dermatology*, *144*(11), 2377–2398. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2024.06.1280>

Simon, D., & Bieber, T. (2014). Systemic therapy for atopic dermatitis. *Allergy*, *69*(1), 46–55. <https://doi.org/10.1111/all.12339>

Simon, H. U., Rothenberg, M. E., & Bochner, B. S. (2020). Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *20*(10), 634–649. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0283-7>

Sinha, A., Singh, J., & Samanta, S. (2021). Modulation of gut microbiota in skin disorders: Probiotics and prebiotics. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 686532. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.686532>

Skowron, K., Bauza-Kaszewska, J., Kraszewska, Z., Wiktorczyk-Kapischke, N., Grudlewska-Buda, K., Kwiecińska-Piróg, J., Wałęcka-Zacharska, E., Radtke, L., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota. *Microorganisms*, *9*(3), 543. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030543>

Stone, K. D., Prussin, C., & Metcalfe, D. D. (2019). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *143*(3), 824–836. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.01.003>

Suárez-Fariñas, M., Dhingra, N., Gittler, J., Shemer, A., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2013). Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *132*(2), 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.046>

Szabo, P. A., Miron, M., & Farber, D. L. (2019). Location, location, location: Tissue resident memory T cells in mice and humans. *Science immunology*, *4*(34), eaas9673. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aas9673>

Takahashi, H., Fujii, T., Yamakawa, S., Yamada, C., Fujiki, K., Kondo, N., Funasaka, K., Hirooka, Y., & Tochio, T. (2023). Combined oral intake of short and long fructans alters the gut microbiota in food allergy model mice and contributes to food allergy prevention. *BMC microbiology*, *23*(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03021-6>

Takahashi, H., Fujii, T., Yamakawa, S., Yamada, C., Fujiki, K., Kondo, N., Funasaka, K., Hirooka, Y., & Tochio, T. (2023). Combined oral intake of short and long fructans alters the gut microbiota in food allergy model mice and contributes to food allergy prevention. *BMC microbiology*, *23*(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03021-6>

Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G. G., George, T., Leonczak, J., Gibson, G. R., ... Spencer, J. P. (2011). Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British Journal of Nutrition*, *106*(6), 936–944. <https://doi.org/10.1017/S0007114511001193>

Ueda, M., Saito, S., Murata, T., Hirano, T., Bise, R., Kabashima, K., & Suzuki, S. (2019). Combined multiphoton imaging and biaxial tissue extension for quantitative analysis of geometric fiber organization in human reticular dermis. *Scientific reports*, *9*(1), 10644. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47213-5>

Valdés-Varela, L., Ruas-Madiedo, P., & Gueimonde, M. (2021). Short-chain fatty acids in the interplay between diet, microbiota, and immune system. *Frontiers in Immunology*, *12*, 707. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.707>

Valenta, R., Karaulov, A., Niederberger, V., Gattinger, P., van Hage, M., Flicker, S., Linhart, B., Campana, R., Focke-Tejkl, M., Curin, M., Eckl-Dorna, J., Lupinek, C., Resch-Marat, Y., Vrtala, S., Mittermann, I., Garib, V., Khaitov, M., Valent, P., & Pickl, W. F. (2018). Molecular Aspects of Allergens and Allergy. *Advances in immunology*, *138*, 195–256. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.03.002>

Vijaya Chandra, S. H., Srinivas, R., Dawson, T. L., Jr, & Common, J. E. (2021). Cutaneous *Malassezia*: Commensal, Pathogen, or Protector?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 614446. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.614446>

Wang, X., Ma, Y., Liu, Y., Zhang, J., Jiang, W., Fang, X., & Wang, L. (2024). Preparation of a *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 microencapsulated-lactulose synbiotic and its effect on equol production. *Food & function*, *15*(18), 9471–9487. <https://doi.org/10.1039/d4fo02690j>

Weidinger, S., Beck, L. A., Bieber, T., Kabashima, K., & Irvine, A. D. (2023). Atopic dermatitis. *Nature Reviews Disease Primers*, *9*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00471-1>

Whitmore, M., Tobin, I., Burkardt, A., & Zhang, G. (2024). Nutritional Modulation of Host Defense Peptide Synthesis: A Novel Host-Directed Antimicrobial Therapeutic Strategy?. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, *15*(9), 100277. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2024.100277>

Wollenberg, A., Reitamo, S., Girolomoni, G., Lahfa, M., Ruzicka, T., Healy, E., Giannetti, A., Bieber, T., Vyas, J., Deleuran, M., & European Tacrolimus Ointment Study Group (2008). Proactive treatment of atopic dermatitis in adults with 0.1% tacrolimus ointment. *Allergy*, *63*(7), 742–750.

Wrześniewska, M., Wołoszczak, J., Świrkosz, G., Szyller, H., & Gomułka, K. (2024). The Role of the Microbiota in the Pathogenesis and Treatment of Atopic Dermatitis-A Literature Review. *International journal of molecular sciences*, *25*(12), 6539. <https://doi.org/10.3390/ijms25126539>

Yoo, J. Y., Kim, S. S., & Kim, Y. (2012). The prebiotic effects of pectic oligosaccharides in vitro. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 363–368. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0047-7>

Yoshida, M., Funasaka, Y., Saeki, H., Yamamoto, M., & Kanda, N. (2023). Dietary Fiber Inulin Improves Murine Imiquimod-Induced Psoriasis-like Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14197. <https://doi.org/10.3390/ijms241814197>

Zasloff M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>

Zhang, Q., Lu, C., Lu, F., Liao, Y., Cai, J., & Gao, J. (2024). Challenges and opportunities in obesity: the role of adipocytes during tissue fibrosis. *Frontiers in endocrinology*, 15, 1365156. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1365156>

Zhao, Y., Yu, C., Zhang, J., Yao, Q., Zhu, X., & Zhou, X. (2025). The gut-skin axis: Emerging insights in understanding and treating skin diseases through gut microbiome modulation (Review). *International journal of molecular medicine*, 56(6), 210. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2025.5651>

Zheng, W., & Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89(4), 587–596. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80240-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80240-8)

Zhu, Z., Hu, C., Liu, Y., Wang, F., & Zhu, B. (2023). Inulin has a beneficial effect by modulating the intestinal microbiome in a BALB/c mouse model. *Beneficial microbes*, 14(4), 371–383. <https://doi.org/10.1163/18762891-20220094>

Zipperer, A., Konnerth, M. C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., Burian, M., Schilling, N. A., Slavetinsky, C., Marschal, M., Willmann, M., Kalbacher, H., Schittek, B., Brötz-Oesterhelt, H., Grond, S., Peschel, A., & Krismer, B. (2016). Human commensals producing a novel

antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*, 535(7613), 511–516.
<https://doi.org/10.1038/nature18634>



11. Anexo

Densidad óptica del crecimiento de las diferentes cepas bacterianas en medio MRS.

Lactiseibacillus rhamnosus Hansen																								
	MRS			Glucosa			Enature			Preventy			NBI			Vizana			Achicoria			Sin glucosa		
6	0.109	0.383	0.118	0.094	0.137	0.172	0.09	0.18	0.174	0.069	0.099	0.129	0.083	0.176	0.12	0.106	0.218	0.15	0.062	0.106	0.105	0.095	0.163	0.113
8	0.373	0.611	0.3	0.294	0.267	0.435	0.308	0.378	0.342	0.234	0.282	0.329	0.301	0.39	0.322	0.357	0.328	0.381	0.214	0.189	0.243	0.334	0.269	0.209
10	1.045	1.684	1.041	0.811	0.899	1.304	0.765	1.25	1.256	0.577	0.827	1.077	0.739	0.955	0.786	0.898	1.016	1.002	0.434	0.408	0.499	0.493	0.513	0.483
12	2.962	3.393	3.063	2.5	2.573	3.012	2.143	2.292	2.227	1.445	1.535	1.625	1.221	1.247	1.248	1.489	1.55	1.594	0.668	0.633	0.781	0.785	0.764	0.722
14	3.525	3.736	3.619	3.274	3.327	3.406	2.383	2.252	2.344	1.661	1.677	1.693	1.365	1.363	1.443	1.743	1.759	1.704	0.833	0.789	0.806	0.848	0.834	0.832
16	3.808	4	3.94	3.641	3.612	3.677	2.451	2.35	2.375	1.767	1.774	1.78	1.438	1.375	1.487	1.828	1.825	1.9	0.797	0.777	0.822	0.859	0.91	0.864

Lactiseibacillus rhamnosus LM07																								
	MRS			Glucosa			Enature			Preventy			NBI			Vizana			Achicoria			Sin glucosa		
6	0.31	0.355	0.322	0.318	0.248	0.266	0.281	0.213	0.328	0.225	0.294	0.233	0.251	0.245	0.256	0.272	0.245	0.248	0.202	0.183	0.183	0.179	0.183	0.186
8	1.004	0.957	0.852	0.896	0.692	0.739	0.952	0.564	0.79	0.803	0.759	0.866	0.726	0.754	0.698	0.772	0.755	0.716	0.379	0.467	0.411	0.425	0.411	0.447
10	2.39	2.602	2.582	2.227	2.197	2.198	2.179	1.771	2.024	1.342	1.535	1.299	1.055	1.055	1.054	1.084	1.202	1.205	0.592	0.613	0.626	0.638	0.596	0.613
12	3.541	3.667	3.522	3.494	3.257	3.291	2.28	2.29	2.226	1.606	1.642	1.619	1.255	1.352	1.158	1.492	1.312	1.31	0.755	0.828	0.792	0.885	0.893	0.964
14	3.961	4	3.856	3.662	3.679	3.676	2.218	2.216	2.161	1.753	1.641	1.627	1.236	1.248	1.213	1.274	1.309	1.326	0.835	0.747	0.795	0.806	0.887	1.088
16	4	4	3.986	3.781	3.755	3.707	2.241	2.235	2.109	1.67	1.683	1.689	1.267	1.356	1.187	1.393	1.384	1.345	0.832	0.7	0.843	0.875	0.896	0.829

Lactiplantibacillus plantarum LP-115																								
	MRS			Glucosa			Enature			Preventy			NBI			Vizana			Achicoria			Sin glucosa		
6	0.557	0.377	0.526	0.448	0.293	0.435	0.463	0.294	0.377	0.538	0.31	0.491	0.364	0.266	0.479	0.496	0.304	0.498	0.322	0.202	0.23	0.317	0.204	0.254
8	1.467	1.145	1.533	1.116	0.877	1.332	1.204	0.939	1.267	1.319	1.003	1.403	0.872	0.868	1.301	1.128	0.965	1.225	0.525	0.517	0.501	0.53	0.516	0.516
10	3.012	3.094	3.198	2.913	2.915	3.064	2.657	2.615	2.634	1.95	1.988	1.973	2.105	2.146	2.131	1.644	1.66	1.68	0.546	0.557	0.521	0.554	0.563	0.556
12	3.605	3.704	3.712	3.455	3.465	3.586	2.876	2.824	3.813	1.94	1.999	1.931	2.127	2.179	2.117	1.721	1.737	1.727	0.569	0.564	0.527	0.582	0.581	0.582
14	3.987	4	3.906	3.712	3.768	3.781	3.117	3.19	3.115	1.887	1.978	1.86	2.087	2.174	2.05	1.788	1.791	1.761	0.573	0.559	0.546	0.595	0.583	0.582
16	4	4	4	3.79	3.908	3.802	3.26	3.274	3.243	1.852	1.961	1.812	2.022	2.112	1.968	1.806	1.874	1.805	0.552	0.555	0.525	0.577	0.576	0.558

Lactiplantibacillus plantarum LM17																								
	MRS			Glucosa			Enature			Preventy			NBI			Vizana			Achicoria			Sin glucosa		
6	1.346	0.61	0.622	1.254	0.538	0.629	1.073	0.494	0.532	1.081	0.463	0.537	0.849	0.396	0.434	0.927	0.446	0.516	0.467	0.224	0.258	0.377	0.199	0.221
8	2.087	2.189	1.989	1.846	1.763	1.758	1.643	1.706	1.582	1.551	1.665	1.536	1.252	1.421	1.363	1.288	1.347	1.271	0.466	0.47	0.478	0.46	0.471	0.47
10	3.089	3.172	2.926	3.004	2.952	2.951	2.831	2.848	2.784	1.834	1.857	1.829	2.032	1.974	1.985	1.609	1.589	1.602	0.504	0.494	0.421	0.486	0.509	0.498
12	3.468	3.469	3.317	3.327	3.346	3.288	3.134	3.12	3.096	1.849	1.87	1.864	2.088	2.029	2.016	1.755	1.741	1.724	0.525	0.508	0.527	0.519	0.53	0.522
14	3.603	3.63	3.421	3.481	3.461	3.348	3.144	3.138	3.133	1.89	1.847	1.879	2.088	2.023	2.048	1.815	1.813	1.783	0.555	0.527	0.556	0.541	0.55	0.547
16	3.627	3.635	3.497	3.521	3.485	3.447	3.133	3.117	3.147	1.911	1.888	1.854	2.053	2.037	2.112	1.849	1.862	1.881	0.583	0.552	0.591	0.546	0.571	0.578

Lactiplantibacillus plantarum LBH 1075																								
	MRS			Glucosa			Enature			Preventy			NBI			Vizana			Achicoria			Sin glucosa		
6	0.286	0.578	0.628	0.283	0.56	0.516	0.27	0.595	0.476	0.269	0.542	0.441	0.225	0.456	0.375	0.269	0.553	0.39	0.193	0.407	0.236	0.169	0.357	0.184
8	1.169	1.592	1.737	1.11	1.474	1.521	1.127	1.621	1.456	1.112	1.35	1.302	0.87	1.087	1.06	0.985	1.233	1.163	0.5	0.494	0.521	0.501	0.482	0.474
10	2.628	3.077	3.019	2.596	3.022	2.832	2.646	2.989	2.786	1.863	1.874	1.961	1.891	1.957	2.066	1.61	1.621	1.63	0.577	0.535	0.57	0.544	0.528	0.529
12	3.435	3.523	3.506	3.444	3.514	3.446	3.279	3.332	3.321	1.935	1.889	1.968	2.006	1.994	2.029	1.681	1.671	1.687	0.63	0.533	0.566	0.582	0.537	0.53
14	3.783	3.719	3.659	3.747	3.651	3.734	3.332	3.402	3.366	1.925	1.902	1.972	2.002	1.999	2.029	1.731	1.721	1.731	0.666	0.579	0.579	0.615	0.576	0.567
16	3.81	3.848	3.84	3.817	3.809	3.867	3.391	3.391	3.38	1.987	1.889	2.005	2.053	1.983	2.022	1.806	1.795	1.791	0.7	0.589	0.608	0.668	0.601	0.593

Densidad óptica del crecimiento de *L. rhamnosus* (Hansen) y *L. plantarum* LP-115 en medio MRS adicionado con IAA1.

<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> Hansen																		
	MRS			20 g/L			2 g/L			0.2 g/L			0.02 g/L			sin glucosa		
6	0.191	0.234	0.19	0.17	0.226	0.134	0.173	0.219	0.175	0.193	0.187	0.175	0.177	0.259	0.178	0.105	0.101	0.047
8	0.492	0.538	0.41	0.388	0.499	0.29	0.379	0.508	0.423	0.418	0.494	0.412	0.402	0.651	0.432	0.229	0.248	0.132
10	1.61	1.709	1.412	1.279	1.655	0.983	1.328	1.609	1.435	1.431	1.551	1.482	1.332	1.952	1.461	0.526	0.466	0.26
12	3.227	3.338	3.027	2.824	3.162	2.467	2.926	3.234	3.001	3.155	3.24	3.068	2.993	3.417	3.045	0.721	0.635	0.384
14	3.743	3.714	3.719	3.538	3.615	3.424	3.614	3.768	3.627	3.712	3.768	3.642	3.645	3.822	3.64	0.934	0.708	0.392
16	3.986	3.944	3.83	3.779	3.891	3.767	3.923	4	3.855	4	3.999	3.907	3.946	3.966	3.86	0.922	0.697	0.383

<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LP-115																		
	MRS			20 g/L			2 g/L			0.2 g/L			0.02 g/L			sin glucosa		
6	0.323	0.472	0.306	0.324	0.451	0.351	0.299	0.506	0.327	0.32	0.435	0.339	0.333	0.422	0.335	0.172	0.221	0.164
8	1.336	1.415	1.197	1.309	1.316	1.28	1.22	1.518	1.267	1.348	1.385	1.356	1.313	1.352	1.404	0.483	0.5	0.531
10	2.911	3.017	2.987	2.839	2.894	2.911	2.875	3.073	2.982	2.936	3	3.029	2.917	2.987	3.077	0.498	0.53	0.566
12	3.5	3.5	3.482	3.406	3.409	3.369	3.54	3.565	3.517	3.533	3.557	3.528	3.635	3.491	3.515	0.517	0.556	0.599
14	3.809	3.767	3.755	3.758	3.72	3.659	3.722	3.847	3.738	3.904	3.887	3.801	3.877	3.829	3.916	0.524	0.563	0.581
16	3.924	3.911	3.947	3.916	3.774	3.914	3.925	3.961	3.869	4	3.95	3.908	3.962	3.954	4	0.535	0.575	0.576

pH y cambio de pH en el medio de crecimiento de las diferentes cepas bacterianas después de 16hrs de inoculación.

	<i>L. rhamnosus</i> Hansen			<i>L. rhamnosus</i> LM07			<i>L. plantarum</i> LP-115			<i>L. plantarum</i> LM17			<i>L. plantarum</i> LBH 1075		
	Medio	pH a las 16 hrs	Cambio de pH	Medio	pH a las 16 hrs	Cambio de pH	Medio	pH a las 16 hrs	Cambio de pH	Medio	pH a las 16 hrs	Cambio de pH	Medio	pH a las 16 hrs	Cambio de pH
MRS C	6.49	4.04 ± 0.04	2.45 ± 0.04	6.64	3.97 ± 0.01	2.67 ± 0.01	6.59	3.86 ± 0.03	2.73 ± 0.03	6.57	3.97 ± 0.02	2.60 ± 0.02	6.60	3.93 ± 0.12	2.67 ± 0.12
Glu C	6.30	4.04 ± 0.02	2.26 ± 0.02	6.42	3.98 ± 0.02	2.44 ± 0.02	6.39	3.86 ± 0.02	2.53 ± 0.02	6.37	4.04 ± 0.01	2.33 ± 0.01	6.37	3.91 ± 0.09	2.46 ± 0.09
IAA 1	6.44	5.05 ± 0.01	1.39 ± 0.01	6.51	5.05 ± 0.03	1.46 ± 0.03	6.51	4.51 ± 0.01	2.00 ± 0.01	6.53	4.49 ± 0.00	2.04 ± 0.00	6.53	4.53 ± 0.03	2.00 ± 0.03
IAA 2	6.45	5.49 ± 0.04	0.96 ± 0.04	6.52	5.49 ± 0.01	1.03 ± 0.01	6.53	5.20 ± 0.02	1.33 ± 0.02	6.53	5.27 ± 0.01	1.26 ± 0.01	6.55	5.22 ± 0.04	1.33 ± 0.04
IAA 3	6.45	5.60 ± 0.01	0.85 ± 0.01	6.52	5.74 ± 0.02	0.78 ± 0.02	6.53	5.11 ± 0.03	1.42 ± 0.03	6.59	5.19 ± 0.01	1.40 ± 0.01	6.58	5.15 ± 0.05	1.43 ± 0.05
IAA 4	6.44	5.37 ± 0.01	1.07 ± 0.01	6.47	5.61 ± 0.02	0.86 ± 0.02	6.51	5.27 ± 0.01	1.24 ± 0.01	6.56	5.41 ± 0.03	1.15 ± 0.03	6.55	5.37 ± 0.08	1.18 ± 0.08
Iac	6.50	6.14 ± 0.09	0.36 ± 0.09	6.51	6.12 ± 0.01	0.39 ± 0.01	6.58	6.06 ± 0.03	0.52 ± 0.03	6.58	6.17 ± 0.02	0.41 ± 0.02	6.60	6.17 ± 0.09	0.43 ± 0.09
Glu-	6.51	6.13 ± 0.01	0.38 ± 0.01	6.56	6.14 ± 0.01	0.42 ± 0.01	6.56	6.08 ± 0.01	0.48 ± 0.01	6.58	6.22 ± 0.01	0.36 ± 0.01	6.60	6.22 ± 0.08	0.38 ± 0.08

Preparación de la eritrosina B para la tinción de H&EB para la identificación de eosinófilos en tejido de oreja.

Pesar 75mg, disolver en 90mL de agua y llevar a pH 10

Pesar 0.15g de eritrosina B y disolver en la solución anterior.

Aforar a 100mL de agua y ajustar el pH final a 10.

Preparación de soluciones para geles de SDS-Poliacrilamida

Acilamida:bis-acilamida 29:1

1. Pesar 29 gr de acilamida con mucho cuidado de no tirar y 1 gr. de

bis:acrilamida.

2. Disolver en 50 ml de agua bidestilada tapando el vaso de precipitados con aluminio. Una vez disuelto, aforar a 100 mL con agua bidestilada.
3. Filtrar con papel watman en la botella donde se almacenará. Filtración manual. En campana de extracción.
4. Cubrir la botella con papel aluminio y almacenar 4°C máximo 4 meses.

