



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Efecto de un probiótico sobre la evolución de la
Dermatitis Atópica en población joven

Autor:

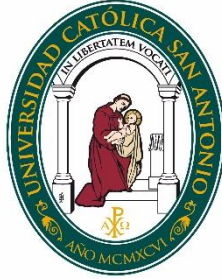
Beatriz Ruzafa Costas

Directores:

Dr. D^a. Ana Adela Ramírez Boscá

Dr. D. Vicente Navarro López

Murcia, septiembre de 2019



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D^a. Ana Ramírez Boscá y el Dr. D. Vicente Navarro López como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Efecto de un probiótico sobre la evolución de la Dermatitis Atópica en población joven” realizada por D^a. Beatriz Ruzafa Costas en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autorizan su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

LO QUE FIRMO, PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS REALES DECRETOS 99/2011, 1393/2007, 56/2005 Y 778/98, EN MURCIA A 20 DE SEPTIEMBRE DE 2019.

Dra. D^a. Ana Ramírez Boscá

Dr. D. Vicente Navarro López

AGRADECIMIENTOS

Haber recorrido este largo camino es todo un logro y un gran orgullo para todo aquel que lo alcanza. Y, ahora que estoy llegando a la meta y veo la luz al final del túnel, no puedo dejar de recordar a todas aquellas personas que me han acompañado.

Para empezar, mis directores de tesis. Ana, con su pasión desbordante, su conocimiento infinito de la clínica y su energía arrolladora. Nunca conoceré a nadie que viva la ciencia como tú. Como profesional eres, sin duda, la meta a alcanzar.

Vicente, con su mente analítica hasta el último nivel, su sosiego admirable y su sentido del humor que hace parecer lo difícil mucho más fácil. Su dedicación a la ciencia solo se puede explicar con una vocación enorme y una visión de la investigación que le lleva cada día más alto.

Ambos me habéis aportado innumerables cosas, tantas y tantas que son las que me han llevado a ser la persona y científica que soy hoy. Eternamente agradecida.

Al Centro Dermatológico Estético de Alicante, por permitirme llevar a cabo este proyecto. Cada una de las personas con las que he coincidido allí, a lo largo de tres años, me ha dado lo mejor sí misma y me ha ayudado hasta el fin de sus posibilidades. He aprendido mucho de la entereza y la gestión magnífica de Roge y Susi, siempre disponibles para mí, así como de la profesionalidad y dulzura de Encarna y Leti, grandes aliadas y maestras de los entresijos de un estudio clínico. Me llevo infinitas sonrisas en mi recuerdo y siempre lo recordaré con cariño y gran afecto. Mil gracias a cada uno de vosotros.

A Bioithas. Por ser el lugar actual donde puedo poner en práctica los conocimientos adquiridos en este tiempo y donde puedo seguir ejerciendo mi carrera investigadora. Por demostrar cada día la confianza depositada en mí. Y a

mis compañeras, por trabajar cada día codo con codo y por poner su granito de arena a mi tesis, aunque sea simplemente en forma de comprensión y ánimo.

A Eva. Por aportar tanto en tan poco tiempo. Por ser alegría, memes y *Power Point*. Todas las palabras se quedan cortas.

A la UCAM. Por una oportunidad de crecer y aprender única y completa. Gracias por colaborar en grandes proyectos de pequeños investigadores, aquellos que se forman cada día para ser los investigadores del mañana. Sin labores como las de esta universidad, nunca sería posible.

A mi hermano Fran. Por recordarme tantas veces que nunca hay que conformarse y que el fracaso no es una opción.

A mis padres. No hay proyecto vital en el que me embarque donde ellos no me apoyen. Me han visto sufrir y superar dudas en el día a día y hoy me ven, por fin, cerrar esta etapa que tan dura ha sido en ocasiones. Una vez más, gracias por la vida, gracias por cada esfuerzo, gracias por siempre.

A José. Porque si alguien puede saber lo que todo esto ha supuesto en mi vida, eres tú que lo has vivido a mi lado. Nuestro camino no ha sido fácil: la doctoranda y el opositor. Y, aun así, seguimos como el primer día, incluso mejor, aunque sea difícil de creer. Estos años de crecimiento a tu lado han sido mucho más fáciles porque tu fortaleza me mantiene en la lucha sin excepciones. Gracias por ser, estar y sumar cuando todo lo demás resta.

“La mente que se abre a una nueva idea, jamás volverá a su tamaño original”. Albert Einstein (1879 -1955)

RESUMEN

Introducción

La dermatitis atópica es una enfermedad dermatológica inflamatoria crónica caracterizada, principalmente, por la presencia de lesiones eccematosas acompañadas por prurito y que cursa con exacerbaciones. Su prevalencia ha aumentado en las últimas décadas hasta situarse en una de las patologías dermatológicas más comunes en niños. Se estima que, en la actualidad, alrededor de un 20 % de la población la sufrirá en algún momento de su vida. Aunque se suele desarrollar en la edad infantil, una gran parte de los pacientes continúa manifestándola en la edad adulta, además de presentar otras comorbilidades asociadas como asma, rinitis alérgica u otras patologías de tipo inmunológico. Todo ello constituye un problema, tanto para el sistema de salud como para la calidad de vida de los pacientes y sus familias, que supone altos costes y grandes molestias en el día a día del paciente. Las lesiones que provoca la enfermedad pueden controlarse mediante tratamiento farmacológico y medidas higiénico-dietéticas, pero estos tratamientos no siempre son eficaces y, en ocasiones, son necesarios durante largos periodos de tiempo, lo que provoca efectos adversos frecuentes. Por este motivo, existe una necesidad de tratamientos más eficaces y seguros. En cuanto a la etiopatogenia de la dermatitis atópica, está todavía en estudio y parece que su causa es multifactorial, contribuyendo a su desarrollo factores genéticos, ambientales, inmunológicos, así como la integridad de las barreras de la piel y el intestino. Este último punto está siendo motivo de interés debido a la hipótesis de la higiene, que relaciona la dermatitis atópica con la microbiota intestinal, definida como el conjunto de microorganismos localizados en el tracto digestivo. En este proyecto de investigación planteamos la hipótesis de que la modulación de la microbiota intestinal, mediante el uso de un preparado probiótico, ayudará a mejorar el pronóstico y la evolución de la dermatitis atópica en población joven.

Método

Cincuenta niños de entre 4 y 17 años con dermatitis atópica y un índice SCORAD (índice de gravedad de la patología) de 20 a 40 puntos fueron incluidos en un estudio de investigación doble ciego, y aleatorizados en dos grupos de intervención según el tratamiento que recibieron: probiótico o placebo. El

preparado probiótico estaba compuesto por las cepas *Bifidobacterium lactis* CECT 8145, *Bifidobacterium longum* CECT 7347 y *Lactobacillus casei* CECT 9104, administrando una dosis diaria de 10^9 unidades formadoras de colonias y con maltodextrina como excipiente. El placebo contenía únicamente maltodextrina. Los pacientes fueron evaluados en un centro especializado en dermatología, el Centro Dermatológico Estético de Alicante, y en cada una de las siete visitas del estudio de intervención se recogieron los datos del paciente según un protocolo previamente establecido. Los principales datos evaluados fueron el SCORAD, el número de brotes de dermatitis atópica, los tratamientos utilizados y los resultados de las determinaciones analíticas de una muestra de sangre periférica y heces. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado y cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. Al tratarse de menores de edad, los padres o tutores también firmaron el consentimiento.

Resultados

Tras un periodo de intervención y seguimiento de 12 semanas, la variable principal analizada, el índice SCORAD, se redujo un 77,1 % en el grupo probiótico frente a un 21,7 % en el placebo. Estos datos mostraron unas diferencias clínicamente muy relevantes con una clara significación estadística ($p < 0,001$). Del mismo modo, el uso de corticosteroides tópicos fue menor en el grupo probiótico, registrándose durante el estudio un menor número de días de utilización y de exacerbaciones. El índice que evaluaba la Impresión Clínica Global del dermatólogo fue menor en este grupo probiótico, donde un 91,2 % redujeron este valor frente a un 20,8 % en el grupo placebo. En cuanto a los parámetros analizados en muestras de sangre periférica, no se encontraron diferencias significativas. Por último, se comparó la microbiota intestinal de todos los pacientes al inicio del estudio con la de la población sana, observándose diferencias claras entre ambas poblaciones, lo que podría indicar que existe una microbiota intestinal específica en pacientes con dermatitis atópica. Tras la ingesta de tratamiento durante 12 semanas, el grupo probiótico experimentó un aumento de los géneros *Eubacterium*, *Gemmiger* y *Collinsella* y una disminución en *Faecalibacterium*, mientras que el grupo placebo permaneció sin cambios importantes. No se registraron acontecimientos adversos graves y su número fue similar en ambos grupos.

Discusión

Los resultados mostraron una gran eficacia del preparado probiótico en la mejora de los signos y síntomas de la dermatitis atópica. En este trabajo se han obtenido mayores diferencias en la respuesta al tratamiento que en otros estudios clínicos ya publicados debido, posiblemente, a la utilización de un preparado probiótico testado previamente en estudios pre-clínicos y con cepas seleccionadas específicamente para la patología. Dos de los tres componentes del SCORAD, la extensión y la intensidad, disminuyeron significativamente. Sin embargo, en los síntomas subjetivos la diferencia fue menor, ya que el tratamiento habitual consiguió controlar esta variable en un porcentaje elevado de casos. En los marcadores de inflamación, no hubo diferencias estadísticas entre grupos, pero sí una tendencia a disminuir los valores de interleuquinas dentro del grupo probiótico, posiblemente relacionado con una mayor respuesta. Respecto a la microbiota intestinal, se identificó una microbiota propia de pacientes con dermatitis atópica que se modificó considerablemente tras la ingesta del probiótico, a la vez que mejoraba la situación clínica del paciente. Futuras líneas de investigación se centrarían en estudiar la dosis y tiempo de administración correctos de este preparado probiótico, evaluar su efecto en otros rangos de población como adultos y neonatos, así como valorar diferentes cepas probióticas en combinación o de forma individual.

Conclusiones

El preparado probiótico estudiado, con cepas específicamente seleccionadas, es un tratamiento coadyuvante eficaz y seguro para el control de la dermatitis atópica leve-moderada en una población de 4 a 17 años. Este tratamiento reduce los valores del índice SCORAD y de sus componentes, el uso de corticosteroides tópicos, y modula la composición de la microbiota intestinal acercándola a los niveles que encontramos en la población sana, tras 12 semanas de tratamiento.

Palabras clave: dermatitis atópica, probiótico, microbiota, SCORAD, corticosteroides, eczema, infantil.

ABSTRACT

Introduction

Atopic dermatitis is a chronic inflammatory dermatological disease mainly characterized by eczema, itching and exacerbations. Its prevalence continues increasing and it is currently one of the most common in children, reaching 20% of the population. Although it is usually developed in children, a large proportion of patients manifest it in adulthood, in addition to presenting other associated comorbidities such as asthma, allergic rhinitis or other dermatological pathologies related to eczema. All of it constitutes a major problem both in the health system and in the quality of life of patients and their families, which entails high costs and great discomfort in day-to-day life. The disease lesions can be controlled by treatment and hygienic-dietetic measures, but they are not always effective and can cause adverse effects. Therefore, there is a need for effective and safe treatments. Additionally, the etiopathogenesis of atopic dermatitis is still under study and it seems that its cause is multifactorial: genetic, environmental and immunological factors, as well as the integrity of the skin and bowel barriers contribute to its development. This last point is being investigated to a greater extent since there could be an association between atopic dermatitis and intestinal microbiota. This study hypothesis was that the gut microbiota modulation by probiotics could produce improvements in the disease symptoms. The aim of this study was to evaluate the efficacy of a probiotic mix in children with mild to moderate atopic dermatitis.

Methods

Fifty children between 4 and 17 years old with a SCORAD (severity index of the pathology) of 20 to 40 points were included in a double-blind and randomized study into two intervention groups according to the treatment they received: probiotic mix and placebo. The probiotic mix was composed of *Bifidobacterium lactis* CECT 8145, *Bifidobacterium longum* CECT 7347 and *Lactobacillus casei* CECT 9104, at a concentration of 10^9 colony forming units with maltodextrin as excipient. The placebo contained maltodextrin only. Seven visits were made in the Centro Dermatológico Estético de Alicante in which all the patient data were recorded in the Case Report Forms including SCORAD index, atopic dermatitis flares, other

treatments use and the results of blood and feces samples analysis in order to study the parameters of inflammation and the composition of the intestinal microbiota. All patients signed the informed consent and fulfilled all the inclusion and exclusion criteria. When dealing with minors, the parents or legal guardians also signed the consent.

Results

At the end of the 12-week follow-up period, the SCORAD index was reduced by 77.1 % in the probiotic group compared to 21.7 % in the placebo group with a statistically significant difference ($p < 0.001$). Similarly, the use of topical corticosteroids was lower in the probiotic group with fewer days of use and number of exacerbations. Clinical Global Impression, again, was lower in this group, where 91.2 % reduced this index compared to 20.8 % in the placebo group. In analytical parameters, no significant differences were found. Finally, at the beginning of the study the intestinal microbiota of patients was compared with the healthy population. Differences between both populations were observed which suggest that a specific intestinal microbiota in patients with atopic dermatitis exists. After the 12-week treatment intake, the probiotic group experienced an increase in the genera *Eubacterium*, *Gemmiger* and *Collinsella* and a decrease in *Faecalibacterium*, while the placebo group remained virtually unchanged. No serious adverse events were recorded, and number was similar in both groups.

Discussion

Results showed a great efficacy of the probiotic in the improvement of atopic dermatitis signs and symptoms. In this work, greater differences have been obtained than in previous ones, due to the selection of the probiotic strains mixture as the optimal ones for the pathology. Two of the three SCORAD components (extension and intensity) decreased significantly. However, in subjective symptoms the difference was smaller since the usual treatment managed to control this variable. In the inflammation markers, there were no statistical differences, but there was a tendency to decrease interleukin values in the probiotic group. Regarding the microbiota, an atopic dermatitis specific microbiota was identified, which was modified after the probiotic ingestion. Future lines of research would focus on studying the correct dose and time of administration, other population

ranges such as adults and neonates, as well as different combinations of probiotic strains.

Conclusions:

A probiotic mixture with selected strains is an effective and safe treatment for the control of mild to moderate atopic dermatitis in a population of 4 to 17 years. This treatment reduces the SCORAD index values, its components and topical corticosteroids use and modulates the intestinal microbiota, bringing it closer to the levels found in the healthy population.

Keywords: atopic dermatitis, probiotic, microbiota, SCORAD, corticosteroids, eczema, childish.

ÍNDICE

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	5
Resumen	9
Abstract.....	13
SIGLAS Y ABREVIATURAS	23
ÍNDICE DE FIGURAS	25
ÍNDICE DE TABLAS	29
I – INTRODUCCIÓN.....	33
1.1 Dermatitis Atópica.....	33
1.1.1 Definición	33
1.1.2 Prevalencia	34
1.1.3 Impacto sobre la calidad de vida	35
1.1.4 Etiopatogenia	35
1.1.5 Lesiones y manifestaciones clínicas.....	38
1.1.6 Diagnóstico.....	40
1.1.7 Escalas de gravedad.....	42
1.1.7.1 SCORAD.....	42
1.1.7.2 Otras escalas de gravedad.....	43
1.1.8 Tratamiento.....	43
1.1.8.1 Antihistamínicos y control del prurito.....	43
1.1.8.2 Corticosteroides e inhibidores de calcineurina tópicos	44
1.1.8.3 Inmunosupresores sistémicos.....	46
1.1.8.4 Otros tratamientos no farmacológicos	46
1.1.8.5 Algoritmo de tratamiento	47

1.1.8.6 Tratamientos en estudio.....	47
1.2 Análisis clínicos.....	48
1.2.1 Translocación bacteriana.....	48
1.2.2 IgE.....	48
1.2.3 Eosinófilos.....	49
1.2.4 Microbiota.....	49
1.3 Probióticos.....	51
1.3.1 Probióticos como tratamiento.....	54
1.4. Justificación del estudio.....	54
II – OBJETIVOS.....	59
2.1 Objetivos del estudio clínico.....	59
2.1.1 Objetivo primario.....	59
2.1.2 Objetivos secundarios.....	59
2.2 Objetivos del proyecto.....	60
2.3 Hipótesis.....	60
III – MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
3.1 Diseño del estudio.....	65
3.1.1 Variables.....	66
3.1.1.1 Variables primarias.....	66
3.1.1.2 Variables secundarias.....	66
3.1.2 Planificación y cronograma.....	67
3.1.3 Comité de ética de investigación clínica y otros aspectos legales.....	67
3.2 Pacientes del estudio.....	68
3.2.1 Consentimiento informado y hoja de información al paciente.....	69
3.2.2 Criterios de inclusión.....	69
3.2.3 Criterios de exclusión.....	70
3.2.4 Criterios de retirada.....	71
3.2.5 Aleatorización.....	71

	19
3.3 Valoraciones clínicas.....	72
3.3.1 SCORAD.....	72
3.3.2 Impresión Clínica Global (ICG).....	75
3.4 Valoraciones analíticas	76
3.4.1 Translocación bacteriana.....	76
3.4.2 Interleuquinas.....	77
3.4.3 Microbiota intestinal.....	77
3.5 Tratamientos del estudio.....	78
3.5.1 Producto en estudio	78
3.5.1.2 Cumplimiento terapéutico.....	79
3.5.2 Corticosteroides tópicos	79
3.5.3 Corticosteroides sistémicos.....	79
3.5.4 Antihistamínicos.....	79
3.5.5 Antibióticos tópicos	80
3.5.6 Emolientes	80
3.6 Seguridad	80
3.6.1 Detección y documentación de acontecimientos adversos	80
3.6.2 Valoración de la causalidad.....	81
3.6.3 Procedimientos para la notificación inmediata de acontecimientos graves o inesperados	82
3.7 Procedimiento del estudio	83
3.7.1 Contenido de las visitas.....	83
3.7.2 Recogida de datos	87
3.7.3 Responsabilidades del personal investigador.....	87
3.8 Sistemas de control de calidad del estudio.....	88
3.8.1 Visitas de monitorización.....	88
3.9 Análisis estadístico.....	88
3.9.1 Determinación del tamaño muestral	88

IV – RESULTADOS.....	95
4.1 Población a estudio	95
4.1.1 Diagrama CONSORT.....	95
4.1.2 Datos demográficos y clínicos	96
4.1.2.1 Datos demográficos	96
4.1.2.2 Criterios de Hanifin-Rajka	97
4.1.2.3 Índice SCORAD	99
4.1.2.4 Otras variables clínicas de la DA	104
4.1.2.5 Parámetros analíticos.....	105
4.1.3 Análisis de homogeneidad	106
4.2. SCORAD.....	108
4.2.1 SCORAD total.....	109
4.2.2 Extensión de las lesiones	113
4.2.3 Intensidad de las lesiones.....	116
4.2.4 Síntomas subjetivos.....	119
4.3 Corticosteroides tópicos	123
4.4 Brotes de dermatitis atópica	126
4.5 Otros tratamientos para la dermatitis atópica.....	128
4.5.1 Corticosteroides orales	128
4.5.2 Antihistamínicos.....	129
4.6 Impresión Clínica Global (ICG).....	129
4.7 Pruebas analíticas.....	133
4.7.1 Parámetros analíticos y bioquímicos generales	133
4.7.1.2 Eosinófilos e IgE	135
4.7.2 Marcadores de inflamación.....	135
4.7.2.1 Translocación bacteriana.....	135
4.7.2.2 Interleuquinas.....	135
4.7.2.3 Proteína C reactiva	136

	21
4.8 Microbiota intestinal	136
4.9 Seguridad	145
4.10 Cumplimiento terapéutico.....	148
4.11 Periodo de seguimiento post-tratamiento	149
V – DISCUSIÓN	155
5.1 Objetivo primario.....	155
5.2 Objetivos secundarios.....	158
5.3 Fortalezas.....	162
5.4 Limitaciones y futuras líneas de investigación	163
5.5 Resumen de la discusión.....	165
VI – CONCLUSIONES	169
VII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	175

SIGLAS Y ABREVIATURAS

Células Treg	Células T reguladoras
CRD	Cuaderno de Recogida de Datos
DA	Dermatitis atópica
DLQI	<i>Dermatology Life Quality Index</i>
EASI	<i>Eczema Area and Severity Index</i>
EDC	Complejo de diferenciación epidérmica (Del inglés: <i>Epidermal Differentiation Complex</i>)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EVA	Escala visual analógica
GRAS	Generalmente reconocido como seguro (Del inglés: <i>Generally regarded as safe</i>)
IC	Intervalo de confianza
ICG	Impresión Clínica Global
IFN- γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleuquinas
Linfocitos Th	Linfocitos T helper
OTC	<i>Over the counter</i>
PIQoL-AD	<i>Parents' Index Quality of Life - Atopic Dermatitis</i>
PO-SCORAD	<i>Patient-Oriented SCOring Atopic Dermatitis</i>
QPS	Presunción cualificada de seguridad (Del inglés: <i>Qualified presumption of safety</i>)
SCORAD	Scoring Atopic Dermatitis
TSLP	Linfopoyetina estromal tímica (Del inglés: <i>Thymic stromal lymphopoietin</i>)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la dermatitis atópica.	33
Figura 2. Un problema de barrera cutánea. (36).....	37
Figura 3. Mecanismos de la DA. (41).....	38
Figura 4. Ejemplos fotográficos de lesiones características de la DA.	39
Figura 5. Zonas de lesiones más comunes en los distintos tipos de DA. (49)	40
Figura 6. Algoritmo de tratamiento de la DA. (77)	47
Figura 7. Mecanismo de acción de los probióticos en DA. (143).....	53
Figura 8. Valores asignados a cada segmento de la superficie corporal para la evaluación de la extensión de las lesiones. (57)	73
Figura 9. Grados de intensidad para cada una de las lesiones valoradas en la intensidad del índice SCORAD. (171)	74
Figura 10. Diagrama CONSORT.....	96
Figura 11. Distribución del índice SCORAD en la población.	99
Figura 12. Distribución de los valores de extensión en la población.	100
Figura 13. Distribución de los valores de intensidad de las lesiones en la población.	102
Figura 14. Distribución de los valores de prurito y pérdida de sueño en la población.	103
Figura 15. Distribución de los valores de los síntomas subjetivos en la población.	104
Figura 16. Evolución del SCORAD.....	110
Figura 17. Diferencias en el índice SCORAD entre grupos.....	110
Figura 18. Porcentaje de reducción del SCORAD.	111
Figura 19. Porcentaje de reducción del SCORAD por paciente en cada grupo de intervención para las distintas semanas de estudio.	112
Figura 20. Evolución de la extensión de las lesiones.	114
Figura 21. Diferencias en la extensión de las lesiones entre grupos.	115

Figura 22. Porcentaje de reducción de la extensión de las lesiones.	116
Figura 23. Evolución de la intensidad de las lesiones.....	117
Figura 24. Diferencias en la intensidad de las lesiones entre grupos.	118
Figura 25. Porcentaje de reducción de la intensidad de las lesiones.	119
Figura 26. Evolución de los síntomas subjetivos.	121
Figura 27. Diferencias en los síntomas subjetivos entre grupos.....	121
Figura 28. Porcentaje de reducción de los síntomas subjetivos.....	122
Figura 29. Días totales de uso de corticosteroides tópicos en cada grupo de tratamiento a lo largo del estudio clínico.....	124
Figura 30. Media de días de uso de corticosteroides tópicos durante el total y las dos mitades del estudio en cada grupo de tratamiento.....	125
Figura 31. Frecuencia de días de uso de corticoides tópicos.	126
Figura 32. Número de brotes de DA en ambos grupos de tratamiento.	128
Figura 33. Distribución de las categorías de ICG.	131
Figura 34. Pacientes que cambian de categoría de ICG en ambos grupos.....	133
Figura 35. Distribución de las muestras de microbiota intestinal de los pacientes de los grupos placebo y probiótico al inicio del estudio.....	138
Figura 36. Biodiversidad a nivel de género en ambos grupos de tratamiento al inicio del estudio clínico.	139
Figura 37. Diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre los pacientes con DA y la población sana.	140
Figura 38. Distribución de las muestras de microbiota intestinal de los pacientes con DA y la población sana.	141
Figura 39. Biodiversidad a nivel de género de los pacientes con DA e individuos sanos de los tres enterotipos.	142
Figura 40. Diferencias en la composición de la microbiota intestinal en los pacientes del grupo probiótico al inicio y el final del estudio.....	144
Figura 41. Distribución de las muestras de microbiota intestinal de los pacientes del grupo probiótico al inicio y al final del estudio.....	145
Figura 42. Brotes de DA en el periodo de seguimiento post-tratamiento.....	150

Figura 43. Días de uso de corticosteroides tópicos en el periodo de seguimiento post-tratamiento..... 151

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema del procedimiento de las visitas del estudio.....	84
Tabla 2. Características demográficas de la población.....	97
Tabla 3. Frecuencia de los criterios menores de Hanifin-Rajka.	98
Tabla 4. Frecuencia de los valores de intensidad de las lesiones.....	101
Tabla 5. Análisis de los parámetros analíticos en la población.....	105
Tabla 6. Análisis de homogeneidad de las variables demográficas y clínicas.....	106
Tabla 7. Análisis de homogeneidad de los parámetros analíticos.....	107
Tabla 8. Valores del SCORAD en ambos grupos de tratamiento.	109
Tabla 9. Reducción del SCORAD en ambos grupos de tratamiento.....	111
Tabla 10. Reducción del SCORAD en hombres y mujeres.	113
Tabla 11. Reducción del SCORAD según la edad.....	113
Tabla 12. Reducción del SCORAD según la edad de inicio de la DA.....	113
Tabla 13. Valores de la extensión de las lesiones en ambos grupos de tratamiento.	114
Tabla 14. Reducción de la extensión de las lesiones en ambos grupos de tratamiento.	115
Tabla 15. Valores de la intensidad de las lesiones en ambos grupos de tratamiento.	117
Tabla 16. Reducción de la intensidad de las lesiones en ambos grupos de tratamiento.....	118
Tabla 17. Valores de los síntomas subjetivos en ambos grupos de tratamiento..	120
Tabla 18. Reducción de los síntomas subjetivos en ambos grupos de tratamiento.	122
Tabla 19. Días totales de uso de corticosteroides tópicos.	123
Tabla 20. Número de brotes de DA.....	127
Tabla 21. Distribución de las categorías de ICG en ambos grupos de tratamiento.	130

Tabla 22. Pacientes con ICG < 2.	131
Tabla 23. Evolución de la DA según el cambio de categoría de la ICG.	132
Tabla 24. Comparación de los parámetros analíticos al final del estudio clínico.	134
Tabla 25. Valores de eosinófilos e IgE según la severidad de la DA en el grupo probiótico al final del estudio.	135
Tabla 26. Valores de interleuquinas al inicio y al final del estudio en ambos grupos.	136
Tabla 27. Composición promedio de la microbiota intestinal de los pacientes incluidos en el estudio.	137
Tabla 28. Distribución de los enterotipos en ambos grupos de tratamiento al inicio y al final del estudio.	143
Tabla 29. Acontecimientos adversos clasificados por nivel de gravedad en cada grupo de intervención.	146
Tabla 30. Acontecimientos adversos clasificados según causalidad con el tratamiento en cada grupo de intervención.	146
Tabla 31. Acontecimientos adversos registrados durante el estudio en cada grupo de intervención.	147
Tabla 32. Porcentaje de cumplimiento en cada grupo de intervención.	149

I - INTRODUCCIÓN

I – INTRODUCCIÓN

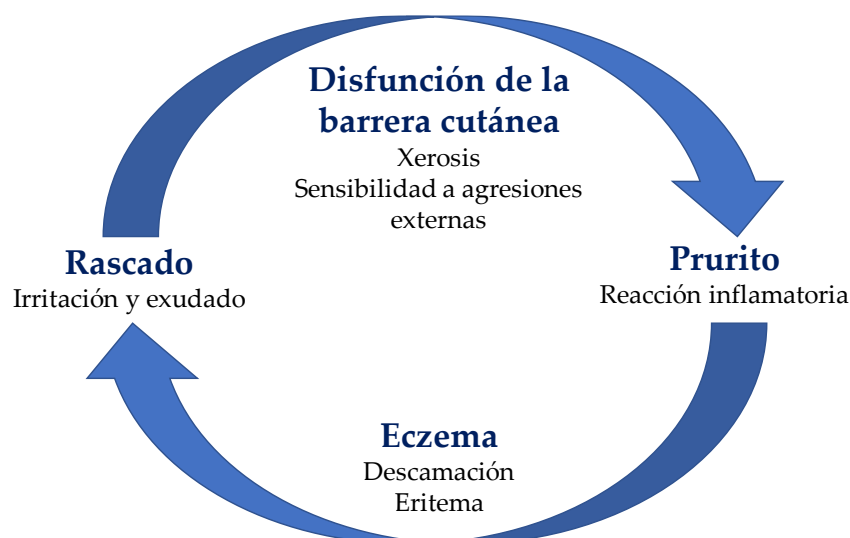
En este capítulo se van a exponer los aspectos relacionados con la dermatitis atópica, desde su inicio, desarrollo y establecimiento hasta su tratamiento, incluyendo una descripción completa de sus características demográficas, analíticas y clínicas.

1.1 DERMATITIS ATÓPICA

1.1.1 Definición

La dermatitis atópica (DA) es la enfermedad inflamatoria crónica cutánea más común. Está caracterizada por lesiones pruriginosas y descamativas, xerosis, inflamación, prurito intenso y exudado, que frecuentemente se asocia y puede coexistir con otras enfermedades como asma, rinitis alérgica, alergia a alimentos e infecciones secundarias recurrentes de la piel (Figura 1). (1, 2)

Figura 1. Ciclo de la dermatitis atópica.



La denominación de la DA fue evolucionando hasta llegar al término que utilizamos actualmente. Primero, en 1891, Brocq y Jacket la denominaron neurodermatitis con el prurito como principal síntoma; posteriormente, Besnier la clasificó como prurigo diatésico, eccematoide liquienoide. No fue hasta 1923 cuando Coca y Cooke eligen el vocablo *atopia*, que deriva del griego *a-* sin, *topos-* lugar, definiéndola como respuesta fuera de lugar, tras contrastar la relación entre alergia y asma. Finalmente, Wise y Sulzberger introdujeron el término de dermatitis atópica en 1933. (3, 4)

1.1.2 Prevalencia

La prevalencia de la DA ha aumentado en todo el mundo en las últimas décadas, especialmente en los países desarrollados donde afecta a un 20 % de la población. (5) El rápido aumento en la prevalencia se ha atribuido a cambios en el estilo de vida y en el medio ambiente, por lo que se deriva una alta variabilidad en los datos obtenidos según rangos de edad y zona geográfica. En general, la prevalencia de la DA se estima entre un 15 % y un 30 % en los niños, mientras que en los adultos oscila entre el 2 % y el 10 %. Algunos autores hablan de una prevalencia en adultos de hasta el 14 %, puesto que este porcentaje de casos está aumentando en los países industrializados. (6-8)

Respecto a la edad de inicio, los primeros síntomas se desarrollan habitualmente durante la infancia. En el 60 % de los casos se presentan en el primer año de vida, y en el 85 % antes de los 5 años, de los que al menos un tercio continúan manifestando la enfermedad en la edad adulta, llegando al 50 % en algunos países. En el resto de los casos, la enfermedad se comporta como auto resolutive y mejora después de la pubertad. (9)

También puede tener un inicio más tardío, conocido como inicio adulto de la DA, cuya frecuencia más aceptada es de un 5 a un 10 %, con mayor prevalencia entre los 20 a 40 años. (8, 10) Esta variabilidad se debe a las diferencias entre países, ya que afecta en mayor medida en algunos de ellos, alcanzando porcentajes de entre el 11 % y el 13 % de adultos en países como Singapur, Malasia o Suecia. (11) Algunos autores lo consideran un subtipo de DA, ya que pueden presentar variantes morfológicas atípicas.

Además, existen diferencias entre razas, detectándose una mayor prevalencia, en primer lugar, en niños de raza negra y, con un porcentaje algo menor, en los de raza asiática. (11, 12)

Por último, en cuanto a las diferencias entre sexos, hay diversidad de opiniones, pero, aunque algunos autores describen mayor prevalencia en niñas, (13) no existe evidencia científica suficiente ni publicaciones contrastadas que lo confirmen.

1.1.3 Impacto sobre la calidad de vida

Aunque la enfermedad, a menudo de carácter familiar, suele ser de escasa gravedad y su tratamiento puede ser sencillo, la DA altera significativamente la calidad de vida de los niños y los adultos, siendo su impacto familiar y económico superior al de la psoriasis (14) y, según algunos autores, equivalente a otras patologías graves como la diabetes *mellitus* de comienzo temprano. (15-18) Es importante reconocer la DA como una enfermedad común e incapacitante no sólo en los niños, sino también en los adultos. (19)

Este impacto socioeconómico supone un gran problema de salud pública, ya que, además, puede coexistir con otras enfermedades como asma bronquial, rinitis alérgica y alergia a alimentos. (20)

1.1.4 Etiopatogenia

Los avances en la comprensión de la patogenia de la DA sugieren que esta se debe a la interacción de múltiples factores que actúan sinérgicamente en la aparición y el mantenimiento de la enfermedad. (21)

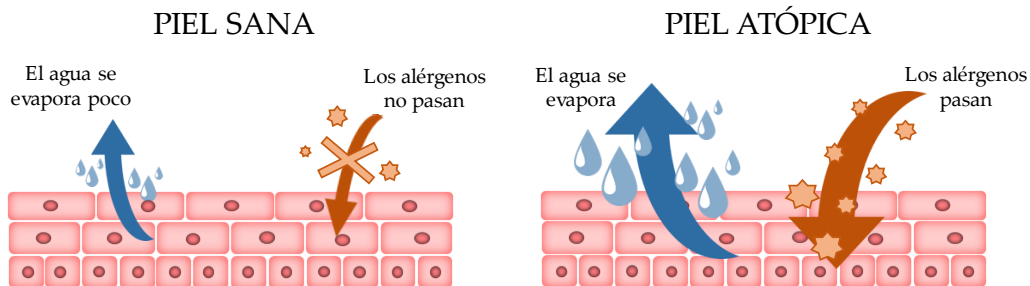
Se ha planteado que la DA es la manifestación cutánea de un trastorno sistémico que también da lugar a otras patologías ya comentadas anteriormente. Una parte de los pacientes con DA presentan niveles sanguíneos elevados de IgE (22) y de eosinófilos, (23) aunque los casos de comienzo temprano, por lo general, se presentan sin sensibilización mediada por IgE detectable. Estos niveles parecen estar relacionados con la gravedad de la enfermedad, de ahí que en los comienzos se muestren valores más reducidos. (24)

Los mecanismos inmunológicos que conducen a las manifestaciones de la DA continúan siendo activa y exhaustivamente investigados. Algunos hallazgos todavía no claramente estructurados, implican a células dendríticas cutáneas presentadoras de antígenos, y también a la pérdida de capacidad inmunosupresora de células Treg CD4+CD25+. (25, 26)

Como ocurre en otras enfermedades atópicas, la predominancia de células Th2 frente a las Th1 causa un desequilibrio que puede incluso agravar la patogénesis de la DA, incrementando la IgE y activando las interleuquinas (IL). (27, 28)

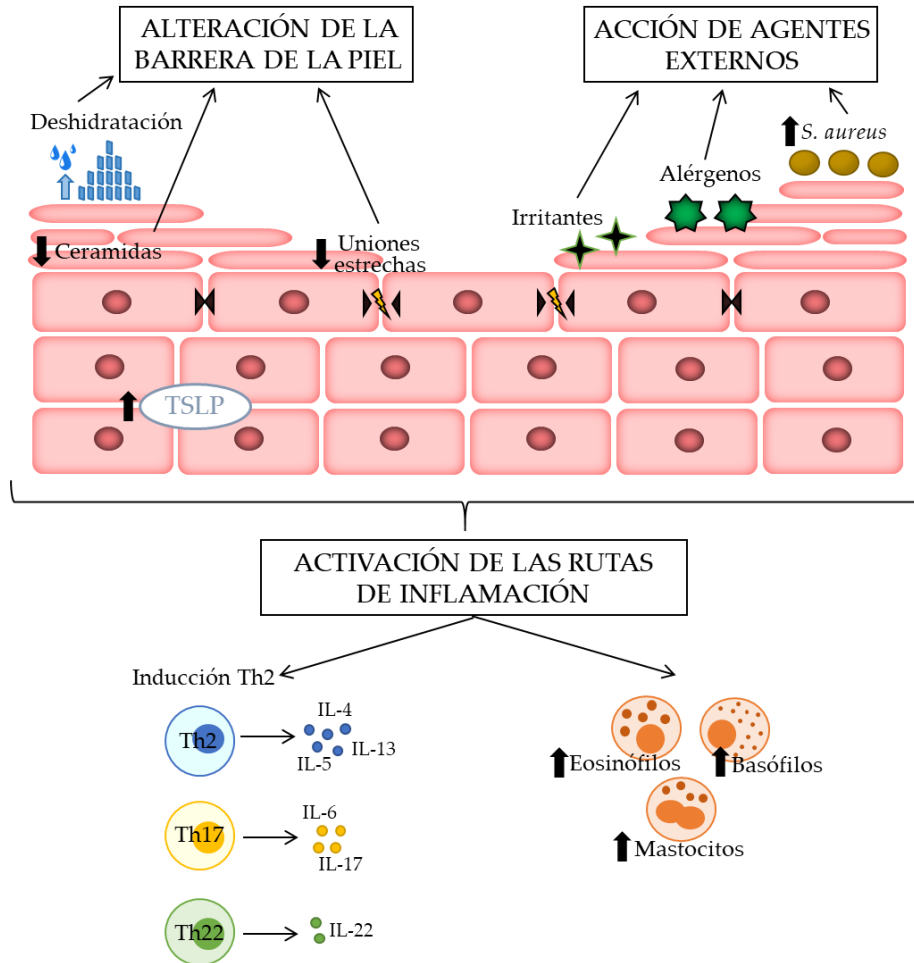
Por otro lado, cabe destacar la importancia de la integridad de la barrera de la piel. En los últimos años, se ha aceptado que su disfunción juega un papel esencial en la patogénesis de la DA. La composición de la barrera cutánea es muy compleja. La capa más externa de la epidermis es el estrato córneo, compuesto principalmente por proteínas, incluyendo filagrina, loricina, involucrina; y una capa de lípidos compuesta por ceramidas de cadena larga. (29) El estrato córneo proporciona protección frente a varios estímulos medioambientales como alérgenos, irritantes, cambios físicos e infecciones bacterianas, así como previene la pérdida de agua trans-epidérmica. Las últimas investigaciones señalan que esta pérdida está aumentada en los pacientes con DA, afectando así a la función de la barrera. (30, 31)

Numerosos estudios familiares han demostrado que la DA es una enfermedad altamente heredable. Actualmente, se están comenzando a estudiar los genes implicados en este proceso. Estudios preliminares han localizado indicios en el cromosoma 1q21 donde se encuentra el locus EDC o complejo de diferenciación epidérmica, aunque parece que se postulan también otros cromosomas. (32) En concreto, de todos los componentes de la barrera cutánea, la filagrina es la más significativa y las mutaciones nulas que se dan en ella han demostrado una fuerte asociación con la DA. (33) La filagrina interactúa con los filamentos intermedios causando su agregación en los microfibrillas. Defectos en la filagrina pueden causar disfunciones en la barrera de la piel, resultando en una protección más baja frente a bacterias y alérgenos (Figura 2). (34, 35)

Figura 2. Un problema de barrera cutánea. (36)

La mutación de los genes de la filagrina y de las uniones estrechas, así como los niveles reducidos de ceramidas contribuyen a las alteraciones de la función de barrera de la piel. Además, las alteraciones de la microbiota y la colonización de *S. aureus* pueden deteriorarla. Estas alteraciones dan como resultado un aumento de la respuesta Th2 mediada por una sobreexpresión de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) en los queratinocitos que aumenta el prurito, entre otros síntomas. (37, 38) En la DA se presenta una respuesta inmunológica bifásica con un perfil de citocinas Th2 prevalente inicial, con IL-4, IL-5 e IL-13 y la coexistencia de respuestas Th17 y Th22. Durante la fase crónica, hay un cambio a las células Th1 con afectación Th2, Th17 y Th22. (39, 40)

En resumen, la causa de la DA es multifactorial, incluyendo la disfunción de la barrera cutánea, las infecciones bacterianas, las alteraciones de la microbiota intestinal y la activación de varias vías inflamatorias, todas ellas relacionadas entre sí (Figura 3).

Figura 3. Mecanismos de la DA. (41)

1.1.5 Lesiones y manifestaciones clínicas

La DA presenta un amplio espectro de lesiones y manifestaciones clínicas cutáneas que aparecen según el estadio de evolución de la enfermedad. Estas oscilan desde formas menores presentes en fases crónicas, como la hiperqueratosis o la pitiriasis alba, pasando por lesiones eritematoedematosas con vesículas en fases agudas, hasta lesiones mayores con importante gravedad, como el *rash* eritrodérmico.

A continuación, se muestran ejemplos fotográficos de algunas de las lesiones más representativas de la DA (Figura 4).

Figura 4. Ejemplos fotográficos de lesiones características de la DA.



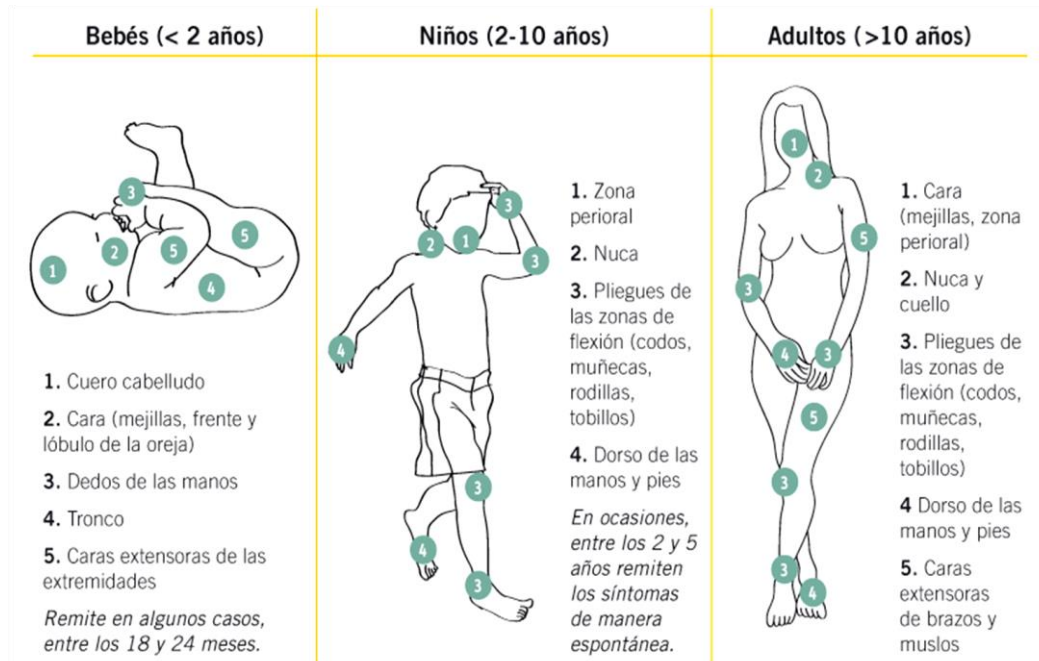
1. Xerosis. (42) 2. Eczema. (43) 3. Pliegue infraorbitario de Dennie-Morgan. (44) 4. Pitiriasis alba. (45) 5. Queratosis folicular. (45) 6. Hiperlinealidad palmar. (46)

Las manifestaciones clínicas se pueden clasificar en tres períodos típicos entre los que varía la distribución de las lesiones (Figura 5). La zona lesionada parece estar relacionada con el desarrollo de la etapa y las zonas que sufren mayor contacto.

El periodo de tiempo por el que se caracteriza cada etapa es el siguiente:

- Dermatitis atópica del lactante: desde el diagnóstico con pocos meses de vida hasta los dos años.
- Dermatitis atópica infantil: desde los dos años hasta un tiempo entre los 7 años y el establecimiento de la pubertad.
- Dermatitis atópica del adulto: puede evolucionar desde la pubertad o, como ya se ha comentado anteriormente, establecerse directamente en la edad adulta. (47, 48)

Figura 5. Zonas de lesiones más comunes en los distintos tipos de DA. (49)



1.1.6 Diagnóstico

La DA cursa sin cambios específicos microscópicos y con datos de laboratorio inconstantes que coinciden con los de otras patologías, por lo que el diagnóstico de la DA es clínico. (50) Los criterios de Hanifin-Rajka (51, 52) continúan siendo el estándar para el diagnóstico de la DA, y se encuentran validados en España y en la mayor parte de los países. Se han desarrollado y publicado otros criterios que pueden ser menos complicados o más prácticos, pero aún no están adecuadamente validados en España. (53-55)

Para considerarse el diagnóstico de DA, el paciente debe presentar, al menos, tres criterios de Hanifin-Rajka de las dos categorías: criterios mayores y menores.

A continuación, se enumeran todos los criterios de ambas categorías:

- **Criterios Mayores.**

- Prurito
- Distribución y morfología típica:
 - a) Liquenificación o linearidad flexional en adultos

b) Compromiso extensor y facial en infantes y niños

- Dermatitis crónica o crónicamente recidivante
- Historia personal o familiar de atopias (asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica)

• **Criterios Menores.**

- Xerosis
- Ictiosis, hiperlinearidad palmar o queratosis pilaris
- Reactividad a pruebas cutáneas inmediata (tipo 1)
- IgE sérico elevado
- Comienzo a temprana edad
- Tendencia a infecciones cutáneas (especialmente *S. aureus* y herpes simple) o defecto en la inmunidad mediada por células
- Tendencia a dermatitis inespecífica en manos y pies
- Eczema del pezón
- Queilitis
- Conjuntivitis recurrente
- Pliegue infraorbitario de Dennie-Morgan
- Queratocono
- Cataratas anteriores subcapsulares
- Oscurecimiento orbitario
- Eritema o palidez facial
- Pitiriasis alba
- Pliegues anteriores del cuello
- Prurito al sudar
- Intolerancia a lanas y solventes orgánicos
- Acentuación perifolicular
- Intolerancia a alimentos
- Curso influenciado por factores ambientales o emocionales
- Dermografismo blanco

1.1.7 Escalas de gravedad

1.1.7.1 SCORAD

Se han desarrollado diversos métodos y criterios que sirven para valorar la severidad y monitorizar la respuesta al tratamiento, tanto en ensayos clínicos como en estudios observacionales, e incluso en la práctica asistencial cuando en ésta se pretende objetivar la evolución del paciente con mayor precisión que la aportada por la percepción subjetiva. (56) En este sentido, uno de los métodos mejor validados, más contrastados, aceptados, utilizados y recomendados es la escala compuesta denominada índice SCORAD (*SCORing of Atopic Dermatitis*), desarrollado por el grupo *European Task Force on Atopic Dermatitis* en 1993. (57) En estudios comparativos se ha concluido que es el método de valoración de la severidad de la DA mejor y más ampliamente sustentado por pruebas concluyentes sobre su validez, reproducibilidad, sensibilidad y aceptabilidad. (58) El SCORAD consiste en un sistema de puntuación que tiene en cuenta la extensión y la intensidad de cinco tipos de lesiones fundamentales: eritema, edema o pápula, exudado o costra, escoriación y liquenificación; así como los síntomas que provocan, prurito y pérdida de sueño.

Existe cierta discrepancia sobre los valores del índice SCORAD que delimitan los diferentes grados de gravedad. Para algunos grupos se considera leve el cuadro que obtiene puntuaciones en el índice SCORAD hasta 15 puntos, pudiendo llegar hasta los 25; mientras que consideran como grave puntuaciones mayores a 40 o incluso hasta los 48 puntos. (59) Otros autores, basándose en correlatos de laboratorio, han aplicado en estudios publicados en revistas de difusión internacional puntuaciones de menor a 20, de 20 a 40, o mayor a 40 puntos, para delimitar, respectivamente, los cuadros leves, moderados y graves. (60, 61)

Actualmente, existe una nueva variante validada del SCORAD: el PO-SCORAD (*Patient-Oriented SCORing of Atopic Dermatitis*). (62, 63) En esta versión, es el paciente, o sus tutores en el caso de menores de edad, el que puede calcular su índice SCORAD a través de una aplicación virtual que le guía en el proceso. Esta aplicación permite registrar y enviar toda esta información al dermatólogo, que puede seguir de forma más controlada la evolución del paciente.

1.1.7.2 Otras escalas de gravedad

Otra escala con un uso muy extendido es el EASI (*Eczema Area and Severity Index*). Se trata de una prueba validada y que se correlaciona con el resto de mediciones para la DA. (59, 64)

Para medir la calidad de vida de los pacientes, se utilizan también escalas métricas como el QoL (*Quality of Life*) o su versión para padres de pacientes, PIQoL (*Parents' Index of Quality of Life*); o el DLQI (*Dermatology Life Quality Index*), ambos validados para su uso. (65, 66)

Por último, encontramos una escala para medir la gravedad general de la enfermedad a criterio del facultativo. Se trata de la Impresión Clínica Global (ICG), o *Investigators' Global Assessment* (IGA) en inglés, una escala compuesta de seis categorías que van desde una puntuación de cero para un paciente limpio de lesiones hasta una puntuación de 5, que corresponde con una DA muy grave. (67)

1.1.8 Tratamiento

El tratamiento de la DA está relativamente consensuado, y en nuestro país se siguen las guías aceptadas. (68, 69) En términos generales, los objetivos del tratamiento son evitar el prurito, eliminar el exudado, curar la infección, acabar con la lesión inflamatoria y prevenir las recaídas. (70, 71)

1.1.8.1 Antihistamínicos y control del prurito

El síntoma más común y persistente en la DA es el prurito, y será la primera diana del tratamiento. El prurito, y el rascado que provoca, incrementan las infecciones y la reacción inflamatoria. Para su eliminación se utilizan antihistamínicos H1, a pesar de que su efectividad no está claramente demostrada. (48) Los que parecen presentar mejores resultados son los antihistamínicos H1 clásicos que producen sedación como la hidroxicina, clemastina o dexclorfeniramina, para la fase más aguda y tras el brote, especialmente en aquellos pacientes en los que el sueño se ve afectado. (72) Los antihistamínicos H1 de más reciente desarrollo como desfenfluramina, loratadina, cetirizina y derivados, tienen menor efecto sedante, pero con resultados que, en ocasiones, no presentan alta eficacia y sin evidencia en su uso como monoterapia. (73)

En la práctica, no obstante, los antihistamínicos de reciente desarrollo se suelen utilizar desde la fase aguda, ya que los clásicos presentan esos efectos adversos en el Sistema Nervioso Central que interfieren con las actividades diarias: sedación, ya comentada y que varía desde somnolencia a sueño; depresión con descoordinación, mareo, laxitud y disminución de la concentración; y, ocasionalmente, agitación. Aunque se considera que los antihistamínicos H1 presentan un bajo riesgo de estos efectos adversos, los datos se extrapolan de su uso en pacientes con patologías de tipo alérgico (asma, rinitis alérgica), y no está claro que en otras patologías el riesgo en niños sea similar. (74, 75) A pesar de todo ello, los pacientes y sus padres encuentran gran utilidad en este tratamiento ya que mejoran su calidad de vida. (76)

Otros fármacos utilizados para combatir el prurito son la naltrexona, un antagonista de los receptores opiáceos, y el montelukast, un antagonista de leucotrienos, ambos con evidencia científica de eficacia. (77, 78)

1.1.8.2 Corticosteroides e inhibidores de calcineurina tópicos

Respecto al tratamiento del eczema, la finalidad primordial es el control de la lesión inflamatoria, que secundariamente ayuda a controlar el picor, y se realiza mediante el uso de corticosteroides tópicos (79-81) de distinta potencia en función de la severidad de la lesión y de la situación del paciente. Generalmente, en la fase de brote o exacerbación aguda de la DA se utilizan los corticosteroides tópicos en administración diaria, mientras que durante la fase de remisión pueden utilizarse pautas de administración semanal.

Los efectos adversos de los corticosteroides tópicos plantean una limitación o restricción para su empleo. En estos pacientes pueden presentarse reacciones adversas que dependen de la potencia del medicamento utilizado y de la duración del tratamiento. Las reacciones adversas en el lugar de administración son las más comunes, pudiendo distinguir: atrofia cutánea, Petequias, estrías atróficas, hipertrichosis, despigmentación, telangiectasias, foliculitis, e incluso glaucoma si se aplican periocularmente. (82, 83) También se han descrito, con mucha menor frecuencia, efectos adversos sistémicos de mayor gravedad, como: supresión del eje hipotalámico-hipófiso-suprarrenal, retraso del crecimiento o manifestaciones cushingoides. (84)

Aproximadamente el 70-80 % de los padres y cuidadores de niños con eczema atópico están preocupados por los efectos adversos de los corticosteroides tópicos, lo que reduce la adherencia al tratamiento. Alrededor de un 25 % de padres no aplican los corticosteroides tópicos por la ansiedad que les origina y la fobia existente contra este tipo de tratamiento. (85, 86)

Los efectos adversos de los corticosteroides, junto con la falta de respuesta a los mismos en algunos pacientes, han promovido el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de la inflamación. (87) Entre los mejor estudiados se encuentran los inhibidores de calcineurina en administración tópica: tacrolimus y pimecrolimus. (88, 89) Estos medicamentos inhiben la actividad de células que participan en la respuesta inmunológica, incluidos los linfocitos T, y reducen la producción de citocinas y la respuesta inflamatoria. No parecen incrementar el riesgo de infecciones y no producen atrofia cutánea. (82)

Anteriormente, existían dudas sobre la seguridad de estos medicamentos en tratamientos a largo plazo, incluso se planteaba un aumento del riesgo de cáncer. Esta relación se basa en la notificación de casos de enfermedades malignas, incluyendo linfomas cutáneos y de otros tipos, así como cáncer de piel, en pacientes que han utilizado estos productos. En la actualidad, todavía se desconoce el efecto a largo plazo sobre la respuesta inmune de la piel a nivel local y se sigue investigando en este campo. El riesgo potencial de absorción de estos fármacos, y de que se alcancen concentraciones activas sistémicamente, sólo se ha detectado con tacrolimus.

Otros inconvenientes del uso de inhibidores de calcineurina consisten en una mayor predisposición a padecer infecciones superficiales de la piel por el virus del herpes o eccema herpético, y que no deben utilizarse sobre infecciones clínicas, por lo que, en estos casos, debe tratarse la zona previamente. Por último, algunos estudios describen un aumento el prurito y producción de quemazón. (90)

Respecto a su eficacia, parece menor a la de los corticosteroides tópicos, pero es un dato sin confirmar. (91) En consecuencia, y a pesar de que cuentan con un apoyo cada día mayor y más estudios que avalan su seguridad, (88, 92, 93) su elevado coste y los datos antes señalados parecen mantener a los inhibidores de calcineurina en una posición muy atractiva, pero con limitaciones y dudas no resueltas. (94)

Como conclusión, los productos que contienen tacrolimus o pimecrolimus para el tratamiento tópico de la DA están indicados en niños mayores de 2 años en los que no se aconseja el uso de corticosteroides tópicos o éstos han fracasado previamente. (77)

1.1.8.3 Inmunosupresores sistémicos

En este grupo encontramos los corticosteroides orales, la ciclosporina, el metotrexato y los tratamientos biológicos, entre otros.

La ciclosporina es otro tipo de inhibidor de calcineurina, con efecto sobre los linfocitos T. Es muy utilizado en psoriasis y empezó a utilizarse como uso preventivo al rechazo de órganos trasplantados. (98)

Si hablamos de fármacos biológicos, disponemos de una amplia variedad de ellos indicados para la DA severa. Algunos ejemplos son el interferón gamma, inmunoglobulinas intravenosas o anticuerpos monoclonales como omalizumab y dupilumab. (95-97)

En general, estos tratamientos continúan siendo estudiados para comprobar su eficacia y su seguridad, pero su uso está aceptado e incluido en algunas guías de tratamiento de la enfermedad como opciones finales y tras el fracaso de los habituales, (99) aunque son necesarios más estudios para su confirmación. (99, 100)

1.1.8.4 Otros tratamientos no farmacológicos

Como tratamiento no farmacológico se puede utilizar la fototerapia. Se trata de una segunda línea de tratamiento, tras fracaso de los tratamientos de lección, y se utiliza en pacientes con DA severa. Su eficacia está limitada por sus efectos secundarios, la variabilidad de los pacientes y el tipo de bandas y luces utilizadas. (101, 102)

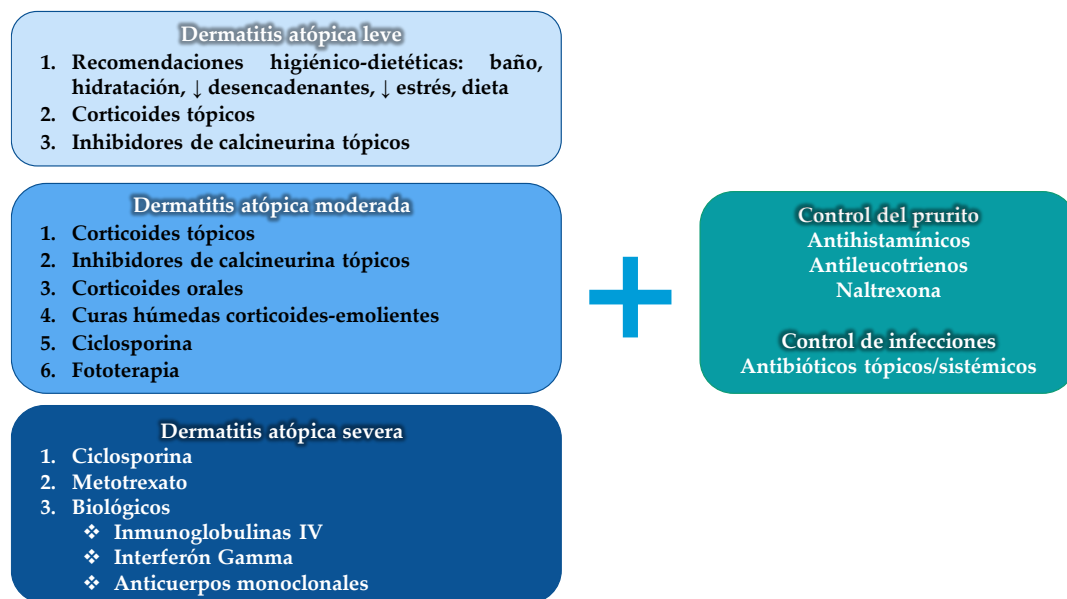
Para prevenir las recidivas se utilizan recomendaciones higiénico-dietéticas, tratando de evitar el contacto con desencadenantes y alérgenos, incluidos alimentos o irritantes de la piel, así como el calor y la humedad excesivos siguiendo unas pautas correctas de baño, por ejemplo. (103) De la misma forma, estas medidas sirven para el cuidado general de la piel, disminuyendo la sequedad y manteniendo la barrera de la piel en condiciones más favorables. (73, 104, 105)

De todas ellas, la más beneficiosa para el cuidado de la piel de la DA es la hidratación con emolientes. La aplicación de los emolientes debe hacerse a diario, siempre sobre las partes de la piel no comprometidas ni lesionadas, sin frotar demasiado y con una buena higiene de manos que evite las infecciones. Los emolientes más apropiados son los que contienen altos porcentajes de ceramidas y aquellos que presentan un pH algo ácido. (106, 107)

1.1.8.5 Algoritmo de tratamiento

En resumen, los algoritmos de tratamiento están claramente estructurados por niveles de gravedad de la DA, en los que va aumentando la potencia del fármaco (Figura 6). (108)

Figura 6. Algoritmo de tratamiento de la DA. (77)



1.1.8.6 Tratamientos en estudio

El tratamiento para la DA está constantemente actualizándose, por lo que están siendo desarrollados nuevos fármacos con posible eficacia sobre ella. Es el caso de la vitamina D, donde estudios preliminares han encontrado

concentraciones más bajas de esta vitamina en la DA de peor pronóstico y mayor gravedad. (109)

Otro caso son los anticuerpos frente a IL-31, que controlan las vías de aparición del prurito y que se encuentran, actualmente, en investigación en fase II con buenos resultados, como es el caso del nemolizumab. (110, 111)

Para terminar, otra nueva vía de estudio nace de los recientes hallazgos en microbiota intestinal y DA de la que podrían surgir nuevas dianas terapéuticas: los probióticos. Su desarrollo podría resultar en un nuevo tratamiento para la DA. (41)

1.2 ANÁLISIS CLÍNICOS

Los siguientes análisis se pueden realizar para conocer las características de la DA. Algunos se encuentran todavía en fase de investigación, pero en el futuro podrían servir todos ellos como factores predictivos y descriptivos, tanto de la gravedad como de la evolución de la enfermedad.

1.2.1 Translocación bacteriana

La translocación bacteriana es un fenómeno que consiste en la circulación de fragmentos de ADN bacteriano en sangre que han pasado al torrente sanguíneo debido a la permeabilidad aumentada en las paredes del intestino. Ocurre en diversas patologías intestinales y también en algunas patologías de la piel, como la psoriasis. La presencia de ADN bacteriano en sangre podría aumentar el número de brotes de estas enfermedades e inducir una respuesta sistémica inflamatoria. (112) Los probióticos podrían contribuir a la integridad de las membranas de manera que se evite esta translocación.

1.2.2 IgE

En la DA, la IgE se eleva por el aumento de la vía Th2 y la producción de interleuquinas proinflamatorias, como IL-4 e IL-13, que estimulan la formación de esta inmunoglobulina.

Las primeras investigaciones apuntaban hacia la IgE como marcador de la enfermedad, ya que aparecía elevada en una gran cantidad de pacientes con DA.

Posteriormente, se ha comprobado que no siempre ocurre así, y que se trata de una característica de la DA grave o relacionada con otras patologías concomitantes, como la rinitis alérgica o el asma. (113)

En los pacientes en los que sí está elevada puede servir como diana terapéutica, siendo el caso de los anticuerpos monoclonales como el omalizumab.

En cuanto a los probióticos, algunos estudios afirman que pacientes tratados con ellos podrían reducir sus niveles de IgE. (114, 115)

1.2.3 Eosinófilos

Este parámetro también se encuentra elevado en algunos pacientes con DA por encima de un recuento celular de 450-550 células por microlitro (cél/ μ l), considerado como eosinofilia, aunque no se considera valor patológico hasta cifras superiores a 1500 células/ μ l. (116) Dicho aumento está asociado, de nuevo, tanto a la DA como a otros procesos alérgicos y patologías similares. Sin embargo, muchos pacientes con DA tienen niveles normales de eosinófilos. (28) Por tanto, no puede utilizarse el recuento de eosinófilos como diagnóstico, aunque niveles altos pueden asociarse, en ocasiones, con mayor severidad e índices SCORAD más elevados. (117) No obstante, en los primeros meses de vida sí podría actuar como factor predictivo del inicio de la DA. (23)

1.2.4 Microbiota

La microbiota intestinal está formada por millones de cepas bacterianas que establecen una relación de huésped con los humanos, de manera que puede influir en la regulación de enfermedades inmunes, modulando las respuestas innatas y adaptativas. (118)

En la actualidad, numerosos programas de investigación se han dedicado, y continúan dedicándose, a caracterizar los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal. Entre ellos, destaca el Proyecto Microbioma Humano o el Proyecto Europeo de Metagenómica del Tracto Intestinal Humano (MetaHIT), en los cuales se pretende describir el microbioma, es decir, el conjunto de genes de todos los microorganismos albergados en el tracto gastrointestinal. (119)

El establecimiento de la microbiota intestinal es un proceso complejo que se inicia en el parto donde, en el caso de parto vaginal, es el contacto del bebé con la vagina lo que aporta las bacterias que colonizarán el intestino, siendo similar la composición de la microbiota vaginal materna y la recién formada microbiota intestinal del neonato. En este caso, predominan las bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides*. (120, 121)

Cuando el parto se realiza por cesárea, no se produce ese contacto directo, por lo que las bacterias que colonizan son las ambientales y cutáneas, con predominio del género *Staphylococcus* y *Streptococcus*, mientras que las bacterias ya comentadas colonizan más tardíamente. (122)

No es hasta cumplir los tres años cuando la microbiota intestinal se establece por completo, aunque sufre modificaciones durante toda la vida. (123, 124) Las causas de estos cambios son múltiples, siendo la dieta la más común de ellas, pero también pueden deberse al uso de antibióticos, a diversas enfermedades y a situaciones de estrés. (125, 126)

En esta primera etapa de la vida, el sistema inmune es inmaduro y es la exposición a la microbiota intestinal lo que provoca, en parte, el desarrollo e integridad del mismo, así como de la regulación de la inmunidad innata y adaptativa en el huésped.

Cuando la microbiota intestinal se ve alterada y cambia su composición, el sistema inmune es incapaz de corregir este desequilibrio y de evitar las agresiones de algunos patógenos. Este fenómeno se conoce como disbiosis, y se define como una alteración de la homeostasis de la microbiota intestinal debida a cambios en su composición funcional, actividades metabólicas o cambios en su distribución local. (127, 128) La disbiosis se ha relacionado con diversas enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal, la enterocolitis, la obesidad, la diabetes o enfermedades alérgicas y de la piel, como la DA. (129)

Estamos asistiendo a un incremento muy significativo de la prevalencia de enfermedades alérgicas y de la piel, lo que podría explicarse mediante la hipótesis de la higiene, que sugiere que la exposición a agentes patógenos en la infancia previene el desarrollo de este tipo de enfermedades. En los países occidentales, se producen cada vez menos infecciones debido a la excesiva protección de los niños y al amplio uso de antibióticos. Los primeros años de vida resultan un periodo

crítico para el desarrollo del sistema inmune, en el que estas exposiciones podrían estimular su maduración y afectar a su funcionamiento en el futuro. (130) Tanto la disbiosis como la hipótesis de la higiene resaltan la relación entre la microbiota y la DA, dando explicación a la alteración inmunológica explicada anteriormente, con la que cursan esta y otras patologías similares. (131)

El estudio de la microbiota intestinal se convierte, por tanto, en un procedimiento esencial para el entendimiento de los mecanismos de ciertas enfermedades y, en concreto, de la DA. Numerosas publicaciones científicas están describiendo la microbiota intestinal característica de ciertas patologías. (132)

Para su análisis, se categorizan las distintas microbiotas intestinales atendiendo al género bacteriano predominante. De esta manera, se han diferenciado tres enterotipos: (133)

- Enterotipo 1 con predominio de bacterias del género *Bacteroides*.
- Enterotipo 2 con predominio de bacterias del género *Prevotella*.
- Enterotipo 3 con predominio de bacterias del género *Ruminococcus*.

La descripción de la microbiota intestinal abre la puerta a una nueva diana de tratamiento mediante la cual se podría modificar su composición. Es el caso de los probióticos, en los que las bacterias que contienen pueden colonizar el intestino y establecerse en él, regular y restaurar la disbiosis de la microbiota intestinal y, por consiguiente, alcanzar una mejora en aquellas patologías que se ven afectadas por la microbiota y su equilibrio, produciendo un efecto inmunomodulador y/o regulador del ecosistema microbiano.

1.3 PROBIÓTICOS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades suficientes y adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped”. Esta definición está aceptada por otras grandes organizaciones internacionales como la Organización Mundial de Gastroenterología, y multitud de grupos de expertos continúan debatiendo y consensuando su papel en la salud. (134)

El uso de probióticos en el tratamiento de la DA se ha estudiado en los últimos años en un número limitado de estudios piloto con resultados variables. El

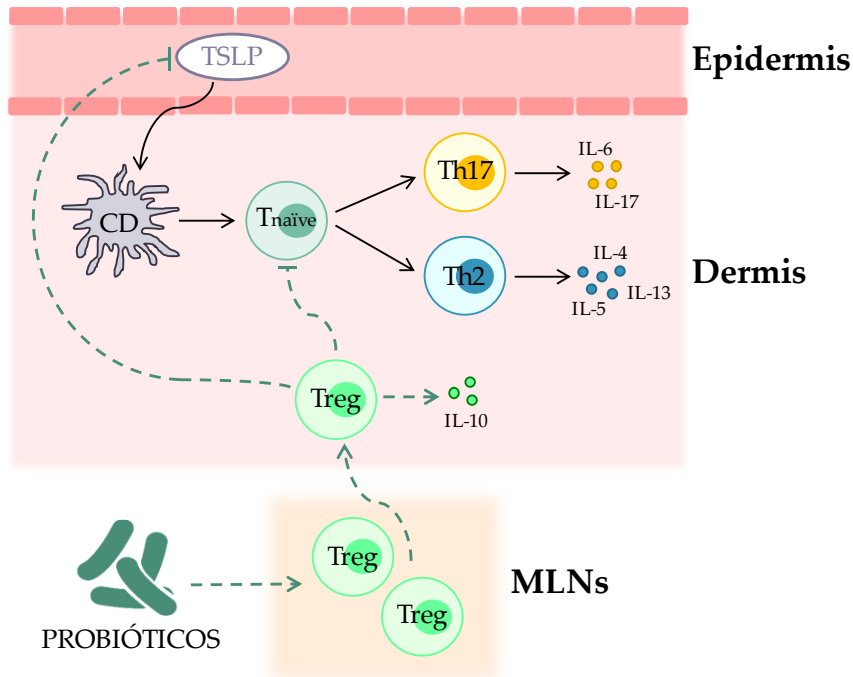
número de estudios clínicos en este campo sigue aumentando, al igual que los metaanálisis atendiendo a publicaciones previas, y todos ellos tienen un objetivo común: demostrar un efecto beneficioso del uso de probióticos en circunstancias diversas, atendiendo a la edad de los pacientes estudiados, al tipo de probiótico utilizado, a la dosis del mismo y al uso de combinaciones de probióticos. (135-140)

Actualmente, disponemos de resultados de un importante número de estudios que han explorado la eficacia de probióticos concretos atendiendo a las cepas específicas de los mismos, tanto en el campo de la prevención como en el tratamiento de la DA. En general, la evidencia sugiere que los probióticos podrían ser una opción para mejorar la DA moderada y severa en niños y adultos. Por el contrario, su uso clínico es limitado y en nuestros días no hay todavía una fuerte evidencia científica que apoye su efectividad y seguridad en la práctica clínica. Luego, sigue existiendo una necesidad de estudios que confirmen esta evidencia con una inclusión cada vez mayor de pacientes en los mismos. (141, 142)

El establecimiento de la microbiota en el periodo temprano tras el nacimiento activa el sistema inmune innato y adaptativo y los estímulos microbianos ininterrumpidos sirven para madurar el sistema inmune de la mucosa intestinal. En el caso de las enfermedades alérgicas se ha descrito un desequilibrio en esta maduración del sistema inmune y, con ello, la respuesta Th1/Th2. Los probióticos contribuyen a regular las reacciones alérgicas de hipersensibilidad mediante la regulación de la respuesta mediada por Th2, que ayuda a mejorar el balance de la respuesta Th1/Th2. (143)

Estudios en modelos animales han demostrado que la ingesta de probióticos disminuye la inflamación producida por los alérgenos en la piel atópica. Los probióticos inducen un aumento de las células Treg, de manera que se reducen los niveles de IFN- γ , IL-4 y linfocitos Th17, y aumenta la expresión de IL-10 y TGF- β , relacionadas con Treg en los ganglios linfáticos mesentéricos. (144, 145)

Los probióticos también producen un efecto inhibitorio de la maduración de células dendríticas y, de ahí que, evitan su migración a órganos linfáticos secundarios, donde se produce la diferenciación de las células T naïve en linfocitos Th2. Los probióticos pueden inhibir esta diferenciación, evitando la inflamación de la piel que producen, mediante la supresión de la expresión de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP). (143, 144) Estos procesos se representan en la Figura 7.

Figura 7. Mecanismo de acción de los probióticos en DA. (143)

Dentro de las posibles cepas probióticas con efecto positivo sobre la DA, destacamos las bacterias del género *Lactobacillus*, que parecen contribuir a la supresión de la inflamación Th2 dominante y al aumento de producción de las citoquinas Th1. (146, 147) Además, algunas cepas de *Lactobacillus* poseen actividad *in vitro* frente a ciertas bacterias patógenas. (148)

Otras cepas con destacados efectos atribuidos sobre la patología en cuestión son las pertenecientes al género *Bifidobacterium*. (149) La cepa *Bifidobacterium lactis* CECT 8145 ha demostrado propiedades antioxidantes en el modelo *Caenorhabditis elegans*, (150, 151) lo que podría beneficiar también en la DA, ya que esta patología se ha relacionado con el estrés oxidativo en estudios anteriores. (152)

Por otro lado, la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347 ha demostrado un efecto antiinflamatorio en estudios preclínicos y clínicos, y puede modular la microbiota intestinal. (153)

1.3.1 Probióticos como tratamiento

La difícil clasificación de los probióticos, así como el vacío legal en el que se enmarcan en numerosas ocasiones, complica la aplicación de la legislación vigente tanto en la investigación clínica como en la posterior comercialización de productos.

La nomenclatura más aceptada sería la de “complemento alimenticio” bajo la que están regulados la mayoría de productos que contienen microorganismos vivos en España.

Según el Reglamento (CE) 178/2002, un complemento alimenticio es “cualquier sustancia o producto destinado a ser ingerido por los seres humanos o con probabilidad razonable de serlo, tanto si han sido transformados entera o parcialmente como si no”. (154) Posteriormente, el Reglamento (CE) 1924/2006, legisló las normas a tener en cuenta para las declaraciones posibles a realizar sobre estos complementos. (155)

A nivel de su venta en farmacia, serían considerados productos *Over the counter* (OTC), de venta libre sin prescripción realizada por un médico y susceptibles de consejo farmacéutico.

Las cepas probióticas utilizadas como tratamiento están clasificadas por la *European Food Safety Authority* como GRAS (Generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés *Generally regarded as safe*) y como QPS (Presunción cualificada de seguridad, por sus siglas en inglés *Qualified presumption of safety*). Por tanto, no necesitan la autorización de ninguna autoridad competente para su comercialización. (156)

1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Muchos autores han descrito, en los últimos años, la asociación entre una disrupción de la función de la barrera intestinal y el origen de la DA, mediada por la activación inmunológica que conduce a la inflamación dominante Th2. En este aspecto, la microbiota intestinal podría jugar un papel inmunomodulador importante y la evidencia sugiere que poseen propiedades inmunomoduladores adicionales en el desarrollo de una tolerancia inmune normal. Recientemente, el análisis de la microbiota intestinal de los pacientes con DA ha mostrado cambios

de composición intraespecie en *Faecalibacterium prausnitzii*, lo que se traduce en la reducción de la producción de butirato y propionato propia de la especie. Estos compuestos son ácidos grasos de cadena corta producidos por bacterias con un papel antiinflamatorio. Además, el butirato ha mostrado tener un papel clave en el mantenimiento de la integridad de las barreras. Por lo tanto, niveles reducidos de microorganismos productores de butirato y propionato pueden provocar un estado proinflamatorio en el intestino y pérdida de la integridad de la barrera. (157) Todos estos datos indican el papel potencial de los probióticos como recuperadores y moduladores de la microbiota y, consecuentemente, como complementos nutricionales suplementarios al tratamiento de la DA.

En cuanto al tratamiento para la DA, existe una necesidad médica bien establecida de tratamientos seguros y eficaces a largo plazo, ya que afecta a una parte importante de la población, con consecuencias remarcables sobre la calidad de vida y con complicaciones médicas de los pacientes afectados. Los tratamientos actuales no consiguen una eficacia total además de producir diversos efectos adversos. Por el contrario, la seguridad del uso de probióticos en patologías diferentes a la atopia, así como su eficacia, ha quedado patente. (158-160) El número de estudios sobre la eficacia de probióticos en la DA ha crecido en los últimos años, pero todavía es necesario aclarar diversos aspectos de estos probióticos para contrastar la evidencia. (161-163)

El estudio presentado en esta tesis doctoral trata de aumentar la evidencia sobre el uso de probióticos y responder a la necesidad del paciente con DA, aportando nuevos datos que permitan el desarrollo de un nuevo tratamiento para utilizar junto al tratamiento habitual.

Como resultado final de este proyecto, se pretendía el lanzamiento al mercado de un tratamiento coadyuvante para la DA leve moderada, seguro y con alta eficacia, del que puedan beneficiarse todos aquellos pacientes que sufran la enfermedad, finalidad en última instancia de la investigación médica y farmacéutica.

II - OBJETIVOS

II – OBJETIVOS

En este capítulo se van a exponer los objetivos, tanto de la investigación clínica llevada a cabo como del proyecto en su totalidad.

2.1 OBJETIVOS DEL ESTUDIO CLÍNICO

El propósito de este estudio clínico fue evaluar la eficacia de un preparado probiótico, formado por tres cepas de lactobacilos y bifidobacterias, en la reducción de la sintomatología y del empleo de corticosteroides y antihistamínicos en el tratamiento de la DA leve-moderada.

2.1.1 Objetivo primario

El objetivo primario del estudio fue doble. Por un lado, evaluar el porcentaje de días en que se utilizaron corticosteroides tópicos, así como el consumo de antihistamínicos, durante las 12 semanas de tratamiento con probiótico o placebo. Por otro lado, estudiar la evolución en el índice SCORAD a las 4, 8 y 12 semanas de tratamiento, en comparación con los valores de la visita basal, en la que se inicia el tratamiento, en cada uno de los dos grupos de intervención.

2.1.2 Objetivos secundarios

Se propusieron los siguientes objetivos secundarios:

- a) Registrar cambios en el índice de Impresión Clínica Global (ICG), considerándose una ICG < 2 como éxito terapéutico.
- b) Estudiar el número de brotes totales acontecidos durante el desarrollo del estudio.

- c) Estudiar la necesidad de incorporar nuevos tratamientos, distintos de los señalados, para el control del paciente que no responde al protocolo terapéutico del estudio.
- d) Analizar las diferencias en parámetros analíticos y de inflamación.
- e) Describir la composición de la microbiota intestinal en pacientes con DA y realizar una comparativa entre grupos al finalizar el periodo de tratamiento.
- f) Determinar la seguridad del tratamiento probiótico mediante el registro de acontecimientos adversos.
- g) Calcular el cumplimiento terapéutico y la adhesión al tratamiento en ambos grupos del estudio.

2.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

En este proyecto de investigación, se planteó el desarrollo de un nuevo tratamiento coadyuvante, en el contexto de un complemento nutricional utilizado junto con el tratamiento habitual, para pacientes con dermatitis atópica leve-moderada. Este tratamiento daría solución a la necesidad de tratamientos con alta eficacia y, a su vez, que no presenten efectos adversos con prevalencia notable.

2.3 HIPÓTESIS

Partiendo de una búsqueda bibliográfica realizada previamente y de las actualizaciones constantes que se habían aportado para el entendimiento de la DA, se formularon las siguientes hipótesis:

1. Existe una relación entre la DA y la composición de la microbiota intestinal influida por la permeabilidad e integridad de la barrera intestinal.
2. La ingesta de probióticos por vía oral puede modular la microbiota intestinal y producir cambios en su composición.
3. Los pacientes diagnosticados de DA poseen una microbiota intestinal característica, con concentraciones alteradas de algunos géneros bacterianos que influyen en la evolución y pronóstico de la enfermedad.

4. Los pacientes con DA cuya microbiota intestinal sea más similar a la población sana sufrirán menos síntomas y signos propios de la patología.
5. Un preparado probiótico con cepas seleccionadas puede producir mejoras en la sintomatología de la DA.

III - MATERIAL Y MÉTODO

III – MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se detallan todos los procedimientos y herramientas utilizadas durante el desarrollo del estudio clínico. Además, se incluye una descripción minuciosa de la legislación seguida durante todo el proceso, así como de toda la información recogida sobre los pacientes incluidos.

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio de investigación doble ciego, controlado con placebo, para evaluar la eficacia de un probiótico por vía oral en pacientes de 4 a 17 años con DA leve a moderada, con un tratamiento de 12 semanas de duración.

Se llevó a cabo en el Centro Dermatológico Estético de Alicante entre diciembre de 2015 y junio de 2016.

Los investigadores que participaron en el desarrollo del estudio fueron:

- Dra. Ana Ramírez Boscá. Investigadora principal, médico especialista en Dermatología. Catedrática de Dermatología de la Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM).
- Dr. Vicente Navarro López. Investigador principal, médico especialista en Medicina Interna. Director de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas y Microbiota Humana de la Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM).
- D^a Beatriz Ruzafa Costas. Farmacéutica y doctoranda.
- D. Miguel Ángel Carrión Gutiérrez. Doctor en Química y monitor de ensayos clínicos.
- Dra. Asunción Martínez Andrés. Médico.
- D^a Encarna Espejo Luna. DUE.
- D^a Leticia Sánchez Aguilar. DUE.

3.1.1 Variables

Las variables del estudio clínico se definen como toda característica observada y/o medida en los sujetos de estudio que permite diferenciar el efecto encontrado en los grupos comparados o en el propio sujeto transcurrido un tiempo determinado. Se clasificaron en dos tipos: primarias y secundarias.

3.1.1.1 Variables primarias

En primer lugar, se definió como variable primaria la puntuación en el índice SCORAD, tanto la basal al inicio del estudio como la registrada en cada visita presencial mensual.

Como segunda variable primaria, se escogió el número de días que cada paciente precisa la administración de corticosteroides tópicos, en base al cuaderno diario del paciente.

3.1.1.2 Variables secundarias

Se tuvieron en cuenta estas otras variables:

- La Impresión Clínica Global (ICG) cuantificada en cada visita presencial. Se consideró una ICG < 2 como éxito terapéutico.
- El número de cápsulas de tratamiento sobrantes o adherencia al tratamiento.
- El número de brotes, considerados como tal cuando se producía, al menos, tres días continuados de uso de corticoides tópicos.
- El consumo de antihistamínicos y la necesidad de nuevos tratamientos.
- El registro de acontecimientos adversos.

Las tres últimas variables se recogieron en todas las visitas posteriores al inicio del tratamiento en base a la información del cuaderno diario con anotaciones del paciente y al interrogatorio clínico.

3.1.2 Planificación y cronograma

Las fechas planteadas inicialmente y recogidas en el protocolo para el desarrollo del estudio fueron las siguientes:

- Inicio de inclusión de pacientes: octubre de 2015
- Fin de inclusión de pacientes: diciembre de 2015
- Fecha de finalización: marzo de 2016
- Análisis de datos del estudio: abril de 2016
- Resultados finales del estudio: junio de 2016

Finalmente, el cronograma seguido fue:

- Inicio de inclusión de pacientes: diciembre de 2015
- Fin de inclusión de pacientes: marzo de 2016
- Fecha de finalización: junio de 2016
- Análisis de datos del estudio: agosto de 2016
- Resultados finales del estudio: enero de 2017

3.1.3 Comité de ética de investigación clínica y otros aspectos legales

El estudio se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki, modificada en las sucesivas asambleas mundiales, y la legislación española en materia de ensayos clínicos en seres humanos. El protocolo del estudio fue revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital General Universitario de Alicante, y notificado a la Agencia Española del Medicamento, así como registrado en el Registro Americano de Ensayos Clínicos (ClinicalTrial.gov) con código NCT02585986.

Cumpliendo con lo dispuesto en el Real Decreto 223/2004, (164) se contrató una póliza de responsabilidad civil con la compañía Mapfre Seguros N^o 0971570035144, con el fin de cubrir la responsabilidad civil derivada de este estudio. La vigencia de esta póliza fue del 1 de diciembre de 2015 hasta el 30 de noviembre del 2017.

Este estudio se desarrolló de acuerdo con el protocolo y con las normas de Buenas Prácticas Clínicas, tal como se describe en:

- Normas Tripartitas Armonizadas de la ICH E6, para las Buenas Prácticas Clínicas de 1996. (165)
- Reglamento (UE) nº 536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de abril de 2014, sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano. (166)
- Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. (164)
- Aclaraciones sobre la aplicación de la normativa de ensayos clínicos con medicamentos de uso humano a partir del 1 de mayo de 2004 (versión nº 6, mayo de 2008). (167)
- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. (168)
- Declaración de Helsinki y enmiendas referente a la investigación médica en seres humanos. (169)

El investigador accedió, con la firma del protocolo, a seguir las instrucciones y procedimientos descritos en el mismo y, por consiguiente, cumplió los principios de Buenas Prácticas Clínicas en los cuales se basa.

Durante la redacción y aprobación por el CEIC del protocolo del estudio, la ley aplicada en todo el proceso fue el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. (164) Por lo tanto, durante el completo desarrollo y procedimiento del estudio se siguieron las directrices de dicho decreto. En la actualidad, este ha sido sustituido por el Real Decreto 1090/2015 del 4 de diciembre, que entró en vigor posteriormente a la aprobación del estudio. (170)

3.2 PACIENTES DEL ESTUDIO

Fueron candidatos a entrar en el estudio los pacientes diagnosticados de DA según los criterios de Hanifin y Rajka, con índice SCORAD de 20 a 40, ambos inclusive, que utilizaban o en quienes se indicaba el empleo de corticosteroides tópicos para el tratamiento de los brotes de DA, y que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión.

3.2.1 Consentimiento informado y hoja de información al paciente

Con el fin de reclutar pacientes para el estudio, se informó del mismo a todos los pacientes consecutivos que acudieron a las consultas del centro participante, y que fueron evaluados por los investigadores del estudio. Al tratarse de menores de edad, el investigador explicó a cada paciente y a sus padres o tutores legales, la naturaleza del estudio, sus propósitos, procedimientos, duración prevista y los potenciales riesgos y beneficios relacionados con la participación en el estudio, así como cualquier inconveniente que este le pudiera suponer. Todos ellos fueron advertidos de que su participación era voluntaria y de que podrían abandonar el estudio en cualquier momento, sin que esto afectase a su tratamiento médico posterior, ni a su relación con el médico que les trataba.

Se obtuvo el consentimiento informado de los padres o del representante legal del menor. El consentimiento informado fue proporcionado mediante un escrito estándar, en lenguaje fácilmente comprensible para el participante. Se disponía del tiempo suficiente para leer y entender las explicaciones antes de fechar y firmar el consentimiento informado y se entregó una copia de los documentos firmados.

De igual forma, el menor también prestó su consentimiento para participar en el estudio, en cumplimiento con lo establecido en el artículo 7.3, apartado a) del Real Decreto 223/2004 de ensayos clínicos. (164) Recibió la información sobre el estudio, los riesgos y los beneficios en un lenguaje adecuado a su capacidad de entendimiento en dos categorías: menor o mayor de 12 años. Ningún paciente fue incluido en el estudio sin que sus padres y ellos mismos hubieran otorgado previamente su consentimiento.

Siguiendo las indicaciones del Real Decreto, el promotor puso en conocimiento del Ministerio Fiscal la autorización del estudio clínico.

3.2.2 Criterios de inclusión

Los pacientes debían cumplir TODOS los criterios enumerados a continuación para su inclusión en el estudio:

1. Pacientes de 4 a 17 años, ambos inclusive.

2. Pacientes diagnosticados de DA según los criterios de Hanifin y Rajka.
3. Pacientes con índice SCORAD de 20 a 40, ambos inclusive.
4. Pacientes que utilicen o en quienes se indique el empleo de corticosteroides tópicos para el tratamiento de los brotes de DA.
5. Pacientes cuyos padres o representante legal firmen el consentimiento informado.
6. Pacientes que firmen el consentimiento informado en sus dos modalidades: menor o mayor de 12 años.

3.2.3 Criterios de exclusión

Los pacientes no debían cumplir NINGUNO de los criterios enumerados a continuación para evitar su exclusión del estudio:

1. Embarazo.
2. Lactancia.
3. Mujeres en edad fértil que no se comprometan a utilizar algún método anticonceptivo eficaz, a juicio del investigador, si mantiene una vida sexual activa o la inicia durante el estudio.
4. Pacientes en tratamiento con fototerapia para la DA.
5. Pacientes en tratamiento con corticosteroides sistémicos en los dos meses previos.
6. Pacientes en tratamiento con inmunosupresores o citostáticos en los dos meses previos.
7. Pacientes que hayan recibido tratamiento con probióticos en los dos meses previos.
8. Pacientes que hayan sido tratados con antibióticos sistémicos en los cuatro días previos.
9. Pacientes con fiebre (temperatura $> 37,5$ °C axilar o equivalente)
10. Pacientes con enfermedades alérgicas graves.

11. Pacientes con patologías relacionadas con procesos de inmunodeficiencia o cáncer.
12. Pacientes con otras patologías dermatológicas que puedan dificultar la evaluación de la DA o precisen el empleo continuado de corticosteroides tópicos.
13. Pacientes en los que esté contraindicado cualquiera de los medicamentos en estudio según lo establecido en sus fichas técnicas.
14. Pacientes con intolerancia al gluten y/o lactosa.
15. Pacientes que hayan participado en estudios de investigación con fármacos en los tres meses previos.

3.2.4 Criterios de retirada

Si durante el curso del estudio clínico algún paciente necesitaba tomar cualquier tipo de tratamiento concomitante, debía notificarlo al médico investigador, anotando éste la dosis, la vía de administración y el motivo de la toma en la hoja de seguimiento individual.

Debían ser retirados del estudio, y considerados como fracaso terapéutico, aquellos pacientes que precisaran tratamiento con corticosteroides sistémicos más de 7 días consecutivos durante el estudio.

También debían ser retirados los pacientes que no tomaran el probiótico durante más de 8 días consecutivos (10 % de los días de tratamiento).

3.2.5 Aleatorización

La asignación del tratamiento se realizó mediante una aleatorización 1:1 estratificada por bloques teniendo en cuenta las variables: sexo (hombre o mujer), edad (menor o mayor de 8 años) y edad de comienzo de la DA (antes o después de los 4 años).

Cada paciente se clasificó en uno de los ocho estratos posibles combinando las tres variables binarias en la situación basal. Los pacientes se asignaron a uno de los dos grupos de tratamiento, probiótico o placebo, según una lista de aleatorización computarizada que se preparó previamente para cada estrato.

3.3 VALORACIONES CLÍNICAS

3.3.1 SCORAD

El índice SCORAD (*SCORing of Atopic Dermatitis*) es la escala de gravedad para la DA utilizada en este estudio (57).

El índice SCORAD consiste en un sistema de puntuación que tiene en cuenta la extensión y la intensidad de cinco tipos de lesiones fundamentales: eritema, edema/pápula, exudado/costra, escoriación y liquenificación; así como los síntomas subjetivos (prurito y pérdida de sueño) que provocan.

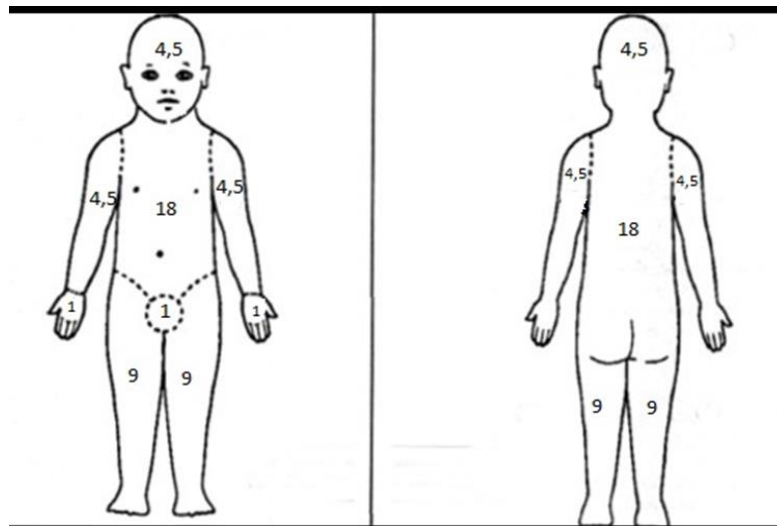
El manejo del índice SCORAD precisa un procedimiento correctamente ejecutado para su validez. La recogida de datos y la fórmula para el cálculo de la puntuación se explican a continuación.

Extensión de las lesiones o Valor A

La superficie corporal se divide en cuatro segmentos (cabeza y cuello, tronco, extremidades superiores y extremidades inferiores), a los que se les asigna un porcentaje relativo en función de la superficie que representen respecto a la superficie corporal total. La superficie de los genitales, así como la palma o el dorso de la mano se consideran un 1 %.

Siguiendo el esquema de la Figura 8, se calcula la superficie afectada por las lesiones de DA, teniendo en cuenta la extensión de la lesión y el porcentaje de superficie relativo de cada segmento corporal. El valor A es la suma de todos los porcentajes de extensión.

Figura 8. Valores asignados a cada segmento de la superficie corporal para la evaluación de la extensión de las lesiones. (57)



Intensidad de las lesiones o Valor B

Se valoran los signos clínicos de cinco tipos de lesiones fundamentales (eritema, edema/pápula, exudado/costra, escoriación y liquenificación) a los que se les asigna un valor entre 0 y 3 puntos en función de su intensidad, donde: 0 = Ausencia; 1 = Leve; 2 = Moderado; 3 = Severo. Del mismo modo, se valora la xerosis de la piel en las zonas cutáneas no afectadas por lesiones de DA.

En la Figura 9 se muestran imágenes representativas de los cuatro niveles de puntuación de las cinco lesiones valoradas y de la xerosis.

Figura 9. Grados de intensidad para cada una de las lesiones valoradas en la intensidad del índice SCORAD. (171)



La valoración de la intensidad de cada lesión se realiza teniendo en cuenta la media del área representativa donde se aprecien afectaciones en la piel.

El valor B es la suma de los valores obtenidos en cada una de las cinco lesiones fundamentales, así como el de la xerosis general detectada.

Síntomas subjetivos o valor C

Los síntomas subjetivos están compuestos, a su vez, por dos variables: prurito y pérdida de sueño. Basándose en una escala visual analógica, (172) los padres de los menores y/o los pacientes, según su edad, valoran de 0 a 10 el valor medio estimado de estos dos síntomas de los últimos tres días.

El valor C es la suma de los valores individuales asignados al prurito y a la pérdida de sueño.

SCORAD total

Para obtener el valor total del SCORAD a partir de los tres valores obtenidos según el procedimiento anterior, se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Puntuación SCORAD final} = \text{Valor A}/5 + 7 \times \text{Valor B}/2 + \text{Valor C}$$

3.3.2 Impresión Clínica Global (ICG)

La Impresión Clínica Global (ICG) mide la severidad de la enfermedad en una escala de 0 a 6 puntos, en base a la evaluación global de las lesiones de la piel. La evaluación la realiza el dermatólogo mediante observación.

El estado general de las lesiones se valora según las siguientes puntuaciones:

- Puntuación de 0 o limpia: sin signos de DA.
- Puntuación de 1 o prácticamente limpia: eritema y pápula/infiltrado solamente perceptibles.
- Puntuación de 2 o leve: eritema y pápula/infiltrado leves.
- Puntuación de 3 o moderada: eritema y pápula/infiltrado moderados.
- Puntuación de 4 o grave: enfermedad grave con eritema severo y pápula/infiltrado graves.
- Puntuación de 5 o muy grave: eritema severo y pápula/infiltrado graves con exudado/costras.

Se considera remisión de la enfermedad una puntuación de ICG menor a 2.

3.4 VALORACIONES ANALÍTICAS

Se recogieron muestras de sangre y heces de cada paciente del estudio al comienzo y al final del periodo de intervención de 12 semanas.

La extracción de sangre la realizó el personal sanitario D.U.E del Centro Dermatológico Estético de Alicante. Se extrajeron alrededor de 10 ml que se repartieron en diferentes tubos para su conservación y según su finalidad: analizar el hemograma, el perfil bioquímico, los niveles de interleuquinas y la presencia de translocación bacteriana.

La toma de la muestra de heces, destinada al análisis de la microbiota intestinal, la realizó el propio paciente con la ayuda de sus progenitores o tutores. Para ello, se le entregó el instrumental necesario para la recogida de la misma y se explicó el procedimiento correcto de almacenamiento, conservación y entrega en la clínica.

Las muestras de sangre se centrifugaron para separar el suero y se conservaron a una temperatura de -20 °C, mientras que las muestras de heces se conservaron a -80 °C. Ambas muestras se rotularon correctamente y distribuyeron en los centros donde se realizaron los análisis.

El Centro Inmunológico de Alicante se encargó del análisis del hemograma y la bioquímica. La translocación bacteriana se analizó en los laboratorios del Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas (CiberEhd) en el Hospital General Universitario de Alicante. El análisis de la microbiota intestinal se realizó en Lifesequencing S.L. (Paterna, Valencia). La determinación de las interleuquinas se llevó a cabo en la Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM).

3.4.1 Translocación bacteriana

Para detectar e identificar fragmentos de ADN de origen bacteriano en sangre, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Primero, el ADN de aisló y extrajo con el QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). A

continuación, se llevó a cabo la PCR de amplio rango, amplificando la región conservada del gen de ARNr bacteriano 16S usando los cebadores: 5'-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3' como cebador sentido, y 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' como cebador antisentido. Las muestras se amplificaron mediante el termociclador MyCycler Thermal Cycler System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US) y se migraron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Finalmente, se observaron mediante una lámpara de luz UV y se comparó la migración de las muestras con los controles positivo y negativo.

3.4.2 Interleuquinas

La determinación cuantitativa de las interleuquinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 se realizó mediante la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en muestras de suero de cada uno de los pacientes del estudio, utilizando el kit Human Quantikine Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) específico para cada una de ellas y siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se utilizó un lector de placas para su lectura. Las muestras, así como la curva de calibración estándar, se realizaron por duplicado. Los límites de detección fueron específicos de cada interleuquina y, a partir de los resultados obtenidos en los controles y la curva estándar, se calcularon todas las concentraciones de las interleuquinas.

3.4.3 Microbiota intestinal

La secuenciación genómica de las muestras de heces se realizó mediante el aislamiento y la amplificación del ADN.

El ADN de las muestras de heces se aisló siguiendo del procedimiento de Yuan *et al.* (173) con pequeñas modificaciones. La extracción y purificación del ADN de las muestras se realizó mediante el sistema MagnaPure (Roche Life Science) para evitar sesgos en la purificación e incluir correctamente las bacterias gram-positivas.

Para la secuenciación masiva, se amplificó la región hipervariable V3-V4 del gen del ARNr bacteriano 16S mediante la tecnología de MiSeq-Illumina utilizando

cebadores y siguiendo las recomendaciones de Illumina para estudios metagenómicos con secuenciación.

La composición bacteriana de todos los pacientes al inicio se comparó con una cohorte de pacientes sanos extraída del Proyecto del Microbioma Humano. (174) Posteriormente, se analizaron los cambios producidos sobre la composición de la microbiota tras la intervención, comparando los grupos probiótico y placebo.

3.5 TRATAMIENTOS DEL ESTUDIO

3.5.1 Producto en estudio

El preparado probiótico utilizado en este estudio contenía 10^9 UFC de tres cepas bacterianas: *Bifidobacterium lactis* CECT 8145, *Bifidobacterium longum* CECT 7347 y *Lactobacillus casei* CECT 9104 con maltodextrina como excipiente. Las cepas se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados de una extensa búsqueda bibliográfica en la que se obtuvieron datos sobre el efecto de las mismas en la microbiota intestinal y la DA. (175)

El producto control o placebo consistía en un preparado de apariencia similar al probiótico que contenía únicamente maltodextrina en polvo.

Las cápsulas de ambos productos eran idénticas en forma, tamaño y volumen del contenido. Las cápsulas se hicieron de gelatina con un calibre de $9,85 \times 16,4$ mm y podían ser abiertas de manera que su contenido fuera disuelto en un medio líquido no caliente, para ayudar a los pacientes más pequeños que presentaban dificultades en la deglución.

La pauta de dosificación fue de una cápsula al día del producto, lo que corresponde a 30 mg/día de probiótico, o su equivalente de placebo.

Los tratamientos en estudio se entregaron, en las condiciones establecidas por la normativa vigente, en la consulta utilizada para el estudio clínico y facilitados por el investigador. Tanto el probiótico como el placebo se utilizaron siguiendo las especificaciones señaladas en la ficha técnica de los productos.

3.5.1.2 *Cumplimiento terapéutico*

El cumplimiento terapéutico es la base del éxito de un tratamiento, así como indicador de la idoneidad del mismo.

Se registró el cumplimiento y adherencia al tratamiento de cada uno de los participantes del estudio. Para ello, se solicitó al paciente y sus familiares que entregaran el tratamiento sobrante cada vez que acudieron a la consulta. Se registró la cantidad de cápsulas devueltas y se analizó el dato registrado según el número total de días que habían transcurrido entre visitas.

El porcentaje de cumplimiento obtenido fue estudiado como objetivo secundario en el estudio.

3.5.2 **Corticosteroides tópicos**

Para el tratamiento de los brotes con corticosteroides tópicos, los pacientes utilizaron metilprednisolona aceponato 1 mg/g, que se aplicó con una capa fina una vez al día sobre la zona afectada frotando ligeramente.

La duración del tratamiento no debía exceder los diez días consecutivos y, como norma general, la duración del tratamiento en niños debe limitarse al mínimo posible.

3.5.3 **Corticosteroides sistémicos**

En los casos en los que se precisó el empleo de corticosteroides sistémicos se prescribió deflazacort 30 mg.

3.5.4 **Antihistamínicos**

Para el tratamiento del prurito se utilizó desloratadina, jarabe o comprimidos. La pauta recomendada fue: en niños de 7 a 11 años, 5 ml de jarabe una vez al día (2,5 mg de desloratadina) y en niños mayores de 12 años, un comprimido (5 mg de desloratadina) una vez al día.

3.5.5 Antibióticos tópicos

Cuando fue necesario un antibiótico tópico para algunos tipos de lesiones, se prescribió ácido fusídico 20 mg/g, antibiótico de uso general para la DA infectada.

3.5.6 Emolientes

Para evitar una sequedad excesiva de la piel, se recomendó el uso de un tratamiento coadyuvante emoliente, Lipikar de la Roche-Posay®, que se proporcionó a los pacientes.

3.6 SEGURIDAD

La seguridad del tratamiento se evaluó mediante la contabilidad de acontecimientos adversos ocurridos durante el transcurso del estudio clínico.

Se considera acontecimiento adverso cualquier acontecimiento médico adverso acontecido a un paciente o a un sujeto de la investigación clínica al que se le ha administrado un producto farmacéutico, aunque no tenga necesariamente una relación causal con este tratamiento. Un acontecimiento adverso puede ser, además, cualquier signo desfavorable o inesperado, incluyendo un hallazgo de laboratorio anormal, síntoma o enfermedad temporalmente asociada con el uso de un producto en investigación, relacionado o no con el mismo.

El registro de acontecimientos adversos es un aspecto relevante de la documentación del estudio, por lo que es importante seguir correctamente las normas para su correcta evaluación.

3.6.1 Detección y documentación de acontecimientos adversos

Fue responsabilidad del investigador documentar todos los acontecimientos adversos que hubieran ocurrido durante el estudio clínico.

En cada visita o evaluación, se recogieron todos los acontecimientos adversos, tanto los observados por el investigador como los comunicados por el paciente espontáneamente o como respuesta a una pregunta no dirigida a ellos mismos o sus progenitores/tutores legales (similar a “¿cómo se encuentra desde el

inicio del tratamiento/última visita?") realizada por el investigador. Los acontecimientos adversos fueron evaluados por el investigador y anotados en la historia clínica del paciente.

Se estableció la naturaleza de cada evento, el tiempo de inicio después de la administración del fármaco, la duración, la gravedad y la relación con el tratamiento. Asimismo, se registraron los detalles de cualquier tratamiento correctivo.

La sintomatología y tratamiento iniciales, si los hubiera, se documentaron correctamente en la visita de selección y la interpretación de los datos de las visitas siguientes se realizó partiendo de la información basal disponible.

En cuanto al seguimiento de los acontecimientos adversos, los investigadores controlaron al paciente hasta que estos disminuyeron, desaparecieron o hasta que el proceso se estabilizó.

La valoración de la gravedad se analizó asignando a la intensidad máxima una de las siguientes categorías:

- Leve: un acontecimiento adverso fácilmente tolerable por el sujeto, causando un malestar mínimo y no interfiriendo en la actividad diaria.
- Moderado: un acontecimiento adverso que es suficientemente molesto para interferir con las actividades normales diarias.
- Grave: cualquier acontecimiento que cumpla los criterios definidos por el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, (164) y que requiere de una comunicación especial. Se definen con detalle en el apartado 3.6.3, así como los procedimientos a seguir en caso de que ocurran.

Mención aparte reciben las reacciones adversas inesperadas, cuya naturaleza o gravedad no se relacionado con la información contenida en la ficha técnica del tratamiento.

3.6.2 Valoración de la causalidad

El investigador valoró, para cada acontecimiento adverso, si existía una relación con el tratamiento en estudio. La causalidad se definió usando las

siguientes categorías basadas en las definidas por el Uppsala Monitoring Centre de la OMS (176):

- Definitiva: si la secuencia temporal es compatible con el momento de administración del fármaco, siguiendo el patrón de respuesta esperado del fármaco en estudio y no puede explicarse por otros factores tales como enfermedades concurrentes u otros tratamientos y, además, desaparece o se reduce notablemente al suspender la administración del fármaco y/o tiene una respuesta positiva cuando se produce la reexposición.
- Probable: si el acontecimiento adverso ocurre tras la administración del fármaco, siguiendo el patrón de respuesta esperado del fármaco en estudio y no puede explicarse por otros factores tales como enfermedades concurrentes u otros tratamientos.
- Posible: si el acontecimiento adverso ocurre tras la administración del fármaco y/o sigue el patrón de respuesta esperado del fármaco en estudio, pero podría también deberse a otros factores tales como enfermedades concurrentes u otros tratamientos.
- Improbable: si el acontecimiento adverso se produce sin una secuencia temporal claramente relaciona con la administración del tratamiento y puede explicarse de manera más admisible mediante otros factores tales como enfermedades concurrentes u otros tratamientos.
- No relacionado: si el acontecimiento adverso está notoriamente vinculado con otros factores tales como enfermedades concurrentes u otros tratamientos.

3.6.3 Procedimientos para la notificación inmediata de acontecimientos graves o inesperados

Se considera acontecimiento adverso grave cualquier caso médico adverso que a cualquier dosis:

- Produce la muerte del sujeto.
- Pone la vida en peligro, referido a un acontecimiento en el que el sujeto corría el riesgo de morir en el momento del acontecimiento. No se refiere a

un acontecimiento que hipotéticamente podría haber causado la muerte si éste fuera más grave.

- Provoca la hospitalización del sujeto o la prolongación de una hospitalización ya existente. No se consideraría como tal cuando la hospitalización se produce por una intervención programada.
- Causa incapacidad significativa o permanente, una anomalía congénita o defecto de nacimiento o una sobredosis (accidental o deliberada).
- Dé lugar a una anomalía o malformación congénita. Por este motivo, cualquier embarazo debe tratarse como un acontecimiento adverso grave.
- Aquellas sospechas de acontecimiento o reacción adversos que se consideren importantes desde el punto de vista médico, aunque no cumplan los criterios anteriores.

El investigador principal debía comunicar inmediatamente al promotor todos los acontecimientos adversos graves y seguir el protocolo establecido de comunicación de dichos acontecimientos.

Esta comunicación debía realizarse al promotor por teléfono o fax en las 24 horas siguientes al conocimiento del acontecimiento adverso por el investigador. El promotor debía comunicar a la Agencia Española del Medicamento las notificaciones de acontecimientos adversos, siguiendo lo establecido en los Artículos 43 a 47 del Real Decreto 223/2004 de ensayos clínicos, (164) que señalan las obligaciones del promotor en el registro, evaluación y comunicación de acontecimientos adversos.

3.7 PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

3.7.1 Contenido de las visitas

La duración global del estudio fue de 12 semanas, desde el reclutamiento de los pacientes hasta la última exploración. El estudio se estructuró en siete visitas, cuatro presenciales y tres controles telefónicos, realizadas de forma alterna cada dos semanas. En la Tabla 1 se muestra un esquema de las visitas.

Tabla 1. Esquema del procedimiento de las visitas del estudio.

Visitas	0 /1	2	3	4	5	6	7
Semana	0	2	4	6	8	10	12
Criterios de inclusión/exclusión	X						
Firma del consentimiento informado	X						
Historia clínica	X						
Exploración física	X		X		X		X
Determinaciones de laboratorio	X						X
Exploraciones complementarias	X			X			
SCORAD	X		X		X		X
ICG	X		X		X		X
Tratamiento farmacológico	X		X		X		
Entrega del CRD del paciente	X						
Recogida de datos del cuaderno diario		X		X		X	X
Evaluación de acontecimientos adversos		X	X	X	X	X	X

El contenido y las acciones realizadas en cada visita, establecidos por el protocolo del estudio, se detallan a continuación.

Selección de pacientes y visita 1

Antes de realizar cualquier tipo de valoración clínica, se explicó el estudio y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres o tutores y del propio paciente.

Seguidamente se comprobó que los pacientes cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión detallados en el protocolo.

Para ello, se verificó que los pacientes estaban diagnosticados correctamente según los criterios de Hanifin-Rajka, y se evaluaron los índices SCORAD e ICG.

En cada paciente se recogieron los siguientes datos clínicos:

- Historia clínica, incluyendo antecedentes personales y familiares y anamnesis por aparatos.
- Exploración física completa que incluyó talla, temperatura y peso corporal.

Además, se llevó a cabo una extracción de sangre para la realización de determinaciones analíticas de:

- Rutina en el seguimiento de los pacientes:
 - Hematología clínica: hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración hemoglobina corpuscular media, plaquetas, leucocitos y fórmula leucocitaria.
 - Bioquímica clínica: GOT, GPT, LDH, fosfatasa alcalina, GGT, bilirrubina total, creatinina, glucemia, colesterol, triglicéridos, proteínas totales, proteína C reactiva y albúmina, así como la IgE como serología relacionada con la DA.
- Biomarcadores de inmunidad:
 - Interleuquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 en suero.
 - ADN bacteriano en suero.

También se recogió una muestra de heces de los pacientes para llevar a cabo el estudio de la microbiota intestinal.

En el caso de las mujeres potencialmente fértiles (todas las mujeres desde la menarquia excepto si existían pruebas de infertilidad), se realizó un test de embarazo para verificar que no se encontraban en periodo de gestación.

Una vez incluido en el estudio, cada paciente fue asignado a uno de los dos grupos de tratamiento siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.5 y recibió una caja numerada, codificada y etiquetada conforme a la normativa vigente, con las cápsulas para el primer mes de tratamiento. Todos los pacientes recibieron un número de cápsulas superior a las que requería la pauta de tratamiento asignada, con el fin de posibilitar el recuento de las unidades consumidas para evaluar el cumplimiento del paciente. Se informó claramente al

paciente y a sus padres de cómo debía tomar las cápsulas cada día, ingiriéndolas a cualquier hora del día siempre que se distanciara de bebidas calientes.

Visitas 3, 5 y 7

Estas visitas fueron presenciales y se corresponden con las 4, 8 y 12 semanas desde el comienzo del tratamiento. En ellas, se valoraron:

- Los brotes aparecidos, los tratamientos recibidos, y los problemas y acontecimientos adversos acontecidos.
- Una exploración física básica.
- SCORAD.
- ICG.

La valoración de los acontecimientos adversos se realizó siguiendo los procedimientos establecidos en el protocolo y descritos en el apartado 3.6 de este trabajo. Se recogieron todos los acontecimientos adversos que refirió el paciente, especificando fecha de comienzo y de finalización, y tratamiento recibido en su caso.

Adicionalmente, el paciente entregó la medicación sobrante, y recibió dos nuevas cajas con el tratamiento correspondiente para el mes siguiente, a excepción de la visita 7, en la que no se entregó nuevo tratamiento al ser la última visita del estudio.

Visitas 2, 4 y 6

Estas visitas se realizaron a los 15 días de cada visita presencial para la revisión del cuaderno del paciente y su evolución, correspondiendo con las semanas 2,6 y 10 desde el inicio del tratamiento.

Las visitas podían ser presenciales o telefónicas, ya que no requerían la presencia de los pacientes al no evaluarse ni el SCORAD ni la ICG. Se realizó un control telefónico en la mayoría de los casos, identificando siempre a la persona que comunicaba la información recogida en dicho cuaderno.

Visita 7 o final

Además de lo explicado en el apartado de las visitas presenciales, en esta visita, se realizó la misma exploración de la visita 1 al paciente, incluyendo el análisis y valoración de una muestra de sangre y otra de heces.

3.7.2 Recogida de datos

Todos los datos derivados del estudio clínico, es decir, las valoraciones de la severidad de la enfermedad (SCORAD e ICG), el número de brotes de DA y su tratamiento, los resultados de las determinaciones analíticas, etc., se recogieron en el Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) de cada paciente de manera individual.

Todos los fármacos que el paciente tomó durante el estudio, especificando las dosis, vía de administración y duración del tratamiento, fecha de inicio y fecha de finalización, así como los acontecimientos adversos que se dieron durante el transcurso del estudio, se anotaron también en el CRD.

La información sobre el tratamiento del estudio también se recogió en el CRD correspondiente, en el que el investigador y/o el personal colaborador del estudio indicaron el cumplimiento en cada visita, mediante un recuento de las cápsulas devueltas y la información facilitada por el paciente.

3.7.3 Responsabilidades del personal investigador

Los índices de valoración de lesiones (SCORAD e ICG) fueron realizados por un dermatólogo en todo momento.

Con permiso previo de los pacientes, yo, autora la tesis doctoral aquí expuesta, estuve presente en todas las visitas de los pacientes del estudio, realizando la recogida de datos, verificando que el protocolo se cumpliera según estaba diseñado e informando tanto a los pacientes como a los padres y tutores del estudio clínico y del tratamiento a estudio desde mi formación como farmacéutica.

El personal D.U.E. realizó la extracción de sangre de los pacientes.

3.8 SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD DEL ESTUDIO

Durante el estudio se llevaron a cabo varios controles de calidad para verificar el correcto desarrollo del estudio. En concreto, hablaremos de las visitas de monitorización, en las que el equipo investigador ha formado parte.

3.8.1 Visitas de monitorización

En las visitas de monitorización se revisaron todos los datos recogidos en los CRD y se compararon con aquellos registrados en la historia clínica del paciente en la plataforma digital del Centro Dermatológico de Alicante como documento fuente.

En total se realizaron ocho visitas de monitorización, de las que la última de ellas fue la visita de cierre.

Después de cada visita de monitorización, se elaboraba un documento con el registro de las incidencias encontradas en la cumplimentación del CRD con el que se informaba al investigador de las correcciones a realizar y subsanar.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.9.1 Determinación del tamaño muestral

Los datos previos de estudios realizados en niños y adultos con diagnóstico similar y gravedad moderada, mostraron un mayor uso de corticosteroides tópicos en el grupo tratado con placebo durante el tiempo de estudio, en pacientes y condiciones similares a este estudio.

Asumiendo un efecto similar en respuesta a placebo oral, y una reducción del 60 % de los días en tratamiento con corticosteroides tópicos en el grupo tratado con probiótico, con unas pérdidas estimadas del 5 % de sujetos del estudio, se precisarían 25 pacientes por grupo para poder detectar esas diferencias como estadísticamente significativas con una potencia del estudio del 80 %.

Por ello, finalmente se estableció un tamaño muestral total de 50 pacientes a incluir en el estudio, a distribuirse en ambos grupos de tratamiento (placebo y probiótico) con un ratio 1:1, es decir, 25 pacientes por grupo.

3.9.2 Análisis estadístico previsto

Los datos demográficos, características basales y datos globales descriptivos se expresaron como la media \pm la desviación estándar para las variables cuantitativas continuas. En el caso de las variables categóricas, se presentaron las frecuencias, junto con los porcentajes correspondientes.

Para los análisis de eficacia principales y secundarios se utilizaron los datos recogidos en la visita de inicio como datos basales. Todos los análisis se realizaron mediante análisis por intención de tratar, incluyendo los pacientes que completaron cada etapa de seguimiento. Se comenzó estudiando la normalidad de las variables para seleccionar el test estadístico correcto y, posteriormente, los datos se presentaron, teniendo en cuenta lo anterior, de la manera más representativa para cada uno de ellos.

Los análisis principales se realizaron en el programa *IBM SPSS Statistics* para Windows, Versión 24.0 (Armonk, NY: IBM Co).

3.9.3 Análisis primario de eficacia

Para el análisis del índice SCORAD se calcularon los valores medios \pm desviación estándar para los datos globales a las 4, 8 y 12 semanas de tratamiento. En cada uno de estos puntos, se compararon los valores con los que el paciente presentaba al comienzo del estudio.

El porcentaje de días en que se utilizan corticosteroides tópicos se calculó como el número de días en tratamiento con corticosteroides tópicos durante el número total de días del estudio. Se calcularon los valores medios \pm desviación estándar para los datos globales a las 4, 8 y 12 semanas de tratamiento. Los grupos del estudio se compararon con un nivel de significación estadística del 5 %, utilizándose una regresión logística para el modelo de probabilidades por paciente. Además, se analizó el número de días acumulado, así como la media de su uso en cada grupo.

3.9.4 Otros análisis de eficacia

Se realizaron otros análisis de eficacia de forma paralela, en los que se valoraron los objetivos secundarios.

Se analizó el número de brotes producidos durante el tiempo de estudio en ambos grupos de intervención. Los datos finales se expresaron como número de brotes acumulados.

El consumo de antihistamínicos y de corticosteroides orales se valoró del mismo modo que el descrito para el análisis del consumo de corticosteroides tópicos.

Las categorías de ICG alcanzadas en cada visita del estudio y el cambio producido entre ellas se reflejaron como frecuencia y porcentaje.

Se analizaron los cambios en los valores analíticos incluyendo los niveles de IL y la presencia de translocación bacteriana. Los datos analíticos se expresaron como media \pm desviación estándar.

Para la tolerabilidad y seguridad, se compararon los acontecimientos adversos ocurridos durante el periodo de intervención. Estos se tabularon según grupo de tratamiento, gravedad, tipo y relación con el tratamiento a estudio.

Se realizó un análisis descriptivo del cumplimiento terapéutico del producto enmascarado en estudio. Los datos se mostraron según el grupo de tratamiento y se expresaron como porcentaje \pm desviación estándar.

3.9.5 Microbiota intestinal

El análisis estadístico de los resultados de amplificar las muestras de heces de los pacientes se realizó mediante técnicas de bioinformática.

Las secuencias que se obtuvieron en la amplificación se dividieron según el código utilizado en la PCR, mientras que las lecturas de R1 y R2 se superpusieron utilizando el programa *PEAR* versión 0.9.1 que proporciona un único archivo *FASTQ* para cada una de las muestras. (177)

El análisis bioinformático se realizó siguiendo unos pasos concretos comenzando por el seguimiento de la calidad de las secuencias a través de diferentes utilidades. La herramienta *fastx* versión 0.013 sirvió para comprobar la

calidad del filtrado (umbral mínimo de Q20), mientras que el programa *cutadapt* versión 1.4.1. se utilizó para eliminar las secuencias de los cebadores del gen ARNr 16S y la selección de longitud (lecturas de más de 300 nucleótidos). (178) Además, se agrupan las secuencias por características de similitud y solapamiento en *clusters*.

Posteriormente, se convirtieron los archivos *FASTQ* en *FASTA* y se utilizó el programa *UCHIME* versión 7.0.1001 para eliminar errores surgidos durante el procedimiento de amplificación y secuenciación. Mediante *blastn* en su versión 2.2.29+, se volcaron los archivos *FASTA* a la base de datos de ARNr 16S de NCBI y los archivos XML obtenidos se procesaron con una secuencia de comandos *Python* desarrollado por la empresa Lifesequencing, S.L. (Paterna, España). Cada secuencia se obtuvo con la asignación taxonómica en uno de los niveles filogenéticos: filo, familia, género y especie.

El análisis de los resultados obtenidos se realizó mediante *Specaccum*, en el paquete *vegan* implementado para R versión 3.2.3. (179)

La diversidad se analizó mediante el soporte informático QIIME. (180, 181)

IV - RESULTADOS

IV – RESULTADOS

En este capítulo se enumeran los resultados y el análisis de los datos recogidos en los pacientes incluidos en el estudio. Se presentan de forma clara y ordenada, estudiando todos los objetivos y variables planteados al inicio de la investigación.

4.1 POBLACIÓN A ESTUDIO

4.1.1 Diagrama CONSORT

Un total de 86 pacientes fueron evaluados para formar parte de la población del estudio. Después de entregar la hoja de información al paciente y realizar la exploración, 36 pacientes no fueron incluidos en el estudio: 26 de ellos debido a que decidieron no participar, y otros 10 porque no cumplieron todos los criterios de inclusión y exclusión detallados en el protocolo del estudio. Se incluyeron, finalmente, los 50 pacientes estipulados en el protocolo del estudio, que se asignaron de forma aleatoria a los dos grupos de intervención: 24 casos en el grupo placebo (48 %) y 26 casos en el grupo probiótico (52 %).

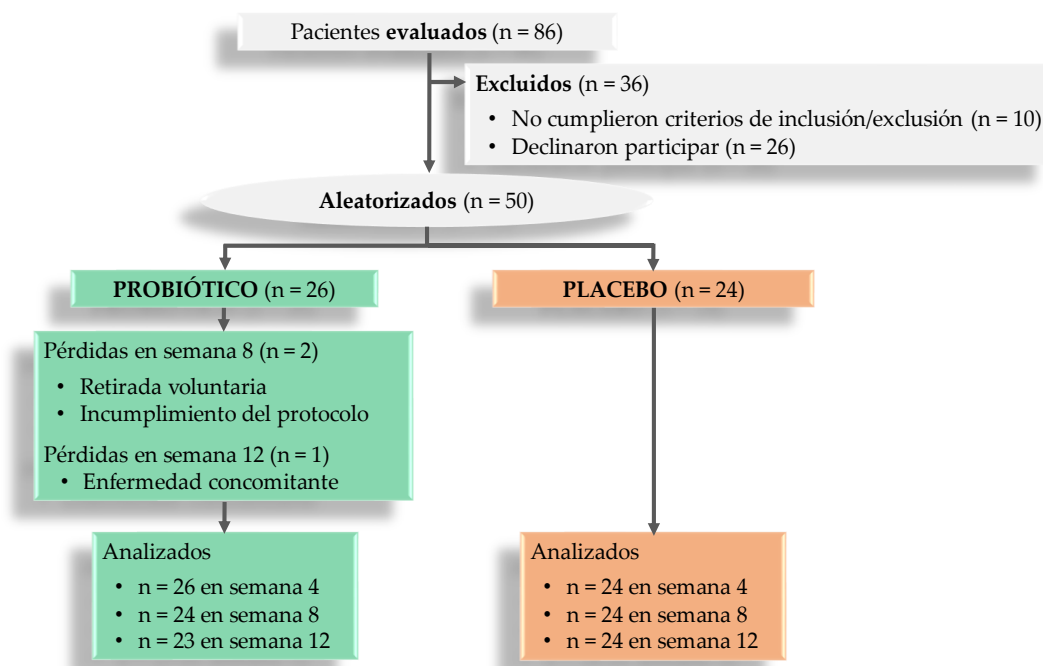
Durante el periodo de intervención, todos los pacientes del grupo placebo terminaron el estudio, mientras que en el grupo probiótico tres pacientes interrumpieron el seguimiento. Las razones de la salida del estudio de estos tres pacientes se indican a continuación:

1. Renuncia a continuar por voluntad propia: la paciente no deseó continuar por problemas de tiempo para acudir a la consulta e informar de su evolución.
2. Incumplimiento del protocolo: uno de los progenitores del paciente no estaba informado de su participación en el estudio y no dio su consentimiento.
3. Patología dermatológica concomitante: la paciente debutó con un cuadro de psoriasis en placas en rodillas que necesitaba de otros

tratamientos y que podían influir en la evaluación de la dermatitis atópica.

En el diagrama CONSORT (182) (Figura 10), se muestra la información del flujo de pacientes a lo largo del estudio, resumiendo toda esta información.

Figura 10. Diagrama CONSORT.



4.1.2 Datos demográficos y clínicos

A fin de poder describir la población incluida en el estudio, se analizaron todas las variables demográficas y clínicas que pudieran influir, de una u otra forma, en los resultados obtenidos en el estudio, relacionados con la respuesta al tratamiento.

4.1.2.1 Datos demográficos

En el estudio se incluyeron pacientes con DA de ambos sexos: 26 mujeres (52%) y 24 hombres (48 %). La edad de los pacientes incluidos fue de $9,2 \pm 3,7$ años, teniendo un mínimo de 4 y un máximo de 17, edades límite aceptadas en el

protocolo. En cuanto al peso, este fue de $36,5 \pm 14,6$ kg, y la talla de $136,9 \pm 21,0$ cm. La desviación en estas variables se justifica con la diversidad de edades de los pacientes incluidos, en periodo de crecimiento. Se preguntó a los pacientes, además, si alguno de ellos fumaba y la respuesta fue negativa en todos los casos. De todos los pacientes incluidos en el estudio, 43 (86 %) tenían antecedentes familiares de DA u otras enfermedades dermatológicas y alérgicas. Además, la edad promedio de debut de la DA fue de 3 años. Todos estos datos se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características demográficas de la población.

	Población total N = 50
Sexo, N (%)	
Mujer	26 (52)
Hombre	24 (48)
Edad (años), media \pm DE	$9,2 \pm 3,7$
< 8 años, N (%)	21 (42)
\geq 8 años, N (%)	29 (58)
Fuma (No), N (%)	50 (100)
Peso (kg), media \pm DE	$36,5 \pm 14,6$
Talla (79), media \pm DE	$136,9 \pm 21,0$
Antecedentes familiares (Sí), N (%)	43 (86)
Edad de inicio de DA (años), media \pm DE	3 ± 3
< 4 años, N (%)	36 (72)
\geq 4 años, N (%)	14 (28)

4.1.2.2 Criterios de Hanifin-Rajka

Para confirmar el diagnóstico de DA en los pacientes participantes, éstos debían cumplir, al menos, tres criterios mayores y tres criterios menores de Hanifin-Rajka. A continuación, se analiza la frecuencia de cada uno de los criterios en la población incluida.

- Criterios mayores

Los cuatro criterios mayores de Hanifin-Rajka se cumplían en la mayoría de los pacientes, ya que uno de los criterios de inclusión consistía en que el paciente debía cumplir al menos tres de ellos.

Los criterios de prurito, morfología típica y dermatitis crónica se encontraban presentes en el 100 % de pacientes. Por el contrario, el criterio de historia personal o familiar de DA se cumplió en el 70 % de los pacientes (N = 35).

- Criterios menores

La distribución de los criterios menores de Hanifin-Rajka, de mayor a menor prevalencia en la población total del estudio, se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Frecuencia de los criterios menores de Hanifin-Rajka.

Criterio menor	N (%)
Xerosis	50 (100)
Palidez o eritema facial	50 (100)
Pitiriasis alba	49 (98)
Dermografismo blanco	49 (98)
Queilitis	48 (96)
Acentuación perifolicular	48 (96)
Cerco periorbitario	47 (94)
Reactividad cutánea inmediata positiva	44 (88)
Comienzo precoz	44 (88)
Pliegue infraorbitario de Dennie-Morgan	44 (88)
Curso influido por factores emocionales y ambientales	39 (78)
Prurito con el sudor	28 (56)
IgE sérica elevada	27 (54)
Ictiosis/ hiperlinealidad palmar/ hiperqueratosis folicular	26 (52)
Intolerancia a la lana o los solventes lipídicos	22 (44)
Tendencia a dermatitis inespecífica de pies o manos	14 (28)
Pliegues anteriores en el cuello	12 (24)

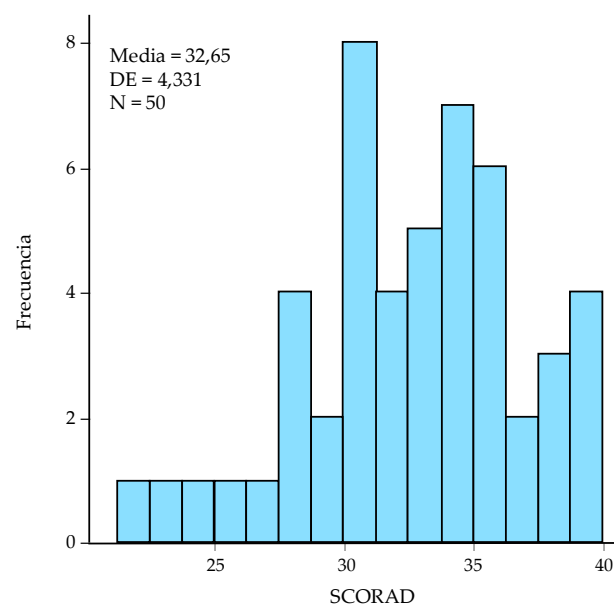
Tendencia a infecciones cutáneas	7 (14)
Conjuntivitis recurrente	5 (10)
Intolerancia alimentaria	4 (8)
Eczema del pezón	2 (4)
Queratocono	0 (0)
Cataratas subcapsulares anteriores	0 (0)

4.1.2.3 Índice SCORAD

Los pacientes incluidos en el estudio debían cumplir el criterio de inclusión de presentar una puntuación en el índice SCORAD total de entre 20 y 40, que definiría una DA de leve a moderada. Así, los valores mínimo y máximo incluidos fueron de 22,3 y 39,60 puntos, respectivamente.

Para conocer si la distribución de los datos se ajustaba a distribución normal, se realizó el análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, obteniendo una p de 0,20, por lo que sí se ajustaron a esa distribución. Se calculó la media de la puntuación de todos los pacientes incluidos, obteniendo un valor de $32,65 \pm 4,33$. En la Figura 11 se muestra la distribución de los datos obtenidos.

Figura 11. Distribución del índice SCORAD en la población.

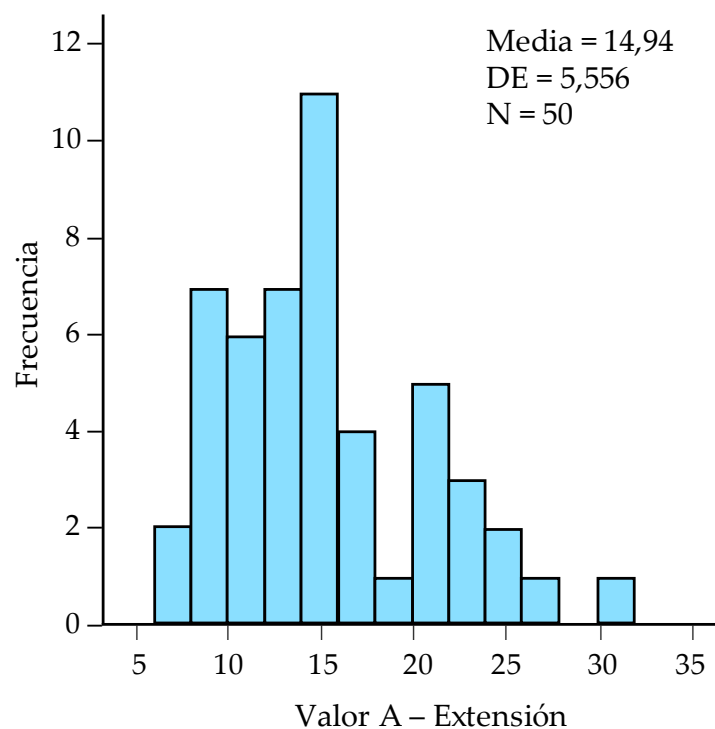


A continuación, se muestra el análisis individual para cada uno de los tres componentes del SCORAD: extensión (valor A) e intensidad (valor B) de las lesiones, y síntomas subjetivos (prurito y pérdida de sueño, valor C).

- Valor A - Extensión de las lesiones

El valor medio de la superficie afectada por lesiones de DA en los pacientes incluidos en el estudio fue de 14,94 %, registrándose desde un valor mínimo del 7 % hasta un valor del 31 % (Figura 12).

Figura 12. Distribución de los valores de extensión en la población.



Respecto a la distribución de los datos, estos no siguen una distribución normal como se puede observar en los resultados del análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, en el que se obtuvo una p de 0,004.

- Valor B - Intensidad de las lesiones

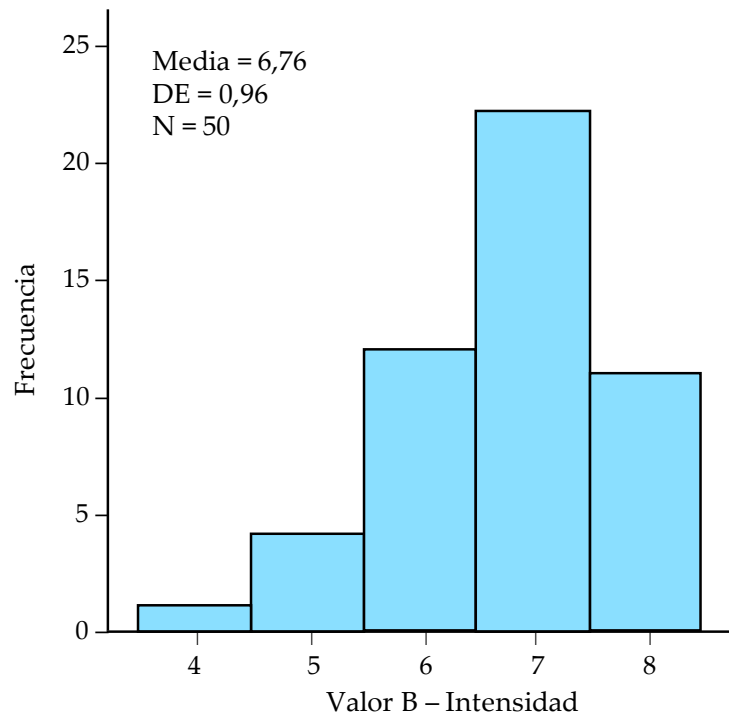
La intensidad de los signos clínicos de los cinco tipos de lesiones fundamentales, así como la sequedad que se encontró en los pacientes a su entrada al estudio, se detalla en la Tabla 4, donde puntuación 0 implica ausencia de lesión, 1 es lesión leve, 2 es lesión moderada y 3 es severa.

Tabla 4. Frecuencia de los valores de intensidad de las lesiones.

		Eritema	Edema	Exudado	Excoriación	Liquenificación	Sequedad
0	N	0	25	37	4	21	0
	%	0	50	74	8	44	0
1	N	29	25	11	31	25	1
	%	58	50	22	62	50	2
2	N	21	0	2	15	15	15
	%	42	0	4	30	30	30
3	N	0	0	0	0	0	34
	%	0	0	0	0	0	68

El promedio del valor B, calculado como la suma de las intensidades de las distintas lesiones de los pacientes incluidos en el estudio fue de $6,76 \pm 0,96$. La distribución de las frecuencias de los valores obtenidos se representa en la Figura 13. Estos datos no siguen una distribución normal según los resultados del análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, en el que se obtuvo una $p < 0,001$.

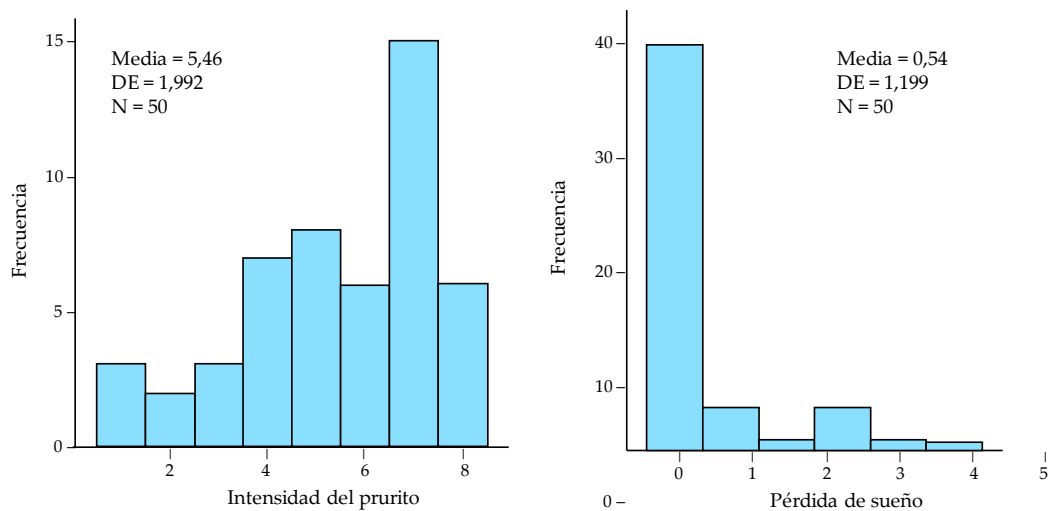
Figura 13. Distribución de los valores de intensidad de las lesiones en la población.



- Valor C – Síntomas subjetivos

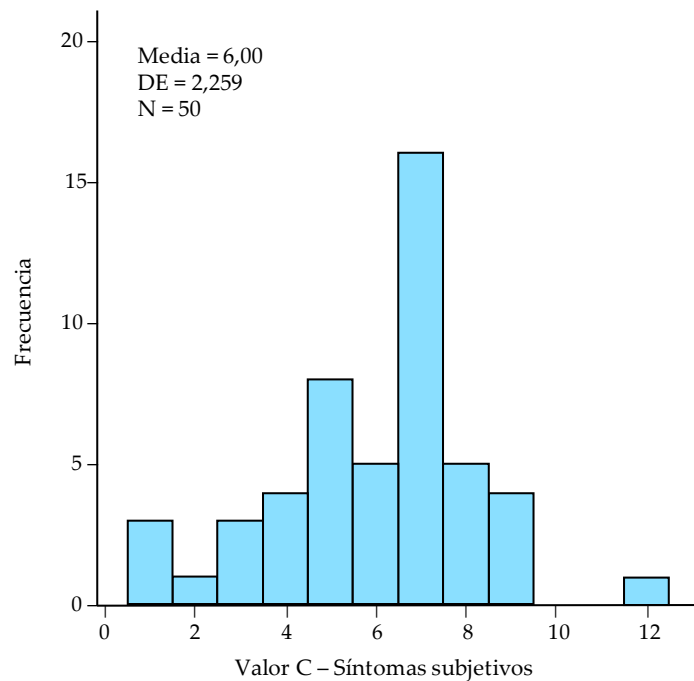
Los pacientes valoraron, mediante una escala analógica visual, el prurito y la pérdida de sueño provocados por la DA. El promedio de estos dos subcomponentes fue de $5,46 \pm 1,99$ y de $0,54 \pm 1,20$, respectivamente. En la Figura 14 se representa la distribución de las frecuencias de estas dos variables.

Figura 14. Distribución de los valores de prurito y pérdida de sueño en la población.



Ninguno de estos dos valores se ajustó a una distribución normal según el análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, en el que se obtuvo una $p < 0,001$ en ambos.

El total de los síntomas subjetivos (o valor C) se calculó mediante la suma de estos dos valores individuales. El promedio del valor C de los pacientes incluidos en el estudio fue de $6,00 \pm 2,26$. En la Figura 15 se representa la distribución de los datos obtenidos, que no se ajustaron a una distribución normal ($p < 0,001$ en el test de Kolmogorov-Smirnov).

Figura 15. Distribución de los valores de los síntomas subjetivos en la población.

4.1.2.4 Otras variables clínicas de la DA

Con respecto a la puntuación en la Impresión Clínica Global (ICG), al tratarse de pacientes con una DA leve-moderada según la puntuación en el índice SCORAD, todos tenían, en el momento de la inclusión, una puntuación de “Leve” (grado 2) o “Moderada” (grado 3). Así, un total de 16 pacientes (32 %) se encontraban dentro de la categoría “Leve” y 34 pacientes (68 %) de la categoría de “Moderada”.

Por otro lado, en el momento de la inclusión, un total de 34 pacientes (68 %) estaban usando corticosteroides tópicos como tratamiento para las lesiones de DA.

4.1.2.5 *Parámetros analíticos*

Los resultados de los parámetros analíticos y bioquímicos analizados a partir de la muestra de sangre extraída en la visita basal del estudio se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de los parámetros analíticos en la población.

	Población total N = 50
Leucocitos (mil/μL)	9,68 \pm 2,43
Hematíes (mil/μL)	4,67 \pm 0,54
Hemoglobina (g/dL)	13,34 \pm 1,39
Hematocrito (%)	40,02 \pm 6,31
V.C.M. (fl)	84,39 \pm 3,82
H.C.M. (pg)	28,62 \pm 1,61
C.H.C.M. (g/mL)	33,90 \pm 1,32
Plaquetas (mil/μL)	325,45 \pm 94,79
Neutrófilos (%)	51,87 \pm 9,17
Linfocitos (%)	35,48 \pm 8,45
Monocitos (%)	7,32 \pm 1,92
Eosinófilos (%)	4,84 \pm 5,05
Basófilos (%)	0,48 \pm 0,18
GOT (U/L)	29,22 \pm 8,16
GPT (U/L)	17,38 \pm 9,05
GGT (U/L)	14,50 \pm 4,14
LDH (U/L)	541,09 \pm 181,31
Fosfatasa alcalina (U/L)	327,16 \pm 155,98
Creatinina (mg/dL)	0,57 \pm 0,13
Glucosa (mg/dL)	96,56 \pm 16,02
Colesterol (mg/dL)	167,12 \pm 24,92
Triglicéridos (mg/dL)	100,50 \pm 45,44
Albúmina (g/dL)	5,16 \pm 0,77
Bilirrubina total (mg/dL)	0,43 \pm 0,32

IgE (IU/ml)	361,65 ± 673,86
Proteínas totales (g/dL)	7,54 ± 1,15
Proteína C reactiva	2 (4)
IL-4 (pg/mL)	31,52 ± 6,88
IL-5 (pg/mL)	4,34 ± 0,57
IL-10 (pg/mL)	13,04 ± 4,30
IL-13 (pg/mL)	83,63 ± 12,48

V.C.M. = Volumen corpuscular medio; H.C.M. = Hemoglobina corpuscular media; C.H.C.M. = Concentración de hemoglobina corpuscular media; GOT = Glutamato-oxalacetato transaminasa; GPT = Glutamato piruvato transaminasa; LDH = Lactato deshidrogenasa. Todos los datos se representan como media ± DE, a excepción de la proteína C reactiva, expresada número de pacientes (y porcentaje) con un valor superior a 0,25 mg/L.

4.1.3 Análisis de homogeneidad

Para evaluar si el proceso de aleatorización había sido eficaz y no existían diferencias entre los dos grupos de tratamiento (placebo y probiótico) en las variables analizadas en el apartado anterior, se realizó, con los datos de todos los pacientes incluidos en cada grupo, un análisis de homogeneidad.

En las Tablas 6 y 7 se recogen los resultados del análisis de homogeneidad de las variables demográficas y clínicas, y de los parámetros analíticos, respectivamente.

Tabla 6. Análisis de homogeneidad de las variables demográficas y clínicas.

	Probiótico N = 26	Placebo N = 24	P
Sexo, N (%)			0,708
Mujer	13 (50)	13 (54,16)	
Hombre	13 (50)	11 (45,83)	
Edad (años), media ± DE	9,35 ± 3,58	8,96 ± 3,94	0,619
< 8 años, N (%)	10 (38,46)	11 (45,83)	0,598
≥ 8 años, N (%)	16 (61,54)	13 (54,17)	
Peso (kg), media ± DE	38,33 ± 14,54	34,80 ± 14,77	0,399
Talla (79), media ± DE	137,58 ± 22,72	136,31 ± 19,69	0,907

Antecedentes familiares (Sí), N (%)	23 (88,46)	20 (83,33)	0,602
Edad de inicio de DA (años), media ± DE	3 ± 3	3 ± 3	-
< 4 años, N (%)	20 (76,92)	16 (66,67)	0,420
≥ 4 años, N (%)	6 (23,08)	8 (33,33)	
SCORAD, media ± DE	33,58 ± 3,38	31,64 ± 5,05	0,122
A - Extensión	15,58 ± 5,65	14,25 ± 5,49	0,354
B - Intensidad	7,00 ± 0,75	6,50 ± 1,11	0,084
C - Síntomas subjetivos	5,96 ± 2,34	6,04 ± 2,22	0,759
ICG, N (%)			0,423
Leve	7 (26,92)	9 (37,50)	
Moderada	19 (73,08)	15 (62,50)	
Utiliza corticosteroides (Sí), N (%)	16 (61,54)	18 (75)	0,308

Tabla 7. Análisis de homogeneidad de los parámetros analíticos.

	Probiótico N = 26	Placebo N = 24	P
Leucocitos (mil/μL)	9,20 ± 2,48	10,18 ± 2,33	0,124
Hematíes (mil/μL)	4,61 ± 0,57	4,74 ± 0,52	0,234
Hemoglobina (g/dL)	13,11 ± 1,51	13,58 ± 1,23	0,243
Hematocrito (%)	38,53 ± 4,54	41,56 ± 7,52	0,080
V.C.M. (fl)	83,76 ± 3,86	85,04 ± 3,75	0,248
H.C.M. (pg)	28,53 ± 1,67	28,70 ± 1,58	0,712
C.H.C.M. (g/mL)	34,05 ± 1,20	33,75 ± 1,44	0,434
Plaquetas (mil/μL)	317,88 ± 105,66	333,33 ± 83,52	0,574
Neutrófilos (%)	52,06 ± 9,46	51,67 ± 9,06	0,803
Linfocitos (%)	35,01 ± 8,66	35,96 ± 8,38	0,697
Monocitos (%)	7,49 ± 2,15	7,15 ± 1,66	0,538
Eosinófilos (%)	4,96 ± 5,80	4,72 ± 4,27	0,582
Basófilos (%)	0,48 ± 0,19	0,49 ± 0,16	0,467
GOT (U/L)	30,19 ± 9,21	28,17 ± 6,88	0,508
GPT (U/L)	17,81 ± 7,99	16,92 ± 10,23	0,344
GGT (U/L)	14,38 ± 4,54	14,62 ± 3,74	0,352

LDH (U/L)	537,42 ± 123,56	544,91 ± 140,34	0,847
Fosfatasa alcalina (U/L)	302,84 ± 149,95	352,50 ± 150,00	0,168
Creatinina (mg/dL)	0,547 ± 0,116	0,597 ± 0,151	0,192
Glucosa (mg/dL)	100,15 ± 12,81	92,67 ± 18,39	0,099
Colesterol (mg/dL)	166,46 ± 22,43	167,83 ± 27,85	0,848
Triglicéridos (mg/dL)	88,77 ± 44,99	113,21 ± 43,30	0,057
Albúmina (g/dL)	5,16 ± 0,28	5,16 ± 0,22	0,768
Bilirrubina total (mg/dL)	0,466 ± 0,41	0,383 ± 0,16	0,540
IgE (IU/mL)	428,44 ± 723,86	292,08 ± 636,57	0,490
Proteínas totales (g/dL)	7,54 ± 0,40	7,55 ± 0,46	0,763
Proteína C reactiva	0 (0)	2 (8,33)	0,133
IL-4 (pg/mL)	32,26 ± 8,50	30,69 ± 4,43	0,803
IL-5 (pg/mL)	4,30 ± 0,71	4,40 ± 0,41	0,582
IL-10 (pg/mL)	13,68 ± 5,50	12,31 ± 2,19	0,856
IL-13 (pg/mL)	82,88 ± 12,88	84,81 ± 12,67	0,616

V.C.M. = Volumen corpuscular medio; H.C.M. = Hemoglobina corpuscular media; C.H.C.M. = Concentración de hemoglobina corpuscular media; GOT = Glutamato-oxalacetato transaminasa; GPT = Glutamato piruvato transaminasa; LDH = Lactato deshidrogenasa. Todos los datos se representan como media ± DE, a excepción de la proteína C reactiva, expresada número de pacientes (y porcentaje) con un valor superior a 0,25 mg/L.

Destaca en el análisis de homogeneidad la no existencia de diferencias entre los grupos en ninguna de las variables demográficas y clínicas, lo que sugiere que ambos grupos son homogéneos y que el proceso de aleatorización se realizó correctamente.

4.2. SCORAD

El índice SCORAD, utilizado como una de las variables principales, fue evaluado en cada una de las visitas presenciales del estudio clínico (semanas 0, 4, 8 y 12), y se analizó, en ambos grupos de tratamiento, de forma global y cada uno de sus componentes por separado: extensión (valor A), intensidad (valor B) y síntomas subjetivos (valor C).

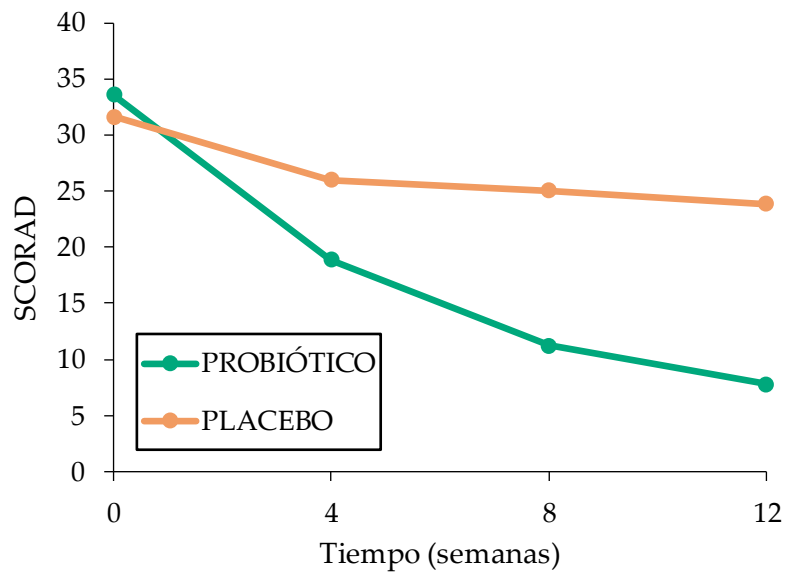
4.2.1 SCORAD total

Al inicio del estudio, en la visita basal, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la puntuación del SCORAD entre ambos grupos de tratamiento, obteniéndose valores medios de $33,58 \pm 3,38$ y $31,64 \pm 5,05$ en los grupos probiótico y placebo, respectivamente.

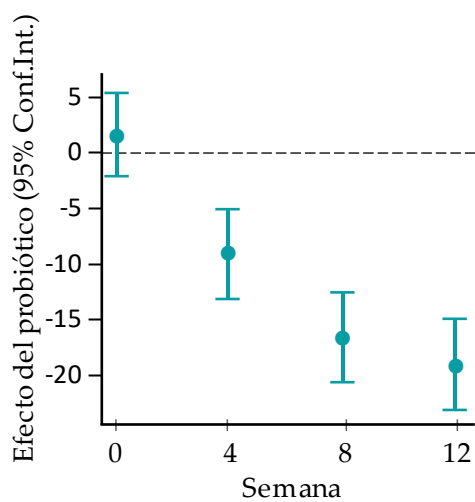
Sin embargo, conforme avanzan las semanas de tratamiento, los valores medios de ambos grupos comienzan a distanciarse, pudiendo observarse diferencias significativas desde la semana 4. Estas diferencias se amplían más en las semanas 8 y 12, en la que se obtienen unos valores de $7,77 \pm 7,72$ en el grupo probiótico y $23,88 \pm 10,07$ en el grupo placebo (Tabla 8 y Figura 16).

Tabla 8. Valores del SCORAD en ambos grupos de tratamiento.

	Probiótico	Placebo	P
Semana 0	$33,58 \pm 3,38$	$31,64 \pm 5,05$	0,122
Semana 4	$18,89 \pm 7,09$	$26,01 \pm 8,70$	< 0,003
Semana 8	$11,26 \pm 6,65$	$25,04 \pm 9,20$	< 0,001
Semana 12	$7,77 \pm 7,72$	$23,88 \pm 10,07$	< 0,001

Figura 16. Evolución del SCORAD.

Para cuantificar el efecto del preparado probiótico, se ha calculado las diferencias en el índice SCORAD entre un grupo probiótico y el placebo, observando que el índice SCORAD llega a reducirse, en la semana 12, cerca de 17 puntos más en el grupo probiótico que en el placebo (Figura 17).

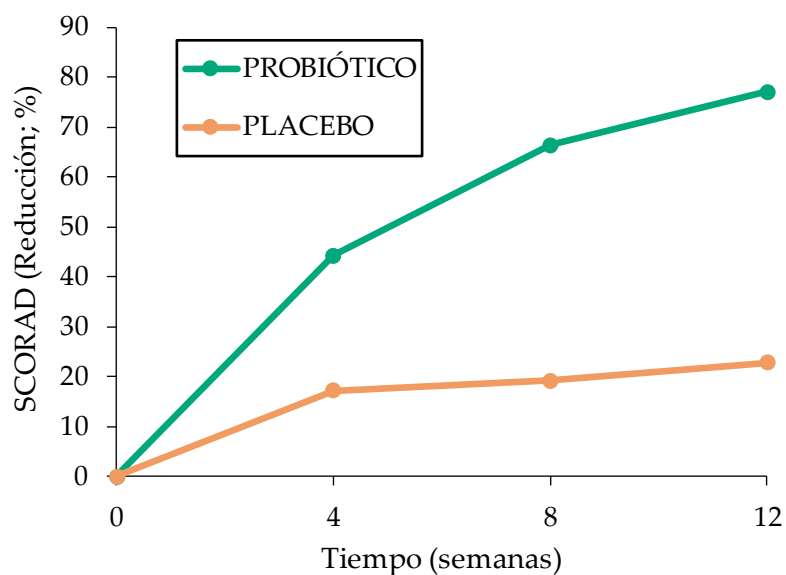
Figura 17. Diferencias en el índice SCORAD entre grupos.

Por otro lado, al analizar el SCORAD como porcentaje de reducción, es decir, cuantificando el cambio en la severidad de la DA en cada uno de los pacientes de ambos grupos, también se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, que se ampliaron con el periodo de tratamiento, llegando a obtener una reducción de la puntuación del SCORAD del 77,1 % en el grupo probiótico, frente a un 22,7 % en el grupo placebo al final del estudio (Tabla 9 y Figura 18).

Tabla 9. Reducción del SCORAD en ambos grupos de tratamiento.

	Probiótico	Placebo	P
Semana 4	44,22 ± 18,89	17,16 ± 24,88	< 0,001
Semana 8	66,38 ± 19,06	19,15 ± 32,75	< 0,001
Semana 12	77,1 ± 22,35	22,70 ± 36,03	< 0,001

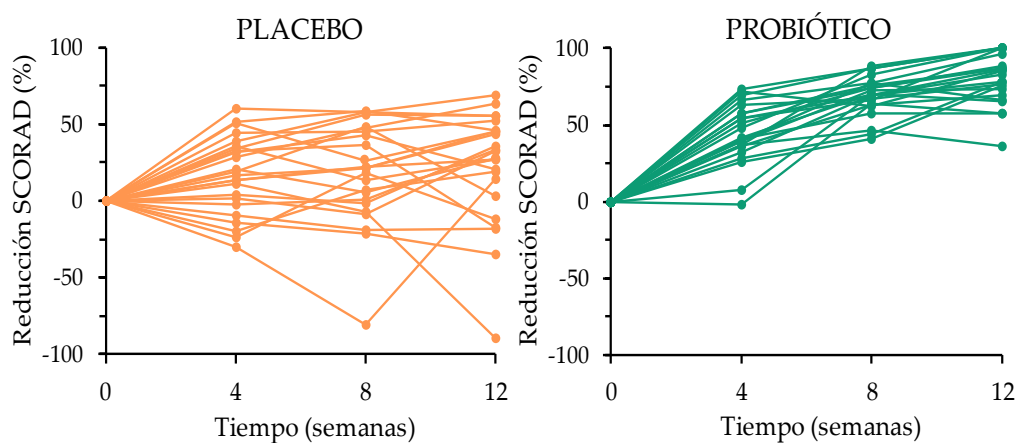
Figura 18. Porcentaje de reducción del SCORAD.



Si observamos la evolución del SCORAD individualizada por paciente y por grupo, puede apreciarse que todos los pacientes del grupo probiótico disminuyen

su SCORAD, no empeorando en ninguno de los casos, y mostrando una gran tendencia de mejoría, ya que la mayoría de los pacientes se encuentran entre el 60 y el 80 % de reducción del índice SCORAD, al finalizar el periodo de seguimiento. En cambio, en el grupo placebo, sí observamos pacientes que empeoran, así como una mejora mucho menor y que en ningún caso supera el 70 % (Figura 19).

Figura 19. Porcentaje de reducción del SCORAD por paciente en cada grupo de intervención para las distintas semanas de estudio.



A fin de identificar la posible influencia de las variables utilizadas en el proceso de aleatorización, es decir, el sexo, la edad y la edad de inicio de la DA, en la eficacia del preparado probiótico, se ha realizado un análisis intragrupo e intergrupo para comparar la reducción del índice SCORAD en la semana 12. Para ello se tuvo en cuenta si los pacientes eran mujeres u hombres, si su edad era menor o mayor o igual a 8 años y si la DA debutó antes o después de cumplir los 4 años. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas intragrupo en ningún caso, por lo que, al menos en este estudio y con esta población, estas variables no parecen influir en el efecto del probiótico. Sin embargo, sí se corroboran las diferencias entre grupos en todos los casos (Tablas 10, 11 y 12).

Tabla 10. Reducción del SCORAD en hombres y mujeres.

	Probiótico	Placebo	P
Hombres	73,85 ± 28,51	23,01 ± 29,80	< 0,001
Mujeres	81,08 ± 10,19	22,43 ± 41,81	< 0,001
P	0,410	0,969	

Tabla 11. Reducción del SCORAD según la edad.

	Probiótico	Placebo	P
< 8 años	75,30 ± 15,99	19,86 ± 45,20	0,002
≥ 8 años	78,08 ± 26,16	25,10 ± 27,80	< 0,001
P	0,778	0,731	

Tabla 12. Reducción del SCORAD según la edad de inicio de la DA.

	Probiótico	Placebo	P
< 4 años	77,37 ± 23,99	15,47 ± 38,46	< 0,001
≥ 4 años	75,22 ± 14,33	37,14 ± 27,20	0,027
P	0,866	0,170	

4.2.2 Extensión de las lesiones

Para poder valorar el efecto del preparado probiótico en la extensión de las lesiones de DA, se ha analizado de forma independiente el valor A del SCORAD y su evolución durante el transcurso del estudio en ambos grupos de intervención.

Al comparar los datos de los grupos probiótico y placebo en la visita basal del estudio, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la puntuación del valor A. Los valores promedio de la extensión de las lesiones en los grupos probiótico y placebo fueron de $15,58 \pm 5,65$ y $14,25 \pm 5,49$, respectivamente.

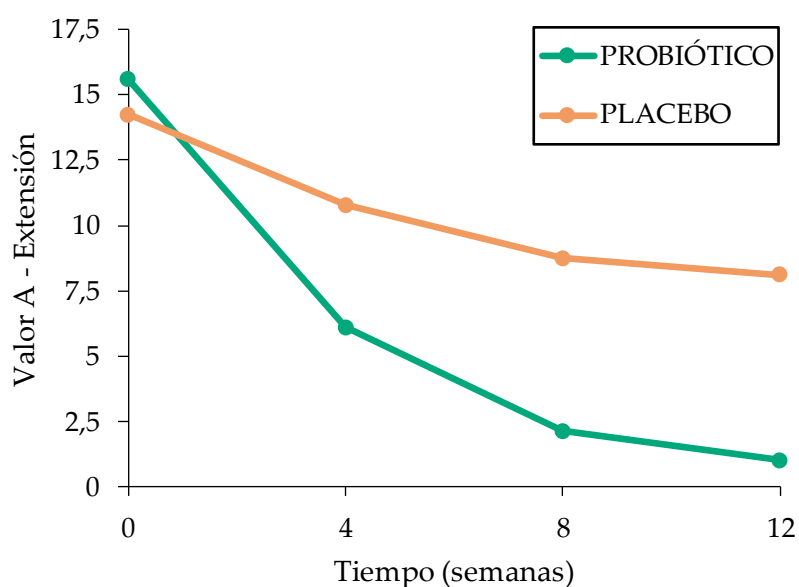
Sin embargo, y al igual que ocurre con la puntuación total del SCORAD, los valores promedio de extensión en ambos grupos se distancian conforme avanzan las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento, obteniendo diferencias estadísticamente

significativas en los tres tiempos. Las puntuaciones del valor A al finalizar el estudio fueron de $1,00 \pm 1,62$ en el grupo probiótico y de $8,12 \pm 6,13$ en el placebo (Tabla 13 y Figura 20).

Tabla 13. Valores de la extensión de las lesiones en ambos grupos de tratamiento.

	Probiótico	Placebo	P
Semana 0	$15,58 \pm 5,65$	$14,25 \pm 5,49$	0,354
Semana 4	$6,10 \pm 4,28$	$10,79 \pm 5,90$	< 0,001
Semana 8	$2,13 \pm 2,92$	$8,75 \pm 5,91$	< 0,001
Semana 12	$1,00 \pm 1,62$	$8,12 \pm 6,13$	< 0,001

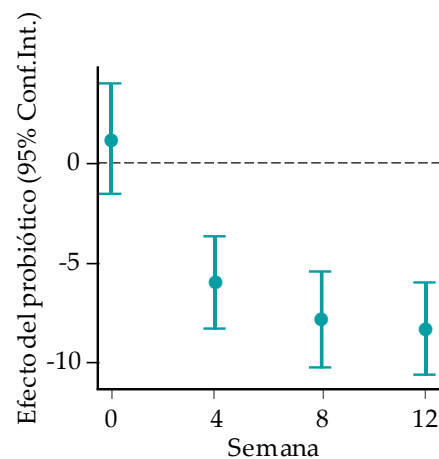
Figura 20. Evolución de la extensión de las lesiones.



Se calculó la diferencia absoluta en el valor A entre ambos grupos para poder valorar el efecto del preparado probiótico en este componente del SCORAD. Como puede observarse en la Figura 21, al finalizar el periodo de tratamiento, el

probiótico consiguió disminuir la extensión de las lesiones de DA 7 puntos por encima del placebo.

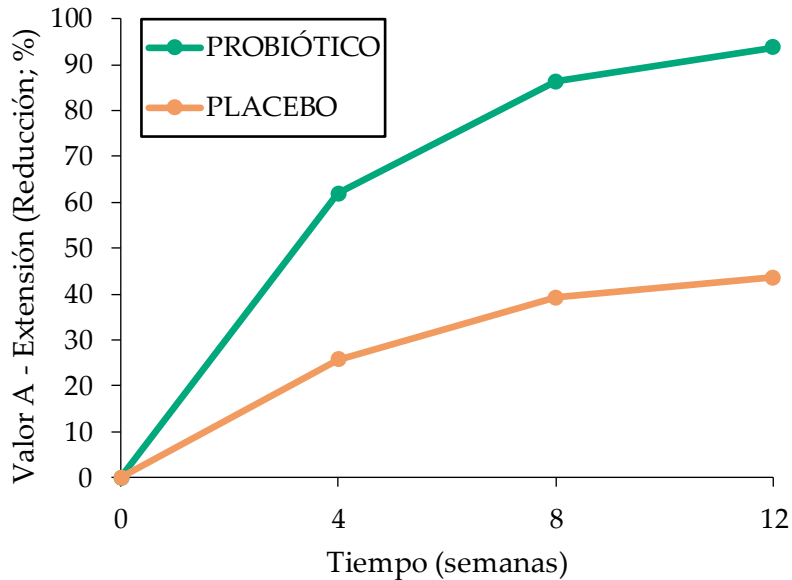
Figura 21. Diferencias en la extensión de las lesiones entre grupos.



Al analizar el cambio en la superficie afectada por las lesiones como porcentaje de reducción desde el valor inicial, se puede observar también diferencias significativas entre los grupos probiótico y placebo en las semanas 4, 8 y 12. Con la finalización del periodo de tratamiento, la extensión de las lesiones se redujo en 93,66 % en el grupo probiótico frente a un 43,55 % en el placebo (Tabla 14 y Figura 22).

Tabla 14. Reducción de la extensión de las lesiones en ambos grupos de tratamiento.

	Probiótico	Placebo	P
Semana 4	61,90 ± 19,60	25,76 ± 19,39	< 0,001
Semana 8	86,37 ± 20,72	39,26 ± 27,95	< 0,001
Semana 12	93,66 ± 9,73	43,55 ± 31,79	< 0,001

Figura 22. Porcentaje de reducción de la extensión de las lesiones.

4.2.3 Intensidad de las lesiones

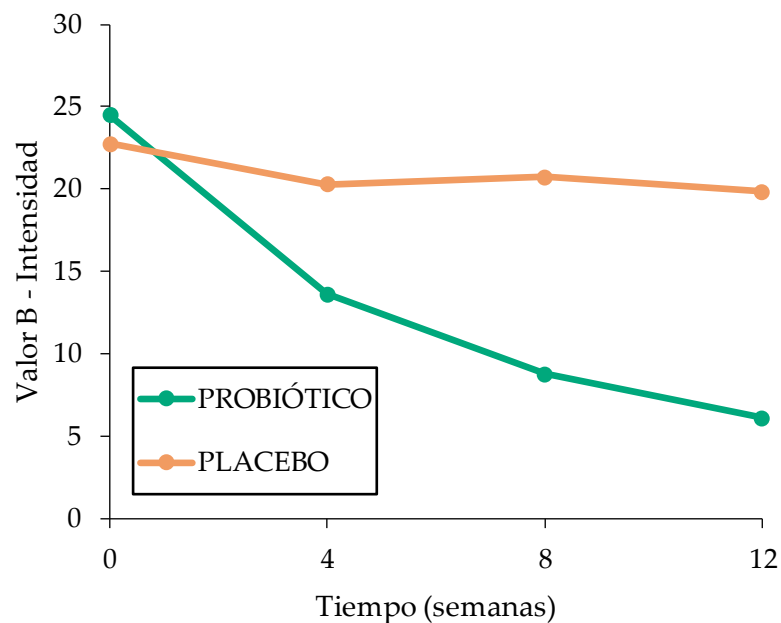
Al igual que se ha realizado con el valor A para poder evaluar el efecto del preparado probiótico en la extensión de las lesiones de DA, también se llevó a cabo de forma independiente el análisis de la intensidad de las lesiones (valor B) y cómo esta variable se ve afectada por la ingesta del probiótico.

Como en los casos anteriores, no se observaron diferencias en la puntuación del valor B entre ambos grupos de tratamiento al inicio del estudio ($24,50 \pm 2,62$ vs. $22,75 \pm 3,86$ en los grupos probiótico y placebo, respectivamente).

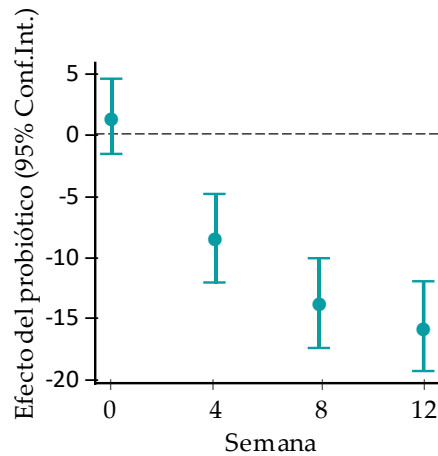
Mientras que los valores de intensidad en el grupo placebo al final del estudio permanecen muy similares a los iniciales ($19,83 \pm 8,10$), la puntuación en el grupo probiótico disminuye significativamente desde la semana 4 de tratamiento, finalizando el periodo de tratamiento con una puntuación de $6,08 \pm 6,52$ (Tabla 15 y Figura 23).

Tabla 15. Valores de la intensidad de las lesiones en ambos grupos de tratamiento.

	Probiótico	Placebo	P
Semana 0	24,50 ± 2,62	22,75 ± 3,86	0,084
Semana 4	13,60 ± 4,46	20,27 ± 6,92	< 0,001
Semana 8	8,75 ± 5,26	20,71 ± 7,29	< 0,001
Semana 12	6,08 ± 6,52	19,83 ± 8,10	< 0,001

Figura 23. Evolución de la intensidad de las lesiones.

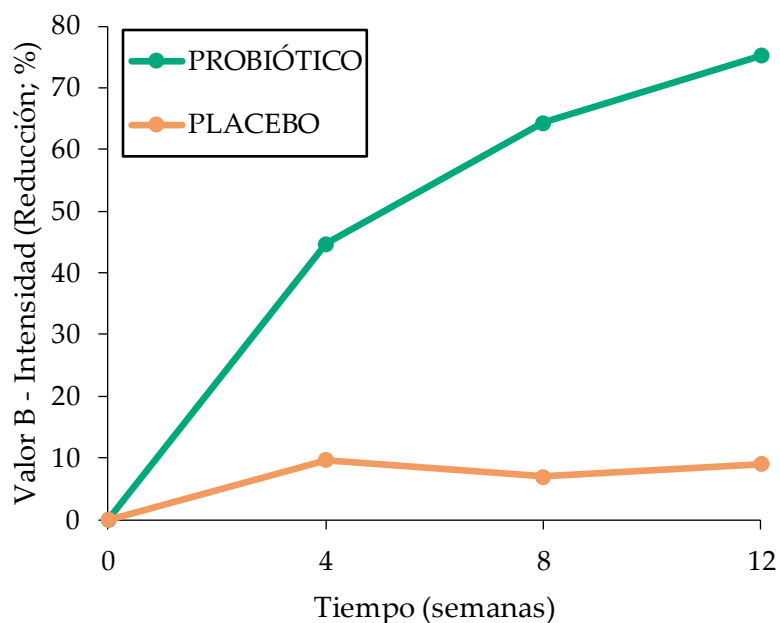
Si analizamos las diferencias entre los resultados obtenidos en los grupos probiótico y placebo en el valor B de intensidad de las lesiones de DA, podemos observar que el probiótico a estudio consigue disminuir la puntuación en esta variable unos 14 puntos más que el placebo al finalizar el periodo de tratamiento (Figura 24).

Figura 24. Diferencias en la intensidad de las lesiones entre grupos.

Cuando evaluamos la reducción (en porcentaje) de la intensidad de las lesiones con respecto al valor al inicio del estudio, podemos observar también una clara diferencia entre ambos grupos de tratamiento. Mientras que al finalizar el periodo de tratamiento el valor B se reduce en un 75,23 % en el grupo probiótico, en el grupo placebo este valor se queda en un 9,04 % (Tabla 16 y Figura 25).

Tabla 16. Reducción de la intensidad de las lesiones en ambos grupos de tratamiento.

	Probiótico	Placebo	P
Semana 4	44,73 ± 16,22	9,63 ± 29,52	< 0,001
Semana 8	64,32 ± 20,50	6,96 ± 35,37	< 0,001
Semana 12	75,23 ± 25,38	9,04 ± 46,75	< 0,001

Figura 25. Porcentaje de reducción de la intensidad de las lesiones.

Aunque la mejoría en esta variable no fue tan elevada como en la extensión, el grupo que recibió el preparado probiótico disminuyó la intensidad de las lesiones con una gran diferencia comparado con el grupo placebo.

4.2.4 Síntomas subjetivos

Al igual que se realizó con los valores A y B (extensión e intensidad) del SCORAD para estudiar el efecto del preparado probiótico, también se analizó de forma individual el valor C, es decir, los síntomas subjetivos (prurito y pérdida de sueño) que se dan en la DA.

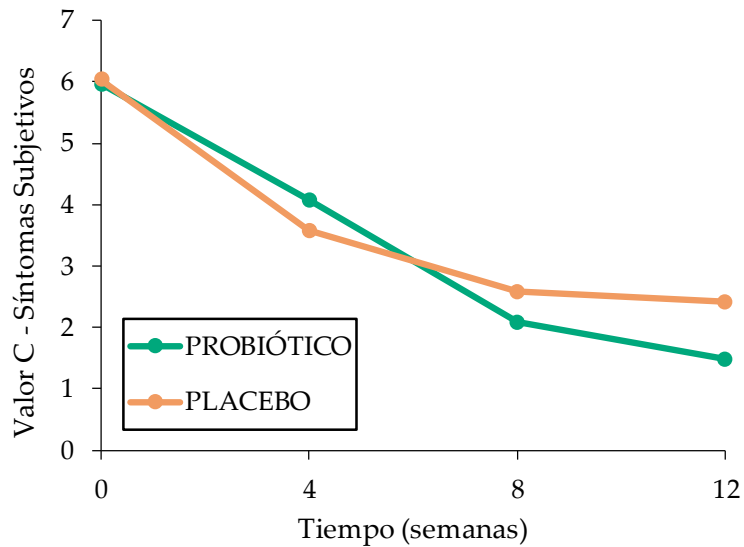
Como en los casos anteriores, al comparar los datos de los grupos probiótico y placebo en la visita basal del estudio, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la puntuación del valor C, así como de sus subcomponentes, prurito y pérdida de sueño, por separado.

No obstante, y en contraposición a los resultados de los valores A, B y el SCORAD total, el probiótico no parece tener un efecto tan acusado en el control de

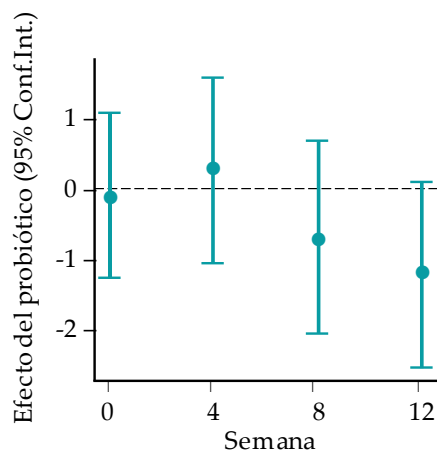
los síntomas subjetivos como lo tiene en el resto de los componentes del SCORAD. El valor C del grupo probiótico a las 12 semanas de tratamiento fue de $1,48 \pm 1,70$ y de $2,42 \pm 2,08$ en el grupo placebo ($p = 0,080$; Tabla 17 y Figura 26). La pérdida de sueño resulta con valores nulos en ambos grupos de tratamiento al finalizar el estudio, por lo que los datos del valor C se deben exclusivamente a los valores de prurito (Tabla 17).

Tabla 17. Valores de los síntomas subjetivos en ambos grupos de tratamiento.

		Probiótico	Placebo	P
Prurito	Semana 0	$5,46 \pm 2,25$	$5,46 \pm 1,72$	0,700
	Semana 4	$3,73 \pm 2,24$	$3,50 \pm 1,84$	0,679
	Semana 8	$2,08 \pm 1,74$	$2,58 \pm 2,06$	0,369
	Semana 12	$1,48 \pm 1,70$	$2,42 \pm 2,08$	0,099
Pérdida de sueño	Semana 0	$0,50 \pm 1,14$	$0,58 \pm 1,28$	0,678
	Semana 4	$0,35 \pm 0,98$	$0,08 \pm 0,41$	0,192
	Semana 8	0 ± 0	0 ± 0	1
	Semana 12	0 ± 0	0 ± 0	1
Valor C	Semana 0	$5,96 \pm 2,34$	$6,04 \pm 2,22$	0,759
	Semana 4	$4,08 \pm 2,68$	$3,58 \pm 2,06$	0,867
	Semana 8	$2,08 \pm 1,74$	$2,58 \pm 2,06$	0,369
	Semana 12	$1,48 \pm 1,70$	$2,42 \pm 2,08$	0,099

Figura 26. Evolución de los síntomas subjetivos.

Se calculó, al igual que en los casos anteriores, la diferencia absoluta entre grupos en el valor C total de los síntomas subjetivos a fin de identificar el efecto del preparado probiótico en este componente del SCORAD. Como puede observarse en la Figura 27, al finalizar el periodo de tratamiento, el probiótico ha conseguido disminuir estos síntomas ligeramente más que en el placebo.

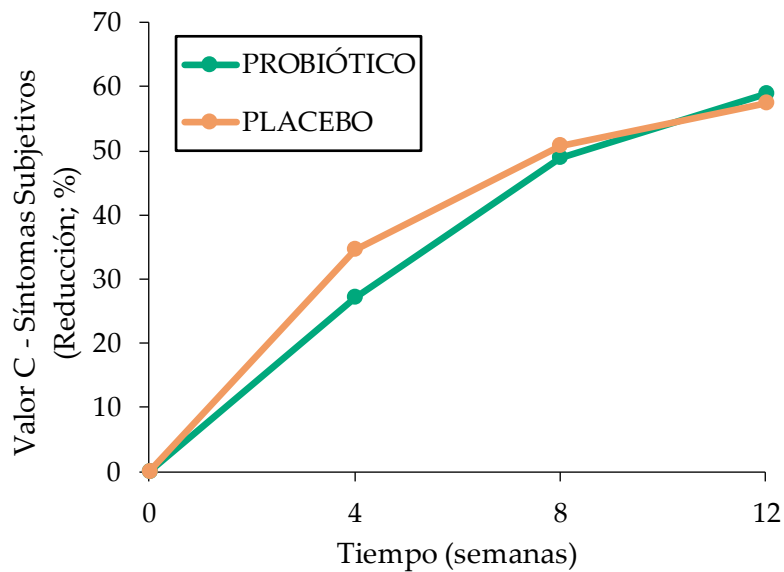
Figura 27. Diferencias en los síntomas subjetivos entre grupos.

Del mismo modo, se calculó el porcentaje de reducción de los síntomas subjetivos comparado con el valor inicial en ambos grupos, y se identificaron diferencias significativas a la semana 12 de tratamiento, en la que se redujo en un 58,93 % en el grupo probiótico frente a un 57,42 % en el grupo placebo (Tabla 18 y Figura 28).

Tabla 18. Reducción de los síntomas subjetivos en ambos grupos de tratamiento.

	Probiótico	Placebo	P
Semana 4	27,17 ± 50,56	34,58 ± 35,33	0,554
Semana 8	48,94 ± 80,01	50,86 ± 38,33	0,916
Semana 12	58,93 ± 83,67	57,42 ± 38,15	0,936

Figura 28. Porcentaje de reducción de los síntomas subjetivos.



En esta variable, el probiótico también consigue una reducción considerable, pero ocurre lo mismo en el grupo placebo, en un porcentaje prácticamente similar.

4.3 CORTICOSTEROIDES TÓPICOS

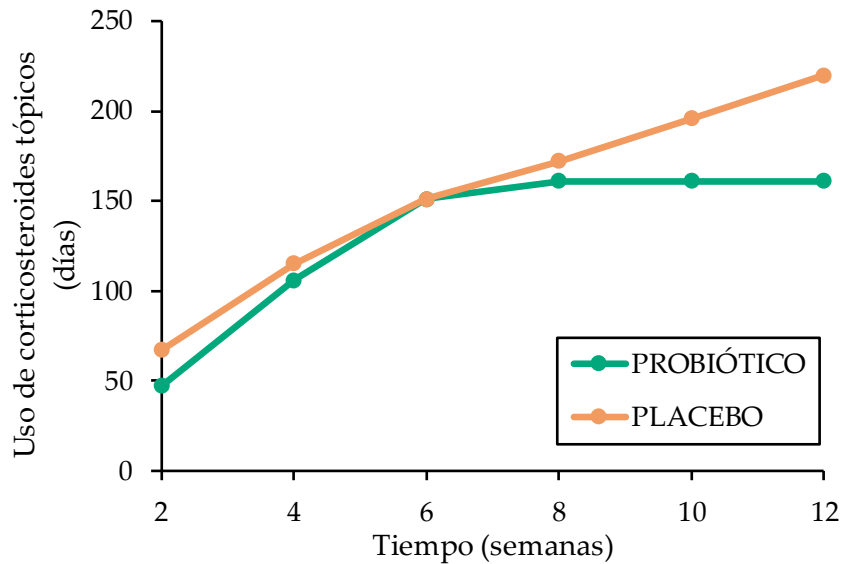
El uso de corticosteroides tópicos durante los brotes de DA (considerados como un mínimo de tres días consecutivos de uso de los mismos), la segunda variable principal del estudio, fue evaluado a partir del registro de uso de los propios pacientes participantes en un documento destinado a esa finalidad. Esta variable se recogió en las visitas de control intermedias, así como en las visitas presenciales, es decir, a las 2, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas de tratamiento.

A fin de evaluar el comportamiento de ambos grupos, se analizó el número total de días acumulados en los que se había utilizado corticosteroides tópicos, tanto en el grupo probiótico como el placebo, a lo largo de las visitas del estudio clínico (Tabla 19 y Figura 29). Como puede observarse en la Figura 29, los resultados fueron similares en ambos grupos de tratamiento durante la primera mitad del estudio clínico. A partir de la semana 6, se observa como el uso de corticosteroides en el grupo placebo continuó aumentando, mientras que en el grupo probiótico se estabilizó.

Tabla 19. Días totales de uso de corticosteroides tópicos.

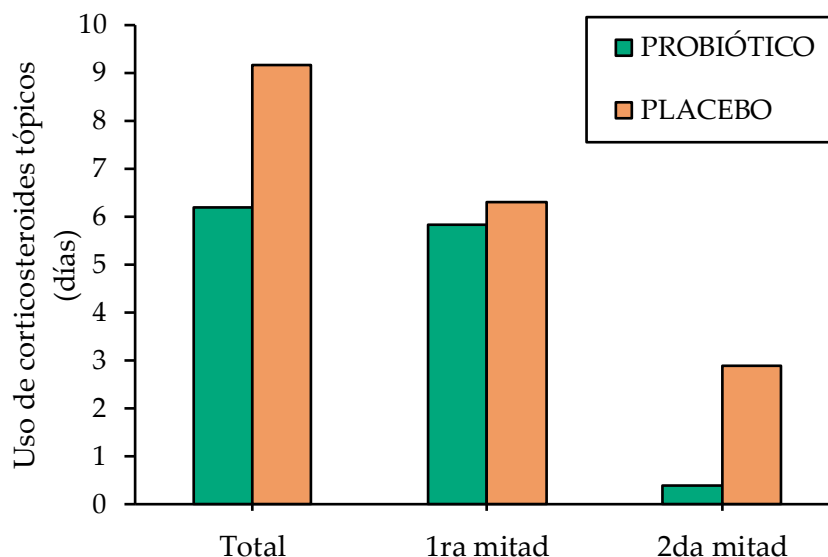
	Probiótico	Placebo	P
Semana 2	47	67	0,503
Semana 4	106	115	0,706
Semana 6	151	151	0,936
Semana 8	161	172	0,666
Semana 10	161	196	0,447
Semana 12	161	220	0,374

Figura 29. Días totales de uso de corticosteroides tópicos en cada grupo de tratamiento a lo largo del estudio clínico.



Se analizó, además, la media del número total de días de uso de corticosteroides tópicos y, al final del estudio clínico, los pacientes del grupo probiótico habían utilizado corticosteroides tópicos una media de $6,19 \pm 7,32$ días, frente a los $9,17 \pm 11,35$ días del grupo placebo ($p = 0,374$; Figura 30). Si analizamos de forma independiente los datos de las dos mitades del estudio clínico, los resultados mostraron que, durante la primera mitad del estudio, el uso de corticosteroides tópicos en ambos grupos fue similar ($6,29 \pm 7,36$ vs. $5,81 \pm 6,63$ en probiótico y placebo, respectivamente), mientras que en la segunda mitad del estudio el uso del grupo probiótico disminuye significativamente comparado con el grupo placebo ($2,88 \pm 6,49$ vs. $0,38 \pm 1,96$, respectivamente; $p = 0,018$; Figura 30).

Figura 30. Media de días de uso de corticosteroides tópicos durante el total y las dos mitades del estudio en cada grupo de tratamiento.

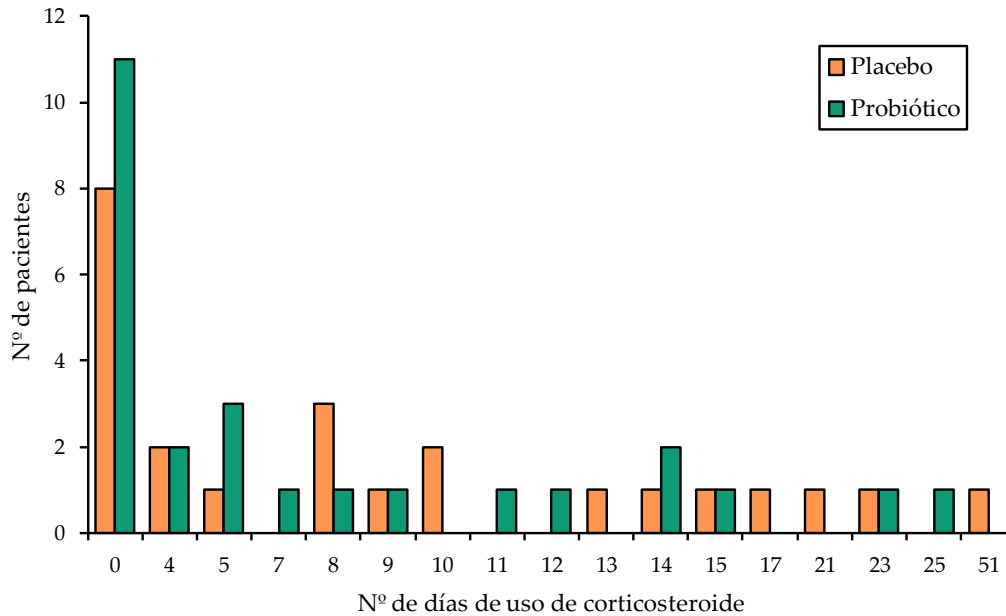


Por último, se analizó el uso de corticoides según los días totales acumulados por grupo de intervención. Al final del seguimiento, se disponía de 2032 días de observación entre todos los pacientes en el grupo placebo y de 2084 días-paciente en el grupo probiótico. Se utilizaron corticosteroides para tratar los brotes en 220 (10,80 %) y en 161 (7,70 %) días en el grupo placebo y probiótico, respectivamente.

La regresión logística ajustada por variables de estratificación en la situación basal estimó un cociente de probabilidades de 0,63 (IC del 95 % 0,52 a 0,78; $p < 0,001$).

Considerando el tiempo de seguimiento individual de cada paciente, se calculó la proporción media de días de uso de corticosteroides tópicos, obteniendo $6,80 \pm 7,93$ % para el grupo probiótico y $9,85 \pm 12,26$ % en el grupo placebo.

Al analizar el uso de corticosteroides tópicos de cada paciente individual, como puede observarse en la Figura 31, hubo un gran número de pacientes que no los emplea a lo largo del estudio, o los utiliza un número reducido de días.

Figura 31. Frecuencia de días de uso de corticoides tópicos.

Para ahondar más en el análisis del uso de corticosteroides tópicos, se realizó también un análisis comparando el total de días de uso de corticosteroides tópicos, no solo durante los brotes de DA. En el grupo placebo el número de días de uso totales fue de 336 (15,01 %), mientras que en el grupo probiótico fue de 291 días de uso (14,0 %). Se realizó de nuevo un análisis de regresión logística ajustada que arrojó un cociente de probabilidades de 0,77 (IC del 95 % 0,65 a 0,91; $p < 0,003$).

4.4 BROTES DE DERMATITIS ATÓPICA

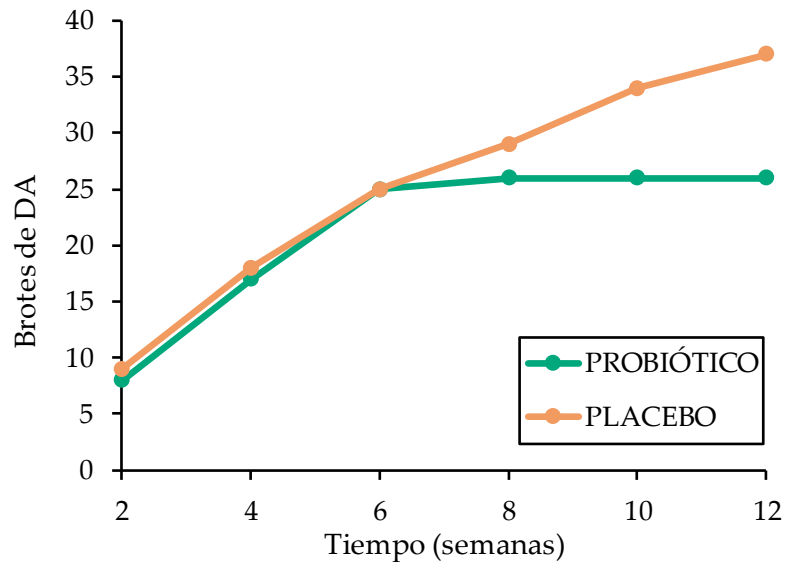
Para evaluar el potencial de prevención de nuevos brotes de DA del preparado probiótico en estudio, se solicitó a los pacientes que registraran, en un cuaderno para esa finalidad, cada vez que presentaban un nuevo brote de la enfermedad (considerado como un mínimo de tres días de uso de corticosteroides tópicos). Esta variable se recogió, además de en las visitas presenciales, también en los controles entre visitas, es decir, cada dos semanas (semanas 2, 4, 6, 8, 10 y 12 desde el inicio del tratamiento).

Como puede observarse en la Tabla 20 y en la Figura 32, que representa el número acumulado de brotes de DA, los pacientes del grupo probiótico presentaron menos brotes (26) que el grupo placebo (37) al final del estudio, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p = 0,37$). Aunque los dos grupos de tratamiento parecen seguir una misma línea de tendencia durante las 6 primeras semanas del estudio (presentando ambos grupos un total de 25 brotes de DA), los resultados muestran que, a partir de la mitad del periodo de tratamiento, los brotes de DA siguen aumentando en el grupo placebo, pero no así en el probiótico.

Tabla 20. Número de brotes de DA.

	Probiótico	Placebo	P
Semana 2	8	9	0,774
Semana 4	17	18	0,856
Semana 6	25	25	0,951
Semana 8	26	29	0,682
Semana 10	26	34	0,433
Semana 12	26	37	0,366

Figura 32. Número de brotes de DA en ambos grupos de tratamiento.



4.5 OTROS TRATAMIENTOS PARA LA DERMATITIS ATÓPICA

Además del uso de corticosteroides tópicos, también se recogió el requerimiento de tratamiento de corticosteroides orales y antihistamínicos para el tratamiento de los síntomas de DA a lo largo del estudio clínico.

4.5.1 Corticosteroides orales

Al final del estudio clínico, los pacientes del grupo probiótico utilizaron corticosteroides orales un total de 28 días, frente a los 21 del grupo placebo, siendo esta diferencia no significativa ($p = 0,491$), que corresponden a 4 (15,38 %) pacientes en el grupo probiótico y 2 (8,33 %) en el grupo placebo ($p = 0,44$). Teniendo en cuenta solo los pacientes que los utilizan en cada grupo de tratamiento, la media de uso a lo largo del estudio fue de $7,00 \pm 0,00$ y de $10,50 \pm 4,95$ días, respectivamente ($p = 0,533$).

4.5.2 Antihistamínicos

Los antihistamínicos son empleados habitualmente en el tratamiento de la DA para disminuir el prurito, aunque también es un tratamiento muy habitual para los síntomas de enfermedades alérgicas, entre otras. El uso de antihistamínicos al final del estudio clínico fue de 153 y 59 días en el grupo probiótico y placebo, respectivamente ($p = 0,033$). Estos días de uso corresponden a 14 (53,85 %) pacientes del grupo probiótico y a 6 (25 %) pacientes del grupo placebo ($p = 0,043$). Sin embargo, cuando se analiza el tiempo medio de tratamiento antihistamínico por paciente, observamos que fue similar en estos pacientes, con valores de $10,93 \pm 5,06$ y $9,83 \pm 5,19$ días en los grupos probiótico y placebo, respectivamente ($p = 0,602$).

4.6 IMPRESIÓN CLÍNICA GLOBAL (ICG)

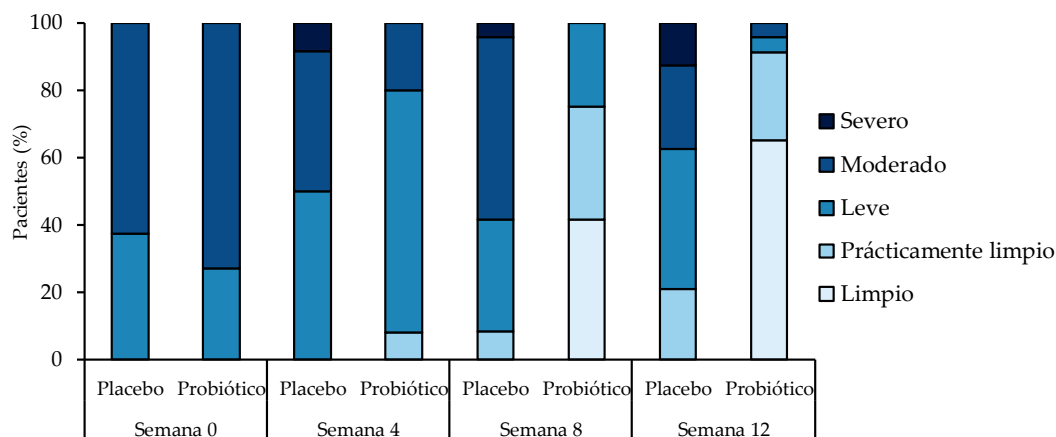
La ICG que describe de forma general la severidad de la DA, fue evaluada, al igual que el índice SCORAD, en las cuatro visitas presenciales del estudio clínico, es decir, en la visita basal y tras 4, 8 y 12 semanas de tratamiento.

Como se ha comentado en el análisis de homogeneidad, sólo fueron incluidos en el estudio pacientes con las categorías de ICG de “Leve” y “Moderado” (categorías 2 y 3, respectivamente), y no se identificaron diferencias en la distribución de estas categorías en ambos grupos de tratamiento al inicio del estudio.

Con el avance del periodo de tratamiento, la distribución de las categorías comenzó a cambiar, observándose que los pacientes del grupo probiótico mejoraron más que los del placebo y finalizaron en categorías más bajas de ICG. La extensa mayoría de ellos concluyeron el estudio en las categorías de “Limpio” (65,22 %) y “Prácticamente limpio” (26,09 %), lo que no ocurrió en el grupo placebo, donde ningún paciente alcanzó la categoría de limpio (Tabla 21 y Figura 33).

Tabla 21. Distribución de las categorías de ICG en ambos grupos de tratamiento.

	Probiótico		Placebo		P	
	N	%	N	%		
Semana 0	0 - Limpio	0	0	0	0,423	
	1 - Práct. Limpio	0	0	0		
	2 - Leve	7	26,92	9		37,50
	3 - Moderado	19	73,08	15		62,50
	4 - Grave	0	0	0		0
Semana 4	0 - Limpio	0	0	0	0,077	
	1 - Práct. Limpio	2	8	0		0
	2 - Leve	18	72	12		50
	3 - Moderado	5	20	10		41,67
	4 - Grave	0	0	2		8,33
Semana 8	0 - Limpio	10	41,67	0	0	< 0,001
	1 - Práct. Limpio	8	33,33	2	8,33	
	2 - Leve	6	25	8	33,33	
	3 - Moderado	0	0	13	54,17	
	4 - Grave	0	0	1	4,17	
Semana 12	0 - Limpio	15	65,22	0	0	< 0,001
	1 - Práct. Limpio	6	26,09	5	20,83	
	2 - Leve	1	4,35	10	41,67	
	3 - Moderado	1	4,35	6	25	
	4 - Grave	0	0	3	12,50	

Figura 33. Distribución de las categorías de ICG.

La comparación entre los grupos probiótico y placebo mostró diferencias significativas en el número de pacientes con respuesta al tratamiento, entendida como una ICG menor a 2 puntos, es decir, en las categorías “Limpio” y “Prácticamente limpio” antes mencionadas. Un total de 21 pacientes (91,30 %) del grupo probiótico obtuvieron puntuaciones en la ICG de 0 o 1, y solo 5 pacientes (20,83 %) lograron estas puntuaciones en el grupo placebo ($p < 0,001$, Tabla 22).

Tabla 22. Pacientes con ICG < 2.

	Probiótico		Placebo		P
	N	%	N	%	
Semana 0	0	0	0	0	1
Semana 4	2	8	0	0	0,157
Semana 8	18	75	2	8,33	< 0,001
Semana 12	21	91,30	5	20,83	< 0,001

Además, los 15 pacientes que finalizaron el estudio con una ICG clasificada como “Limpia”, pertenecían todos ellos al grupo tratado con el preparado probiótico. Esto supone 15 de 23 pacientes (65,22 %) frente a ninguno de los 24 pacientes del grupo placebo.

Para evaluar el cambio en esta variable en cada uno de los pacientes, se analizó también el número y porcentaje de pacientes que migraron a otra categoría de ICG. Para ello se clasificaron en cinco grupos: los pacientes que subían a una categoría de mayor severidad (“Empeora”), permanecían en la misma categoría (“No mejora”), bajaron en una categoría (“Mejora 1”), bajaron en dos categorías (“Mejora 2”) o bajaron tres categorías (“Mejora 3”). Este cambio se evaluó en las semanas 4, 8 y 12, comparando con los datos de la visita inicial, en ambos grupos de tratamiento.

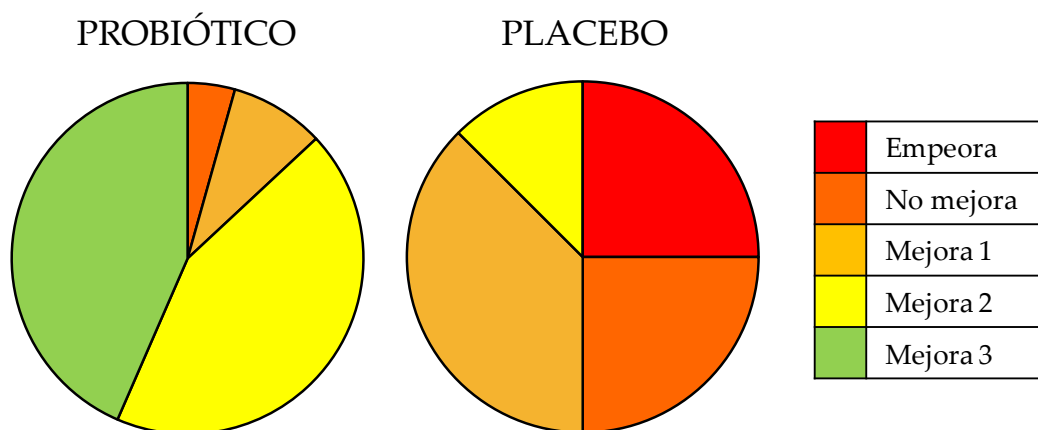
En el grupo probiótico, el 95,65 % de los pacientes finalizó el periodo de tratamiento con una mejora de su categoría de ICG, destacando que el 43,48 % mejoró en 3 categorías. Además, en este grupo no fue evaluado ningún paciente que mostrase un empeoramiento. Por el contrario, en el grupo placebo sí hubo pacientes que empeoraron (25 %), y disminuyeron la categoría a otra de menor severidad el 50 %, mientras que el 25 % restante no presentó mejoría. En el grupo placebo, ningún paciente llegó a mejorar la severidad de la DA en más de dos categorías de ICG (Tabla 23 y Figura 34).

Tabla 23. Evolución de la DA según el cambio de categoría de la ICG.

		Probiótico		Placebo		P
		N	%	N	%	
Semana 4	Empeora	1	4	5	20,83	0,056
	No mejora	9	36	13	54,17	
	Mejora 1	14	56	6	25	
	Mejora 2	1	4	0	0	
	Mejora 3	0	0	0	0	
Semana 8	Empeora	0	0	5	20,83	< 0,001
	No mejora	2	8,33	13	54,17	
	Mejora 1	5	20,83	5	20,83	
	Mejora 2	11	45,83	1	4,17	
	Mejora 3	6	25	0	0	
Semana 12	Empeora	0	0	6	25	< 0,001
	No mejora	1	4,35	6	25	

Mejora 1	2	8,70	9	37,50
Mejora 2	10	43,48	3	12,50
Mejora 3	10	43,48	0	0

Figura 34. Pacientes que cambian de categoría de ICG en ambos grupos.



4.7 PRUEBAS ANALÍTICAS

4.7.1 Parámetros analíticos y bioquímicos generales

A fin de esclarecer si el preparado probiótico a estudio tiene algún efecto en los parámetros analíticos y bioquímicos sanguíneos generales, se estudiaron de nuevo al finalizar el periodo de tratamiento de los pacientes. Todos estos parámetros fueron homogéneos entre grupos al inicio del estudio clínico y continuaron siéndolo al finalizar el periodo de tratamiento, no existiendo diferencias entre grupos en ninguno de ellos (Tabla 24).

Tabla 24. Comparación de los parámetros analíticos al final del estudio clínico.

	Probiótico	Placebo	P
Leucocitos (mil/ μ L)	9,40 \pm 3,05	9,12 \pm 1,96	0,725
Hematíes (mil/ μ L)	4,50 \pm 0,36	4,58 \pm 0,37	0,521
Hemoglobina (g/dL)	12,72 \pm 0,89	13,17 \pm 1,16	0,163
Hematocrito (%)	38,79 \pm 3,03	37,61 \pm 3,23	0,229
V.C.M. (fl)	83,74 \pm 3,88	84,74 \pm 3,56	0,390
H.C.M. (pg)	28,30 \pm 1,46	28,78 \pm 1,34	0,278
C.H.C.M. (g/mL)	33,85 \pm 1,07	33,95 \pm 1,15	0,772
Plaquetas (mil/ μ L)	326,33 \pm 106,08	333,86 \pm 103,91	0,880
Neutrófilos (%)	47,10 \pm 12,26	46,37 \pm 12,05	0,847
Linfocitos (%)	37,84 \pm 9,57	40,31 \pm 11,60	0,458
Monocitos (%)	7,54 \pm 1,49	7,71 \pm 1,83	0,747
Eosinófilos (%)	6,99 \pm 5,85	5,06 \pm 4,04	0,345
Basófilos (%)	0,53 \pm 0,27	0,56 \pm 0,28	0,582
GOT (U/L)	29,22 \pm 8,15	27,58 \pm 7,77	0,485
GPT (U/L)	16,91 \pm 8,03	19,79 \pm 26,27	0,515
GGT (U/L)	13,52 \pm 3,07	13,88 \pm 4,00	0,737
LDH (U/L)	616,14 \pm 188,43	631,86 \pm 166,02	0,770
Fosfatasa alcalina (U/L)	291,17 \pm 98,64	289,35 \pm 143,60	0,960
Creatinina (mg/dL)	0,55 \pm 0,12	0,57 \pm 0,14	0,640
Glucosa (mg/dL)	95,91 \pm 13,55	92,63 \pm 12,28	0,388
Colesterol (mg/dL)	150,52 \pm 23,48	157,29 \pm 36,21	0,453
Triglicéridos (mg/dL)	79,74 \pm 3,43	119,92 \pm 86,45	0,133
Albúmina (g/dL)	5,45 \pm 0,78	5,17 \pm 0,41	0,131
Bilirrubina total (mg/dL)	0,51 \pm 0,44	0,39 \pm 0,16	0,886
IgE (IU/mL)	521,65 \pm 899,61	350,91 \pm 700,72	0,835
Proteínas totales (g/dL)	7,51 \pm 0,57	7,35 \pm 0,91	0,544

V.C.M. = Volumen corpuscular medio; H.C.M. = Hemoglobina corpuscular media; C.H.C.M. = Concentración de hemoglobina corpuscular media; GOT = Glutamato-oxalacetato transaminasa; GPT = Glutamato piruvato transaminasa; LDH = Lactato deshidrogenasa.

4.7.1.2 Eosinófilos e IgE

De todos los parámetros analizados, se debe hacer especial referencia a los valores de eosinófilos e IgE debido a su relación conocida con la DA. En un análisis general de comparación entre grupos, no se observaron diferencias en ninguno de estos dos parámetros (Tabla 24).

Al analizar de forma independiente esta variable únicamente en aquellos pacientes que finalizaron el estudio con DA limpia (según categoría de ICG de "Limpio", que coincidieron con valores de SCORAD por debajo de 7 puntos), todos ellos del grupo probiótico, tampoco se identificaron valores más bajos de estas variables (Tabla 25).

Tabla 25. Valores de eosinófilos e IgE según la severidad de la DA en el grupo probiótico al final del estudio.

	DA limpia	DA no limpia	P
Eosinófilos (%)	6,42 ± 5,33	6,03 ± 5,02	0,922
IgE (IU/mL)	398,64 ± 790,17	452,69 ± 819,09	0,905

4.7.2 Marcadores de inflamación

4.7.2.1 Translocación bacteriana

Se analizó la presencia de ADN bacteriano circulante en muestras de sangre periférica de los pacientes, tanto al inicio como al final del estudio, y no fueron detectados en ninguno de los pacientes incluidos en el estudio, independientemente del grupo de intervención.

4.7.2.2 Interleuquinas

Se cuantificaron los niveles sanguíneos de las interleuquinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, tanto al inicio como al final del periodo de intervención del estudio clínico. No se identificaron diferencias en ninguna de ellas, ni al inicio ni tras las 12 semanas de tratamiento, al comparar entre grupos de intervención (Tabla 26).

Tabla 26. Valores de interleuquinas al inicio y al final del estudio en ambos grupos.

		Probiótico	Placebo	P
IL-4 (pg/mL)	Semana 0	31,74 ± 8,64	30,69 ± 4,43	0,803
	Semana 12	28,05 ± 2,37	29,28 ± 3,64	0,139
IL-5 (pg/mL)	Semana 0	4,30 ± 0,71	4,40 ± 0,41	0,582
	Semana 12	4,17 ± 0,68	4,52 ± 0,84	0,104
IL-10 (pg/mL)	Semana 0	13,70 ± 5,73	12,31 ± 2,19	0,856
	Semana 12	13,15 ± 5,42	11,83 ± 2,73	0,919
IL-13 (pg/mL)	Semana 0	82,88 ± 12,88	84,81 ± 12,67	0,616
	Semana 12	80,49 ± 16,38	86,45 ± 9,86	0,149

4.7.2.3 Proteína C reactiva

Al final del estudio, el valor registrado de proteína C reactiva fue negativo en prácticamente todos los pacientes, obteniéndose valores por debajo de 0,25 mg/L. Únicamente se encontraron cuatro valores elevados (dos en cada grupo de intervención) y coincidían con episodios bacterianos registrados en el CRD. Por tanto, no se encontraron signos de inflamación destacables en los pacientes.

4.8 MICROBIOTA INTESTINAL

A partir de la toma de muestras de heces de los pacientes al inicio y al final del estudio clínico, se analizó la composición de la microbiota intestinal a nivel taxonómico de género.

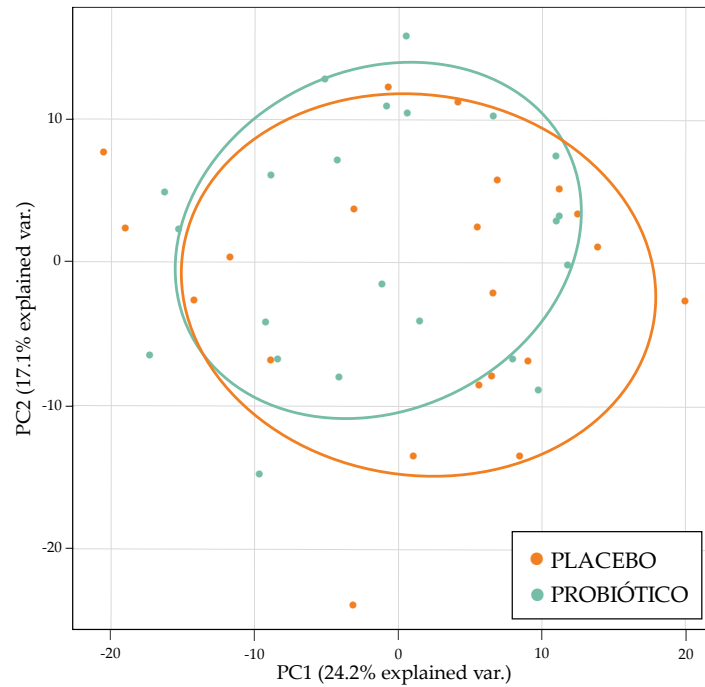
En primer lugar, se estudió la composición de la microbiota intestinal de toda la población incluida en el estudio clínico en el momento inicial, es decir, antes de comenzar el periodo de intervención con probiótico o placebo. En la Tabla 27, se indica el porcentaje promedio que representa cada género bacteriano, ordenados de mayor a menor.

Tabla 27. Composición promedio de la microbiota intestinal de los pacientes incluidos en el estudio.

GÉNERO	Porcentaje (%)
<i>Bacteroides</i>	10,74
<i>Faecalibacterium</i>	9,55
<i>Ruminococcus</i>	7,85
<i>Bifidobacterium</i>	5,57
<i>Akkermansia</i>	4,31
<i>Roseburia</i>	4,09
<i>Eubacterium</i>	4,05
<i>Dialister</i>	3,63
<i>Agathobacter</i>	3,58
<i>Blautia</i>	3,49

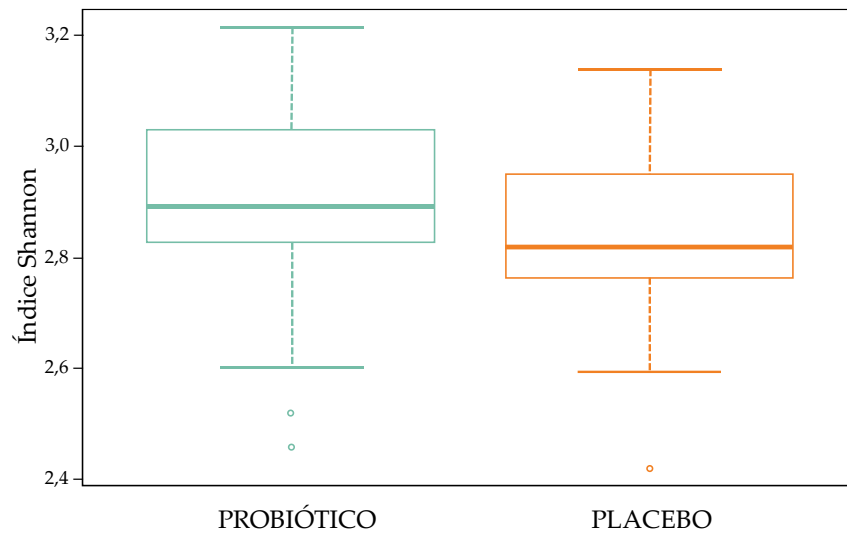
Se compararon los resultados por grupo de tratamiento, probiótico o placebo, para poder analizar si ambos eran comparables y no se encontraron diferencias significativas en ningún grupo bacteriano al inicio del estudio clínico. Como puede observarse en el PCA de la Figura 35, la distribución de ambos grupos era prácticamente solapante.

Figura 35. Distribución de las muestras de microbiota intestinal de los pacientes de los grupos placebo y probiótico al inicio del estudio.



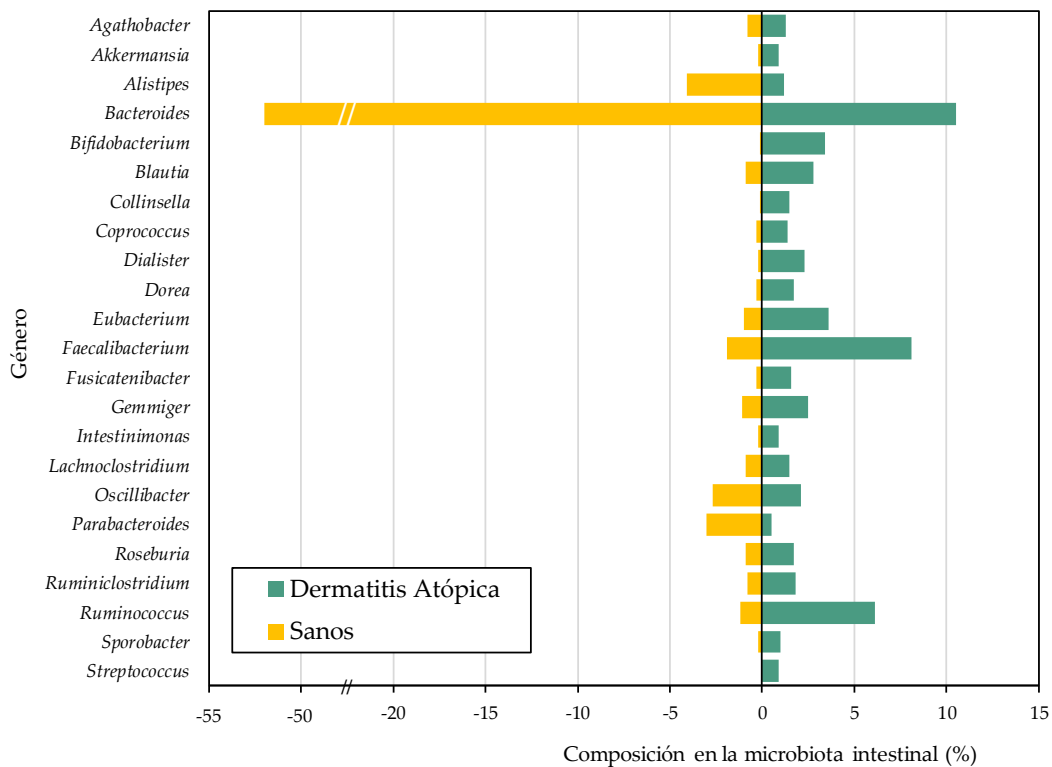
Así mismo, se estudió la variabilidad a nivel de género en ambos grupos, probiótico y placebo, a través del índice de Shannon, que da una idea de la biodiversidad existente en la muestra (Figura 36). La diversidad del grupo probiótico [2,89 (2,83 a 3,02)] parece ser un poco más elevada que la del grupo placebo [2,82 (2,76 a 2,95)], pero sin diferencias significativas. Por lo tanto, no hubo diferencias entre los dos grupos de tratamiento y eran homogéneos también a nivel de biodiversidad de la microbiota intestinal.

Figura 36. Biodiversidad a nivel de género en ambos grupos de tratamiento al inicio del estudio clínico.



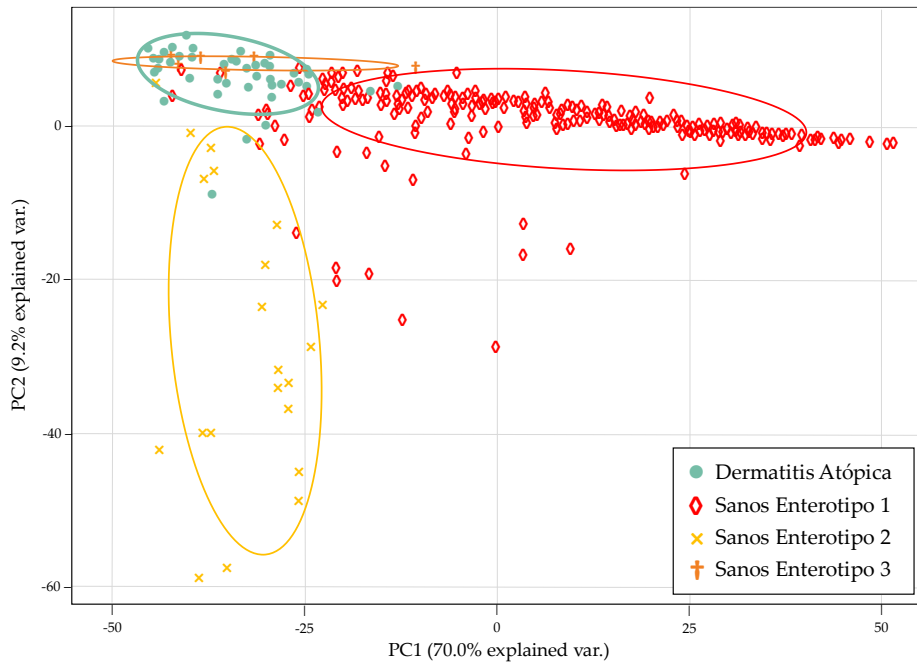
Además, la composición de todos los pacientes incluidos se comparó con datos de población sana previamente publicados del estudio MetaHit, a fin de identificar diferencias entre pacientes sanos y con DA. En la Figura 37 se muestran los géneros en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones.

Figura 37. Diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre los pacientes con DA y la población sana.



La diferencia más significativa entre ambas poblaciones radica en el género *Bacteroides*, cuyo porcentaje asciende a más del 50 % en población sana, mientras que en los pacientes con DA está claramente disminuido (10,74 %). Los géneros *Faecalibacterium* y *Ruminococcus* están ambos aumentados en los pacientes con DA frente a los pacientes sanos. Este aumento del género *Ruminococcus* parece indicar que los pacientes con DA presentan una microbiota intestinal con una composición más similar al enterotipo 3, en el que este género es el principal, tal y como puede observarse en el PCA de la Figura 38, en el que se muestra la distribución de los pacientes con DA y los pacientes sanos pertenecientes a los tres enterotipos.

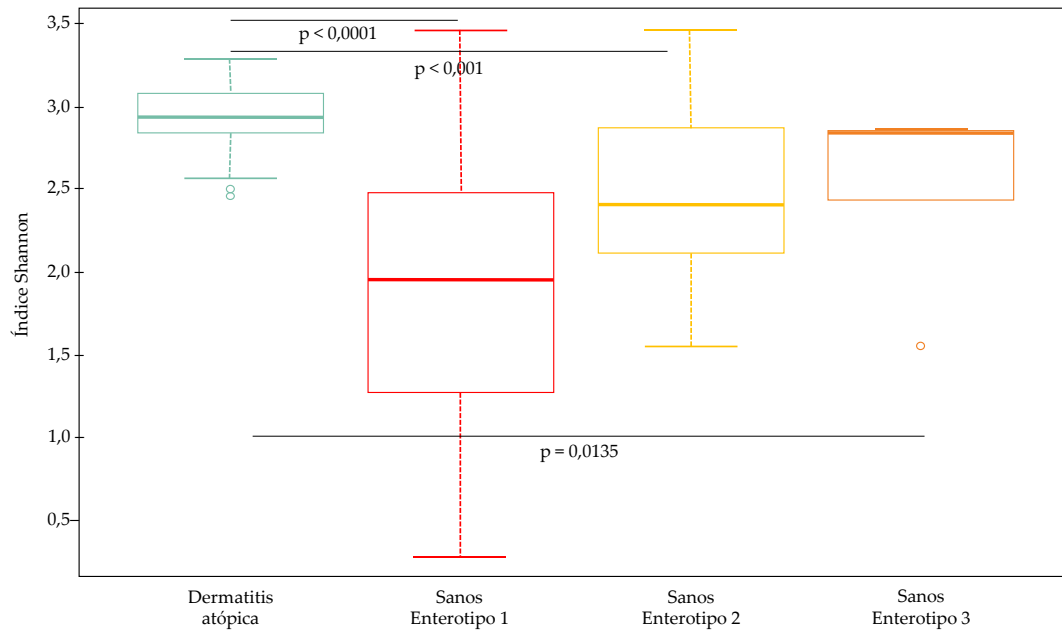
Figura 38. Distribución de las muestras de microbiota intestinal de los pacientes con DA y la población sana.



Los pacientes con DA están distribuidos principalmente cerca del enterotipo 1 y 3, y muy alejados del enterotipo 2, formando prácticamente un grupo separado, aunque solapando en algunas circunstancias con los individuos de la población sana.

Si analizamos la biodiversidad bacteriana de los pacientes con DA y la de los individuos sanos de los tres enterotipos, podemos observar mayor variabilidad en los pacientes con DA, con una mediana y rango intercuartílico de 2,93 (2,84 a 3,06) frente a 1,94 (1,27 a 2,46), 2,40 (2,11 a 2,86) y 2,83 (2,42 a 2,84) que se obtuvieron en los individuos sanos con enterotipos 1, 2 y 3, respectivamente (Figura 39). Esta diferencia fue estadísticamente significativa al comparar el grupo con DA frente a los enterotipos 1 y 2 de la población sana ($p < 0,001$, para ambos análisis). En este caso, y al igual que ocurre con el PCA (Figura 38), la biodiversidad de los pacientes con DA se asemeja más a la de los individuos sanos pertenecientes al enterotipo 3 y, en general, tienen una mayor variabilidad.

Figura 39. Biodiversidad a nivel de género de los pacientes con DA e individuos sanos de los tres enterotipos.



Además, se estudió a qué enterotipo pertenecían los pacientes con DA incluidos en el estudio. Como se recoge en la Tabla 28, los enterotipos 1 y 3 fueron los mayoritarios en ambos grupos (57,14 % y 38,10 % en el grupo probiótico, y 45,45 % y 50 % en el grupo placebo, respectivamente), sin apenas presencia de enterotipo 2.

Tras la intervención y la ingesta del tratamiento, se observaron también pocos casos clasificados como enterotipo 2, con *Prevotella* como género principal. Parte de los pacientes pertenecientes al enterotipo 1 al inicio del estudio, migraron hacia el enterotipo 3 al final del estudio clínico, en una proporción muy similar en ambos grupos. El efecto contrario se observó en el caso de los pacientes clasificados como enterotipo 3 al inicio del estudio clínico (Tabla 28).

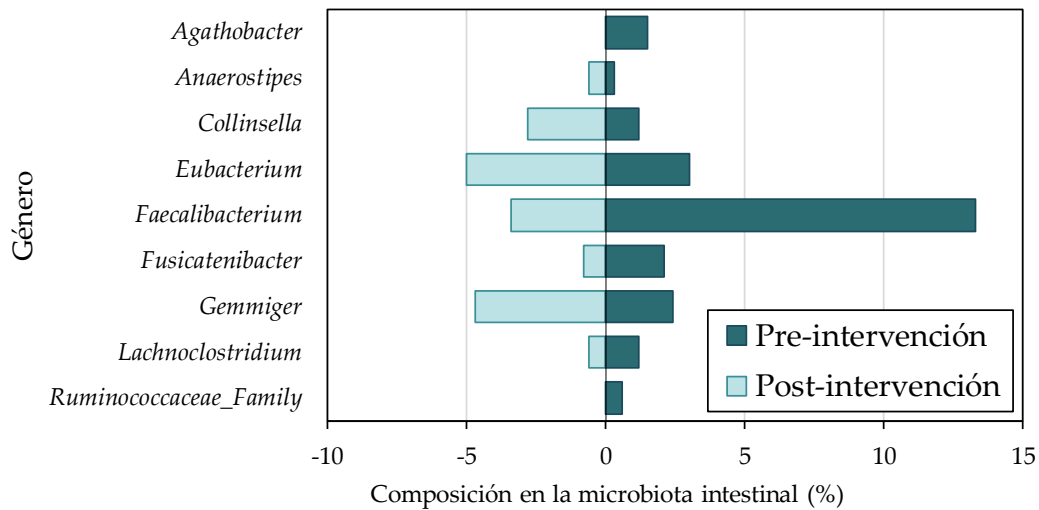
Tabla 28. Distribución de los enterotipos en ambos grupos de tratamiento al inicio y al final del estudio.

Inicio (Semana 0)	Grupo	N (%)	Final (Semana 12)			P
			Enterotipo 1	Enterotipo 2	Enterotipo 3	
Enterotipo 1	Probiótico	12 (57,14)	7 (58,33)	1 (8,33)	4 (33,33)	0,981
	Placebo	10 (45,45)	6 (60,00)	1 (10)	3 (30,00)	
Enterotipo 2	Probiótico	1 (4,76)	0	0	1 (100,00)	NA
	Placebo	1 (4,55)	0	0	1 (100,00)	
Enterotipo 3	Probiótico	8 (38,10)	2 (25,00)	0	6 (75,00)	0,377
	Placebo	11 (50)	5 (45,45)	1 (9,09)	5 (45,45)	

Al analizar qué ocurre con la composición de la microbiota intestinal en ambos grupos al final del periodo de intervención, observamos que el grupo placebo se mantuvo sin grandes cambios, sólo con pequeños cambios significativos en géneros con un porcentaje bajo, como *Agathobacter*, *Collinsella* o *Lachnoclostridium*.

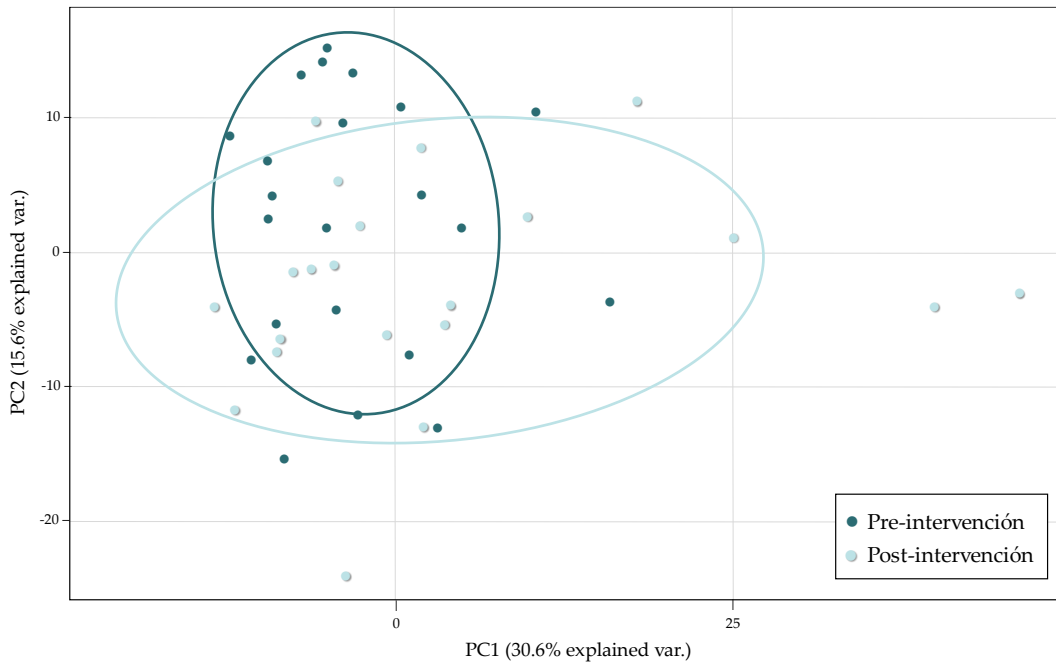
Por su parte, el grupo probiótico si presentó más cambios (Figura 40), siendo el más notorio la disminución del género *Faecalibacterium*, que se reduce hasta un 3,75 %. Además, los géneros *Eubacterium* y *Gemmiger* aumentan su presencia hasta casi un 5 %. También aumenta el género *Collinsella*. En la Figura 40 se muestran los géneros en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 40. Diferencias en la composición de la microbiota intestinal en los pacientes del grupo probiótico al inicio y el final del estudio.



El PCA de la Figura 41 muestra la distribución de los pacientes del grupo probiótico al inicio y al final del periodo de intervención. El gráfico parece indicar que la composición de la microbiota intestinal se diversifica tras la ingesta de la mezcla probiótica.

Figura 41. Distribución de las muestras de microbiota intestinal de los pacientes del grupo probiótico al inicio y al final del estudio.



En cuanto a la biodiversidad de ambos grupos de tratamiento, permanece sin cambios significativos, aunque se ve ligeramente reducida en ambos casos.

Para terminar, destacamos el comportamiento de 3 géneros bacterianos, ya que este es opuesto en ambos grupos. Se trata de *Eubacterium* e *Intestinimonas* que aumentan en el grupo probiótico, pero disminuyen en placebo; y *Fusicatenibacter* que se comporta de manera contraria, aumenta en el grupo placebo y disminuye en el que toma probiótico.

4.9 SEGURIDAD

A fin de evaluar si el preparado probiótico a estudio era seguro y no tenía efectos secundarios, se solicitó a los pacientes que registrasen, en el cuaderno aportado, todos aquellos acontecimientos adversos que se dieran durante el estudio, estuvieran o no relacionados con la ingesta del tratamiento (probiótico o placebo).

En total se recogieron en el estudio 149 eventos adversos, 65 en el grupo tratado con el probiótico y 84 en el grupo que recibió placebo. En ambos grupos, la mayoría de los eventos fueron calificados como leves (69,13 %). Los acontecimientos adversos moderados fueron más frecuentes en el grupo placebo, observándose 21 (25 %) frente a 16 (24,62 %) con probiótico. Fueron calificados como graves 6 acontecimientos adversos, 5 en el grupo del probiótico y 1 en el grupo placebo. Todos estos datos se recogen en la Tabla 29.

Tabla 29. Acontecimientos adversos clasificados por nivel de gravedad en cada grupo de intervención.

	Probiótico		Placebo		Total	
	N	%	N	%	N	%
Leve	42	64,62	61	72,62	103	69,13
Moderada	16	24,62	21	25,00	37	24,83
Grave	5	7,69	1	1,19	6	4,03
No definido	2	3,08	1	1,19	3	2,01
Total	65	100,00	84	100,00	149	100,00

Se estudió la causalidad de los distintos acontecimientos adversos, observándose en la mayoría de los eventos de los dos grupos una calificación de “no relacionado”, y sólo algunos como “posible”, y en la misma proporción en ambos grupos (Tabla 30). Todos los acontecimientos adversos clasificados como “graves”, resultaron no relacionados con el probiótico según criterio de los investigadores y de los propios progenitores de los pacientes.

Tabla 30. Acontecimientos adversos clasificados según causalidad con el tratamiento en cada grupo de intervención.

	Probiótico		Placebo		Total	
	N	%	N	%	N	%
No relacionado	61	93,85	78	92,86	139	93,29
Posible	4	6,15	6	7,14	10	6,71

Total	65	100,00	84	100,00	149	100,00
--------------	----	--------	----	--------	-----	--------

Los acontecimientos calificados como posibles estaban relacionados con molestias digestivas y en todos ellos desaparecieron a lo largo de las semanas de ingesta del producto.

Si analizamos los acontecimientos adversos según su naturaleza, encontramos que los más numerosos corresponden a dolores menores, cuadros gripales, infecciones bacterianas y molestias digestivas. En la Tabla 31 se recoge el número de acontecimientos adversos según su tipo en cada grupo de tratamiento, ordenados alfabéticamente.

Tabla 31. Acontecimientos adversos registrados durante el estudio en cada grupo de intervención.

	Probiótico	Placebo	Total
Amigdalitis	3	9	12
Asma		6	6
Broncoespasmo	1		1
Bronquitis		1	1
Caspa		1	1
Cefalea	10	10	20
Congestión nasal		3	3
Diarrea con fiebre	2		2
Diarrea y dolor de cabeza		1	1
Diarrea/deposiciones blandas	1	2	3
Dolor de garganta	2	4	6
Dolor de oído		1	1
Dolor estómago/meteorismo	2	8	10
Dolor menstrual	7	1	8
Eczema numular	1		1
Esguince tobillo		1	1
Falta apetito/Saciedad	2	1	3
Faringitis y fiebre	1		1

Fiebre	3	1	4
Gripe	2	9	11
Heces oscuras		1	1
Herida con puntos	1		1
Impétigo	1		1
Infección	1		1
Irritación ocular	1	1	2
Lombrices	1	1	2
Malestar general/cansancio		7	7
Mayor sensación de hambre y meteorismo		1	1
Menstruación persistente	1		1
Migraña	4		4
Mucosidad y tos	7	4	11
Otitis		1	1
Picadura de mosquito	1		1
Picor de cabeza		1	1
Reacción alérgica		2	2
Resfriado	6	4	10
Tos	1		1
Vómitos	2	1	3
Vómitos y diarrea		1	1
Vómitos y fiebre	1		1
Total	65	84	149

4.10 CUMPLIMIENTO TERAPÉUTICO

Para poder evaluar si los resultados se debían a la ingesta del probiótico, se analizó la tasa de cumplimiento terapéutico en ambos grupos, y en el total de los pacientes, a partir de las cápsulas sobrantes aportadas por los pacientes y los días totales de seguimiento (Tabla 32).

Tabla 32. Porcentaje de cumplimiento en cada grupo de intervención.

	Media \pm DE (%)
Placebo	92,62 \pm 7,22
Probiótico	89,99 \pm 8,94
Total	91,28 \pm 8,96

Casi la totalidad de los pacientes (96 %) superó el 80 % de cumplimiento, lo que indica una buena adherencia al tratamiento. El menor porcentaje de cumplimiento observado fue de 66,6 % y corresponde a un paciente del grupo de probiótico. Este bajo cumplimiento no se relacionó con el tratamiento, y tanto el paciente como sus progenitores refirieron que se debió a motivos personales y olvidos puntuales.

Si relacionamos el cambio en la severidad de la DA con el cumplimiento terapéutico, cabe destacar que el paciente del grupo probiótico con menor tasa de cumplimiento durante el último mes (53,3 %) finalizó el estudio con puntuaciones de SCORAD más altas que el resto del grupo y, por tanto, con una reducción menor (36,5 %). Es decir, el paciente con peor tasa de cumplimiento del grupo es el que mostró una menor mejora de la sintomatología.

4.11 PERIODO DE SEGUIMIENTO POST-TRATAMIENTO

Después de las 12 semanas de tratamiento, se llevó a cabo un seguimiento de todos los pacientes durante los tres meses posteriores, aunque no estaba recogido previamente en el protocolo del estudio. En los meses 1, 2 y 3 post-tratamiento se recogió, de nuevo, los brotes de DA y el uso de corticosteroides tópicos en los pacientes de ambos grupos.

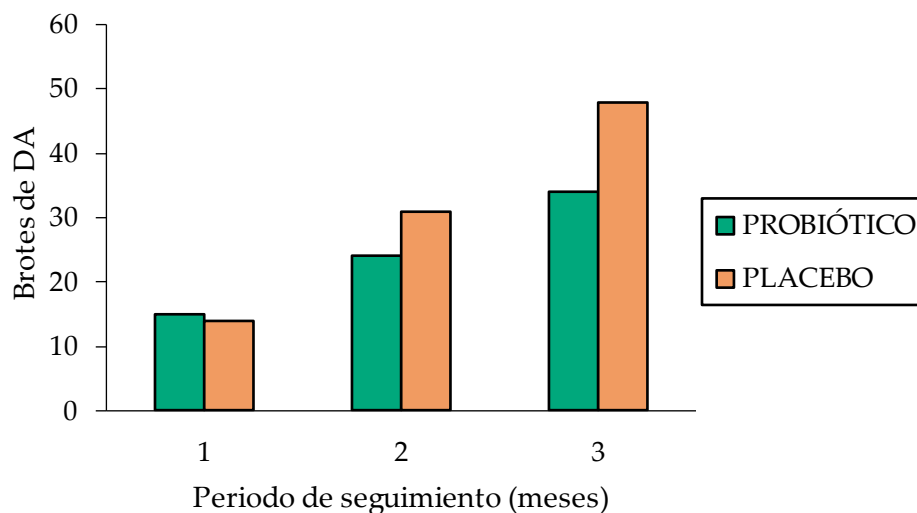
Se contabilizó el número de pacientes que presentaba un brote de DA después de finalizar el periodo de tratamiento y si aparecía durante el primer, segundo o tercer mes después de finalizar el estudio.

En el primer mes post-tratamiento, un total de 12 (52 %) y 12 (50 %) pacientes en el grupo probiótico y placebo, respectivamente, presentaron un nuevo brote de

DA ($p = 0,88$). En el segundo mes, el número ascendió a 13 (57 %) en el grupo probiótico y 16 (67 %) en el placebo, cifra que se mantuvo durante el tercer mes, no identificándose diferencias entre grupos ($p = 0,47$).

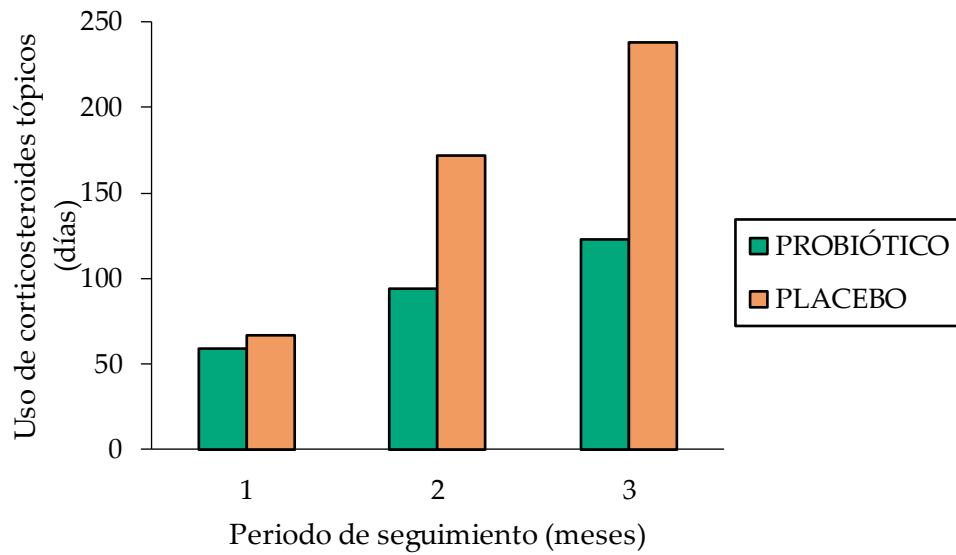
Al analizar por otro lado el número total de brotes de DA en cada grupo de tratamiento, podemos observar como éste es menor en el grupo probiótico que en el placebo, pero sin diferencia estadísticamente significativa, al finalizar los tres meses del periodo de seguimiento (34 vs. 48 en probiótico y placebo, respectivamente; $p = 0,765$; Figura 42).

Figura 42. Brotes de DA en el periodo de seguimiento post-tratamiento.



Se analizó también el uso de corticosteroides tópicos utilizados en los brotes de DA, durante los tres meses de seguimiento, a fin de identificar posibles diferencias entre grupos. Al igual que ocurre con el número de brotes, el número de días de uso de corticosteroides tópicos es menor en el grupo probiótico (123 días) que en el placebo (238 días), sin alcanzar la significación estadística ($p = 0,600$; Figura 43).

Figura 43. Días de uso de corticosteroides tópicos en el periodo de seguimiento post-tratamiento.



V - DISCUSIÓN

V – DISCUSIÓN

En este apartado se analizan los resultados obtenidos comparándolos con estudios publicados anteriormente, se reflexiona sobre sus puntos fuertes y sus limitaciones, así como se valora si se han cumplido los objetivos y contrastado las hipótesis formuladas al inicio. Todo ello, llevará a la formulación de las conclusiones y al establecimiento de las futuras líneas de investigación.

Uno de los problemas planteados en la “Introducción” que justificaron la realización de este trabajo, es la existencia de la necesidad de tratamientos para la DA con eficacia elevada y con bajo índice de aparición de efectos adversos. Este tratamiento podría estar basado en cepas probióticas, producto analizado en varios estudios clínicos importantes en los que se ha valorado su eficacia en la prevención y tratamiento de la DA. En general, los resultados publicados sugieren que algunas cepas probióticas pueden ser una opción para incrementar los porcentajes de mejora de la DA moderada en niños y adultos. Sin embargo, hasta el momento, no existe evidencia experimental sólida que respalde su eficacia en la práctica clínica. Por tanto, hay una gran necesidad de ensayos clínicos que demuestren los efectos específicos de estas cepas probióticas, de manera que puedan utilizarse como tratamiento coadyuvante en la DA.

5.1 OBJETIVO PRIMARIO

El estudio clínico aquí descrito examina el efecto de una mezcla de probióticos en pacientes con DA moderada. En este trabajo de tesis doctoral se pretendía evaluar el porcentaje de días en que se utilizaron corticosteroides tópicos durante los brotes de DA, en las 12 semanas de tratamiento con probiótico o placebo, así como el consumo de antihistamínicos. Por otro lado, y también como objetivo principal, se estudió la evolución en el índice SCORAD a las 4, 8 y 12 semanas de tratamiento, en comparación con los valores de la visita en la que se inicia el tratamiento.

Nuestros resultados sugieren que la administración de esta mezcla de probióticos como tratamiento coadyuvante puede ser efectiva para reducir la puntuación del índice SCORAD y, consecuentemente, reducir el uso de corticosteroides durante los brotes de DA.

Se detectaron diferencias significativas en la tasa de respuesta cuando se comparó la reducción del índice SCORAD basal entre los grupos. El grupo probiótico presentó una reducción del índice SCORAD muy elevada, mientras que en el grupo placebo esta reducción fue mucho menor (77,1% y 22,70%, respectivamente).

La respuesta clínica documentada en este estudio en el grupo del probiótico fue mayor que la obtenida con otros probióticos evaluados en estudios clínicos notificados previamente y controlados con placebo. La justificación de las mayores tasas de reducción obtenidas en el presente estudio clínico viene dada por cuatro factores fundamentales que podrían influir en la respuesta y que se tomaron en cuenta en el diseño del estudio: (I) la duración del periodo de intervención, (II) la composición del preparado probiótico, (III) la edad de los pacientes y (IV) la gravedad de la DA.

Cuando analizamos el diseño de los estudios previos, observamos que algunos autores han seguido protocolos de intervención de 8 semanas, en contraposición a este estudio, cuyo diseño incluye una ingesta del tratamiento probiótico de 12 semanas. Un tiempo más reducido podría no ser suficiente para valorar el efecto completo del probiótico. (183-186) Hay que destacar el trabajo de Yang *et al.*, (187) donde el tiempo de tratamiento fue de solo 6 semanas, tras las que no se encontraron diferencias en los parámetros analizados.

En cuanto a la edad, parece que los pacientes mayores de 1 año tienen mejor respuesta frente a los probióticos, ya que en los recién nacidos la microbiota no es estable y está muy influida por el tipo de nacimiento y la dieta administrada. (121, 126) Estudios con pacientes por debajo de esa edad obtienen resultados peores. (184, 188, 189)

Respecto a la gravedad de la enfermedad, los resultados obtenidos hasta la fecha muestran que los pacientes con DA moderada a grave alcanzan también mejores respuestas que aquellos con menor gravedad, como es descrito por Kim *et al.* (135) en un metaanálisis sobre estudios con probióticos en DA.

El último factor es el que concierne al tratamiento probiótico, ya que una mezcla de cepas probióticas tiene efectos más beneficiosos que un solo probiótico, especialmente cuando se incluyen lactobacilos y bifidobacterias en dicha mezcla. (147, 184) Otros estudios publicados donde se ha utilizado únicamente una sola cepa obtuvieron resultados por debajo de los aquí expuestos. (190-192) En el caso del estudio realizado por Iemoli *et al.* (193) se utilizaron dos cepas probióticas, alcanzando un 63 % de reducción en el índice SCORAD. Se desconoce todavía si esto ocurre debido a efectos aditivos y/o sinérgicos o a que, en combinación, el tratamiento contiene mayores cantidades de cepas probióticas. (194) Teniendo en cuenta todo lo anterior, así como la información descrita en la "Introducción" de esta tesis sobre la búsqueda bibliográfica realizada al inicio del proyecto, se seleccionó la mezcla final utilizada en el estudio.

Si analizamos los datos de eficacia del estudio y, en concreto, los factores constituyentes del SCORAD, dos de sus tres subcomponentes (extensión e intensidad del eczema) mostraron una clara mejoría a favor del grupo probiótico en comparación con el grupo placebo.

La extensión es la variable del SCORAD que más se reduce en el grupo probiótico y, por tanto, donde parece que el preparado probiótico ha mostrado una mayor eficacia. Con el uso del tratamiento, se producen menos lesiones de DA y estas se extienden en una superficie corporal menor. Por su parte, la reducción en la intensidad muestra una clara relación con la mejora de la sintomatología de la DA, así como del estado de la piel en general, ya que, además, contempla la sequedad. El probiótico es eficaz en el control de la intensidad de la lesión, para lo que no fueron eficaces los tratamientos habituales, es decir, los corticosteroides, en el grupo placebo.

Por contraste, el último componente del índice SCORAD, los síntomas subjetivos, no alcanzó la significación estadística entre los grupos, ya que ambos redujeron este valor en un porcentaje similar. Este resultado no se debió a la falta de efecto en el grupo del probiótico, sino más bien a que también hubo una reducción importante en el grupo placebo, mayor que la observada en los otros dos componentes del SCORAD. Una posible explicación es que el grupo placebo fue capaz de reducir síntomas como el prurito con la utilización del tratamiento habitual, que parece ser eficaz en el control de los mismos. Además, cabe

mencionar el posible efecto placebo, ya que se trata del único componente del SCORAD que muestra la subjetividad del paciente. Aun así, la falta de potencia es la causa más probable ya que este estudio no fue diseñado para evaluar los subcomponentes SCORAD individualmente, sino en conjunto.

Por último, se realizó el análisis del valor del índice SCORAD por separado según las variables de aleatorización establecidas en el protocolo: sexo, edad de los pacientes y edad de inicio de la DA, no mostrando diferencias en ninguna de ellas. Podemos concluir que el efecto del probiótico sobre el SCORAD no depende de estas variables, ya que funciona en todos estos grupos de una manera muy similar.

En lo relacionado con el otro objetivo principal, el uso de corticoide para el tratamiento de la DA, encontramos un menor uso en el grupo probiótico. Es lógico pensar que, si se reducen las lesiones, lo que ocurre cuando se reduce el valor del índice SCORAD, el paciente necesitará utilizar menor cantidad de corticoides. Esto se puede apreciar, en mayor medida, desde que comienza la segunda mitad del estudio, alrededor de la semana 6 de intervención, donde las diferencias entre los grupos probiótico y placebo se hacen evidentes. La justificación para este cambio podría ser que, a partir de esa semana, ocurriría el establecimiento total del probiótico en la microbiota intestinal y, por consiguiente, la modificación de la diversidad y composición de la misma.

No es posible encontrar otros estudios donde los autores describan una disminución del uso de corticosteroides tópicos tras el uso de un preparado probiótico. No es una variable que se registre frecuentemente y, en los casos donde se recoge, los resultados no son significativos. (147, 190) En el trabajo de Gerasimov *et al.* (195) tampoco se encontraron diferencias en el uso de corticoides, pero sí en la cantidad utilizada en gramos, variable no recogida en este estudio clínico.

5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

El segundo índice de gravedad de la enfermedad evaluado durante el estudio clínico fue la ICG. Basándonos en las categorías presentes en este índice, se estableció, por protocolo, un valor inferior a 2 puntos, al finalizar el periodo de intervención, como indicador de éxito terapéutico. En este caso, al igual que ocurrió con el índice SCORAD, se obtuvieron mejores resultados en el grupo probiótico al comparar los datos con los del grupo placebo. De hecho, en el grupo probiótico,

una gran parte de los pacientes finalizaron con puntuaciones de 0 ó 1, correspondientes a las categorías de “limpio” y “prácticamente limpio” respectivamente, al contrario de lo acontecido en la mayoría de los pacientes del grupo placebo, donde ningún paciente alcanzó el valor 0.

No se han encontrado otros estudios clínicos aleatorizados con probióticos en los que se utilice esta escala, de ahí que no podamos comparar resultados de nuestro estudio con trabajos previos. En todo caso, el porcentaje de éxito documentado mediante el índice SCORAD es, desde el punto de vista clínico y estadístico, relevante a favor del grupo tratado con probióticos. Lo esperable, por tanto, es que de haberse evaluado la ICG en otros estudios anteriores, la respuesta hubiera sido similar a la evaluada mediante el índice SCORAD, tal y como ocurrió en este trabajo.

En cuanto al número de brotes de DA totales acontecidos durante el desarrollo del estudio, este fue menor en el grupo probiótico que en el grupo placebo. Esto nos indica que se ha producido un control y manejo de la DA correcto y más consistente en el grupo probiótico y, en consecuencia, una menor aparición de lesiones y/o de menor extensión e intensidad.

Por otro lado, también fue menor la necesidad de corticosteroides orales para el control de los síntomas de los pacientes del grupo probiótico, ya que se produjeron menos casos en los que los pacientes no respondieron al protocolo terapéutico del estudio. Siguiendo la argumentación descrita anteriormente, ante una disminución en el número de brotes, disminuyen las lesiones y la gravedad de las mismas y, por ende, fueron necesarios un menor número de fármacos para su control. De esta manera, reduciendo el uso de corticoides orales, se evita la aparición de los efectos adversos asociados a este tratamiento, como sucedió en el presente estudio.

Sin embargo, el uso de antihistamínicos fue mayor en el grupo probiótico y, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, es un dato a analizar. En este caso, probablemente estemos ante un sesgo provocado por patologías concomitantes de los pacientes y un inadecuado control clínico de la variable, ya que no ha podido registrarse el uso debido a dichas patologías, como asma y/o alergias, muy prevalentes en estos pacientes. Como consecuencia de ello, el análisis de los resultados de la variable “uso de antihistamínicos” debe valorarse

dentro de este complejo contexto de comorbilidad y uso frecuente de dichos medicamentos en estas patologías.

Si hablamos de parámetros analíticos e inflamación, tras las 12 semanas de intervención, constatamos una reducción ligeramente mayor de IL-4, IL-5 e IL-13 en el grupo del probiótico, en comparación con el grupo placebo, que no alcanzó la significación estadística. Esto podría ser indicador de una menor actividad de los linfocitos T colaboradores de tipo 2 y un equilibrio más positivo del balance Th1/Th2 en el grupo del probiótico. La IL-10 se mantuvo sin cambios destacables en ninguno de los grupos, al igual que los valores de IgE y de eosinófilos. De manera similar a lo ocurrido en los síntomas subjetivos, subcomponente del SCORAD, la falta de potencia y un estudio no diseñado específicamente para ello, podrían ser también las razones por las cuales ninguna de las IL ni otros biomarcadores como IgE o eosinófilos, alcanzaron diferencias estadísticas entre los grupos de estudio. Otra razón para explicar la falta de significación estadística podría ser que los pacientes incluidos en el estudio sufrían de DA leve a moderada y no grave, situación en la que la literatura científica describe una mayor elevación de estos parámetros.

Para concluir con lo que respecta al análisis efectuado en la muestra de sangre de los pacientes, no se detectaron signos de inflamación en los mismos, no encontrándose diferencias en los parámetros de proteína C reactiva ni presencia de translocación bacteriana.

En la composición de la microbiota destacamos los niveles elevados de *Faecalibacterium* encontrados en los pacientes al inicio del estudio, al igual que describen otros autores. (196, 197) Sin embargo, estos niveles son contrarios a lo que se ha descrito previamente en otras patologías en las que se piensa que la microbiota intestinal puede estar involucrada. Este género es conocido por ser productor de ácidos grasos de cadena corta, butirato y propionato principalmente, lo que *a priori*, y según las investigaciones realizadas hasta el momento, es positivo para el individuo. Sin embargo, se han encontrado subespecies y cepas concretas de una especie de este género bacteriano como es *Faecalibacterium prausnitzii*, que sintetizan menores cantidades de butirato. (198) Estudios recientes describen dos filogrupos diferentes de esta especie con distintos efectos sobre la inflamación. (199) El epitelio inflamado y la disfunción de la barrera intestinal, característicos de

la DA, producen la liberación de determinados nutrientes que estimulan el crecimiento de estas subespecies. Con estas cepas prevaleciendo dentro del género, ocurriría una menor producción de ácidos grasos, lo que aumentaría aún más la inflamación del epitelio intestinal e iniciaría la respuesta mediada Th2, favoreciendo el desbalance que ocurre en la DA. (196) Posteriormente, se produciría la liberación de citocinas proinflamatorias y de IgE, de forma que la DA empeoraría o se establecería por completo.

Durante el estudio de intervención y tras completar las 12 semanas de tratamiento probiótico, encontramos que se produce una normalización de la microbiota en este grupo, entendida como una mayor similitud, a nivel de género, con la descrita en la población sana. (174) El preparado probiótico ha conseguido una corrección de la disbiosis, derivada de la pérdida de organismos beneficiosos y el excesivo crecimiento de organismo potencialmente patógenos. (200) Respecto a la biodiversidad, está aumentada en los pacientes con DA, al contrario de lo ocurre cuando hay una disbiosis, que suele haber una pérdida. Por consiguiente, en esta patología el probiótico sería responsable, principalmente, de la normalización de la disbiosis intestinal y, con ello, aparecería la mejora de los síntomas y signos de la DA.

Analizando los resultados obtenidos en la microbiota intestinal y relacionándolos con los de ambos objetivos primarios, podríamos suponer que el cambio más importante en ella se produce alrededor de las 4 a 6 semanas de ingesta del probiótico. Futuras investigaciones se centrarían en comprobar la duración de este cambio y su mantenimiento en el tiempo con tratamiento continuado.

Aunque el número de acontecimientos adversos registrados es elevado, es habitual tratándose de población infantil, donde son comunes los dolores menores, cuadros gripales e infecciones bacterianas, así como caídas y lesiones musculares y óseas.

Los acontecimientos adversos valorados como atribuibles al tratamiento fueron categorizados dentro de la categoría de leves y se describen como pequeñas molestias a nivel digestivo. Todos ellos desaparecieron a lo largo de las semanas de ingesta del producto. Se atribuyen a la adaptación al tratamiento, tanto a las cepas probióticas como al excipiente, ya que el grupo placebo también los sufrió, incluso en mayor número.

Una vez revisados todos los acontecimientos adversos acaecidos durante el tiempo de estudio, se confirma que se trata de un tratamiento seguro con ausencia de efectos adversos importantes. Nuestros resultados concuerdan con las catalogaciones recibidas por los probióticos de QPS y GRAS, a las que se ha hecho referencia en el apartado de "Introducción: Probióticos como tratamiento".

Sobre el cumplimiento terapéutico y la adhesión al tratamiento, podemos afirmar que fue muy positiva en ambos grupos del estudio, lo que nos indica que se trata de un tratamiento cómodo, por el hecho de administrarse en una sola toma diaria, con muy pocos efectos secundarios y formulado con una buena dosificación en cápsulas de fácil deglución. A su vez, demuestra confianza en el producto y en su eficacia.

5.3 FORTALEZAS

Esta investigación cuenta con un diseño cuidadoso y un procedimiento realizado siguiendo fielmente el protocolo propuesto, lo que le otorga una gran validez al estudio clínico que se discute en este apartado.

Una vez analizados los resultados, podemos concluir que se trata de resultados válidos, ya que se confirman las hipótesis planteadas: existe una relación entre la microbiota intestinal y la DA. Esto se confirma mediante los datos obtenidos en el análisis de la composición de la microbiota de los pacientes de este estudio clínico, mostrando diferencias con respecto a la población sana y entre ambos grupos de intervención al finalizar el tratamiento.

El seguimiento de los pacientes se realizó correctamente, de manera que 47 pacientes de 50 realizaron todas las visitas del estudio. Esto nos permite obtener gran cantidad de datos con un tamaño muestral considerable, ya que está incluida en el análisis la muestra inicial casi al completo.

Variables, tales como uso de antibióticos, dieta y otras enfermedades alérgicas concomitantes, fueron controladas para evitar sesgos, registrándose en todos los casos incluidos. Los instrumentos y test utilizados están debidamente validados, por lo que el método aplicado es correcto. El cumplimiento de los pacientes es excelente, lo que permite afirmar que los resultados obtenidos se deben a la utilización del producto. Además, todos los pacientes incluidos en el análisis

siguieron el protocolo sin desviaciones. Por tales motivos y como conclusión, podemos definir el estudio aquí presentado como fiable y con gran validez interna.

5.4 LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Las limitaciones de un estudio clínico deben tenerse siempre en cuenta y se deben aclarar mediante nuevas investigaciones adicionales que incluyan la misma combinación probiótica. Entre las limitaciones encontradas en el estudio, destacamos la dieta. El contexto en el que se ha desarrollado este estudio clínico es el de una dieta principalmente mediterránea y, dada la influencia de los alimentos en la microbiota intestinal, la aplicabilidad de los resultados en otras regiones geográficas, que siguen una dieta diferente, podría verse afectada.

La población del estudio se definió a partir de una búsqueda bibliográfica sobre la DA y su relación con los probióticos. Finalmente, se decidió que el intervalo de edad fuera entre los 4 y los 17 años, ya que se considera que hasta los 3 años la microbiota no se estabiliza por completo y es entonces cuando se acerca más a la del adulto. (123, 124) La gravedad de la DA incluida en el estudio se estableció según los tratamientos habituales utilizados en cada nivel; los pacientes con una patología severa necesitan tratamientos más potentes y que influirían en el transcurso del estudio. Es por ello por lo que los resultados son aplicables a una población con DA leve-moderada y de rango de edad entre 4 y 17 años. Para poder hacer extensibles estos resultados a otros grupos de población, como a adultos de más de 17 años, niños menores de 3 años e incluso a recién nacidos (menores de un año), son necesarios nuevos estudios que incluyan esta población.

De manera semejante, el periodo de seguimiento, 12 semanas, y el hecho de que solo haya participado un centro en la inclusión se consideran delimitaciones que necesitan de estudios multicéntricos posteriores y con mayor tiempo de seguimiento para confirmar la eficacia y aportar nuevos datos acerca de los probióticos.

La validez externa y aplicabilidad del estudio es, por tanto, limitada y necesita de futuras investigaciones y estudios clínicos que apliquen estos hallazgos en otros contextos y poblaciones.

Para finalizar, respecto al tratamiento, se debe responder a las preguntas sobre la dosis adecuada, la duración de la administración probiótica y la edad en que el uso de probióticos sería más eficaz. Serán necesarios estudios futuros y deben considerarse todas estas preguntas para evaluar tanto la mezcla probiótica usada en este estudio clínico como otras cepas probióticas específicas, y tal vez la asociación con otros tratamientos como los prebióticos y los simbióticos.

Por lo que se refiere a las dificultades encontradas en el procedimiento del estudio clínico, una de las principales limitaciones fue el difícil control del uso de corticosteroides tópicos. En la recogida de datos y entrevista con los pacientes y sus progenitores y/o tutores legales se detectaron usos erróneos de los corticoides, tanto por abuso como por defecto. En la visita de inclusión en el estudio, se trató de aleccionar a los padres, y a los pacientes más mayores que ya se encargaban del cuidado de su propia piel, del modo óptimo de utilización: dosis, aplicación, zonas y lesiones. No obstante, hubo que corregir este procedimiento en bastantes casos, y en algunos de ellos sin mucho éxito. Existe una corriente de padres muy reacios a utilizar derivados de la cortisona, ya que está muy extendido el conocimiento de sus efectos adversos, así como las pautas de retirada que se recomiendan al finalizar el tratamiento por vía oral. La retirada brusca de los corticoides orales puede causar la recurrencia de la enfermedad que originó su prescripción, síndrome de abstinencia o insuficiencia suprarrenal causada por la supresión del eje hipotalámico-hipofisario. (201) Como resultado, se ha despertado un miedo, en parte infundado, en algunos padres de pacientes con DA, lo que complica el control de esta variable. Por el contrario, nos encontramos con casos inversos en los que los padres llevan muchos años de tratamiento con sus hijos y, ante una buena respuesta, aplican corticoide a la mínima lesión cuando podría no ser necesario. Todo ello podría haber producido sesgos en las diferencias encontradas en el uso de corticoides en cada grupo, alterando los resultados finales. Asimismo, no se registró la dosis en gramos de corticoide tópico, únicamente el número de aplicaciones contabilizando días de uso. Nuevos estudios clínicos deberían incluir este dato como variable a estudio.

Otra limitación fue la extracción de la muestra de sangre. Se incluyeron niños desde 4 años, lo que supone que nos encontremos ante pacientes que no toleran bien este tipo de intervención, con capilares muy finos y que no permanecen inmóviles durante la extracción. En consecuencia, se obtuvieron muestras

coaguladas o en pequeña cantidad y que, en algunos casos, no fueron suficientes para todos los análisis. También se obtuvieron falsos resultados muy elevados debidos al estrés por el procedimiento o por no realizarse en ayunas, que se normalizaron al repetir la extracción.

5.5 RESUMEN DE LA DISCUSIÓN

En general, esta investigación ha contribuido a generar nuevos conocimientos sobre la DA y la posible implicación que tiene la microbiota intestinal en ella, así como a un mayor entendimiento y gestión del uso de probióticos en enfermedades de la piel, un tema poco tratado en ensayos clínicos.

El principal aporte de este proyecto de investigación es el desarrollo de un nuevo tratamiento para la DA. Se propone, en definitiva y como aplicación práctica, la inclusión de los probióticos, en concreto de las cepas que hayan demostrado eficacia clínica, en las guías de tratamiento de la DA.

De igual modo, se postulan recomendaciones de futuras investigaciones a realizar para conseguir la perpetuación de los probióticos como tratamiento válido, seguro y eficaz, tanto en la patología aquí expuesta como en numerosas otras patologías en las que estos podrían actuar de manera análoga.

VI – CONCLUSIONES

VI – CONCLUSIONES

Los resultados de nuestro estudio indican un fuerte efecto positivo sobre la reducción del índice SCORAD y el uso de corticoides tópicos en el grupo tratado con la mezcla de probióticos. Estas pruebas respaldan la eficacia de administrar el preparado probiótico a pacientes con DA moderada, e indican que podría utilizarse de forma más extensa en la práctica clínica.

A continuación, se exponen las conclusiones extraídas de los resultados obtenidos en este estudio.

1. Cumpliendo el objetivo principal del estudio de investigación, el tratamiento con el preparado probiótico de cepas seleccionadas reduce el índice SCORAD en pacientes con DA leve moderada tras una intervención de 12 semanas. Actúa sobre las tres variables del SCORAD mostrando mayor eficacia sobre la reducción de la extensión y la intensidad de las lesiones. Los síntomas subjetivos, prurito y pérdida de sueño, también se reducen, aunque en menor proporción, y sin diferencias con el grupo control. Durante la ingesta del probiótico, el índice SCORAD evoluciona hacia una mejora de la patología y, en ningún caso de los aquí presentados, experimentan un empeoramiento desde el valor inicial. Tanto el sexo como la edad no influyen en el efecto del probiótico en la reducción del SCORAD. Para terminar, un número considerable de pacientes redujo su SCORAD hasta un valor de 0, efecto apenas descrito en estudios clínicos previos con probióticos.
2. El preparado probiótico produce mejoras en la sintomatología de la DA, lo que se traduce en una menor necesidad de empleo de corticosteroides tópicos. El probiótico consigue este efecto sobre todo a partir de los 45 días de tratamiento, momento en el que el paciente con DA deja de utilizar corticoides o los utiliza en cantidades muy inferiores a las habituales.

3. La ICG, valorada por el especialista en Dermatología, disminuye tras el tratamiento. Esta reducción es considerada como éxito terapéutico, ya que prácticamente todos los pacientes del grupo probiótico alcanzan las puntuaciones más bajas de este índice, correspondiente con la ausencia de lesiones atópicas.
4. El tratamiento probiótico a estudio reduce la aparición de nuevos brotes y recaídas de DA. Este efecto se aprecia en los pacientes evaluados a partir de los 45 días de tratamiento, donde el paciente con DA deja de padecer nuevos brotes y se mantiene estable en cuanto a lesiones y manifestaciones de la enfermedad.
5. Las lesiones de la DA, así como su extensión e intensidad, se ven reducidas con el uso del preparado probiótico, por lo que también se reduce la necesidad de uso de otros tratamientos, entre ellos, los corticosteroides sistémicos orales.
6. Los parámetros analíticos, la bioquímica y el hemograma, de los pacientes con DA no se ven afectados por la ingesta del tratamiento probiótico. No se observan diferencias en ninguno de estos parámetros tras un periodo de seguimiento de 12 semanas.
7. Los niveles de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IgE y eosinófilos de una muestra de sangre periférica no sufren modificaciones significativas tras la ingesta del preparado probiótico. El entorno inmunológico de la DA, todavía no comprendido en su totalidad, podría ser causa de una autorregulación de estos parámetros en los casos menos graves de la enfermedad, como ocurre en los pacientes de este estudio.
8. Existe una microbiota intestinal específica de pacientes con DA en los que se observan los niveles de los géneros *Faecalibacterium* y *Ruminococcus* aumentados y el género *Bacteroides* disminuido, en comparación con la de

la población sana. Estas concentraciones concretas influyen en la evolución y el pronóstico de la patología.

9. La microbiota intestinal de pacientes con DA se modifica tras la ingesta del preparado probiótico durante 12 semanas. Los niveles de los géneros *Eubacterium* y *Gemmiger* se ven aumentados, mientras que el género *Faecalibacterium* disminuye, de manera que la microbiota se asemeja más a la población sana.
10. El tratamiento con el preparado probiótico es seguro, no produciendo efectos adversos destacables. Se han detectado pequeñas molestias a nivel digestivo, que, además, también han sido descritas en el grupo de estudio que no ingirió el probiótico, y que se justifican por la adaptación a su ingesta.
11. El cumplimiento registrado es muy alto y denota una gran satisfacción con la formulación del producto, ya que el preparado probiótico se administra en una cómoda única dosis diaria mediante una cápsula de fácil deglución.

El fruto de este proyecto de investigación es la demostración de la eficacia y seguridad de este preparado probiótico, como tratamiento coadyuvante en el control de la DA leve a moderada en población infantil. Actualmente, está siendo utilizado en la práctica clínica habitual por dermatólogos y pediatras de varios países de Europa y América.

VII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2016;387(10023):1109-22.
2. Kantor R, Thyssen JP, Paller AS, Silverberg JI. Atopic dermatitis, atopic eczema, or eczema? A systematic review, meta-analysis, and recommendation for uniform use of 'atopic dermatitis'. *Allergy*. 2016;71(10):1480-5.
3. Cohen S, Dworetzky M, Frick OL. Coca and Cooke on the classification of hypersensitiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1):205-10.
4. Kramer ON, Strom MA, Ladizinski B, Lio PA. The history of atopic dermatitis. *Clin Dermatol*. 2017;35(4):344-8.
5. DaVeiga SP. Epidemiology of atopic dermatitis: a review. *Allergy Asthma Proc*. 2012;33(3):227-34.
6. Cheek S, Yee F, Song Ma JY, Leow R, Ho MSL, Yew YW, et al. Prevalence and descriptive epidemiology of atopic dermatitis and its impact on quality of life in Singapore. *Br J Dermatol*. 2018;178(1):276-7.
7. Garg N, Silverberg JI. Epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Clin Dermatol*. 2015;33(3):281-8.
8. Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab*. 2015;66 Suppl 1:8-16.
9. Mortz CG, Andersen KE, Dellgren C, Barington T, Bindsvlev-Jensen C. Atopic dermatitis from adolescence to adulthood in the TOACS cohort: prevalence, persistence and comorbidities. *Allergy*. 2015;70(7):836-45.
10. Silvestre Salvador JF, Romero-Perez D, Encabo-Duran B. Atopic Dermatitis in Adults: A Diagnostic Challenge. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(2):78-88.
11. Mei-Yen Yong A, Tay YK. Atopic Dermatitis: Racial and Ethnic Differences. *Dermatol Clin*. 2017;35(3):395-402.
12. Silverberg NB. A practical overview of pediatric atopic dermatitis, part 1: epidemiology and pathogenesis. *Cutis*. 2016;97(4):267-71.
13. Ballardini N, Kull I, Soderhall C, Lilja G, Wickman M, Wahlgren CF. Eczema severity in preadolescent children and its relation to sex, filaggrin mutations, asthma, rhinitis, aggravating factors and topical treatment: a report from the BAMSE birth cohort. *Br J Dermatol*. 2013;168(3):588-94.
14. Lifschitz C. The impact of atopic dermatitis on quality of life. *Ann Nutr Metab*. 2015;66 Suppl 1:34-40.

15. Pustisek N, Vurnek Zivkovic M, Situm M. Quality of Life in Families with Children with Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol*. 2016;33(1):28-32.
16. Jirakova A, Vojackova N, Gopfertova D, Hercogova J. A comparative study of the impairment of quality of life in Czech children with atopic dermatitis of different age groups and their families. *Int J Dermatol*. 2012;51(6):688-92.
17. Jang HJ, Hwang S, Ahn Y, Lim DH, Sohn M, Kim JH. Family quality of life among families of children with atopic dermatitis. *Asia Pac Allergy*. 2016;6(4):213-9.
18. Celakovska J, Bukac J. The severity of atopic dermatitis evaluated with the SCORAD index and the occurrence of bronchial asthma and rhinitis, and the duration of atopic dermatitis. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2016;7(1):8-13.
19. Jeon C, Yan D, Nakamura M, Sekhon S, Bhutani T, Berger T, et al. Frequency and Management of Sleep Disturbance in Adults with Atopic Dermatitis: A Systematic Review. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2017;7(3):349-64.
20. Silverberg JI. Public Health Burden and Epidemiology of Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin*. 2017;35(3):283-9.
21. Sullivan M, Silverberg NB. Current and emerging concepts in atopic dermatitis pathogenesis. *Clin Dermatol*. 2017;35(4):349-53.
22. Mittermann I, Wikberg G, Johansson C, Lupinek C, Lundeberg L, Cramer R, et al. IgE Sensitization Profiles Differ between Adult Patients with Severe and Moderate Atopic Dermatitis. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156077.
23. Rossberg S, Gerhold K, Geske T, Zimmermann K, Menke G, Zaino M, et al. Elevated blood eosinophils in early infancy are predictive of atopic dermatitis in children with risk for atopy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(7):702-8.
24. Kiiski V, Karlsson O, Remitz A, Reitamo S. High serum total IgE predicts poor long-term outcome in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(8):943-7.
25. Dos Santos VG, Orfali RL, de Oliveira Titz T, da Silva Duarte AJ, Sato MN, Aoki V. Evidence of regulatory myeloid dendritic cells and circulating inflammatory epidermal dendritic cells-like modulated by Toll-like receptors 2 and 7/8 in adults with atopic dermatitis. *Int J Dermatol*. 2017;56(6):630-5.
26. Kraj P, Ignatowicz L. The mechanisms shaping the repertoire of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunology*. 2018;153(3):290-6.
27. Buzney CD, Gottlieb AB, Rosmarin D. Asthma and Atopic Dermatitis: A Review of Targeted Inhibition of Interleukin-4 and Interleukin-13 As Therapy for Atopic Disease. *J Drugs Dermatol*. 2016;15(2):165-71.
28. Liu FT, Goodarzi H, Chen HY. IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41(3):298-310.

29. Park K, Lee S, Lee YM. Sphingolipids and antimicrobial peptides: function and roles in atopic dermatitis. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013;21(4):251-7.
30. Zaniboni MC, Samorano LP, Orfali RL, Aoki V. Skin barrier in atopic dermatitis: beyond filaggrin. *An Bras Dermatol*. 2016;91(4):472-8.
31. Tsakok T, Woolf R, Smith CH, Weidinger S, Flohr C. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *Br J Dermatol*. 2018.
32. Baurecht H, Hotze M, Brand S, Buning C, Cormican P, Corvin A, et al. Genome-wide comparative analysis of atopic dermatitis and psoriasis gives insight into opposing genetic mechanisms. *Am J Hum Genet*. 2015;96(1):104-20.
33. Bin L, Leung DY. Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2016;12:52.
34. McLean WH. Filaggrin failure - from ichthyosis vulgaris to atopic eczema and beyond. *Br J Dermatol*. 2016;175 Suppl 2:4-7.
35. Nakatsuji T, Chen TH, Two AM, Chun KA, Narala S, Geha RS, et al. Staphylococcus aureus Exploits Epidermal Barrier Defects in Atopic Dermatitis to Trigger Cytokine Expression. *J Invest Dermatol*. 2016;136(11):2192-200.
36. Atopique FpD. Un problema de barrera cutánea.
37. Nygaard U, Hvid M, Johansen C, Buchner M, Folster-Holst R, Deleuran M, et al. TSLP, IL-31, IL-33 and sST2 are new biomarkers in endophenotypic profiling of adult and childhood atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(11):1930-8.
38. Yin H, Tian Y, Luo R, Deng Y. Thymic stromal lymphopoietin is expressed in human corneal stromal cells and secreted upon protease-activated receptor 1 activation. *IUBMB Life*. 2017;69(8):606-10.
39. Furue M, Chiba T, Tsuji G, Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, et al. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergol Int*. 2017;66(3):398-403.
40. McPherson T. Current Understanding in Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Indian J Dermatol*. 2016;61(6):649-55.
41. D'Auria E, Banderali G, Barberi S, Gualandri L, Pietra B, Riva E, et al. Atopic dermatitis: recent insight on pathogenesis and novel therapeutic target. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016;34(2):98-108.
42. dermatologo.net. Xerosis 2012 [
43. Commons W. Eczema o dermatite atopica avambraccio. 2015.
44. Blanc S, Bourrier T, Albertini M, Chiaverini C, Giovannini-Chami L. Dennie-Morgan fold plus dark circles: suspect atopy at first sight. *J Pediatr*. 2015;166(6):1541.
45. Siegfried EC, Hebert AA. Diagnosis of Atopic Dermatitis: Mimics, Overlaps, and Complications. *J Clin Med*. 2015;4(5):884-917.

46. On HR, Lee SE, Kim SE, Hong WJ, Kim HJ, Nomura T, et al. Filaggrin Mutation in Korean Patients with Atopic Dermatitis. *Yonsei Med J.* 2017;58(2):395-400.
47. Silverberg JI, Vakharia PP, Chopra R, Sacotte R, Patel N, Immaneni S, et al. Phenotypical Differences of Childhood- and Adult-Onset Atopic Dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(4):1306-12.
48. Lyons JJ, Milner JD, Stone KD. Atopic dermatitis in children: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2015;35(1):161-83.
49. Desconocido. Localización de las lesiones de piel atópica en función de la edad [Available from: www.laboratoriosbabe.com/cuidados/piel-atopica.aspx].
50. Silverberg NB. A practical overview of pediatric atopic dermatitis, part 3: differential diagnosis, comorbidities, and measurement of disease burden. *Cutis.* 2016;97(6):408-12.
51. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl.* 1980;92:44 - 7.
52. Wahab MA, Rahman MH, Khondker L, Hawlader AR, Ali A, Hafiz MA, et al. Minor criteria for atopic dermatitis in children. *Mymensingh Med J.* 2011;20(3):419-24.
53. Vakharia PP, Chopra R, Silverberg JI. Systematic Review of Diagnostic Criteria Used in Atopic Dermatitis Randomized Controlled Trials. *Am J Clin Dermatol.* 2018;19(1):15-22.
54. Schram ME, Leeflang MM, JP DENO, Spuls PI, Bos JD. Validation and refinement of the Millennium Criteria for atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2011;38(9):850-8.
55. Lee SC, Committee of Korean Atopic Dermatitis Association for R. Various diagnostic criteria for atopic dermatitis (AD): A proposal of Reliable Estimation of Atopic Dermatitis in Childhood (REACH) criteria, a novel questionnaire-based diagnostic tool for AD. *J Dermatol.* 2016;43(4):376-84.
56. Silverberg NB. A practical overview of pediatric atopic dermatitis, part 2: triggers and grading. *Cutis.* 2016;97(5):326-9.
57. Dermatitis ETFoA. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology.* 1993;186(1):23-31.
58. Wollenberg A, Oranje A, Deleuran M, Simon D, Szalai Z, Kunz B, et al. ETFAD/EADV Eczema task force 2015 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adult and paediatric patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(5):729-47.

59. Chopra R, Vakharia PP, Sacotte R, Patel N, Immaneni S, White T, et al. Severity strata for Eczema Area and Severity Index (EASI), modified EASI, Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD), objective SCORAD, Atopic Dermatitis Severity Index and body surface area in adolescents and adults with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2017;177(5):1316-21.
60. Kong TS, Han TY, Lee JH, Son SJ. Correlation between Severity of Atopic Dermatitis and Sleep Quality in Children and Adults. *Ann Dermatol*. 2016;28(3):321-6.
61. Koh MJ, Giam YC, Liew HM, Foong AY, Chong JH, Wong SMY, et al. Comparison of the Simple Patient-Centric Atopic Dermatitis Scoring System PEST with SCORAD in Young Children Using a Ceramide Dominant Therapeutic Moisturizer. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2017;7(3):383-93.
62. Sawatzky S, Schario M, Stroux A, Lunnemann L, Zuberbier T, Blume-Peytavi U, et al. Children with Dry Skin and Atopic Predisposition: Outcome Measurement with Validated Scores for Atopic Dermatitis. *Skin Pharmacol Physiol*. 2016;29(3):148-56.
63. Gerbens LA, Prinsen CA, Chalmers JR, Drucker AM, von Kobyletzki LB, Limpens J, et al. Evaluation of the measurement properties of symptom measurement instruments for atopic eczema: a systematic review. *Allergy*. 2017;72(1):146-63.
64. Hurault G, Schram ME, Roekevisch E, Spuls PI, Tanaka RJ. Relationship and probabilistic stratification of EASI and oSCORAD severity scores for atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2018.
65. Chernyshov PV, Ho RC, Monti F, Jirakova A, Velitchko SS, Hercogova J, et al. An International Multi-center Study on Self-assessed and Family Quality of Life in Children with Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2015;23(4):247-53.
66. Holm JG, Agner T, Clausen ML, Thomsen SF. Quality of life and disease severity in patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(10):1760-7.
67. Futamura M, Leshem YA, Thomas KS, Nankervis H, Williams HC, Simpson EL. A systematic review of Investigator Global Assessment (IGA) in atopic dermatitis (AD) trials: Many options, no standards. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(2):288-94.
68. Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(6):850-78.

69. Galli E, Neri I, Ricci G, Baldo E, Barone M, Belloni Fortina A, et al. Consensus Conference on Clinical Management of pediatric Atopic Dermatitis. *Ital J Pediatr.* 2016;42:26.
70. Stein SL, Cifu AS. Management of Atopic Dermatitis. *JAMA.* 2016;315(14):1510-1.
71. Thomsen SF. Atopic dermatitis: natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN Allergy.* 2014;2014:354250.
72. Nowicki R, Trzeciak M, Wilkowska A, Sokolowska-Wojdylo M, Lugowska-Umer H, Baranska-Rybak W, et al. Atopic dermatitis: current treatment guidelines. Statement of the experts of the Dermatological Section, Polish Society of Allergology, and the Allergology Section, Polish Society of Dermatology. *Postepy Dermatol Alergol.* 2015;32(4):239-49.
73. Madhok V, Futamura M, Thomas KS, Barbarot S. What's new in atopic eczema? An analysis of systematic reviews published in 2012 and 2013. Part 2. Treatment and prevention. *Clin Exp Dermatol.* 2015;40(4):349-54; quiz 54-5.
74. Raap U, Papakonstantinou E, Metz M, Lippert U, Schmelz M. [Update on the cutaneous neurobiology of pruritus]. *Hautarzt.* 2016;67(8):595-600.
75. Takeuchi S, Oba J, Esaki H, Furue M. Pruritus of patients with atopic dermatitis in daily life and their experience of therapeutic effects: results of a web-based questionnaire survey. *Br J Dermatol.* 2015;173(1):250-2.
76. Chawla V, Hogan MB, Moonie S, Fenwick GL, Hooft A, Wilson NW. Parental perception of efficacy of antihistamines for pruritus in pediatric atopic dermatitis. *Allergy Asthma Proc.* 2016;37(2):157-63.
77. Garnacho-Saucedo G, Salido-Vallejo R, Moreno-Gimenez JC. Atopic dermatitis: update and proposed management algorithm. *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(1):4-16.
78. Pongcharoen P, Fleischer AB, Jr. An evidence-based review of systemic treatments for itch. *Eur J Pain.* 2016;20(1):24-31.
79. Sach TH, McManus E, McMonagle C, Levell N. Economic evidence for the prevention and treatment of atopic eczema: a protocol for a systematic review. *Syst Rev.* 2016;5:90.
80. Strathie Page S, Weston S, Loh R. Atopic dermatitis in children. *Aust Fam Physician.* 2016;45(5):293-6.
81. Thomas KS, Stuart B, O'Leary CJ, Schmitt J, Paul C, Williams HC, et al. Validation of treatment escalation as a definition of atopic eczema flares. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124770.
82. Jirakova A, Rob F, Secnikova Z, Koblova K, Dzambova M, Rajska L, et al. Topical Corticosteroids but Not Calcineurin Inhibitors Induced Atrophy after Four Weeks. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2015;29(3):701-6.

83. Mooney E, Rademaker M, Dailey R, Daniel BS, Drummond C, Fischer G, et al. Adverse effects of topical corticosteroids in paediatric eczema: Australasian consensus statement. *Australas J Dermatol*. 2015;56(4):241-51.
84. Del Rosso J, Friedlander SF. Corticosteroids: options in the era of steroid-sparing therapy. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(1 Suppl 1):S50-8.
85. Li AW, Yin ES, Antaya RJ. Topical Corticosteroid Phobia in Atopic Dermatitis: A Systematic Review. *JAMA Dermatol*. 2017;153(10):1036-42.
86. Muller SM, Tomaschett D, Euler S, Vogt DR, Herzog L, Itin P. Topical Corticosteroid Concerns in Dermatological Outpatients: A Cross-Sectional and Interventional Study. *Dermatology*. 2016;232(4):444-52.
87. Chong M, Fonacier L. Treatment of Eczema: Corticosteroids and Beyond. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;51(3):249-62.
88. Cury Martins J, Martins C, Aoki V, Gois AF, Ishii HA, da Silva EM. Topical tacrolimus for atopic dermatitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015(7):CD009864.
89. Sathishkumar D, Moss C. Topical Therapy in Atopic Dermatitis in Children. *Indian J Dermatol*. 2016;61(6):656-61.
90. Broeders JA, Ahmed Ali U, Fischer G. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials (RCTs) comparing topical calcineurin inhibitors with topical corticosteroids for atopic dermatitis: A 15-year experience. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(2):410-9 e3.
91. Schmitt J, von Kobyletzki L, Svensson A, Apfelbacher C. Efficacy and tolerability of proactive treatment with topical corticosteroids and calcineurin inhibitors for atopic eczema: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Dermatol*. 2011;164(2):415-28.
92. Sigurgeirsson B, Boznanski A, Todd G, Vertruyen A, Schuttelaar ML, Zhu X, et al. Safety and efficacy of pimecrolimus in atopic dermatitis: a 5-year randomized trial. *Pediatrics*. 2015;135(4):597-606.
93. Rahman MF, Nandi AK, Kabir S, Kamal M, Basher MS, Banu LA. Topical Tacrolimus versus Hydrocortisone on Atopic Dermatitis in Paediatric Patients: A Randomized Controlled Trial. *Mymensingh Med J*. 2015;24(3):457-63.
94. Chia BK, Tey HL. Systematic review on the efficacy, safety, and cost-effectiveness of topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis. *Dermatitis*. 2015;26(3):122-32.
95. Hamilton JD, Ungar B, Guttman-Yassky E. Drug evaluation review: dupilumab in atopic dermatitis. *Immunotherapy*. 2015;7(10):1043-58.
96. Wang D, Beck LA. Immunologic Targets in Atopic Dermatitis and Emerging Therapies: An Update. *Am J Clin Dermatol*. 2016;17(5):425-43.

97. Drucker AM, Ellis A, Jabbar-Lopez Z, Yiu ZZN, Arents BWM, Burton T, et al. Systemic immunomodulatory treatments for atopic dermatitis: protocol for a systematic review with network meta-analysis. *BMJ Open*. 2018;8(8):e023061.
98. Kutlubay Z, Erdogan BC, Engin B, Serdaroglu S. Cyclosporine in Dermatology. *Skinmed*. 2016;14(2):105-9.
99. Megna M, Napolitano M, Patruno C, Villani A, Balato A, Monfrecola G, et al. Systemic Treatment of Adult Atopic Dermatitis: A Review. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2017;7(1):1-23.
100. Prezzano JC, Beck LA. Long-Term Treatment of Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin*. 2017;35(3):335-49.
101. Rodenbeck DL, Silverberg JL, Silverberg NB. Phototherapy for atopic dermatitis. *Clin Dermatol*. 2016;34(5):607-13.
102. Ortiz-Salvador JM, Perez-Ferriols A. Phototherapy in Atopic Dermatitis. *Adv Exp Med Biol*. 2017;996:279-86.
103. Czarnowicki T, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Novel concepts of prevention and treatment of atopic dermatitis through barrier and immune manipulations with implications for the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(6):1723-34.
104. Sidbury R, Tom WL, Bergman JN, Cooper KD, Silverman RA, Berger TG, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 4. Prevention of disease flares and use of adjunctive therapies and approaches. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(6):1218-33.
105. Giam YC, Hebert AA, Dizon MV, Van Bever H, Tiongco-Recto M, Kim KH, et al. A review on the role of moisturizers for atopic dermatitis. *Asia Pac Allergy*. 2016;6(2):120-8.
106. Sala-Cunill A, Lazaro M, Herraiz L, Quinones MD, Moro-Moro M, Sanchez I. Basic Skin Care and Topical Therapies for Atopic Dermatitis: Beyond Essential Approaches. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018:0.
107. Eichenfield LF, Tom WL, Berger TG, Krol A, Paller AS, Schwarzenberger K, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(1):116-32.
108. Saeki H, Nakahara T, Tanaka A, Kabashima K, Sugaya M, Murota H, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Atopic Dermatitis 2016. *J Dermatol*. 2016;43(10):1117-45.
109. Ronceray S, Benkalfate L, Saillard C, Ezzedine K, Adamski H, Dupuy A, et al. [Atopic dermatitis severity and vitamin D concentration: a cross-sectional study]. *Ann Dermatol Venereol*. 2014;141(4):265-71.

110. Saleem MD, Oussedik E, D'Amber V, Feldman SR. Interleukin-31 pathway and its role in atopic dermatitis: a systematic review. *J Dermatolog Treat.* 2017;28(7):591-9.
111. Kabashima K, Furue M, Hanifin JM, Pulka G, Wollenberg A, Galus R, et al. Nemolizumab in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: Randomized, phase II, long-term extension study. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(4):1121-30 e7.
112. Ramirez-Bosca A, Navarro-Lopez V, Martinez-Andres A, Such J, Frances R, Horga de la Parte J, et al. Identification of Bacterial DNA in the Peripheral Blood of Patients With Active Psoriasis. *JAMA Dermatol.* 2015;151(6):670-1.
113. Cid Del Prado-Izquierdo ML, Zarco-Cid Del Prado O, Visoso-Salgado A. [Severe atopic dermatitis and hiper-IgE]. *Rev Alerg Mex.* 2017;64(4):487-92.
114. Smith-Norowitz TA, Bluth MH. Probiotics and diseases of altered IgE regulation: A short review. *J Immunotoxicol.* 2016;13(2):136-40.
115. Kim JY, Kwon JH, Ahn SH, Lee SI, Han YS, Choi YO, et al. Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21(2 Pt 2):e386-93.
116. Kovalszki A, Weller PF. Eosinophilia. *Prim Care.* 2016;43(4):607-17.
117. Sheen YH, Jee HM, Kim DH, Ha EK, Jeong IJ, Lee SJ, et al. Serum zonulin is associated with presence and severity of atopic dermatitis in children, independent of total IgE and eosinophil. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(8):1059-62.
118. Powers CE, McShane DB, Gilligan PH, Burkhart CN, Morrell DS. Microbiome and pediatric atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2015;42(12):1137-42.
119. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):834-41.
120. Wang J, Zheng J, Shi W, Du N, Xu X, Zhang Y, et al. Dysbiosis of maternal and neonatal microbiota associated with gestational diabetes mellitus. *Gut.* 2018;67(9):1614-25.
121. Rautava S. Microbial Composition of the Initial Colonization of Newborns. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2017;88:11-21.
122. Liu D, Yu J, Li L, Ai Q, Feng J, Song C, et al. Bacterial community structure associated with elective cesarean section versus vaginal delivery in Chinese newborns. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015;60(2):240-6.
123. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015;21(29):8787-803.

124. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26:26050.
125. Dicks LMT, Geldenhuys J, Mikkelsen LS, Brandsborg E, Marcotte H. Our gut microbiota: a long walk to homeostasis. *Benef Microbes.* 2018;9(1):3-20.
126. Walker WA. Bacterial Colonization of the Newborn Gut, Immune Development, and Prevention of Disease. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2017;88:23-33.
127. Jiang Z, Jacob JA, Li J, Wu X, Wei G, Vimalanathan A, et al. Influence of diet and dietary nanoparticles on gut dysbiosis. *Microb Pathog.* 2018;118:61-5.
128. Martínez FD, Guerra S. Early Origins of Asthma. Role of Microbial Dysbiosis and Metabolic Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;197(5):573-9.
129. Lu CY, Ni YH. Gut microbiota and the development of pediatric diseases. *J Gastroenterol.* 2015;50(7):720-6.
130. Thomas CL, Fernandez-Penas P. The microbiome and atopic eczema: More than skin deep. *Australas J Dermatol.* 2017;58(1):18-24.
131. Brussow H. Turning the inside out: the microbiology of atopic dermatitis. *Environ Microbiol.* 2016;18(7):2089-102.
132. Codoner FM, Ramirez-Bosca A, Climent E, Carrion-Gutierrez M, Guerrero M, Perez-Orquin JM, et al. Gut microbial composition in patients with psoriasis. *Sci Rep.* 2018;8(1):3812.
133. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473(7346):174-80.
134. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(8):506-14.
135. Kim SO, Ah YM, Yu YM, Choi KH, Shin WG, Lee JY. Effects of probiotics for the treatment of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014;113(2):217-26.
136. Blattner CM, Crosby MS, Goedken M, Murase JE. Update: Do probiotics prevent or treat pediatric atopic dermatitis? *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27(4):425-8.
137. Cao L, Wang L, Yang L, Tao S, Xia R, Fan W. Long-term effect of early-life supplementation with probiotics on preventing atopic dermatitis: A meta-analysis. *J Dermatolog Treat.* 2015;26(6):537-40.

138. da Costa Baptista IP, Accioly E, de Carvalho Padilha P. Effect of the use of probiotics in the treatment of children with atopic dermatitis; a literature review. *Nutr Hosp.* 2013;28(1):16-26.
139. Allen SJ, Jordan S, Storey M, Thornton CA, Gravenor MB, Garaiova I, et al. Probiotics in the prevention of eczema: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child.* 2014;99(11):1014-9.
140. Foolad N, Armstrong AW. Prebiotics and probiotics: the prevention and reduction in severity of atopic dermatitis in children. *Benef Microbes.* 2014;5(2):151-60.
141. Fuchs-Tarlovsky V, Marquez-Barba MF, Sriram K. Probiotics in dermatologic practice. *Nutrition.* 2016;32(3):289-95.
142. Licari A, Marseglia A, Castellazzi AM, Ricci A, Tagliacarne C, Valsecchi C, et al. Atopic Dermatitis: Is There a Role for Probiotics? *J Biol Regul Homeost Agents.* 2015;29(2 Suppl 1):18-24.
143. Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek WK, Park YH. Probiotics and Atopic Dermatitis: An Overview. *Front Microbiol.* 2016;7:507.
144. Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients.* 2013;5(6):1869-912.
145. Kim HJ, Kim HY, Lee SY, Seo JH, Lee E, Hong SJ. Clinical efficacy and mechanism of probiotics in allergic diseases. *Korean J Pediatr.* 2013;56(9):369-76.
146. Inoue Y, Kambara T, Murata N, Komori-Yamaguchi J, Matsukura S, Takahashi Y, et al. Effects of oral administration of *Lactobacillus acidophilus* L-92 on the symptoms and serum cytokines of atopic dermatitis in Japanese adults: a double-blind, randomized, clinical trial. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;165(4):247-54.
147. Wang IJ, Wang JY. Children with atopic dermatitis show clinical improvement after *Lactobacillus* exposure. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(4):779-87.
148. Shokryazdan P, Sieo CC, Kalavathy R, Liang JB, Alitheen NB, Faseleh Jahromi M, et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *Biomed Res Int.* 2014;2014:927268.
149. Lin RJ, Qiu LH, Guan RZ, Hu SJ, Liu YY, Wang GJ. Protective effect of probiotics in the treatment of infantile eczema. *Exp Ther Med.* 2015;9(5):1593-6.
150. Chenoll E, Codoner FM, Silva A, Martinez-Blanch JF, Martorell P, Ramon D, et al. Draft Genome Sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Strain CECT 8145, Able To Improve Metabolic Syndrome In Vivo. *Genome Announc.* 2014;2(2).
151. Martorell P, Llopis S, Gonzalez N, Chenoll E, Lopez-Carreras N, Aleixandre A, et al. Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145 Reduces

- Fat Content and Modulates Lipid Metabolism and Antioxidant Response in *Caenorhabditis elegans*. *J Agric Food Chem*. 2016;64(17):3462-72.
152. Ji H, Li XK. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2721469.
153. Olivares M, Castillejo G, Varea V, Sanz Y. Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. *Br J Nutr*. 2014;112(1):30-40.
154. Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. 2002.
155. Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. , (2006).
156. (EFSA) EFSA. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 7: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2017. *EFSA J* 2018;16(1):5131.
157. Roduit C, Frei R, Ferstl R, Loeliger S, Westermann P, Rhyner C, et al. High levels of Butyrate and Propionate in early life are associated with protection against atopy. *Allergy*. 2018.
158. Bjarnason I, Sission G, Hayee B. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of a multi-strain probiotic in patients with asymptomatic ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammopharmacology*. 2019;27(3):465-73.
159. Lukasik J, Szajewska H. Effect of a multispecies probiotic on reducing the incidence of antibiotic-associated diarrhoea in children: a protocol for a randomised controlled trial. *Bmj Open*. 2018;8(5).
160. Kobylak N, Abenavoli L, Mykhalchyshyn G, Kononenko L, Boccutto L, Kyriienko D, et al. A Multi-strain Probiotic Reduces the Fatty Liver Index, Cytokines and Aminotransferase levels in NAFLD Patients: Evidence from a Randomized Clinical Trial. *J Gastrointest Liver*. 2018;27(1):41-9.
161. Kobylak N, Falalyeyeva T, Mykhalchyshyn G, Kyriienko D, Komissarenko I. Effect of alive probiotic on insulin resistance in type 2 diabetes patients: Randomized clinical trial. *Diabetes Metab Syndr*. 2018;12(5):617-24.
162. Borges NA, Carmo FL, Stockler-Pinto MB, de Brito JS, Dolenga CJ, Ferreira DC, et al. Probiotic Supplementation in Chronic Kidney Disease: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial. *J Renal Nutr*. 2018;28(1):28-36.
163. Ali RAR, Zaharuddin L, Chan SN, Wong ZQ, Ngiu CS, Mokhtar NM. The Clinical and Circulating Inflammatory Cytokines Effects of Probiotic Containing

- Lactobacillus and Bifidobacterium Strains in Patients with Colorectal Cancer: A Randomized Double Blind Controlled Trial. *Gastroenterology*. 2018;154(6):S414-S.
164. Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. 2004.
165. ICH E6 Good Clinical Practice (GCP) Guideline. 1996.
166. Reglamento (UE) No 536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de abril de 2014 sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano, y por el que se deroga la Directiva 2001/20/CE 2014.
167. Aclaraciones sobre la aplicación de la normativa de ensayos clínicos con medicamentos de uso humano a partir del 1 de mayo de 2004 (versión nº6, Mayo de 2008). 2008.
168. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. 2007.
169. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.
170. Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos. 2015.
171. Atopique FplD. Signs of inflammation <https://www.fondation-dermatite-atopique.org/en/atopic-eczema/symptoms-atopic-eczema>
172. Alshevskaya AA, Lopatnikova JA, Krugleeva OL, Nepomnyschih VM, Lukinov VL, Karaulov AV, et al. Expression density of receptors to IL-1beta in atopic dermatitis. *Mol Immunol*. 2016;75:92-100.
173. Yuan S, Cohen DB, Ravel J, Abdo Z, Forney LJ. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One*. 2012;7(3):e33865.
174. Human Microbiome Project (HMP) - <http://hmpdacc.org/>.
175. Navarro-Lopez V, Ramirez-Bosca A, Ramon-Vidal D, Ruzafa-Costas B, Genoves-Martinez S, Chenoll-Cuadros E, et al. Effect of Oral Administration of a Mixture of Probiotic Strains on SCORAD Index and Use of Topical Steroids in Young Patients With Moderate Atopic Dermatitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*. 2018;154(1):37-43.
176. The Uppsala Monitoring Centre (the UMC) WCCfIDM. Safety Monitoring of Medicinal Products: Guidelines for Setting Up and Running a Pharmacovigilance Centre 2001.
177. Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*. 2014;30(5):614-20.
178. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i884-i90.

179. Varsos C, Patkos T, Oulas A, Pavloundi C, Gougousis A, Ijaz UZ, et al. Optimized R functions for analysis of ecological community data using the R virtual laboratory (RvLab). *Biodivers Data J*. 2016(4):e8357.
180. Suárez-Moya A. Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia Advance Acces* 2017:1-7.
181. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335-6.
182. Trials CSOR. The CONSORT Flow Diagram. 2010.
183. Niccoli AA, Artesi AL, Candio F, Ceccarelli S, Cozzali R, Ferraro L, et al. Preliminary results on clinical effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* LS01 in children affected by atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48 Suppl 1:S34-6.
184. Farid R, Ahanchian H, Jabbari F, Moghiman T. Effect of a new synbiotic mixture on atopic dermatitis in children: a randomized-controlled trial. *Iran J Pediatr*. 2011;21(2):225-30.
185. Yesilova Y, Calka O, Akdeniz N, Berktaş M. Effect of probiotics on the treatment of children with atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. 2012;24(2):189-93.
186. Ibanez MD, Rodriguez Del Rio P, Gonzalez-Segura Alsina D, Villegas Iglesias V. Effect of synbiotic supplementation on children with atopic dermatitis: an observational prospective study. *Eur J Pediatr*. 2018;177(12):1851-8.
187. Yang HJ, Min TK, Lee HW, Pyun BY. Efficacy of Probiotic Therapy on Atopic Dermatitis in Children: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014;6(3):208-15.
188. Prakoeswa CRS, Herwanto N, Prameswari R, Astari L, Sawitri S, Hidayati AN, et al. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 supplementation reduced SCORAD in children with atopic dermatitis. *Benef Microbes*. 2017;8(5):833-40.
189. Wu YJ, Wu WF, Hung CW, Ku MS, Liao PF, Sun HL, et al. Evaluation of efficacy and safety of *Lactobacillus rhamnosus* in children aged 4-48 months with atopic dermatitis: An 8-week, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017;50(5):684-92.
190. Han Y, Kim B, Ban J, Lee J, Kim BJ, Choi BS, et al. A randomized trial of *Lactobacillus plantarum* CJLP133 for the treatment of atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012;23(7):667-73.
191. Drago L, Iemoli E, Rodighiero V, Nicola L, De Vecchi E, Piconi S. Effects of *Lactobacillus salivarius* LS01 (DSM 22775) treatment on adult atopic dermatitis: a randomized placebo-controlled study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(4):1037-48.
192. Yan DC, Hung CH, Sy LB, Lue KH, Shih IH, Yang CY, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial Assessing the Oral Administration of a

Heat-Treated *Lactobacillus paracasei* Supplement in Infants with Atopic Dermatitis Receiving Topical Corticosteroid Therapy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2019;1-11.

193. Iemoli E, Trabattoni D, Parisotto S, Borgonovo L, Toscano M, Rizzardini G, et al. Probiotics reduce gut microbial translocation and improve adult atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46 Suppl:S33-40.

194. Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr*. 2011;50(1):1-17.

195. Gerasimov SV, Vasjuta VV, Myhovykh OO, Bondarchuk LI. Probiotic supplement reduces atopic dermatitis in preschool children: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Am J Clin Dermatol*. 2010;11(5):351-61.

196. Reddel S, Del Chierico F, Quagliariello A, Giancristoforo S, Vernocchi P, Russo A, et al. Gut microbiota profile in children affected by atopic dermatitis and evaluation of intestinal persistence of a probiotic mixture. *Sci Rep*. 2019;9(1):4996.

197. Zheng H, Liang H, Wang Y, Miao M, Shi T, Yang F, et al. Altered Gut Microbiota Composition Associated with Eczema in Infants. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166026.

198. Song H, Yoo Y, Hwang J, Na YC, Kim HS. *Faecalibacterium prausnitzii* subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(3):852-60.

199. Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J*. 2017;11(4):841-52.

200. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(5):1137-50.

201. Dinsen S, Baslund B, Klose M, Rasmussen AK, Friis-Hansen L, Hilsted L, et al. Why glucocorticoid withdrawal may sometimes be as dangerous as the treatment itself. *Eur J Intern Med*. 2013;24(8):714-20.

