



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA**

**PAULA DANIELLE SANTA MARIA ALBUQUERQUE DE ANDRADE**

**Estudo randomizado, duplo-cego controlado, sobre eficácia de probióticos  
combinados no tratamento da dermatite atópica em crianças**

**RIBEIRÃO PRETO-SP**

**2019**

PAULA DANIELLE SANTA MARIA ALBUQUERQUE DE ANDRADE

**Estudo randomizado, duplo-cego controlado, sobre eficácia de probióticos combinados no tratamento da dermatite atópica em crianças**

**Versão Corrigida**

Tese apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Prof. Dr. Pérsio Roxo Júnior

RIBEIRÃO PRETO

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

ANDRADE, P.D.S.M.A.

Estudo randomizado, duplo-cego controlado, sobre eficácia de probióticos combinados no tratamento da dermatite atópica em crianças. Ribeirão Preto, 2019.

55f. : il. ; 30 cm.

Tese apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente.

ANDRADE, Paula Danielle Santa Maria Albuquerque de. Estudo randomizado, duplo-cego controlado, sobre eficácia de probióticos combinados no tratamento da dermatite atópica em crianças.

Tese apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil

Dedico este trabalho aos meus grandes e eternos amores, que doaram suas vidas incansavelmente para garantir a minha formação humana e intelectual, Painho e Mainha...

Ao meu esposo, Guilherme, meu porto seguro, com quem compartilho uma vida de amor e crescimento...

A todas as crianças que me ensinam diariamente, por meio da sua inocência, como o ser humano é genuinamente bom e reforçam a minha esperança no bem.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida e pelos caminhos que percorri até este momento de vitória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pérsio Roxo Júnior, por ter acreditado em meu potencial, incentivado a alçar novos voos e me ajudado a descobrir o amor pela docência. Minha profunda gratidão pela sua amizade, sua confiança e seus ensinamentos que me acompanham desde a Residência médica.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Carregaro e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jorgete Maria e Silva, que tão prontamente colaboraram na produção deste trabalho. Obrigada pelo apoio.

Muito obrigada às crianças e aos adolescentes e a seus familiares, que participaram e acreditaram neste estudo, pela disponibilidade e pela confiança. Espero que este trabalho possa trazer contribuições importantes para um tratamento eficaz e indolor a todas as crianças que sofrem com esta patologia.

A toda a equipe do ambulatório de Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP-RP, da qual fiz parte por alguns anos, sendo este um motivo de imenso orgulho, e que sempre lembrarei com muitas saudades e gratidão por tantos ensinamentos e vivências.

À equipe dos laboratórios nos quais realizei os experimentos. Obrigada pela prontidão e pela disponibilidade em ajudar e em ensinar.

Às Professoras Dr.<sup>a</sup> Regina Sawamura e Dr.<sup>a</sup> Janaína Michelle Lima Melo que, por ocasião do Exame de Qualificação, ofereceram sugestões valiosas para a finalização deste trabalho.

Às minhas companheiras de residência em Alergia e Imunologia pediátrica e amigas para toda a vida: Juliana, Maria Eduarda, Marília e Thaís. Obrigada pela nossa convivência tão especial e por compartilharmos tantos aprendizados na especialidade que escolhemos e amamos.

Aos funcionários do HC criança, obrigada pelo amparo.

À Verinha, secretária do Departamento de Pediatria, que me acompanhou durante as residências (Pediatria e Alergia e Imunologia pediátrica) e a Pós-Graduação, e que foi uma verdadeira ajuda nesta caminhada longa e, por vezes, árdua. Muito obrigada!

Aos meus pais, Paulo Marcos e Martha, serei eternamente grata por tudo o que sou e pelo tanto que vocês fizeram para eu estar aqui. Obrigada pelo amor incondicional, pelo incentivo em crescer de maneira honesta e por me ensinarem que estudar vale a pena e nos

transforma em pessoas melhores para o mundo. Amo vocês infinitamente!

Ao meu esposo amado, Guilherme, obrigada por demonstrar tanto amor e orgulho por mim. Obrigada por estar ao meu lado em tantos momentos, sempre me incentivando a seguir em frente e crescer, sempre me ensinando e partilhando a vida. Amo você imensamente!

Aos meus irmãos, Marquinhos e Mayra, por compartilharem uma jornada, que começou ainda na infância, de amor, amizade e de companheirismo. Obrigada por, mesmo longe, estarem sempre tão presentes na minha vida. Amo vocês para sempre!

À minha cunhada e irmã de coração, Ericka, e às minhas sobrinhas lindas, Malu e Liz, por serem somas essenciais à nossa família. Obrigada pelo amor que nos une e por serem bênçãos em minha vida.

À minha amada família, que sempre renova as minhas forças para eu seguir em frente, muito obrigada.

Aos meus amigos de perto e de longe, amigos da vida, que se fizeram presentes ao longo desta caminhada: obrigada pelo carinho, apoio e amizade!

Minha gratidão a todos aqueles que estiveram ao meu lado nesses anos de estudo.

Muito obrigada!



## RESUMO

ANDRADE, P. D. S. M. A. Estudo randomizado, duplo-cego controlado, sobre eficácia de probióticos combinados no tratamento da dermatite atópica em crianças. 2019. 55 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

**Introdução:** A dermatite atópica é uma desordem imunológica, caracterizada por inflamação cutânea crônica e/ou recidivante, cuja prevalência vem aumentando em todo o mundo. A hipótese de que uma estimulação precoce apropriada da microbiota intestinal contribua para o estabelecimento do equilíbrio do sistema imunológico tem levado ao uso de probióticos na prevenção e no tratamento da dermatite atópica em vários estudos clínicos e experimentais. **Objetivos:** Avaliar a eficácia clínica da mistura de probióticos (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e os efeitos da suplementação na sensibilização, inflamação e tolerância, em crianças e adolescentes com dermatite atópica. **Método:** Trata-se de um estudo clínico, duplo-cego, randomizado e controlado com placebo com duração de um ano. Quarenta crianças e adolescentes foram acompanhados com avaliações clínicas trimestrais e coleta sanguínea semestral. O teste cutâneo de leitura imediata foi realizado no início e ao final da pesquisa. Todos os pacientes foram tratados por um período de seis meses e receberam 1 grama (sachê) ao dia. **Resultados:** A análise estatística revelou resposta clínica significativa do grupo probiótico em relação ao grupo placebo, após seis meses de tratamento, com redução do SCORAD ( $p = 0,03$ ; IC 95%, 2,44-52,94), mesmo após o ajuste pelas covariáveis ( $p = 0,02$ ; IC 95%, 5,52-59,13). Observou-se, ainda, manutenção da melhora no grupo probiótico após três meses da pausa, quando realizado o ajuste pelas covariáveis ( $p = 0,04$ ; IC 95%, 0,78-27,70). Os níveis de IgE total não sofreram alterações entre os grupos. Os demais parâmetros (teste cutâneo de leitura imediata, citocinas inflamatórias e de tolerância imunológica) não apresentaram riscos relativos com diferenças estatísticas em relação ao placebo. **Conclusões:** A mistura de probióticos utilizada por seis meses em crianças e em adolescentes com dermatite atópica foi eficaz na redução do SCORAD. Este efeito benéfico não foi observado na modulação de citocinas inflamatórias ou tolerogênicas, assim como não houve influência sobre o teste cutâneo de leitura imediata e a IgE total. ClinicalTrials.gov #NCT02519556.

**Palavras-chave:** Dermatite atópica. Microbiota. Inflamação. Sensibilização. Tolerância imunológica.

## ABSTRACT

ANDRADE, P. D. S. M. A. Double blind, randomized, placebo controlled clinical trial of the efficacy of combined probiotics in the treatment of atopic dermatitis in children. 2019. 55 f. Thesis (Doctorate) – Department of Childcare and Pediatrics of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2019.

**Background:** Atopic dermatitis, an immunological disorder characterized by chronic and/or relapsing skin inflammation, is increasing worldwide. The hypothesis that appropriate early stimulation of the gut microbiota contributes to immune system balance has encouraged the use of probiotics to prevent and to treat atopic dermatitis in several clinical and experimental studies. **Objectives:** To evaluate the clinical efficacy of a mixture of probiotics (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) in children and teenagers with atopic dermatitis and the effects of probiotics on sensitization, inflammation, and immunological tolerance. **Method:** This is a one-year double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial that monitored 40 children and adolescents through quarterly clinical examinations and semiannual blood collection. The skin prick test was performed at the beginning and end of the trial. All the patients were treated for six months and received one gram of probiotics (sachet) per day. **Results:** Clinical response was significantly better in the probiotic group as compared to the placebo group after treatment for six months; SCORAD decreased ( $p = 0.03$ , 95% CI, 2.44–52.94) even after adjustment for co-variables ( $p = 0.02$ , 95% CI, 5.52–59.13). Three months after treatment was discontinued, improvement persisted in the probiotic group even after adjustment for co-variables ( $p = 0.04$ , 95% CI, 0.78–27.70). Neither probiotics nor placebo modified serum IgE levels. The other parameters (skin prick test and inflammatory and immunological tolerance cytokines) did not reveal statistically significant relative risks as compared to placebo. **Conclusions:** Use of a mixture of probiotics for six months effectively reduced SCORAD in children and adolescents with atopic dermatitis. This beneficial effect was not evident in the modulation of inflammatory or tolerogenic cytokines, skin prick test, or serum IgE levels. ClinicalTrials.gov #NCT02519556.

**Keywords:** Atopic dermatitis. Microbiota. Inflammation. Sensitization. Immune tolerance.

## LISTA DE BREVIATURAS E DE SIGLAS

Bg	<i>Blatella germanica</i>
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
CA	Califórnia, Estados Unidos da América
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil
DA	Dermatite atópica
DCs	Células dendríticas
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
Dpt	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ETFAD	<i>The European Task Force on Atopic Dermatitis</i>
EUA	Estados Unidos da América
FLG	Filagrina
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
KIGGS	<i>German Interview and Examination Survey for Children and Adolescents</i>
ku/L	<i>Quilo-unidades por litro</i>
LI	Limite inferior
LS	Limite superior
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pa	<i>Periplaneta americana</i>
rpm	rotações por minuto
SCORAD	<i>SCORing Atopic Dermatitis</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	Células T <i>helper</i>
TIS	<i>Three Item Severity</i>

TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Treg	Células T reguladoras
USP	Universidade de São Paulo
WAO	<i>World Allergy Organization</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidade formadora de colônias

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Algoritmo da fase de recrutamento e randomização dos pacientes.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 2 Análise comparativa do efeito das suplementações sobre o SCORAD nos períodos avaliados .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 3 Análise comparativa do efeito do probiótico sobre o SCORAD entre os períodos avaliados, após ajuste pelas covariáveis ..	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 4 Comparação entre Placebo e Probiótico sobre o <i>prick</i> teste ao final do estudo (após seis meses sem utilizá-los).....	39
Figura 5 Comparação entre Placebo e Probiótico sobre as citocinas após seis meses de tratamento .....	40
Figura 6 Comparação entre Placebo e Probiótico sobre as citocinas ao final do estudo (após seis meses sem utilizá-los).....	40

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Critérios diagnósticos maiores e menores, baseados em aspectos clínicos.....	20
Quadro 2 Potência dos corticoides tópicos.....	23
Quadro 3 Extratos utilizados para avaliação do <i>prick</i> teste.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características demográficas dos participantes após recrutamento.....	36
Tabela 2 Características demográficas dos participantes que completaram o estudo .....	36
Tabela 3 Comparação do efeito Placebo (A) e Probiótico (B) sobre a IgE total. ....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Doenças alérgicas.....	15
1.2 Dermatite atópica.....	16
1.3 Probióticos e Dermatite atópica.....	26
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
3.1 Objetivo primário.....	31
3.2 Objetivos secundários .....	31
<b>4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Modelo e População do Estudo .....	32
4.2 Materiais e métodos .....	33
4.3 Análise Estatística .....	34
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
5.1 Recrutamento, randomização e características demográficas dos participantes.....	35
5.2 Avaliação clínica (SCORAD) .....	36
5.3 Avaliação da sensibilização (IgE total e <i>prick</i> teste).....	38
5.4 Avaliação da tolerância e inflamação (citocinas).....	39
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>52</b>
APÊNDICE A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.....	52
APÊNDICE B Termo de Assentimento Livre e Esclarecido .....	54

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças alérgicas

As condições alérgicas têm aumentado continuamente nas últimas décadas nos países ocidentais (FIOCCHI *et al.*, 2015). Estima-se que até 20% da população possui alguma alergia, como dermatite atópica (DA), alergia alimentar, asma, rinite alérgica e/ou conjuntivite (CUELLO-GARCIA *et al.*, 2015). Segundo a *World Allergy Organization* (WAO), os lactentes apresentam uma prevalência de alergias aproximadamente de 10% quando pais e irmãos não têm doenças alérgicas e 20-30%, nos casos em que há algum parente de primeiro grau acometido (FIOCCHI *et al.*, 2015). Estas doenças representam importante problema de saúde pública (ARROYAVE *et al.*, 2014).

O relatório do *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC), que coletou dados de cerca de 1.200.000 crianças em 98 países, revelou uma prevalência semelhante dessas doenças nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Entre os adolescentes desse estudo (idades variando entre 13-14 anos), asma, rinoconjuntivite e eczema acometeram 14,1%, 14,6% e 7,3%, respectivamente. Na faixa etária dos seis aos sete anos, a prevalência respectiva para estas doenças foi de 11,7%, 8,5% e 7,9% (ZUCOTTI *et al.*, 2015).

O aumento da incidência e prevalência das doenças alérgicas tem sido relacionado à hipótese da higiene (MUIR *et al.*, 2016). Em 1989, Strachan propôs esta teoria, segundo a qual o aparente aumento da prevalência de doenças alérgicas pode ser causado por uma exposição reduzida a microrganismos, com a conseqüente alteração do equilíbrio da resposta imune. Essa hipótese evoluiu nos anos 1990 e, graças aos estudos em modelos animais, os cientistas descobriram um mecanismo plausível que envolve a distinção das populações de linfócitos Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>. Eles reconheceram que a “imunidade natural” para combate às infecções induz um padrão Th<sub>1</sub>, suprimindo potencialmente as respostas imunes Th<sub>2</sub> envolvidas na alergia mediada por IgE (ZUCOTTI *et al.*, 2015).

Acredita-se que o estilo de vida ocidental acarrete pequena exposição aos patógenos, levando o sistema imunológico a “confundir” alimentos inócuos e partículas ambientais com esses patógenos. Estudos recentes observaram que indivíduos de comunidades rurais, com maior exposição a animais, são menos propícios a desenvolverem alergias do que aqueles expostos a ambientes urbanos (MUIR *et al.*, 2016).

Modelos de ratos sem germes e tratados com antibióticos também têm sido usados

para testar essa hipótese e têm apoiado a ideia de que a exposição precoce a diversos comensais é essencial para o desenvolvimento da tolerância imunológica (MUIR *et al.*, 2016).

Uma microbiota intestinal disbiótica pode exercer um papel importante no desenvolvimento das doenças mediadas por IgE (MUIR *et al.*, 2016), por modular as respostas sistêmicas imunológicas e inflamatórias e, assim, influenciar o desenvolvimento da sensibilização e da alergia (FIOCCHI *et al.*, 2015). Fatores genéticos, ambientais e dietéticos podem alterar a microbiota comensal, ocasionando um quadro inflamatório com desregulação da homeostase. Estudos em murinos e em humanos começaram a elucidar o papel da microbiota na patogênese das doenças atópicas, incluindo asma, dermatite atópica e alergias alimentares (MUIR *et al.*, 2016).

## 1.2 Dermatite atópica

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele, caracterizada por quadros pruriginosos recorrentes, com múltiplas etiologias interrelacionadas, incluindo fatores imunoinflamatórios, funcionais de barreira e microbianos (POWERS *et al.*, 2015). Além da identificação dos principais agentes desencadeantes e/ou agravantes envolvidos na expressão clínica da DA, verificou-se ser a integridade da barreira cutânea um dos pontos fundamentais para a manutenção da homeostase da pele (CARVALHO *et al.*, 2017).

O estrato córneo fornece barreira física e atua como a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o meio ambiente, patógenos e alérgenos e é fundamental para a homeostase hídrica. A filagrina (FLG), uma proteína grande (37 kD), rica em histidina, que foi nomeada após sua capacidade de agregar filamentos intermediários de queratina (*Filament aggregating Protein*), é crucial para a estrutura e função do estrato córneo (DRISLANE; IRVINE, 2019). Ela interage com filamentos intermediários, causando sua agregação em microfibrilas (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2018).

Foi demonstrado que a FLG é uma das principais proteínas epidérmicas que participa na patogênese da DA (DRISLANE; IRVINE, 2019). Defeitos nesta proteína causam disfunções na barreira cutânea, resultando em menor proteção contra o meio externo. (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2018). Aproximadamente, 42% dos pacientes com DA apresentam mutação no gene da filagrina e *Staphylococcus aureus* abundantes em comparação com peles normais (POWERS *et al.*, 2015). De fato, o reconhecimento do papel do gene da filagrina na patogênese de DA em um significativo número de pacientes apoia a associação entre a função de barreira e a alteração do microbioma da pele no desenvolvimento desta doença (POWERS



*et al.*,2015).

Aproximadamente, dois milhões de crianças têm DA em todo o mundo, com prevalência ao longo da vida de até 20% (POWERS *et al.*, 2015; BJERRE *et al.*, 2017), sendo menor a taxa em adultos (BJERRE *et al.*, 2017). No Brasil, a prevalência entre os adolescentes oscila entre 7,1% e 12,5%, com tendência à estabilização (ANTUNES *et al.*, 2017).

Os primeiros sintomas da doença geralmente se desenvolvem na infância e, aproximadamente, 50% dos casos são diagnosticados no primeiro ano de vida (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2018). É frequentemente associada a comorbidades como rinite alérgica, asma (MUIR *et al.*, 2016; NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2018), reações alimentares IgE mediadas e conjuntivite alérgica (ROXO JÚNIOR, 2011). Algumas dessas condições se resolvem com a idade, entretanto, outras podem persistir por muitos anos. A progressão dessas manifestações alérgicas na infância é conhecida como “marcha atópica” (ROXO JÚNIOR, 2011; ANTUNES *et al.*, 2017). Isto ocorre porque as doenças alérgicas compartilham aspectos genéticos e fisiopatológicos, destacando-se a sensibilização a alérgenos e o predomínio Th2 (ANTUNES *et al.*, 2017).

Tipicamente, a criança desenvolve a DA nos primeiros meses de vida, que pode ser acompanhada pela sensibilização às proteínas do leite de vaca, ovo ou amendoim, eventualmente manifestando vômitos, diarreia ou anafilaxia relacionados à ingestão destes alimentos, por volta dos 6-12 meses de vida. Este quadro é sucedido pela sensibilização aos aeroalérgenos (ácaros domiciliares, epitélios de animais), até que a criança manifeste episódios de sibilância de repetição antes dos dois anos de idade, em geral associados às infecções virais das vias aéreas superiores (ANTUNES *et al.*, 2017).

Evidências mostram que crianças com eczema e com sensibilização em idade precoce têm risco significativamente maior para o desenvolvimento de asma e rinite. Um outro aspecto a ser ressaltado é a maior frequência de asma e rinite de acordo com a gravidade da dermatite, atingindo 70% entre pacientes com DA grave (ANTUNES *et al.*, 2017).

Em um estudo alemão, realizado pela *German Interview and Examination Survey for Children and Adolescents* (KIGGS), foi aplicado um inquérito representativo transversal em todo o país, incluindo 17.641 crianças com idades entre zero e dezessete anos, e se obteve uma taxa de resposta de 66,6%. Observou-se uma prevalência de diagnóstico médico de eczema de 13,2%, com associação significativa positiva entre eczema nas crianças e alergias dos pais (WOLLENBERG; FEICHTNER, 2013).

No primeiro ano de vida, a prevalência de diagnóstico médico de DA em países da

Europa e América Central foi avaliada como parte do *International Study of Wheezing in Infants (Estudio Internacional de Sibilancia en el Lactente, EISL)*. Observou-se variação ampla das taxas encontradas: 10,6% (Valência, Espanha) a 28,2% (San Pedro Sula, Honduras). Os valores médios obtidos na América Central foram significativamente mais elevados quando comparados aos da Europa: 18,2% e 14,2%, respectivamente (ANTUNES *et al.*, 2017).

Apesar de ser uma doença de insignificante mortalidade, a DA é de elevada morbidade devido às frequentes complicações (infecções secundárias) e ao desconforto provocado pelo prurido intenso (ROXO JÚNIOR, 2006), o qual é constante e incontrolável em alguns pacientes, sendo um dos fatores responsáveis pela diminuição da qualidade de vida deles e de seus familiares (ANTUNES *et al.*, 2017). O desgaste psicossocial e financeiro das crianças e de suas famílias é grande, com tratamentos prolongados, mudanças dietéticas, ambientais e impacto financeiro significativo de quase US \$ 1 bilhão/ano nos EUA. Oitenta e quatro por cento das crianças relatam dificuldade para adormecer e mais que um terço se sente envergonhado ou zangado com sua aparência (POWERS *et al.*, 2015). A dermatite atópica é frequentemente associada a baixo rendimento escolar, dificuldade de interação social e participação em atividades físicas, além do aumento das taxas de ansiedade, depressão e ideação suicida (SIMPSON *et al.*, 2019).

Entre os fatores desencadeantes e agravantes, destacam-se os alérgenos inalantes e alimentares; identificá-los é fundamental na manutenção de longos períodos sem crise (CARVALHO *et al.*, 2017). A diminuição da população de ácaros pode contribuir para a redução de exacerbações das lesões cutâneas em pacientes com DA sensibilizados. Os ácaros da poeira, devido à sua atividade enzimática, são capazes de penetrar através da barreira cutânea alterada destes pacientes e ativar células do sistema imunológico, desencadeando resposta de hipersensibilidade imediata e tardia. Dois estudos documentaram que a redução efetiva no nível de ácaros da poeira está associada à melhora clínica em pacientes com DA, embora outros estudos controlados não tenham comprovado esta melhora clínica (CARVALHO *et al.*, 2017).

Quanto aos alimentos, evidências atuais têm demonstrado que as alterações existentes na barreira cutânea facilitam a penetração de alérgenos alimentares, e alguns estudos mostram uma prevalência de alergia alimentar em cerca de 30% das crianças com DA moderada e grave e que não respondem ao tratamento habitual, principalmente lactentes. Os principais alérgenos envolvidos são clara de ovo, leite de vaca e trigo e, segundo alguns autores, a clara de ovo é o alimento mais implicado como desencadeante de DA. Entretanto, estes dados não

podem ser extrapolados para outras faixas etárias, em que o alimento não é apontado como um desencadeante importante (ANTUNES *et al.*, 2017).

Outros desencadeantes podem ser agentes físicos e funcionarem como irritantes mecânicos, como a lã e as fibras de roupas sintéticas; biológicos, como bactérias e, ainda, químicos, como ácidos, alvejantes e solventes (CARVALHO *et al.*, 2017).

A lesão elementar característica da doença é o eczema, que consiste em uma lesão inflamatória não contagiosa da derme e da epiderme, caracterizada por prurido de intensidade variável, eritema, edema, pápulas, vesículas, transudação, liquenificação e xerose (ROXO JUNIOR, 2011; NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2018). Os pacientes portadores de DA compartilham as características de xerodermia (pele seca) e limiar diminuído para prurido (ANTUNES *et al.*, 2017); este último colabora para o aumento da reação inflamatória, comprometimento da barreira cutânea, perda de água, xerose, colonização microbiana e consequente infecção secundária (ROXO JUNIOR, 2011). Acredita-se, ainda, que indivíduos sem defeito de barreira cutânea (gene da filagrina funcionante) apresentam integridade epidérmica completa, marcada por perda transepidérmica mínima de água e proteção adequada contra micróbios e alérgenos ambientais (FLOHR; MANN, 2014).

Em lactentes, a região malar é tipicamente o primeiro lugar afetado (BJERRE *et al.*, 2017), poupando o triângulo nasolabial. Há envolvimento de couro cabeludo, do pescoço, das pregas infra e das retroauriculares e regiões extensoras de membros (ROXO JUNIOR, 2011). As regiões articulares flexurais predominam em crianças mais velhas e uma apresentação variada ocorre em adultos (BJERRE *et al.*, 2017).

É bem estabelecido que o *Staphylococcus aureus* é o principal causador de infecções cutâneas, exacerbações e cronicidade na DA (FLOHR; MANN, 2014). Um estudo baseado em cultura observou que 70% das lesões cutâneas e 39% da pele nesses pacientes são colonizadas por *Staphylococcus aureus*, o que afeta a gravidade da doença. Não só bactérias, mas também os fungos estão envolvidos (BJERRE *et al.*, 2017). Em adolescentes e em adultos, é frequente a colonização cutânea por *Malassezia furfur* e *Malassezia sympodialis*. Entre as crianças, infecções virais secundárias são frequentes, especialmente pelos vírus *Herpes simplex* e *Molluscum contagiosum* (ROXO JUNIOR, 2011).

Por não haver um teste laboratorial definitivo, o diagnóstico de DA é realizado com base em uma combinação de sintomas clínicos: dermatite crônica pruriginosa e/ou redicivante, com distribuição característica (face, pescoço e superfícies extensoras em lactentes e crianças; regiões de flexuras em pacientes de qualquer idade) (EICHENFIELD *et al.*, 2015). Além disso, é importante observar a presença ou não de infecções secundárias e

textura da pele (grau de hidratação) (ROXO JUNIOR, 2011). A atopia é um fator importante a ser considerado, visto o caráter genético de DA (ROXO JUNIOR, 2011), embora 10-30% dos pacientes não apresentem qualquer aumento dos níveis séricos de IgE total ou específica (LEONARDI *et. al.*,2007).

Histologicamente, as lesões cutâneas apresentam grandes infiltrados de mastócitos, eosinófilos e células Th<sub>2</sub>, além de alterações celulares como hiperqueratose e hiperplasia. As citocinas predominantes são as interleucinas (IL) 4, IL-5 e IL-13, que conduzem uma resposta imunológica com elevação de IgE. Embora as células Th<sub>2</sub> sejam dominantes durante a fase aguda, a produção de interferon (IFN) -gamma e IL-12 por células Th<sub>1</sub> contribuem para a patogênese na fase crônica (SHIN; CHUNG; SEO, 2016).

Hanifin e Rajka (1980) estabeleceram critérios diagnósticos (maiores e menores), que são utilizados até a atualidade (Quadro 1). A presença de, no mínimo, três critérios maiores e três menores torna sugestivo o diagnóstico de DA.

Quadro 1 Critérios diagnósticos maiores e menores, baseados em aspectos clínicos.

<p>Critérios maiores</p> <p>Prurido de intensidade variável;</p> <p>Típica distribuição e morfologia das lesões;</p> <p>Evolução crônica ou recorrente;</p> <p>História pessoal ou familiar de atopia (asma, rinite ou DA).</p>
<p>Critérios menores</p> <p>Xerose</p> <p>Ictiose / hiperlinearidade palmar</p> <p>Reatividade do <i>skin prick test</i></p> <p>IgE sérica elevada</p> <p>Início em idade precoce</p> <p>Suscetibilidade para infecções cutâneas</p> <p>Tendência para dermatite inespecífica de mãos e pés</p> <p>Eczema mamilar</p> <p>Queilites</p> <p>Conjuntivites recorrentes</p> <p>Pregas infraorbitárias de Dennie-Morgan</p> <p>Ceratocone (extremamente raro)</p> <p>Catarata subcapsular anterior</p> <p>Escurecimento orbital</p> <p>Eritema facial</p> <p>Ptiríase alba</p> <p>Pregas anteriores em pescoço</p> <p>Prurido em áreas de suor</p> <p>Intolerância à lã</p> <p>Acentuação perifolicular</p> <p>Alergia alimentar</p> <p>Influência de fatores emocionais e ambientais</p> <p>Dermografismo branco</p>

Fonte: Hanifin e Rajka (1980).

Embora sejam clássicos, esses critérios apresentam limitações, devido à sua complexidade e à pouca praticidade. Dessa maneira, outras ferramentas foram desenvolvidas, com destaque para o índice SCORAD, que auxilia na avaliação da gravidade (ROXO JUNIOR, 2011).

SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*) consiste na avaliação de três itens: (A) extensão da doença, de acordo com a regra dos nove (corresponde a 20% do escore), (B) intensidade das lesões (composto de seis subitens – cada um pontuando em escala de 0 a 3 – eritema, edema e pápulas, formação de crostas, escoriação, liquenificação e xerose; corresponde a 60% do escore) e (C) subjetividade dos sintomas (prurido e insônia) referente aos últimos três dias (corresponde a 20% do escore). O cálculo de índice máximo (0-103) é realizado da seguinte fórmula:  $A/5 + 7B/2 + C$  (ROXO JUNIOR, 2011).

O SCORAD objetivo, desenvolvido também pela ETFAD (*The European Task Force on Atopic Dermatitis*), corresponde à retirada dos sintomas subjetivos do SCORAD, objetivando maior praticidade (ROXO JUNIOR, 2011).

O escore de três itens (*Three Item Severity – TIS*) utiliza apenas três itens de intensidade do SCORAD (eritema, edema e escoriações) e possui boa correlação com os resultados obtidos por ele, tornando-se uma ferramenta de grande utilidade em estudos epidemiológicos, além de boa aplicabilidade prática (ROXO JUNIOR, 2011).

O *prick* teste ou teste cutâneo de leitura imediata determina a presença de anticorpos IgE antígeno-específicos, uma vez que, após o contato do alérgeno com mastócitos sensibilizados localizados nas camadas mais superficiais da epiderme, ocorre liberação de histamina (ROXO JUNIOR, 2011). A finalidade desse teste é avaliar a sensibilização do paciente *in vivo*.

A dosagem da IgE sérica total traduz a concentração desse anticorpo após o contato com um antígeno sensibilizante, capaz de desgranular mastócitos e liberar histamina, gerando a reação alérgica. A finalidade desse teste é avaliar a sensibilização do paciente *in vitro* (ROXO JUNIOR, 2011). A IgE sérica total tem papel controverso na fisiopatologia da DA e, embora valores altos sugiram a possibilidade de sensibilização alérgica, valores normais não afastam a doença. A maioria dos pacientes com dermatite atópica tem níveis elevados de IgE total. Entretanto, um subgrupo de crianças, assim como cerca de 30% dos pacientes cuja doença apresenta idade de início tardio, nunca será sensibilizado, embora tenham lesões eczematosas típicas (ANTUNES *et al.*, 2017).

A DA assume forma leve em 80% das crianças acometidas e, em 70% dos casos, há melhora gradual até o final da infância (ANTUNES *et al.*, 2017). Independentemente da

gravidade da doença, estratégias de manejo básicas devem ser implementadas para cada paciente com diagnóstico de DA (EICHENFIELD *et al.*, 2015). O tratamento da DA requer educar os pais e os pacientes em seus três aspectos: hidratação da pele, evitar os desencadeantes alérgicos e o uso correto de medicações anti-inflamatórias (CARVALHO *et al.*, 2017).

A hidratação da pele pode ser preservada e a integridade da barreira cutânea restaurada com a aplicação de hidratantes, que são a primeira linha de tratamento, recomendados para todas as formas da doença. Os hidratantes podem ser produzidos nos veículos loção ou creme (CARVALHO *et al.*, 2017). A escolha do hidratante deve ser baseada na preferência/tolerância do paciente, objetivando a melhora cutânea (EICHENFIELD *et al.*, 2015). As loções têm alto teor de água, o que permite maior tolerância e evaporação. Os cremes têm textura agradável, são uma emulsão bifásica de água em óleo ou óleo em água. As pomadas têm uma textura gordurosa e menos conservantes em sua formulação, proporcionando menor irritabilidade, principalmente na pele lesada (CARVALHO *et al.*, 2017).

O aumento da camada gordurosa da epiderme, que leva à diminuição das perdas hídricas, influencia diretamente a melhora do prurido, da inflamação e na redução de contaminação bacteriana secundária (ROXO JUIOR, 2011). Loções contêm conservantes, fragrâncias e outros produtos químicos e podem causar hipersensibilidade ou reações irritantes; elas possuem um elevado teor de água e, especialmente para os pacientes graves, causam ressecamento (EICHENFIELD *et al.*, 2015).

Uma revisão sistemática recente, incluindo 77 ensaios clínicos randomizados e 6.603 participantes, avaliou o efeito dos emolientes no eczema, demonstrando redução do SCORAD no grupo que utilizou o emoliente, comparado ao grupo que não o utilizou (diferença de média -2,42, IC 95%: -4,55 a -0,28). Foram observadas menos exacerbações (RR 0,40, IC 95% 0,23-0,70) e menor uso de corticosteroides tópicos ao longo de seis a oito semanas (MD -9,30 g, IC 95% 15,3 a -3,27) no grupo que utilizou emoliente (VAN ZUUREN; FEDOROWICZ; ARENTS, 2017).

Para que a pele fique hidratada são necessárias, no mínimo, duas aplicações diárias do hidratante. O custo pode ser elevado, pois uma criança utiliza 150 a 200 g por semana e um adolescente, aproximadamente, 500 g por semana. Os hidratantes desenvolvidos especificamente para a DA são os mais indicados, pois contém substâncias com ação emoliente, princípios ativos e componentes que se encontram diminuídos na pele da criança com DA, como ceramidas, glicerina, ácidos graxos e ésteres de colesterol. Quando usados

adequadamente, permitem diminuir o uso de corticosteroides tópicos (CARVALHO *et al.*, 2017).

Emolientes que contém novos princípios ativos capazes de restituir as funções da barreira cutânea ou que modificam o microbioma têm sido desenvolvidos com os lisados de *Aquaphilus dolomia* ou *Vitreoscilla filiformis*. É importante ressaltar que devem ser evitadas as preparações que contém alérgenos, como amendoim ou trigo. O lactato de amônio e a ureia em altas concentrações podem causar irritação na pele do paciente com DA e devem ser evitados nos surtos agudos. O óleo de semente de girassol purificado melhora a barreira cutânea na DA, enquanto que o óleo de oliva e o óleo de semente de mostarda são prejudiciais para a reparação da barreira cutânea e podem causar eritema, reforçando que os óleos não são intercambiáveis (CARVALHO *et al.*, 2017).

O banho com hipoclorito de sódio, ou *bleach bath*, pode ser utilizado duas vezes por semana, ou diariamente em quadros mais graves, como medida antisséptica. Dilui-se, aproximadamente, meio copo de hipoclorito de sódio em 40 galões de água/banheira cheia ou 1 mL / L (EICHENFIELD *et al.*, 2015).

Em relação aos medicamentos, os corticoides tópicos são utilizados como droga anti-inflamatória de primeira escolha nas exacerbações, pois atuam nas células dendríticas, monócitos, macrófagos e linfócitos T e impedem a síntese de IL. Os corticosteroides controlam os principais sintomas da DA, como o prurido e as lesões eczematosas, mas podem apresentar efeitos colaterais, especialmente locais, quando utilizados de forma prolongada ou mesmo quando utilizados corticoides de alta potência em regiões de pele mais fina (CARVALHO *et al.*, 2017).

Utilizam-se corticoides de potências variáveis, sendo os de média potência mais frequentemente recomendados. Deve-se atentar para o fato de que diferentes formulações do mesmo corticoide tópico, mesmo com concentrações iguais, podem ter potências diferentes, a depender do veículo, por exemplo, pomada de furoato de mometasona 0,1% é de alta potência, ao passo que furoato de mometasona creme 0,1% é de potência média (EICHENFIELD *et al.*, 2015). As potências de alguns corticoides estão descritas no Quadro 2.

#### Quadro 2 Potência dos corticoides tópicos

<b>Grupo I (superpotentes)</b> Propionato de clobetasol 0,05% (creme e pomada)
<b>Grupo II (potentes)</b>

Dipropionato de betametasona 0,05% (pomada) Valerato de betametasona 0,1% (pomada) Halcinonida 0,1% (pomada) Valerato de Diflucortolona (creme e pomada)
<b>Grupo III – Potentes</b> Dipropionato de betametasona 0,05% (creme) Valerato de betametasona 0,1% (creme) Halcinonida 0,1% (creme) Acetonido de triamcinolona (pomada)
<b>Grupo IV – Potência Média</b> Furoato de mometasona 0,1% (pomada) Acetonido de fluocinolona (pomada) Prednicarbato (pomada) Acetonido de triamcinolona (creme) Desonida (pomada) Aceponato de metilprednisolona (creme)
<b>Grupo V – Potência Média</b> Furoato de mometasona 0,1% (creme) Acetonido de fluocinolona (creme) Prednicarbato (creme) Desonida (creme) Aceponato de metilprednisolona (creme)
<b>Grupo VI – Potência Leve</b> Fluorandrenolide (creme ou pomada) Hidrocortisona (pomada) Pivalato de flumetasona (creme ou pomada)
<b>Grupo VII - Leve</b> Hidrocortisona (creme) Dexametasona Prednisolona Metilprednisolona

Fonte: Carvalho *et al.* (2017).

O tempo de uso recomendado nas crises é até que ocorra melhora significativa da lesão e redução da sua espessura, para isto podem ser necessários de dias a semanas. O uso de corticosteroides na terapia proativa (aplicar duas vezes por semana em áreas de recorrência de lesão) mostrou-se eficiente em reduzir as crises, em diminuir a gravidade da doença e em reduzir a produção de IgE contra aeroalérgenos. Deste modo, pode ser uma opção para os pacientes com crises frequentes (CARVALHO *et al.*, 2017).

Os imunossupressores tópicos apresentam boa eficácia no controle da inflamação cutânea e com segurança para uso diário contínuo, apresentando menos efeitos adversos que os corticoides tópicos. Estão disponíveis para uso tópico dois inibidores de calcineurina: o pimecrolimo e o tacrolimo. No Brasil, o pimecrolimo pode ser indicado a partir dos três



meses de idade e com única apresentação em creme na concentração de 1%. O tacrolimo é indicado a partir dos dois anos de idade, com apresentações em pomada contendo 0,03% (uso pediátrico e face em adultos), e 0,1% (uso corporal em maiores de 16 anos) da droga. Ambos devem ser aplicados duas vezes ao dia e está indicada proteção solar (CARVALHO *et al.*, 2017).

A escolha entre os imunossuppressores e corticoides tópicos para terapia de manutenção depende da preferência do paciente/responsável, do acesso aos medicamentos (incluindo o custo), da localização da lesão (uso de corticoides tópicos em áreas da pele como a face e pálpebras deve ser evitado) e eficácia e tolerabilidade para cada paciente (EICHENFIELD *et al.*, 2015).

A terapia *wet-wrap* (com ou sem corticoides tópicos) pode reduzir a gravidade da doença, especialmente em casos moderados a graves, durante as exacerbações. O paciente ou o cuidador é instruído na aplicação de bandagens ou de gazes molhadas (embebidas em água morna, torcida até ficar ligeiramente úmida) sobre corticoide tópico ou emoliente, seguido por uma camada de material semelhante seca (nunca envoltório de plástico). Pode ser utilizada por várias horas e repetida durante vários dias até duas semanas. Deve-se tomar cuidado com a terapia, especialmente quando houver uso de medicação anti-inflamatória de potência média a alta (EICHENFIELD *et al.*, 2015).

Os anti-histamínicos orais podem ser utilizados em casos de prurido intenso; entretanto, na DA, sabe-se que a histamina não é seu único mediador causador. Portanto, sua eficácia é limitada. Em casos de infecção bacteriana, está indicada antibioticoterapia sistêmica (ROXO JUNIOR, 2011).

Em pacientes com DA grave, refratários ao tratamento tópico e com eventos adversos importantes aos corticoides, os imunossuppressores sistêmicos, como a Ciclosporina A (3-5 mg/kg/dia), são opções alternativas (ROXO JUNIOR, 2011).

Diversos ensaios clínicos controlados em curso ou publicados recentemente têm-se interessado nas novas terapias direcionadas. Até o momento, dois estudos controlados não mostraram efeitos clínicos do anticorpo monoclonal anti-IgE (omalizumabe), sugerindo que níveis altos de IgE são epifenômeno de DA, ou seja, estão relacionados às comorbidades, como alergia alimentar, asma e rinoconjuntivite, mas não somente pela ocorrência de DA (BRUNNER; GUTTMAN-YASSKY; LEUNG, 2017).

A IL-5, que atua especificamente sobre os eosinófilos, pode não desempenhar um papel na DA, visto que o mepolizumabe, um antagonista monoclonal da IL-5, não mostrou eficácia nos ensaios iniciais. Entretanto, mais estudos são necessários para definir a função da

IL-5 na DA, uma vez que os estudos iniciais tiveram apenas duas semanas de duração, o que pode ser um período de tempo demasiado curto para avaliar o efeito desta medicação (BRUNNER; GUTTMAN-YASSKY; LEUNG, 2017).

Por outro lado, o dupilumabe, um anticorpo anti-subunidade alfa do receptor da IL-4, que bloqueia IL-4 e IL-13, mostrou-se eficaz no controle de DA em pacientes com doença moderada a grave. Este biológico mostrou excelente segurança e eficácia em dois grandes estudos de fase III (SOLO1 e SOLO2) em 671 e 708 pacientes com DA moderada a grave, respectivamente (BRUNNER; GUTTMAN-YASSKY; LEUNG, 2017). Observou-se melhora significativa dos sintomas, incluindo prurido, ansiedade e depressão, além de um aumento na qualidade de vida. Atualmente, ele é aprovado para o tratamento de pacientes com 12 anos ou mais com dose inicial de 400 mg, através da administração subcutânea, seguida de 200 mg a cada 2 semanas em adolescentes (idade  $\geq 12$  a  $< 18$  anos) com peso corporal inicial menor que 60 kg, ou uma dose inicial de 600 mg seguida de 300 mg a cada 2 semanas em adolescentes com peso igual ou superior a 60 kg e adultos, portadores de DA moderada a grave inadequadamente controlada com terapias tópicas (SIMPSON *et al.*, 2019).

### **1.3 Probióticos e Dermatite atópica**

Os humanos e outros mamíferos são hospedeiros de uma diversidade de bactérias intestinais simbióticas e patogênicas; aproximadamente, 1.000 espécies microbianas residem no cólon. O conceito de probióticos, “[...] microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro”, remonta a mais de 100 anos (HILL *et al.*, 2014; AWASTHI *et al.*, 2016). Essa definição inclui uma ampla gama de micróbios e aplicações, enquanto captura a essência dos probióticos (microbiana, viável e benéfica à saúde). A distinção entre microorganismos comensais e probióticos também é inferida a partir dessa definição. Embora os comensais no intestino sejam frequentemente a fonte de cepas probióticas, até que essas cepas sejam isoladas, caracterizadas e um caso confiável apresentado por seus efeitos na saúde, elas não podem ser chamadas de 'probióticos' (HILL *et al.*, 2014).

Até o momento, vários estudos sobre probióticos têm revelado o potencial efeito benéfico dessas bactérias à saúde e, dessa forma, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou diretrizes permitindo o seu uso como suplemento nutricional (AWASTHI *et al.*, 2016).

Os probióticos têm ação imunomoduladora por exercerem efeitos estimulantes sobre o

sistema imunológico inato e adaptativo do intestino, melhorar as funções da barreira mucosa, induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias e facilitar a indução de tolerância (WEST; HAMMARSTRÖM; HERNELL, 2013).

Muitos ensaios clínicos avaliaram o papel dos probióticos na prevenção e sensibilização das doenças alérgicas e existem evidências convincentes sobre o seu efeito na DA no início da vida (AVERSHINA *et al.*, 2017). Vários estudos têm demonstrado uma clara ligação entre o desenvolvimento do sistema imunológico tolerante e a composição da microbiota intestinal (AWASTHI *et al.*, 2016).

Alguns trabalhos têm demonstrado que ratos “livres de germes” apresentam aumento da produção de IgE e diminuição da produção de interferon. Por outro lado, a colonização precoce com *Bifidobacterium infantis* induz tolerância oral a alérgenos alimentares comuns. A colonização microbiana secundária precoce em camundongos “livres de germes” favoreceu a ativação e expansão das células T reguladoras do cólon (EIGENMANN, 2013).

Em outro estudo realizado em murinos com DA, os probióticos promoveram a tolerância imunológica, por agirem sobre células dendríticas (DCs); estimularam o desenvolvimento de células T reguladoras (Treg) e/ou diminuíram a ativação de células Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub> e Th<sub>17</sub>. A ativação do *Toll-like receptor* (TLR) parece ser crucial para o efeito imunomodulador dos probióticos (SHIN; CHUNG; SEO, 2016).

Uma metanálise recente encontrou uma redução de 20-24% na incidência de DA entre crianças com suplementação materna com probióticos nos períodos pré e pós-natal. Crianças com pequena diversidade da microbiota intestinal durante o primeiro mês de vida têm um risco aumentado de desenvolver eczema. Em contrapartida, lactobacilos e bifidobactérias colonizam mais frequentemente o intestino de crianças suplementadas com probióticos ( $p < 0,001$ ) (BLATTNER *et al.*, 2016).

Recentemente, um análise da microbiota intestinal de pacientes com DA mostrou uma mudança de composição na subespécie *Faecalibacterium prausnitzii* que reduz a produção de butirato e propionato (SONG *et al.*, 2016). O butirato e o propionato são ácidos graxos de cadeia curta, de origem microbiana, com um papel anti-inflamatório. Além disso, o butirato tem demonstrado ser um participante fundamental na manutenção da integridade da barreira intestinal. Portanto, níveis reduzidos na microbiota produtora de butirato e propionato podem resultar em um estado pró-inflamatório no intestino e perda da integridade da barreira (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2018).

Esses e outros ensaios mostraram claramente que a microbiota pode ter um efeito protetor global na alergia (AVERSHINA *et al.*, 2017). Em janeiro de 2015, a WAO publicou

as “Diretrizes para a prevenção de doenças alérgicas: probióticos” e recomendou o uso de probióticos para gestantes e lactantes cujos filhos têm alto risco para o desenvolvimento de alergias, bem como para lactentes com alto risco de desenvolver alergias. No entanto, cada recomendação é baseada em evidências limitadas, sem nenhuma recomendação específica sobre a cepa, a dose ou a duração do tratamento (FIOCCHI *et al.*, 2015; BLATTNER, 2016). Em geral, a administração combinada (pré-natal e pós-natal) de probióticos é benéfica e os *Lactobacillus rhamnosus GG* e *Bifidobacterium* são os mais eficazes (BLATTNER, 2016).

A farmacocinética das bactérias comensais e a quantificação necessária para atingir a colonização intestinal até o momento não foi avaliada (AWASTHI, 2016). Embora sejam necessários mais estudos para estabelecer o momento e a dosagem adequados da terapia probiótica, a suplementação materna com *Lactobacillus rhamnosus GG*  $6 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por dia pode ser iniciado durante as últimas 4 semanas de gestação e continuada nos primeiros 6 meses, se aleitamento materno. A criança também deve receber probióticos diariamente nos primeiros 2 anos de vida (BLATTNER, 2016).

Para que os probióticos sejam considerados efetivos, alguns requisitos devem ser atingidos. A cepa deve ser segura, apresentar boa resistência ao ácido presente no estômago e à bile e ter benefícios comprovados clinicamente em seu hospedeiro (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2016).

Os micro-organismos são geralmente consumidos em alimentos fermentados e os gêneros mais comumente usados incluem *Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium*, também presentes na flora gastrointestinal e conhecidos por terem a capacidade de resistir a esse ambiente físico-químico (HENDAUS; JOMHA; EHLAYEL, 2016). Cada cepa de probiótico tem seus próprios benefícios específicos (KRAMER; HEATH, 2014).

*Lactobacillus rhamnosus* é uma bactéria gram-positiva encontrada em queijos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Tem sido relatado que esse micro-organismo, em altas concentrações (em cápsulas liofilizadas), apresenta efeitos positivos sobre a pele, principalmente na DA (ROUDSARI *et al.*, 2015).

*Lactobacillus acidophilus* é uma bactéria gram-positiva, que frequentemente habita o trato gastrintestinal e a vagina do ser humano (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

*Bifidobacterium lactis* foram descobertos nas fezes de lactentes amamentados, desempenhando papel fundamental na microbiota intestinal de seres humanos durante a vida

(FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

*Lactobacillus paracasei* é uma bactéria gram-positiva que habita o trato gastrintestinal humano, podendo ser encontrada, também, em leites fermentados, carnes e vegetais (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Em um estudo de coorte recente, a colonização precoce (desde o nascimento) com *L. paracasei* foi associada com um risco reduzido de eczema aos dois anos de idade (WEST; HAMMARSTRÖM; HERNELL, 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, muitos autores sugeriram uma associação entre uma perturbação da função da barreira intestinal e a origem da DA, mediada pela ativação imunológica, direcionada para uma inflamação dominante do tipo 2. Nesse aspecto, a microbiota intestinal poderia desempenhar um importante papel imunomodulador no desenvolvimento da tolerância imunológica normal (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2018).

A DA é uma doença multifatorial, mas a interação entre fatores genéticos e ambientais que conduz ao desenvolvimento da doença ainda não é totalmente compreendida (BJERRE *et al.*, 2017). Os probióticos têm sido estudados para o tratamento e prevenção de uma variedade de doenças na infância, incluindo DA (AWASTHI *et al.*, 2016). Dessa maneira, justifica-se a avaliação da resposta clínica e de parâmetros inflamatórios, de tolerância e de sensibilização em pacientes portadores de DA tratados com uma mistura de probióticos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo primário

Avaliar a eficácia clínica da mistura de probióticos (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) em crianças e adolescentes com DA, através do SCORAD.

#### 3.2 Objetivos secundários

Avaliar os efeitos da mistura de probióticos nos seguintes parâmetros laboratoriais:

- a) sensibilização: *prick* teste (teste cutâneo de leitura imediata) e IgE sérica total;
- b) inflamação: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ );
- c) tolerância imunológica: IL-10 e TGF- $\beta$ .

## 4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Modelo e População do Estudo

Trata-se de um ensaio clínico, duplo-cego, randomizado e controlado com placebo. ClinicalTrials.gov #NCT02519556.

Pacientes acompanhados nos Ambulatórios de Alergia Pediátrica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), de ambos os gêneros e de todas as classes sociais, foram convidados a participar do estudo.

Antes do início da pesquisa, todos os pacientes foram avaliados clinicamente quanto à gravidade, por meio do SCORAD, e laboratorialmente, pelos marcadores de sensibilização (IgE total e *prick* teste), de inflamação e de tolerância imunológica.

O SCORAD determinou o estrato de cada grupo (leve, moderado e grave), sendo realizada a randomização por blocos de quatro (04) em cada um desses grupos; assim, cada estrato tinha a mesma quantidade de pacientes recebendo placebo e probiótico.

Os participantes foram acompanhados durante o período de um ano, com início do recrutamento em 2015, sendo tratados durante os seis primeiros meses do estudo. Todos os participantes iniciaram seus tratamentos na mesma época (agosto de 2015), visto que a sazonalidade é um fator de influência sobre a DA. As avaliações clínicas ocorreram a cada trimestre e a coleta de sangue para análise laboratorial a cada semestre. O *prick* teste foi realizado novamente apenas ao final da pesquisa. As fases de inscrição e de randomização dos pacientes, bem como as avaliações periódicas, foram executadas sempre pela mesma médica avaliadora.

Os critérios de inclusão foram pacientes com idades entre seis meses e dezenove anos e diagnóstico clínico de DA, de acordo com os critérios de Hanifin e Rajka (1980).

Os critérios de não inclusão e exclusão consistiram da presença de doenças cutâneas, além da pertinente ao estudo, que interferissem nos resultados da pesquisa; uso de medicamentos, que poderiam interferir sistemicamente na evolução da doença, por pelo menos 30 dias; reação adversa grave atribuível ao probiótico; não fazer uso regular da medicação por, no mínimo, um mês contínuo; falta de comparecimento em mais de 50% das avaliações realizadas durante a pesquisa.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Processo HCRP 2367/2015). Todos os



responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Os adolescentes assinaram também o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.

Em todos os momentos do estudo, os participantes tiveram acesso aos pesquisadores responsáveis para quaisquer intercorrências.

## 4.2 Materiais e métodos

A medicação utilizada foi o Probiatop® (probiótico composto pela mistura de cepas: *Lactobacillus rhamnosus* HN001 -  $10^9$  UFC; *Lactobacillus acidophilus* NCFM -  $10^9$  UFC; *Lactobacillus paracasei* LCP-37 -  $10^9$ UFC e *Bifidobacterium lactis* HN019 -  $10^9$ UFC), na dose de 1 grama (sachê) ao dia. O placebo foi composto de maltodextrina, na mesma quantidade de pó em cada sachê, para assegurar a semelhança em todas as características. Os sachês apresentavam embalagens idênticas, apenas com identificação do grupo (A ou B), para assegurar o cegamento dos participantes e da avaliadora. Todos os pacientes foram orientados a diluir um sachê em 100 mL de água com temperatura natural e tomá-lo pela manhã, todos os dias. Um comitê externo, formado por três profissionais não envolvidos com o estudo, garantiu o monitoramento externo.

Todos os participantes submeteram-se às coletas de sangue periférico para as avaliações laboratoriais. O soro dos participantes foi obtido por meio do processo de centrifugação a 2.500 rpm, em temperatura de 4° C, durante 10 minutos. As amostras de soro foram armazenadas e congeladas a -80° C, até que todas as análises fossem realizadas. No final, placas de 96 poços foram recobertas e incubadas com anticorpo purificado anti-IL-17 (R&D System, Minneapolis, MN, EUA), anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-10, anti-TNF- $\alpha$  ou anti-TGF- $\beta$  (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA), seguindo-se as etapas do método *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), conforme orientação de cada fabricante.

As dosagens de IgE total foram realizadas por meio de um ensaio fluoroenzimático automatizado (*Phadia ImmunoCap System, Uppsala, Sweden*), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em kU/L e considerados elevados quando os valores eram superiores a 100 kU/L.

O *prick* teste foi realizado por meio da aplicação de extratos padronizados Greer® (Quadro 3) na superfície volar do antebraço, acompanhados de controles negativo (solução diluente) e positivo (histamina). O teste foi considerado positivo, quando se formava uma pápula maior que 3mm de diâmetro em relação ao controle negativo, após 20 minutos da

aplicação.

Quadro 3 Extratos utilizados para avaliação do *prick* teste

<b>Aeroalérgenos</b>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Dpt)	
	<i>Dermatophagoides farinae</i> (Df)	
	<i>Blomia tropicalis</i> (Bt)	
	<i>Blatella germanica</i> (Bg)	
	<i>Periplaneta americana</i> (Pa)	
	Epitélio de cão	
Epitélio de gato		
<b>Alérgenos alimentares</b>	Leite	Trigo
	Ovo	Amendoim
	Soja	Frutos do mar
		Peixe

### 4.3 Análise Estatística

A variável SCORAD foi representada na forma de porcentagem, de tal maneira que as observações dos tempos 3, 6, 9 e 12 meses foram divididas pelos valores em  $T_0$  e, após, multiplicadas por 100.

Para a análise dos dados, foram propostos modelos lineares de efeitos mistos simples (apenas uma variável independente) e múltiplos (duas ou mais variáveis independentes). Esse modelo foi utilizado por conter um efeito aleatório que contempla a dependência entre as medidas de um mesmo indivíduo ao longo do estudo.

A variável IgE total também foi considerada na forma de porcentagem. Ainda, devido à alta variabilidade, os dados foram transformados em logaritmos naturais. A análise estatística desse dado foi semelhante à realizada para o SCORAD.

Para se verificar a associação dos grupos de intervenção com o comportamento das citocinas e *prick* teste, foram propostos modelos de regressão log-binomiais, estimando-se riscos relativos brutos e ajustados, bem como seus intervalos de confiança 95%, para as categorias de melhora e piora.

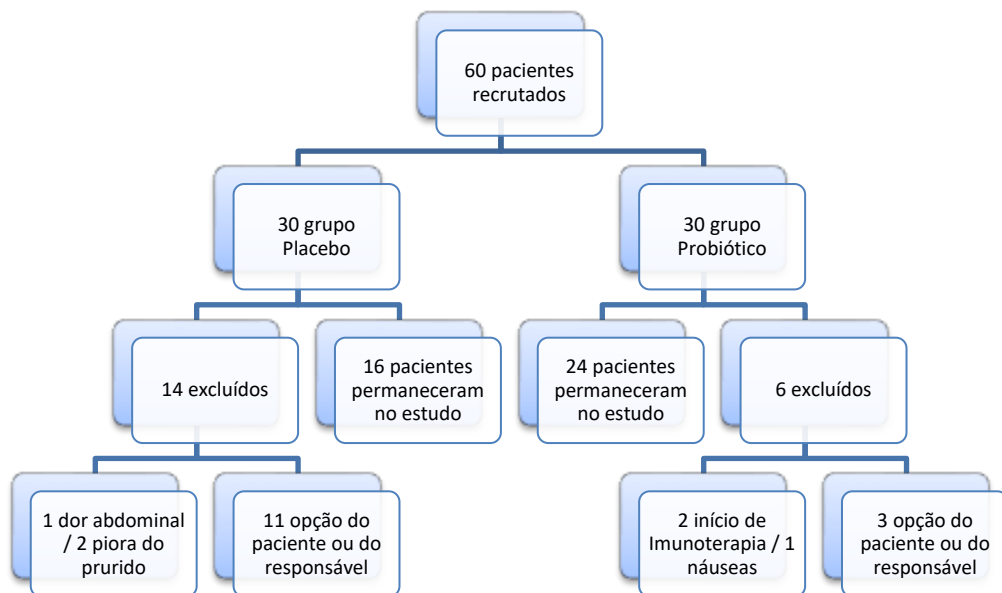
Todas as análises estatísticas utilizaram o software SAS 9.3.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Recrutamento, randomização e características demográficas dos participantes

O número de participantes em cada grupo foi calculado por uma expressão matemática, considerando-se um nível de significância  $\alpha = 0,05$  e um poder de 0,90, com determinação de 30 sujeitos em cada grupo. As etapas de recrutamento e randomização dos pacientes encontram-se na Figura 1.

Figura 1 Algoritmo da fase de recrutamento e randomização dos pacientes.



As características demográficas de cada grupo após o recrutamento e ao final da pesquisa estão apresentadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Apenas os dados dos pacientes que completaram o estudo foram analisados.

Tabela 1 Características demográficas dos participantes após recrutamento.

	Placebo	Probiótico
<b>Participantes</b>	30	30
<b>Gênero</b>		
Feminino	16	17
Masculino	14	13
<b>Faixa etária do início do estudo</b>		
Lactentes	2	0
2-6 anos	10	9
6-12 anos	12	13
Adolescentes	6	8
<b>Tipo de parto</b>		
Normal	9	13
Cesárea	21	17
<b>SCORAD inicial</b>		
Leve	13	14
Moderado	12	12
Grave	5	4

Tabela 2 Características demográficas dos participantes que completaram o estudo.

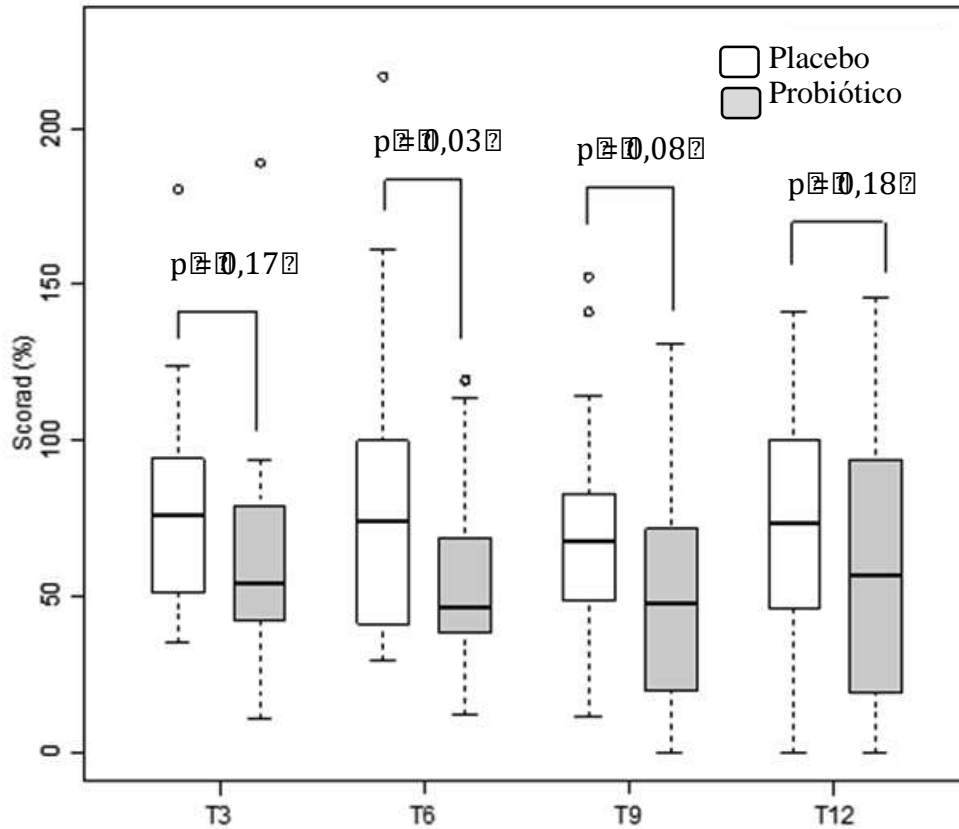
	Placebo	Probiótico
<b>Participantes</b>	16	24
<b>Gênero</b>		
Feminino	8	16
Masculino	8	8
<b>Faixa etária do início do estudo</b>		
Lactentes	0	0
2-6 anos	4	7
6-12 anos	9	10
Adolescentes	3	7
<b>Tipo de parto</b>		
Normal	5	11
Cesárea	11	13
<b>SCORAD inicial</b>		
Leve	7	12
Moderado	6	9
Grave	3	3

## 5.2 Avaliação clínica (SCORAD)

A análise estatística revelou uma resposta clínica significativa do grupo probiótico em relação ao grupo placebo após seis meses de tratamento, com relação à avaliação do SCORAD ( $p = 0,03$ ; IC 95%, 2,44-52,94), conforme demonstrado na Figura 2. Mesmo após o ajuste pelas covariáveis, este efeito se manteve ( $p = 0,02$ ; IC 95%, 5,52-59,13).

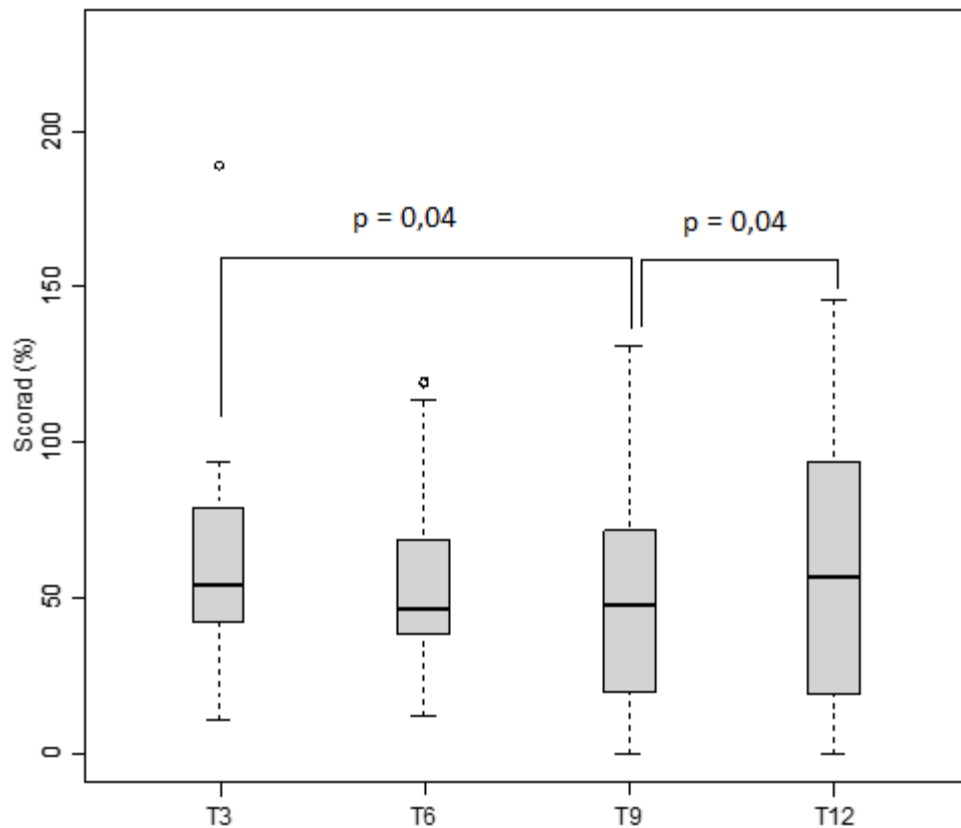
Consideraram-se covariáveis: idade, gênero, tipo de parto e medicações (hidratantes, anti-histamínicos, corticoides tópicos, imunossupressores tópicos, antileucotrienos).

Figura 2 Análise comparativa do efeito das suplementações sobre o SCORAD nos períodos avaliados.



Outro resultado relevante observado foi a manutenção da melhora no grupo probiótico após três meses da pausa (T9), quando realizado o ajuste pelas covariáveis ( $p = 0,04$ ; IC 95%, 0,78-27,70) – Figura 3. Quando comparadas as avaliações realizadas aos nove e doze meses de estudo, verificou-se uma piora do SCORAD, demonstrada por meio da Figura 3 ( $p = 0,04$ ; IC 95%, -28,71-0,68).

Figura 3 Análise comparativa do efeito do probiótico sobre o SCORAD entre os períodos avaliados, após ajuste pelas covariáveis.



### 5.3 Avaliação da sensibilização (IgE total e *prick* teste)

Com relação aos níveis séricos de IgE total, não houve diferenças significantivas entre os grupos (Tabela 3).

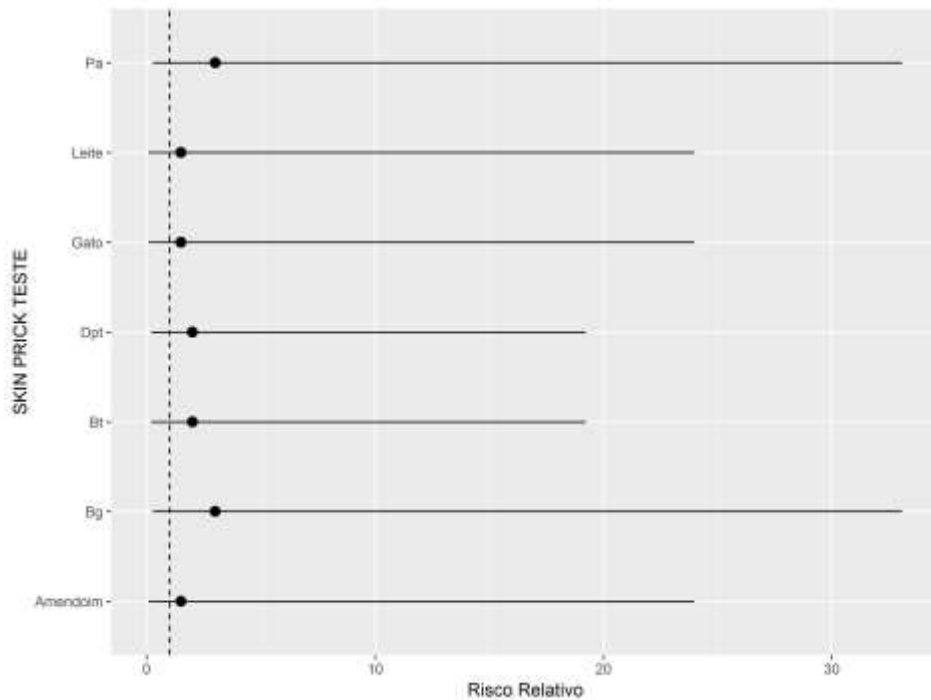
Tabela 3 Comparação do efeito Placebo (A) e Probiótico (B) sobre a IgE total.

Comparações	Modelo Simples			Modelo Ajustado		
	p	LI	LS	p	LI	LS
A6 - B6	0,93	-0,82	0,90	0,95	-0,88	0,82
A12 - B12	0,27	-0,38	1,33	0,33	-0,43	1,26

LI = Limite inferior. LS = Limite superior.

Com relação ao *prick* teste, não houve risco relativo com diferença estatística entre os grupos (Figura 4).

Figura 4 Comparação entre Placebo e Probiótico sobre o *prick* teste ao final do estudo (após seis meses sem utilizá-los).

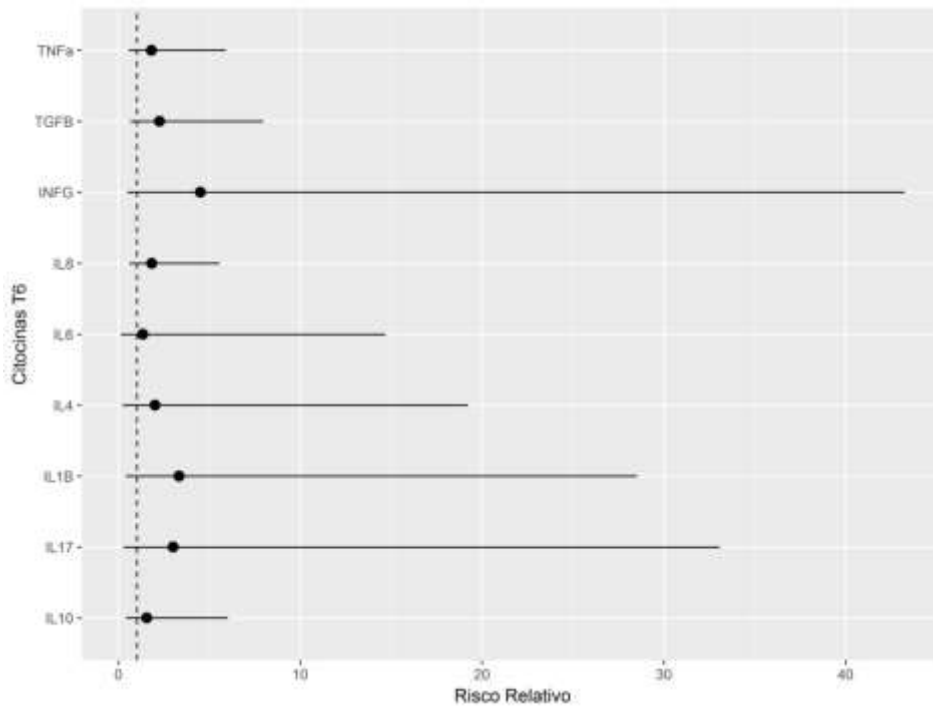


Bg = *Blatella germanica*. Bt = *Blomia tropicalis*. Dpt = *Dermatophagoides pteronyssinus*. Pa = *Periplaneta americana*. \*\*\* Os extratos que não constam na figura, em algum tempo da avaliação, não acometeram pacientes (n = 0).

#### 5.4 Avaliação da tolerância e inflamação (citocinas)

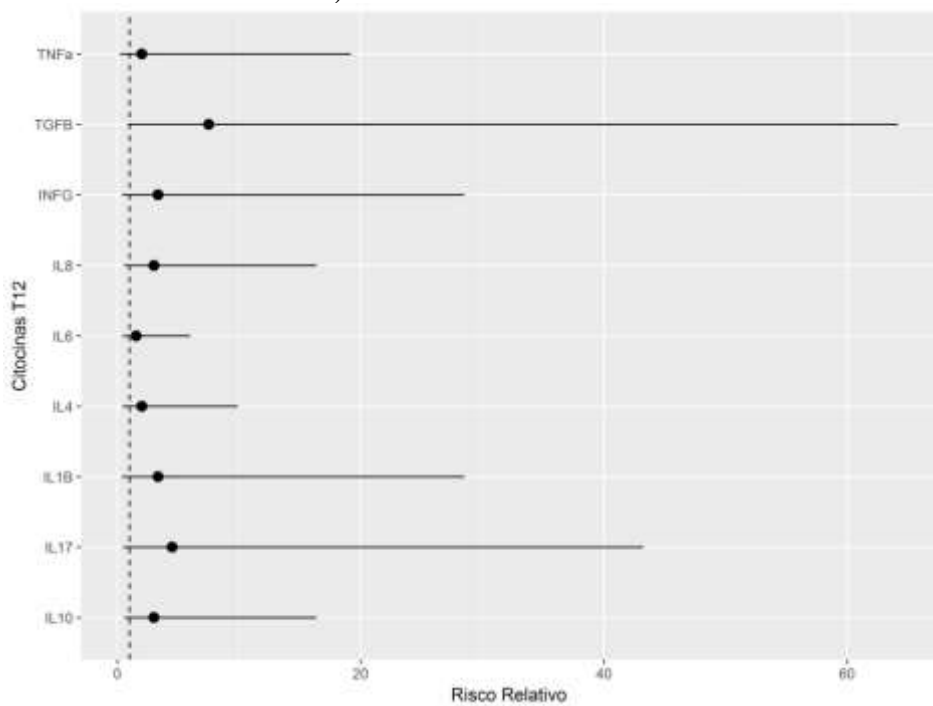
Com relação à avaliação das citocinas tolerogênicas e inflamatórias, a exemplo da sensibilização, não se observou riscos relativos com diferenças estatísticas entre os grupos (Figuras 5 e 6).

Figura 5 Comparação entre Placebo e Probiótico sobre as citocinas após seis meses de tratamento.



IFN = interferon. IL= interleucina. TGF = *transforming growth factor*. TNF = *tumor necrosis factor*.

Figura 6 Comparação entre Placebo e Probiótico sobre as citocinas ao final do estudo (após seis meses sem utilizá-los).



IFN = interferon. IL= interleucina. TGF = *transforming growth factor*. TNF = *tumor necrosis factor*.



## 6 DISCUSSÃO

Este estudo randomizado, duplo cego e controlado por placebo, avaliou a eficácia clínica e laboratorial de uma mistura de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*) no tratamento de DA em crianças e em adolescentes e evidenciou redução do SCORAD ( $p = 0,03$ ) quando comparado ao grupo placebo, após seis meses de uso da medicação, mesmo após análise ajustada ( $p = 0,02$ ). Não houve diferenças entre os grupos na avaliação de citocinas inflamatórias ou tolerogênicas, bem como em relação ao teste cutâneo e a IgE total. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo realizado no Brasil que tenha demonstrado benefício dos probióticos no tratamento de DA.

Embora no passado a DA fosse tradicionalmente considerada uma doença da infância e com potencial de remissão completa e definitiva em mais de 50% dos pacientes até os dez anos de idade, evidências epidemiológicas mais recentes têm mostrado que, uma vez iniciada, a doença pode persistir por toda a vida (BIEBER *et al.*, 2017). Atualmente, não há cura para a DA e, por isso, um interesse crescente no tema vem surgindo (RØ, *et al.*, 2017). O presente estudo avaliou um perfil etário semelhante ao que se espera para a doença (SAEKI *et al.*, 2017), com predomínio de crianças (75% dos pacientes), ratificando-se a necessidade de um tratamento acessível, seguro e eficaz para minimizar e/ou anular os possíveis efeitos da inflamação da pele a longo prazo.

Na infância, a maioria dos pacientes é diagnosticada como sendo portador de doença leve (EICHENFIELD *et al.*, 2015). Estudos anteriores sobre gravidade de DA observaram que 67,9 a 86,1% dos pacientes apresentavam formas leves em pesquisas comunitárias, ao passo que a prevalência de doença leve nos estudos hospitalares era de 32,7% (KIM *et al.*, 2016). Em um estudo prospectivo de quatro anos, Kim *et al.* (2016) encontraram a presença de quadros leves em 70% das crianças com DA na população estudada. No presente estudo, verificou-se a predominância de quadros leves (47,5% dos sujeitos), embora uma porcentagem significativa de pacientes com doença moderada (37,5%) tenha sido observada. Possivelmente, isto se deva ao fato de o estudo ter sido conduzido em hospital terciário. Por outro lado, a menor porcentagem de pacientes graves (15%), mesmo em se tratando de hospital terciário, provavelmente se deve aos critérios de exclusão do estudo, visto que, geralmente, essa categoria de pacientes utiliza medicações imunossupressoras, realiza imunoterapia ou tratamentos que interferem na imunomodulação sistêmica.

Nas últimas quatro décadas, tem-se notado um aumento significativo na prevalência de DA em países desenvolvidos (AVERSHINA *et al.*, 2017), fato que tem sido correlacionado à higiene excessiva que acompanha o estilo de vida ocidental, reduzindo a exposição do sistema imunológico do hospedeiro aos micróbios (HUANG *et al.*, 2017). A quantidade e a qualidade da população de germes comensais no intestino humano durante o período neonatal são moldadas pelas exposições na vida intrauterina e, possivelmente, intraparto (MUIR *et al.*, 2016). Jakobsson *et al.* (2014) mostraram que crianças nascidas por parto cesariano têm uma redução da diversidade do filo *Bacteroides*. A esterilização relacionada ao procedimento cirúrgico e a falta de exposição à microbiota vaginal materna têm sido responsabilizadas por esta diminuição da colonização (MUIR *et al.*, 2016). No presente estudo, houve maior quantidade de crianças nascidas de parto cesáreo (60%), sinalizando um possível fator de influência na predisposição à DA, embora a flora intestinal dessas crianças não tenha sido avaliada.

Há evidências crescentes de que as comunidades microbianas residentes no hospedeiro contribuem para a sua saúde. A ligação da microbiota à resposta imunológica aumenta o conhecimento de que o microbioma desempenhe um papel importante no desenvolvimento e nas manifestações de doenças alérgicas (HUANG *et al.*, 2017). Vários ensaios têm avaliado a eficácia dos probióticos na prevenção de DA. Por outro lado, as evidências que suportam a utilização de probióticos para tratamento desta doença são menos robustas do que para prevenção (BLATTNER *et al.*, 2016).

Han *et al.* (2012) realizaram um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo e investigaram os efeitos do uso de *Lactobacillus plantarum* CJLP133 nos sintomas de DA. O estudo foi realizado por um período de doze semanas, avaliando crianças entre um e doze anos de idade. Verificou-se melhora no SCORAD, com diminuição de IFN- $\gamma$ , IL-4 e do número de eosinófilos. Wang *et al.* (2015) avaliaram, em estudo randomizado duplo-cego, o uso de *Lactobacillus paracasei* isolado, *Lactobacillus fermentum* isolado e a associação das duas cepas e observaram que o SCORAD foi menor nos grupos que receberam probióticos, comparativamente ao grupo placebo, quatro meses após a descontinuação do tratamento probiótico. Kim *et al.* (2014) realizaram uma metanálise de 25 ensaios clínicos randomizados (n = 1.599 pacientes) para determinar a eficácia dos probióticos no tratamento de DA, com o objetivo primário de avaliar a diferença na pontuação do SCORAD, apresentando resultado favorável ao uso de probióticos em crianças de um a dezoito anos de idade, mas nenhum efeito em lactentes menores que um ano.

Recentemente, Navarro-Lopez *et al.* (2018) publicaram um ensaio clínico, duplo

cego, placebo controlado, realizado com crianças e adolescentes entre 4 e 17 anos de idade e portadores de dermatite atópica moderada. Os pacientes foram suplementados diariamente com uma mistura de probióticos: *Bifidobacterium lactis* CECT 8145, *B longum* CECT 7347, e *Lactobacillus casei* CECT 9104 por 12 semanas e apresentaram redução no índice do SCORAD e no uso de corticoesteroides tópicos.

O presente estudo apresentou concordância com a metanálise de Kim *et al.* (2014) e com os demais estudos duplo-cegos controlados com placebo supracitados, tendo encontrado diferença significativa no SCORAD após seis meses de suplementação de uma mistura de probióticos (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), em comparação com o grupo placebo. Observou-se, ainda, manutenção da queda do SCORAD após nove meses do início do estudo em relação à avaliação clínica aos três meses, sugerindo um efeito benéfico de curto prazo após a pausa da suplementação (que ocorreu após seis meses de uso). É possível que esse efeito não se tenha estendido ao final do estudo, devido à pausa do uso da medicação precocemente e pela própria microbiota de cada paciente já se ter desenvolvido por diversos fatores relacionados com o hospedeiro e externos. Alguns estudos demonstram que, por volta dos três anos de idade, a composição da comunidade microbiana assemelha-se mais com a do adulto (PINTO, 2016); os participantes do nosso estudo eram crianças e adolescentes, ou seja, já possuíam uma microbiota estabelecida.

Outro aspecto interessante observado foi que no grupo probiótico, apesar da redução do SCORAD constatada para todos os participantes, alguns pacientes apresentaram melhora significativa em comparação a outros. Avershina *et al.* (2017) analisaram as amostras fecais de crianças de dois anos de idade, cujas mães foram submetidas a suplementação com probióticos durante a gestação e observaram uma redução de 40% na incidência de DA nesse grupo de crianças. Os autores verificaram que as crianças atópicas que não responderam à intervenção apresentaram uma microbiota desviante ( $p = 0,028$ ), com níveis elevados ( $> 10\%$ ) de *Bifidobacterium dentium* ( $p = 0,039$ ). Em contrapartida, o grupo que respondeu à intervenção probiótica apresentou microbiota intestinal comparável à de crianças não atópicas, concluindo que os possíveis efeitos da intervenção dependem da microbiota intrínseca. Esse recente estudo poderia justificar a diversidade de resposta ao tratamento observada em nossos pacientes. Ensaio futuros que analisem a microbiota fecal ajudarão a elucidar esta hipótese plausível.

Duas principais vias biológicas estão envolvidas na DA: disfunção epitelial epidérmica e alteração da resposta imune inata / adaptativa (HUANG *et al.*, 2017). Considera-se que células T *helper* são particularmente importantes na inflamação da doença, determinando o

grau e direção da resposta imune. As células TCD4<sup>+</sup> exercem sua ação principalmente pela ativação e recrutamento de outros tipos celulares, interferindo na relação Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>. As células T reguladoras (Treg) são essenciais para limitar a resposta imunoinflamatória excessiva; quantidade reduzida de Treg no início da vida é um fator de risco para o desenvolvimento posterior de DA (RØ, *et al.*, 2017).

Na fase aguda da DA, o processo inflamatório é deflagrado por meio da resposta imune mediada por células Th<sub>2</sub>. Durante a fase crônica da doença, ocorre mudança para a resposta imune mediada por células Th<sub>1</sub>. Além das respostas celulares Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>, evidências sugerem o envolvimento de células Th<sub>17</sub> na patogênese de DA (SAEKI *et al.*, 2017).

As bactérias probióticas têm a capacidade de modificar o equilíbrio de células T *helper* por meio dos seus efeitos sobre as células dendríticas (RØ, *et al.*, 2017). Estudos mostram que os probióticos exercem inibição sobre a maturação das células dendríticas e, portanto, diminuem a capacidade de diferenciação das células T naive em células Th<sub>2</sub> (KWON, H. K. *et al.*, 2010; WEISS *et al.*, 2011). Kim *et al.* (KIM *et al.*, 2013<sub>1</sub>; KIM *et al.*, 2013<sub>2</sub>) confirmaram a participação dos probióticos sobre as células dendríticas, no sentido de reduzir a expressão da doença alérgica em camundongos. Recentemente, Holowacz *et al.* (2018) observaram que o tratamento com uma mistura de probióticos limitou significativamente a indução da inflamação crônica da pele em ratos; verificou-se uma diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-22) e aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias (tolerogênicas), como a IL-10.

Todavia, existem resultados conflitantes quanto aos efeitos dos probióticos entre os subgrupos de células T em crianças (RØ, *et al.*, 2017). Alguns estudos relataram inclinação para um perfil Th<sub>1</sub> com aumento da produção de interferon gama (IFN $\gamma$ ), enquanto outros não observaram qualquer efeito sobre o equilíbrio Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> ou Treg (RØ, *et al.*, 2017). Yeşilova *et al.* (2012) realizaram um ensaio clínico duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, avaliando o efeito de uma combinação de probióticos (*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus salivarius*) por oito semanas no tratamento de DA em crianças com idades entre um e treze anos. Eles concluíram que os probióticos foram eficazes na redução do SCORAD, das citocinas IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$  e nos níveis séricos de IgE total, mas não ocorreu redução de IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  e IL-10. Ludwing *et al.* (2018) verificaram que os mediadores solúveis de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LSM) não alteraram o número das células dendríticas ou o estado de maturação das mesmas, em doadores saudáveis; no entanto, essas células cultivadas demonstraram capacidade de induzir a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 nas células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

O presente estudo não mostrou diferenças entre a ação dos probióticos e do placebo sobre as citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17 e TNF- $\alpha$ ) e as tolerogênicas (IL-10 e TGF- $\beta$ ), assim como não houve diferença estatística entre os níveis séricos de IgE total e nas avaliações do *prick* teste. Apesar de não ter sido realizado cultura celular, a investigação por citocinas englobou um painel com todas as possíveis respostas (Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub>, Th<sub>17</sub> e Treg) e, dessa forma, podemos inferir que não houve influência dos probióticos sobre os subtipos celulares. Questionamos algumas possíveis razões para esses resultados. A dose de probióticos utilizada por Yeşilova *et al.* (2012) foi maior que a dose utilizada em nosso estudo (2g x 1g). Além disso, no presente estudo, a análise das citocinas foi realizada no soro dos pacientes, enquanto, nos ensaios citados, as citocinas foram analisadas no plasma. Entretanto, a escassez de estudos com análise de citocinas em humanos com DA que foram tratados com probióticos não permite mais conclusões sobre outros possíveis fatores de influência em nossos resultados.

Da mesma forma que as citocinas, os grupos probióticos e placebo não diferiram quanto à ação sobre os níveis séricos de IgE ou os resultados de *prick* teste. Não foram encontrados estudos recentes que avaliassem os níveis de IgE e/ou *prick* teste em pacientes com DA tratados com probióticos.

Probióticos são conhecidos por sua segurança (AWASTHI *et al.*, 2016), principalmente quando utilizados lactobacilos e bifidobactérias (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). Diarreia, vômitos e aumento de flatulência são os efeitos adversos mais frequentemente descritos (AWASTHI *et al.*, 2016). Entretanto, não existe risco zero, particularmente no contexto de certas formas de susceptibilidade ao hospedeiro. As infecções invasivas foram observadas em indivíduos adultos imunocomprometidos, já em lactentes e crianças são extremamente raras. Como com outras formas de terapêutica, os potenciais benefícios da suplementação devem ser pesados contra o risco (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). No presente estudo, não foram observadas, durante o período de um ano no qual os pacientes foram acompanhados, intercorrências no grupo que utilizou a mistura de probióticos. Além disso, pacientes com imunodeficiência não foram incluídos.

As limitações do estudo incluem pequeno tamanho amostral e dificuldade de adesão pelos pacientes. É possível que estes dados estejam intimamente correlacionados, devido às faixas etárias dos participantes: crianças e adolescentes. Estudos com esse perfil de idade são, frequentemente, acompanhados por questionamento e por insegurança parental quanto à necessidade de submeter um filho (a) ao experimento e à importância pessoal e comunitária dessa participação. Além disso, por se tratar de uma medicação oral, a aceitação infantil,

principalmente entre os mais novos, é mais difícil. Diante dessas dificuldades, observa-se que o número de ensaios clínicos com crianças é bem inferior aos realizados com as demais faixas etárias.

O campo sobre o tratamento das doenças alérgicas com probióticos, especificamente a DA, permanece um desafio. Mais estudos sobre o mecanismo imunológico, bem como a análise da microbiota intestinal na vigência dessa terapia, auxiliarão no entendimento da patogênese de DA e na elucidação dos questionamentos que permeiam as controvérsias entre os resultados dos estudos, contribuindo com o desenvolvimento de terapias alternativas.

## CONCLUSÕES

1. A mistura de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*) utilizada por seis meses em crianças e adolescentes com dermatite atópica foi eficaz na redução do SCORAD, o que se manteve por três meses após a interrupção do tratamento.

2. A mistura de probióticos não teve efeito sobre a sensibilização (*prick* teste e IgE sérica total), sobre os mediadores inflamatórios (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17 e TNF- $\alpha$ ) e sobre os mediadores tolerogênicos (IL-10 e TGF- $\beta$ ).

## 8 REFERÊNCIAS

- ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023, de 21.11.2018**. Informação e documentação, trabalhos acadêmicos, apresentação. Rio de Janeiro, 2018.
- ANTUNES, A. A. *et al.* Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte I: abordagem etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Arq Asma Alerg Imunol.**, v. 1, n. 2, p. 131-156, 2017.
- ARROYAVE, W. D. *et al.* Impermeable dust mite covers in the primary and tertiary prevention of allergic disease: a meta-analysis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 112, n. 3, p. 237-248, 2014.
- AVERSHINA, E. *et al.* Effect of probiotics in prevention of atopic dermatitis is dependent on the intrinsic microbiota at early infancy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 4, p. 1399-1402, 2017.
- AWASTHI, S. *et al.* Dietary supplementation with *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (*B. infantis*) in healthy breastfed infants: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 17, n. 1, p. 340, 2016.
- BIEBER, T. *et al.* Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? **J Allergy Clin Immunol.**, v. 139, n. 4, p. S58-64, 2017.
- BJERRE, R. D. *et al.* The role of the skin microbiome in atopic dermatitis: a systematic review. **Br J Dermatol.**, v. 177, n. 5, p. 1.272-1278, 2017.
- BLATTNER, C. M. *et al.* Update: Do probiotics prevent or treat pediatric atopic dermatitis? **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 27, n. 4, p. 425-438, 2016.
- BRUNNER, P. M.; GUTTMAN-YASSKY, E; LEUNG, D. Y. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. **J Allergy Clin Immunol**, v. 139, n. 4, p. S65-76, 2017.
- CARVALHO, V. O. *et al.* Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte II: abordagem terapêutica. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Arq Asma Alerg Imunol.**, v. 1, n. 2, p. 157-182, 2017.
- CUELLO-GARCIA, C. A. *et al.* Probiotics for the prevention of allergy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Allergy Clin Immunol**, v. 136, n. 4, p. 952-961, 2015.
- DRISLANE, C.; IRVINE, A. D. The role of filaggrin in atopic dermatitis and allergic disease. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**. 2019 Oct 14. doi:10.1016/j.anai.2019.10.008. [Epub ahead of print]
- EICHENFIELD, L.F. *et al.* Translating atopic dermatitis management guidelines into practice for primary care providers. **Pediatrics**, v. 136, n. 3, p. 554-565, 2015.
- EIGENMANN, P. A. Evidence of preventive effect of probiotics and prebiotics for infantile



eczema. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 13, n. 4, p. 426-431, 2013.

FIOCCHI, A. *et al.* World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. **World Allergy Organization Journal**, v. 8, n. 1, p. 4, 2015.

FLOHR, C; MANN, J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. **Allergy**, v. 69, n. 1, p. 3-16, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **Report**. Cordoba, 2001.

HAN, Y. *et al.* A randomized trial of *Lactobacillus plantarum* CJLP133 for the treatment of atopic dermatitis. **Pediatr. Allergy Immunol.** v. 23, n. 7, p. 667-673, 2012.

HANIFIN, J. M.; RAJKA, G. Diagnostic features of atopic dermatitis. **Acta Dermatovener (Stockh)**, v. 92, p. 44-47, 1980.

HENDAUS, M. A.; JOMHA, F. A.; EHLAYEL, M. Allergic diseases among children: nutritional prevention and intervention. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 12, p. 361-372, 2016.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 11, p. 506–514, 2014.

HOLLOWACZ, S. *et al.* A mixture of five bacterial strains attenuates skin inflammation in mice. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, 2018.

HUANG, Y. J. *et al.* The microbiome in allergic disease: Current understanding and future opportunities – 2017 PRACTALL document of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.**, v. 139, n. 4, p. 1099-1110, 2017.

JAKOBSSON, H. E. *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonization and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. **Gut**, v. 63, n. 4, p. 559-566, 2014.

KIM, H. J. *et al.* Clinical efficacy and mechanism of probiotics in allergic diseases. **Korean J. Pediatr.**, v. 56, n. 9, p. 369-376, 2013<sub>a</sub>.

KIM, H. J. *et al.* Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on asthma with an adoptive transfer of dendritic cells in mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 115, n. 3, p. 872-879, 2013<sub>b</sub>.

KIM, S. O. *et al.* Effects of probiotics for the treatment of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 113, n. 2, p. 217-226, 2014.

KIM, Y. J. *et al.* Four years prospective study of natural history of atopic dermatitis aged 7~8

years at an individual level: A community-based survey by Dermatologists skin examination in childhood. **Ann Dermatol**, v. 28, n. 6, p. 684-689, 2016.

KRAMER, M. F.; HEATH, M. D. Probiotics in the treatment of chronic rhinoconjunctivitis and chronic rhinosinusitis. **J Allergy (Cairo)**, v. 2014, abr. 2014.

KWON, H. K. *et al.* Generation of regulatory dendritic cells and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 5, p. 2159-2164, 2010.

LEONARDI, S. *et al.* IgE values and T-lymphocyte subsets in children with atopic eczema/dermatitis syndrome. **Allergy Asthma Proc**, v. 28, n. 5, p. 529-534, 2007.

LUDWIG, I. S. *et al.* Lactobacillus rhamnosus gg-derived soluble mediators modulate adaptive immune cells. **Front. Immunol.**, v. 9, artigo 1546, 2018.

MUIR, A. B. *et al.* Microbiome and its impact on gastrointestinal atopy. **Allergy**, v. 71, n. 9, p. 1256-1263, 2016.

NAVARRO-LÓPEZ, V. *et al.* Effect of oral administration of a mixture of probiotic strains on Scord index and use of topical steroids in young patients with moderate atopic dermatitis: A randomized clinical trial. **JAMA Dermatol.**, v. 154, n. 1, p. 37-43, 2018.

PINTO, M. C. **Homeostase da microbiota intestinal: saúde ou doença no homem.** 2016. 29 p. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

POWERS, C. E. *et al.* Microbiome and pediatric atopic dermatitis. **Journal of Dermatology**, v. 42, n. 12, p. 1137-1142, 2015.

RØ, A. D. B. *et al.* Reduced Th22 cell proportion and prevention of atopic dermatitis in infants following maternal probiotic supplementation. **Clin Exp Allergy**, v. 47, n. 8, p. 1014-1021, 2017.

ROUDSARI, M. R. *et al.* Health effects of probiotics on the skin. **Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 9, p. 1219-1240, 2015.

ROXO-JÚNIOR, P. Dermatite atópica. In: ROXO-JÚNIOR, P. **Alergia e imunodeficiência em pediatria: abordagem prática.** Ribeirão Preto: Tecmedd, 2006. p. 23-41.

ROXO-JÚNIOR, P. Dermatite atópica. In: ROXO-JÚNIOR, P. **Diagnóstico e tratamento de doenças alérgicas em pediatria.** São Paulo: Ed. Atheneu, 2011. p. 17-40. ISBN 978-85-388-0234-1.

SAEKI, H. *et al.* Efficacy and safety of ustekinumab in Japanese patients with severe atopic dermatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. **Br J Dermatol.**, v. 117, n. 2, p. 419-427, 2017.

SIMPSON, E. L. *et al.* Efficacy and safety of Dupilumab in adolescents with uncontrolled moderate to severe Atopic Dermatitis. A phase 3 randomized clinical trial. **JAMA Dermatology** 2019 Nov 6. doi:10.1001/jamadermatol.2019.3336. [Epub ahead of print]

- SHIN, J. H.; CHUNG, M. J.; SEO, J. G. A multistrain probiotic formulation attenuates skin symptoms of atopic dermatitis in a mouse model through the generation of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells. **Food Nutr Res.**, v. 60, 2016.
- SONG, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 137, n. 3, p. 852-860, 2016.
- VAN ZUUREN, E. J.; FEDOROWICZ, Z; ARENTS, B. W. M. Emollients and moisturizers for eczema: abridged Cochrane systematic review including grade assessments. **Br J Dermatol.**, v. 177, n. 5, p. 1256-1271, 2017.
- VANDENPLAS, Y; HUYS, G; DAUBE, G. Probiotics: an update. **J Pediatr (Rio de Janeiro)**, v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.
- WANG, I. J.; WANG, J. Y. Children with atopic dermatitis show clinical improvement after *Lactobacillus* exposure. **Clin. Exp. Allergy.** v. 45, n. 4, p. 779-787, 2015.
- WEISS, G. *et al.* Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon- $\beta$  profiles in dendritic cells. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 520-530, 2011.
- WEST, C. E.; HAMMARSTRÖM, M. L.; HERNELL, O. Probiotics in primary prevention of allergic disease – follow-up at 8–9 years of age. **Allergy**, v. 68, n. 8, p. 1015-1020, 2013.
- WOLLENBERG, A; FEICHTNER, K. Atopic dermatitis and skin allergies. **Allergy**, v. 68, n.12, p. 1509-1519, 2013.
- YEŞİLOVA, Y. *et al.* Effect of probiotics on the treatment of children with atopic dermatitis. **Ann Dermatol.**, v. 24, n. 2, p. 189-193, 2012.
- ZUCOTTI, G. *et al.* Probiotics for prevention of atopic diseases in infants: systematic review and meta-analysis. **Allergy**, v. 70, n. 11, p. 1356-1371, 2015.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Você e a criança pela qual é responsável estão sendo convidados a participar da pesquisa ESTUDO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO CONTROLADO SOBRE EFICÁCIA DE PROBIÓTICOS COMBINADOS NO TRATAMENTO DA DERMATITE ATÓPICA EM CRIANÇAS ACIMA DE 6 MESES DE VIDA. O objetivo desta pesquisa é avaliar a capacidade dos probióticos no tratamento de dermatite atópica em crianças.

O trabalho consiste em verificar se o uso do medicamento melhora o controle da doença com o tratamento convencional. Para isso, será necessário comparar os efeitos desse medicamento com um medicamento que não tem nenhum efeito, chamado de placebo. Seu filho (a) será orientado (a) a usar o medicamento regularmente, sempre pela via oral (por boca), 1 vez ao dia (diluído em 100ml de água), durante 6 (seis) meses, mas nem você nem o pesquisador saberão se está usando o medicamento verdadeiro ou o sem efeito. Isso somente será revelado no final do estudo. O tratamento que seu filho (a) irá receber será decidido com base em uma espécie de sorteio, totalmente ao acaso, e você não saberá qual tratamento está usando para não influenciar os resultados. Seu filho (a) será avaliado durante 1 ano, a cada 3 meses, por meio de um exame clínico de avaliação médica da dermatite atópica, com duração de 10 minutos. Além disso, a cada 6 meses (no total de 3 vezes) será feita coleta de sangue para realização dos exames que avaliarão a sensibilização para alergia e o processo inflamatório do seu filho (a); será também realizado o Prick teste (teste no qual por meio de uma lanceta descartável de metal será introduzido na pele superficial, por meio de uma leve picada, treze substâncias – uma por vez – que avaliarão a sensibilização para alergia). O volume de sangue coletado será de 5mL (o que equivale à 1 colher de chá) por meio de uma picada de agulha na veia, o que pode doer um pouco e pode deixar uma marca roxa no braço. A coleta de sangue dura menos de 5 minutos. O Prick teste, por utilizar uma lanceta de metal, pode causar um pouco dor e, até mesmo, arranhar a pele; as substâncias usadas podem causar coceira, caso seu filho (a) seja alérgico (a) a elas, e vermelhidão apenas no local. Reações graves são muito raras (como, placas avermelhadas e inchaço de todo o corpo, falta de ar e queda de pressão). O Prick teste dura, aproximadamente, 20 minutos. Todo o material utilizado é descartável, por isso seu filho (a) não corre risco de ser contaminado com nada. Todos os procedimentos acima serão realizados no mesmo dia da sua consulta de retorno. Esses procedimentos deverão durar cerca de 40 minutos no total.

Ao final do tempo estipulado de tratamento, seu filho (a) irá parar de usar o medicamento até que possamos terminar o estudo e concluir se ele realmente funciona ou não. Se os resultados mostrarem que o medicamento é eficaz e seguro, seu filho (a) poderá voltar a usar o medicamento, se for necessário e se quiser, ou começar a usá-lo caso ele tenha participado do grupo que recebia o medicamento placebo, se for necessário e se quiser.

Seu filho (a) não correrá nenhum risco de sua doença piorar por causa do uso do medicamento, caso ele seja sorteado para usá-lo, ou do placebo, já que o tratamento não será modificado. Há diversos estudos que confirmam a segurança do uso desse medicamento, bem como o reconhecimento da segurança desse tipo de medicamento pela Organização Mundial de Saúde, e ele é aprovado no Brasil pela ANVISA, mas mesmo assim existe a pequena possibilidade de seu filho (a) ter alergia ao medicamento (como, por exemplo, placas avermelhadas pelo corpo e inchaço de algumas partes, como boca, olhos e orelhas) e também do surgimento de efeitos colaterais (diarreia, sensação de estufamento na barriga, gases). Nesses casos, o pesquisador responsável, cuja formação é médica, deverá ser contatado

imediatamente para avaliar o seu filho (a) e efetuar as orientações cabíveis para o tratamento destas intercorrências, como por exemplo as medicações a serem tomadas a depender do caso (algumas medicações – antialérgicos, protetores gástricos e analgésicos – já serão prescritas no início da pesquisa); caso necessário, este mesmo pesquisador realizará a internação hospitalar no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, visto que seu filho (a) é paciente do Ambulatório de Alergia deste hospital, e o acompanhará diariamente até a resolução da intercorrência. Caso ocorram danos decorrentes da pesquisa, será avaliada uma forma de indenizar o paciente conforme as leis vigentes no país.

Essas informações serão muito importantes para conhecermos melhor os efeitos desta medicação no tratamento da dermatite atópica.

Mesmo após o término da pesquisa, seu filho (a) continuará o acompanhamento no Ambulatório de Alergia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, no qual já realiza.

A participação do seu filho (a) será voluntária e você tem o direito de recusar que ele (a) participe desse estudo ou mesmo pare de participar em qualquer momento que desejar, sem que isso prejudique a continuidade do atendimento de seu filho (a), ou sofra qualquer tipo de advertência ou retaliação.

Em nenhum momento durante a realização do estudo, ou durante a divulgação dos resultados do estudo, a identidade de seu filho (a) será revelada.

De acordo com a resolução 466/12, não está prevista nenhuma forma de compensação, remuneração ou ressarcimento das despesas decorrentes da participação do seu filho (a) na pesquisa (como, por exemplo: transporte e alimentação).

Os resultados deste estudo serão divulgados independente de suas conclusões a favor ou contra o uso do medicamento.

Você receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas por você responsável e pelo pesquisador; nos casos em que o participante é um adolescente, este receberá uma via do Termo de Assentimento, também assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador.

Você poderá solicitar, a qualquer momento, esclarecimentos adicionais sobre a participação do seu filho (a) no estudo ou sobre o tratamento utilizado. Caso haja alguma dúvida quanto às questões éticas, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (16) 3602-2228 encontra-se disponível. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, durante ou após a participação no estudo, você ou qualquer membro de sua família poderá contatar os responsáveis pelo estudo, pessoalmente ou por telefone.

Responsáveis pelo estudo:

Paula D. St. M. De Albuquerque – telefone (16) 3602-2424 e celular (16) 98132-9192 – e-mail: paula\_albuquerque@usp.br

Prof Dr. Pérsio Roxo Júnior – telefone (16) 3602-1000. Departamento de Puericultura e Pediatria, Hospital das Clínicas – 7º andar.

Participante: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Responsável pelo participante: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa ESTUDO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO CONTROLADO SOBRE EFICÁCIA DE PROBIÓTICOS COMBINADOS NO TRATAMENTO DA DERMATITE ATÓPICA EM CRIANÇAS ACIMA DE 6 MESES DE VIDA. Seus pais permitiram que você participe.

O trabalho consiste em verificar se o uso do medicamento melhora o controle da sua doença com o tratamento convencional. Para isso, será necessário comparar os efeitos desse medicamento com um medicamento que não tem nenhum efeito, chamado placebo.

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm entre 6 meses e 18 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser; é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

Você será orientado (a) a usar o medicamento todos os dias, sempre por boca, 1 vez ao dia (diluído em 100ml de água), durante 6 (seis) meses, mas nem você nem o pesquisador saberão se está usando o medicamento verdadeiro ou o sem efeito. Isso somente será revelado no final do estudo. O tratamento que seu você receberá será decidido com base em uma espécie de sorteio, totalmente ao acaso, e você não saberá qual tratamento está usando para não influenciar os resultados.

Você será avaliado durante 1 ano, a cada 3 meses, por meio de um exame médico da dermatite atópica, com duração de 10 minutos. Além disso, a cada 6 meses (no total de 3 vezes), será feita coleta do seu sangue para realização dos exames que avaliarão sua sensibilização para alergia e inflamação; será também realizado o Prick teste (teste no qual por meio de uma lanceta descartável de metal será introduzido em sua pele superficial, com uma leve picada, treze substâncias – uma por vez – que avaliarão sua sensibilização para alergia). O volume de sangue coletado será de 5mL (o que equivale à 1 colher de chá) por meio de uma picada de agulha na veia, o que pode doer um pouco e pode deixar uma marca roxa no braço. A coleta de sangue dura menos de 5 minutos. O Prick teste, por utilizar uma lanceta de metal, pode causar um pouco dor e, até mesmo, arranhar a pele; as substâncias usadas podem causar coceira, caso você seja alérgico (a) a elas, e vermelhidão apenas no local. Reações graves são muito raras (como, placas avermelhadas e inchaço de todo o corpo, falta de ar e queda de pressão). O Prick teste dura, aproximadamente, 20 minutos. Todo o material utilizado é descartável, por isso você não corre risco de ser contaminado com nada. Todos os procedimentos acima serão realizados no mesmo dia da sua consulta de retorno. Esses procedimentos deverão durar cerca de 40 minutos no total.

Você não correrá nenhum risco de sua doença piorar por causa do uso do medicamento, caso seja sorteado para usá-lo, ou do placebo, já que o tratamento não será modificado. Há diversos estudos que confirmam a segurança do uso desse medicamento, bem como o reconhecimento da segurança desse tipo de medicamento pela Organização Mundial de Saúde, e ele é aprovado no Brasil pela ANVISA, mas mesmo assim existe a pequena possibilidade de você ter alergia ao medicamento (como, por exemplo, placas avermelhadas pelo corpo e inchaço de algumas partes, como boca, olhos e orelhas) e também do surgimento de efeitos colaterais (diarreia, sensação de estufamento na barriga, gases). Nesses casos, o pesquisador responsável, cuja formação é médica, deverá ser contatado imediatamente para avaliá-lo e efetuar as orientações para o tratamento destas intercorrências, como por exemplo as medicações a serem tomadas a depender do caso (algumas medicações – antialérgicos, protetores gástricos e analgésicos – já serão prescritas no início da pesquisa); caso necessário, este mesmo pesquisador realizará a sua internação hospitalar no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, visto que você é paciente do Ambulatório de Alergia desse hospital, e o acompanhará diariamente até a resolução da intercorrência.

Essas informações serão muito importantes para conhecermos melhor os efeitos desta

medicação no tratamento da sua doença (dermatite atópica). Se os resultados mostrarem que o medicamento é eficaz, você poderá voltar a usar o medicamento, se for necessário, ou começar a usá-lo caso tenha participado do grupo que recebia o medicamento sem efeito.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa.

Mesmo após o término da pesquisa, você continuará o acompanhamento no Ambulatório de Alergia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, ao qual pertence.

Sua participação será voluntária e você tem o direito de recusar-se a participar desse estudo ou mesmo parar de participar em qualquer momento que desejar, sem que isso prejudique a continuidade do seu atendimento, ou sofra qualquer tipo de advertência ou retaliação.

Você receberá uma via do Termo de Assentimento, assinado e rubricado em todas as páginas por você e pelo pesquisador. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, durante ou após a participação no estudo, você ou qualquer membro de sua família poderá contatar os responsáveis pelo estudo, pessoalmente ou por telefone.

Responsáveis pelo estudo:

Paula D. St. M. De Albuquerque – telefone (16) 3602-2424 e celular (16) 98132-9192 – e-mail: paula\_albuquerque@usp.br

Prof Dr. Pérsio Roxo Júnior – telefone (16) 3602-1000. Departamento de Puericultura e Pediatria, Hospital das Clínicas – 7º andar.

Participante: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_