

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

**ESTUDO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO CONTROLADO, SOBRE EFICÁCIA DE
PROBIÓTICOS COMBINADOS NO TRATAMENTO DE RINITE ALÉRGICA EM
CRIANÇAS DE 6 A 12 ANOS**

MARINA BENEVIDES PINHEIRO CAVALCANTE

RIBEIRÃO PRETO

2025

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

**ESTUDO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO CONTROLADO, SOBRE EFICÁCIA DE
PROBIÓTICOS COMBINADOS NO TRATAMENTO DE RINITE ALÉRGICA EM
CRIANÇAS DE 6 A 12 ANOS**

MARINA BENEVIDES PINHEIRO CAVALCANTE

Projeto de tese de Doutorado apresentado ao Departamento de
Puericultura e Pediatria - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
sob a orientação do Prof. Dr. Pêrsio Roxo Júnior e coorientação da
Prof. Dra. Wilma Terezinha Alselman Lima

RIBEIRÃO PRETO

2025

RESUMO

A rinite alérgica (RA) é uma condição inflamatória mediada por IgE, como consequência do contato com o alérgeno em um indivíduo previamente sensibilizado. Trata-se de doença crônica muito prevalente, que pode ocasionar sequelas significativas, com elevada morbidade. A hipótese de que a estimulação precoce apropriada da microbiota intestinal possa contribuir para a homeostase do sistema imunológico, estimulou o desenvolvimento de ensaios clínicos e experimentais para avaliar a eficácia de probióticos no tratamento de RA. Entretanto, até o momento, não foram realizados estudos avaliando os benefícios dos probióticos no manejo da RA em crianças no Brasil. Desta maneira, os objetivos do presente estudo serão avaliar a eficácia clínica da mistura de probióticos (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) em crianças de 6 a 12 anos com RA, através do escore total de sintomas nasais (TNSS), do questionário de qualidade de vida (PQRLQ), além de avaliar os efeitos desta medicação nos seguintes parâmetros laboratoriais: sensibilização (prick teste e IgE sérica total), inflamação (IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 e TNF- α) e tolerância imunológica (IL-10, TGF- β e IL-17).

Palavras-chaves: Rinite Alérgica; Infecções de repetição; Probióticos; Inflamação; Sensibilização; Tolerância imunológica.

SUMÁRIO

I. Introdução.....	5
I.1. Doenças alérgicas.....	5
I.2.Rinite alérgica.....	5
I.3 Hipótese de higiene.....	8
I.4. Probióticos e alergia.....	9
II. Justificativa.....	11
III. Hipótese.....	12
IV. Objetivos.....	13
IV.1. Objetivo primário.....	13
IV.2. Objetivos secundários.....	13
V. Pacientes, Materiais e Métodos.....	14
V.1. Pacientes e Desenho de estudo.....	14
V.1.1. Critérios de inclusão.....	14
V.1.2. Critérios de exclusão e não inclusão	14
V.1.3. Co-variáveis.....	15
V.1.4. Determinação do tamanho amostral.....	15
IV.1.5. Aleatorização.....	15
IV.1.6. Cegamento.....	15
V.2. Materiais e métodos.....	16
V.2.1. Protocolo de tratamento.....	16
V.2.2. Avaliação clínica.....	16
V.2.3. Avaliação laboratorial.....	16
VI. Análise Estatística.....	17
VII. Aspectos éticos.....	18
VIII. Orçamento.....	19
IX. Cronograma.....	19
X. Referências.....	20

I. Introdução

1. Doenças alérgicas

Alergia é causada por uma reação anormal e exagerada do sistema imunológico a alérgenos e atinge em torno de 10-40% da população (Pawankar et al, 2013). A prevalência das doenças alérgicas tem aumentado nas últimas décadas (Hosseini et al, 2014). No período de 2011 a 2012, cerca de 40% da população foi diagnosticada com uma doença alérgica ou com sensibilização (Arroyave et al, 2014).

Atopia é a tendência hereditária para desenvolver hipersensibilidade a alérgenos ambientais. Na infância pode se manifestar em sequência, na qual o eczema e alergia alimentar iniciam-se nos primeiros anos de vida, progredindo posteriormente para rinite alérgica (RA) e asma, o que é conhecido como “marcha atópica” (Khan et al, 2017).

Apesar da relação temporal entre as condições incluídas na “marcha atópica”, ainda é controverso se essas doenças são mais influenciadas por fatores genéticos e/ou ambientais (Khan et al, 2017). A etiologia das doenças alérgicas é pouco compreendida e seus mecanismos biológicos ainda não estão completamente esclarecidos (Meng et al, 2019). Estilo de vida, fatores ambientais, diminuição da exposição aos estímulos microbiológicos e alterações nos hábitos dietéticos já foram listados como possíveis fatores responsáveis pela maior predisposição à atopia (Hosseini et al, 2014; Zhang et al, 2021).

2. Rinite Alérgica

Alergia respiratória, também conhecida como “doença das vias aéreas únicas”, é uma doença heterogênea que contempla a RA e asma (Pawankar et al, 2013). Entre 10 e 40% dos pacientes com RA também possuem diagnóstico de asma alérgica e uma grande proporção de pacientes asmáticos (60-80%) apresentam sintomas crônicos de RA (Pawankar et al, 2013; Arroyave et al, 2014; Hosseini et al, 2014; GINA, 2021). As consequências socioeconômicas da RA e suas comorbidades são consideráveis para os sistemas de saúde em todo o mundo (Pfaar et al, 2017).

A rinite alérgica é a doença imuno-mediada mais comum em todo mundo, com prevalência ainda em ascensão. Estima-se que 1 em cada 3 cidadãos europeus é afetado pela RA, apesar de ainda tratar-se de condição amplamente subestimada, subdiagnosticada e subtratada. A doença pode afetar a vida social, desempenho escolar e produtividade no trabalho (Pfaar et al, 2017).

Após uma análise de dados coletados de 2008 até 2017, no sistema nacional de saúde da

Corea, foi encontrada uma prevalência da RA nos lactentes em torno de 9%, na idade de 2-5 anos de 27,6% e de 6-18 anos entre 17,1% (Ha et al., 2020). Estudos anteriores evidenciam aumento da prevalência mundial da RA de 10% para 40% em adultos e de 2% para 25% das crianças. Essa progressão crescente da rinite alérgica é associada ao rápido desenvolvimento econômico com estilos de vida ocidentalizados (Asher et al, 2006).

Estudo recente realizado na Holanda, estimou custos diretos ao paciente em torno de 1043 euros anualmente (Avdeeva et al, 2020). Por tratar-se de uma doença de alta incidência, que compromete a qualidade de vida, gerando impacto financeiro significativo com custos diretos e indiretos para seu manejo, é essencial a adoção de estratégias de diagnóstico e terapias eficientes (Zhang et al, 2021).

Uma coorte prospectiva realizada com crianças na Suécia evidenciou, como principais fatores de risco para RA, o histórico de atopia familiar, sensibilização alérgica e a presença de outras doenças alérgicas (Bernt et al, 2011). Além disso, até a idade de 5 anos a RA foi correlacionada como preditor de desenvolvimento de asma entre 5-13 anos de idade (Rochat et al, 2010; Bernt et al, 2011).

O diagnóstico de RA inclui a história clínica, antecedentes pessoais e familiares de atopia, exame físico e exames complementares. O diagnóstico é clínico, com a presença dos seguintes sintomas: espirros em salva, prurido nasal, coriza clara, abundante e obstrução nasal, com a identificação do possível alérgeno desencadeante pelo teste cutâneo de hipersensibilidade imediata ou IgE específica (Sakano et al, 2017).

Nos últimos anos foram desenvolvidas diretrizes para auxiliar o diagnóstico e manejo da RA na prática clínica. As primeiras diretrizes baseadas em evidências foram as recomendações do ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*). De acordo com esta diretriz (ARIA, 2008), a RA é classificada clinicamente, de acordo com a duração e gravidade dos sintomas. Com relação à duração, é subdividida em intermitente (sintomas < 4 dias/semana ou < 4 semanas/ano) ou persistente (sintomas > 4x/semana e por mais de 4 semanas/ano). Em relação à gravidade, é subdividida em leve (sem sintomas perturbadores) ou moderada/grave (1 ou mais dos itens a seguir: distúrbio do sono, prejuízo de atividades diárias/esporte/lazer, prejuízo acadêmico ou trabalho. Embora essa classificação seja clássica e prática, a partir dela não é possível mensurar o impacto da doença de forma quantitativa, sendo necessária a utilização de questionários. Esses instrumentos auxiliam na avaliação da gravidade e impacto na qualidade de vida antes e após a introdução do tratamento.

A gravidade e atividade da RA podem ser avaliadas através de escalas objetivas. O escore de sintomas nasais total (*Total Nasal Symptom Score* - TNSS) é um questionário, baseado em três itens,

sendo a soma dos valores respondidos pelo paciente ou pelos pais para cada item individual que o compõe. A escala de avaliação é dividida em quatro graus (0-3), onde 0 indica ausência de sintomas; 1 indica sintomas leves que são facilmente tolerados; 2 indica sintomas incômodos, mas toleráveis; e 3 indica sintomas graves difíceis de tolerar e que interferem nas atividades diárias (Barnes et al, 2009; Ellis et al, 2015). Os seguintes sintomas são avaliados: obstrução nasal, rinorreia, espirros/prurido nasal. A pontuação total pode variar de um mínimo de 0 a um máximo de 9 pontos. Desta forma, obtém-se a seguinte classificação: 0: sem sintomas; 1-3: rinite leve; 4-6: rinite moderada; 7-9: rinite grave (Barnes et al, 2009; Downie et al, 2004).

Outro importante objetivo do tratamento é obter melhora na qualidade de vida do paciente, que além de verificar o quanto a doença incomoda, também mede o impacto da doença nos aspectos sociais, ocupacionais, emocionais e físicos (Junipet et al, 1998; Del Giudice et al, 2017). Esse parâmetro pode ser avaliado através do questionário de qualidade de vida pediátrico (*Paediatric Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire – PRQLQ*), que possui 23 itens, divididos em cinco domínios (limitações de atividade, problemas práticos, sintomas nasais, sintomas oculares e outros sintomas). Cada pergunta varia em uma escala de 0, sem comprometimento, a 6, gravemente prejudicado (Junipet et al, 1998).

Por ser uma doença crônica, o tratamento da RA deve ser planejado com perspectivas em longo prazo. Suas principais metas são: identificar os alérgenos desencadeantes e evitá-los quando possível; educação da família e paciente sobre como evitar os alérgenos sensibilizantes e irritantes não específicos; farmacoterapia e imunoterapia, com o intuito de proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes e familiares (ARIA, 2008).

A identificação dos alérgenos desencadeantes de sintomas na RA pode ser feita através da realização do teste de sensibilidade cutânea imediata (Prick Test) ou *in vitro* (dosagem de IgE específica para os alérgenos suspeitos). A partir da identificação dos alérgenos envolvidos na sensibilização pode-se orientar de forma mais direcionada quais as medidas mais efetivas em relação ao ambiente (Ansotegui et al, 2020). A avaliação do impacto das medidas de controle de exposição a alérgenos sobre a redução de sintomas depende do número de alérgenos aos quais o indivíduo está sensibilizado e exposto. Além do que essas medidas devem ser mantidas pelo menos de 3 a 6 meses para que algum benefício clínico gradual possa ser observado (Sakano et al, 2017).

Em relação ao tratamento farmacológico, o objetivo deve ser o controle da doença e a escolha individualizada deverá ser realizada de acordo com a capacidade e preferência do paciente, os sintomas predominantes, a sua gravidade, o tempo de ação do medicamento e da resposta aos tratamentos realizados anteriormente. Dentre as opções disponíveis, os corticosteroides nasais tópicos (INCS) são utilizados como tratamento de primeira escolha para pacientes com RA,

entretanto necessitam de alguns dias para atingir sua eficácia máxima (Onseca et al, 2020). A associação com anti-histamínico H1 (anti-H1) oral é uma prática bastante comum, visando alívio sintomático mais rápido. Um estudo de avaliação de tecnologias de saúde concluiu que a maioria dos medicamentos para RA tem efeitos semelhantes (Glacy et al, 2013).

Dentro das possibilidades farmacológicas, a associação de anti-H1 e descongestionantes orais (DO) pode ser administrada quando o controle da obstrução nasal não é obtido (Zhang et al, 2016). Em geral, estas combinações são mais efetivas do que qualquer anti-H1 oral ou DO isoladamente (Berkowitz et al, 2006). Por outro lado, esta associação pode causar ou amplificar efeitos colaterais como insônia, cefaleia, boca seca e irritabilidade, especialmente quando se trata de anti-H1 de primeira geração (Chervinsky et al, 2005).

Recentemente, a associação de anti-H1 e INCS, em dispositivo único, foi acrescentada nas opções no tratamento da RA, sendo indicada para pacientes maiores de 6 anos de idade (Sakano et al, 2017). Sua eficácia foi superior à dos INCS como monoterapia e possui maior rapidez de ação. Devido ao custo elevado, seu uso justifica-se quando os sintomas não são controlados de outra forma (Onseca et al, 2020).

A imunoterapia (IT) é uma opção terapêutica comprovada para o tratamento da RA e/ou asma, podendo ser feita por via sublingual (ITSL) ou subcutânea (ITSC) (Halken et al, 2017). Na maioria dos países, a IT tem custo mais elevado que outros tratamentos e, portanto, deve ser considerada no contexto de uma abordagem terapêutica estratificada. Além do que suas recomendações são complexas, sendo necessários avaliação da duração dos sintomas durante exposição alérgica, evidência de sensibilização e disponibilidade de extratos de boa qualidade e, sempre que possível, padronizados (Onseca et al, 2020; Halken et al, 2017).

3. Hipótese da Higiene

A hipótese da higiene sugere que a perda de relações simbióticas com microrganismos relevantes, devido a melhorias na limpeza, maior tempo em ambientes fechados e falta de exposição precoce a agentes infecciosos, pode prejudicar o estímulo necessário para o sistema imunológico desenvolver respostas tolerogênicas e, portanto, contribuir para o aumento das doenças alérgicas (Foolad et al, 2014; Zhang et al, 2021).

Alterações da microbiota intestinal (devido ao uso abusivo de antibióticos, antiparasitários, aumento de número de cesarianas), modificação dos hábitos alimentares (introdução precoce de alimentos, consumo de alimentos processados, ingestão em excesso de ácidos graxos ω -6, redução

da ingestão de antioxidantes) e melhora do saneamento básico são alguns dos fatores associados ao aumento de linfócitos T *helper*2 (Th2), responsáveis pelo desenvolvimento de manifestações alérgicas (Cocco et al, 2009; Zhang et al, 2021).

Em estudo realizado com lactentes de Copenhagen foi avaliada a associação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento de distúrbios alérgicos até a idade de seis anos. Uma diversidade reduzida da microbiota bacteriana foi associada a um maior risco de RA, sensibilização e eosinofilia em sangue periférico durante os seis primeiros anos de vida. Embora a relação causal da associação entre a diversidade da flora intestinal e o desenvolvimento de doenças alérgicas ainda não esteja completamente definida, este estudo colabora com a hipótese de que o desequilíbrio da microbiota humana durante a infância interfere no desenvolvimento de doenças associadas ao estilo de vida, tais como as doenças alérgicas (Bisgaard et al, 2011).

Estudos realizados com crianças objetivando identificar parte desses fatores, sugeriram a adoção de medidas preventivas em 3 níveis: 1. Prevenção primária: impedir a sensibilização aos alérgenos; 2. Prevenção secundária: deter a expressão da doença; 3. Prevenção terciária: minimizar a morbidade para os indivíduos que já manifestaram a doença (Sole et al, 2006).

4. Probióticos e alergia

O intestino dos mamíferos é colonizado por um grande número de bactérias não patogênicas. Estima-se que o trato gastrointestinal humano abrigue em torno de 500-1000 espécies bacterianas distintas, que fazem parte da microbiota, a qual está ativamente envolvida em várias funções, como digestão dos alimentos e resposta imunológica do hospedeiro (Eigenmann et al, 2013; Anania et al, 2021).

O microbioma é um elemento chave para o desenvolvimento da resposta imune, particularmente durante a infância, estabelecendo relação efetiva com o hospedeiro. Dentro do microbioma normal há equilíbrio entre bactérias gram-positivas e gram-negativas. A interrupção desse equilíbrio pode gerar alterações no sistema imunológico com consequente ativação de macrófagos produtores de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) que promove a transição de células T virgens para células Th2, com efeito negativo na inflamação (Anania et al, 2021).

Durante o período de imaturidade do sistema imunológico das mucosas, ocorre aumento da permeabilidade, ocasionando maior absorção de macromoléculas intactas e favorecendo a translocação de patógenos, tornando então a criança mais suscetível para infecção e inflamação (Rautava et al, 2005).

O reconhecido papel da microbiota intestinal no desenvolvimento e regulação do sistema

imunológico tem gerado crescente interesse na utilização de probióticos (West et al, 2013). Estes podem, direta ou indiretamente, modular o desenvolvimento do sistema imune, a partir dos seus efeitos imunomoduladores em favor da supressão de Th2 e estimulação do perfil Th1, além de agir também no desenvolvimento de células T reguladoras (Anania et al, 2021; Bergmann et al, 2021).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), probióticos são definidos como microrganismos vivos que precisam ser administrados em quantidades adequadas para conferir um benefício à saúde do hospedeiro (Bergmann et al, 2021).

Os probióticos exercem efeitos estimulantes sobre o sistema imunológico inato e adaptativo do intestino, melhoram as funções de barreira mucosa, induzem a produção de citocinas anti-inflamatórias, possibilitando a indução de tolerância. Alguns estudos sugerem que os probióticos poderiam prevenir o desenvolvimento das doenças alérgicas, apresentando também efeitos benéficos no seu tratamento. Entretanto, estes efeitos não foram observados em todos os estudos (Iemoli et al, 2012).

A Organização Mundial de Alergia (WAO) sugere a suplementação de probióticos em mulheres grávidas/lactantes e lactentes com história familiar de doença alérgica, principalmente dermatite atópica (Anania et al, 2021). Recentemente, foi sugerido que os probióticos podem ser um possível tratamento para RA, em particular, os probióticos com baixo perfil de efeitos adversos, como lactobacilos e bifidobactérias (Kim et al, 2018).

Watts et. al (2016) avaliaram o uso de probióticos em pacientes com RA e relataram resultados positivos na qualidade de vida e redução do uso de medicamentos. Bergmann et al (2021) demonstraram que a suplementação adequada por diferentes cepas pode ser um novo conceito adjuvante no manejo da RA. Uma metanálise avaliando estudos com as principais espécies de *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* também mostrou redução dos sintomas da rinite e melhoria de qualidade de vida dos pacientes (Zajac et al, 2015).

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, ter benefícios comprovados clinicamente e apresentar propriedades tecnológicas, como capacidade de sobreviver no produto para consumo (FAO/WHO, 2001).

Os micro-organismos são geralmente consumidos em alimentos fermentados e os gêneros mais comumente usados incluem *Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium*. Eles são tipicamente organismos anaeróbios e, no intestino, fermentam alimentos ingeridos para a produção de ácido láctico. Cada cepa de probiótico tem seus próprios benefícios específicos (Kramer et al, 2014).

Lactobacillus rhamnosus é uma bactéria gram-positiva encontrada em queijos (FAO/WHO, 2001). Tem sido relatado que este micro-organismo, em altas concentrações (em cápsulas

lioofilizadas), apresentam efeitos positivos sobre os sintomas da RA perene (Ishida et al, 2005).

Lactobacillus acidophilus é uma bactéria gram-positiva, que frequentemente habita o trato gastrointestinal e a vagina do ser humano (FAO/WHO, 2001).

Bifidobacterium lactis foram descobertos nas fezes de lactentes amamentados, desempenhando papel fundamental na microbiota intestinal de seres humanos durante a vida (FAO/WHO, 2001).

Lactobacillus paracasei é uma bactéria gram-positiva que habita o trato gastrointestinal humano, podendo ser encontrada, também, em leites fermentados, carnes e vegetais (FAO/WHO,2001). Em um estudo de coorte recente, a colonização precoce com *L. paracasei* (desde o nascimento) foi associada com risco reduzido de eczema aos 2 anos de idade, primeiro sintoma da marcha atópica (West et al, 2013). Outro estudo realizado com esta cepa demonstrou melhora na qualidade de vida média em pacientes com RA, através do questionário de qualidade de vida de rinoconjuntivite pediátrica modificado (RQLQ) (Peng & Hsu, 2005).

II. Justificativa

A flora intestinal na criança consiste em fonte de estimulação imunológica precoce. Como as doenças alérgicas geralmente se manifestam no início da vida acredita-se em possíveis benefícios utilizando suplementação com probióticos, por modificar a flora gastrointestinal (Özdemir et al, 2013).

O interesse no potencial preventivo e terapêutico dos probióticos em doenças alérgicas advém da sua ação na melhora da permeabilidade intestinal e redução das citocinas inflamatórias. Tais efeitos seriam desejáveis no tratamento de doenças alérgicas, incluindo RA. Vários estudos têm sido recentemente realizados para avaliar a eficácia dos probióticos em várias condições alérgicas, tais como dermatite atópica, RA e alergias alimentares (Kramer et al, 2014; Kim et al, 2018). Entretanto não foram encontrados estudos avaliando a eficácia em crianças com RA na população brasileira.

III. Hipótese

A hipótese desse estudo é que a mistura de cepas probióticas utilizada acarrete numa resposta clínica favorável em pacientes com RA, assim como tenha papel relevante na redução da inflamação e indução de tolerância, possibilitando menor ocorrência de comorbidades como infecções recorrentes vias aéreas superiores.

IV. Objetivos

1. Objetivo primário

Avaliar a eficácia clínica da mistura de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus paracasei*) em crianças com RA, através do escore TNSS.

2. Objetivos secundários

Avaliar os efeitos da mistura de probióticos:

- Impacto na qualidade de vida através da aplicação do questionário PQRLQ.
- Frequência de uso do corticoide nasal e anti-H1.
- Ocorrência/ frequência de infecções de vias aéreas superiores.
- Citocinas inflamatórias e tolerogênicas (IL1 β , IFN- γ , IL4, IL5, IL6, IL10, IL13, IL17, TGF- β e TNF- α).
- Sensibilização: prick teste e IgE sérica total.

V. Pacientes, Materiais e Métodos

1. Pacientes e Desenho de estudo

Trata-se de um estudo clínico, duplo-cego, randomizado e controlado com placebo.

Serão convidados para participar os pacientes de ambos os sexos e todas as classes sociais acompanhados nos Ambulatórios de Alergia Pediátrica, no Centro Especializado de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) e no ambulatório do CSE Sumarezinho, com idade de 6 a 12 anos e diagnóstico clínico de RA, de acordo com o ARIA.

Os participantes serão divididos em 2 grupos: Grupo Probiótico (GP, composto por pacientes em uso de probióticos) e Grupo Controle (GC, composto por pacientes em uso de placebo). Todos os pacientes continuarão recebendo as medicações orais ou tópicas, como anti-leucotrienos, anti-histamínicos e corticosteroides nasais, de acordo com a prescrição médica.

1.1. Critérios de inclusão

- Crianças com idade de 6 a 12 anos.
- Diagnóstico clínico de RA, de acordo com o ARIA, há pelo menos 6 meses.
- Sensibilização comprovada a pelo menos 1 aeroalérgeno (prick-teste ou IgE específica) e/ou IgE total ≥ 100 kU/L.

1.2. Critérios de exclusão e não inclusão

- Solicitação dos pais ou responsáveis.
- Diagnóstico de erros inatos da imunidade e de malformações do nariz, orelhas e garganta.
- **Necessidade de início do tratamento para rinite concomitante ao início da intervenção.**
- Tratamento prévio com imunoterapia ou biológicos.
- Infecção nas 2 semanas que antecedem o início da intervenção.
- Uso de anti-histamínicos e descongestionantes (orais e tópicos), anti-inflamatórios e corticosteroides orais no período de 7 dias que antecedem o início da intervenção.
- Alergia ou reação adversa grave após o início da intervenção.
- Não aderência ao tratamento (ou seja, não apresentar uso regular, conforme a prescrição) por, no mínimo, um mês contínuo.
- Falta de comparecimento em mais de 50% das avaliações (clínicas e/ou laboratoriais) que serão realizadas durante a pesquisa.

1.3. Co-variáveis

- Idade dos participantes.
- Estação climática do ano em cada avaliação.
- Condições sócios-econômicas.
- Medicações orais e tópicas em uso.

1.4. Determinação do tamanho amostral

Considerando a taxa de resposta ao tratamento, ao final do estudo, para o grupo controle, como 20% e para o grupo tratado, de 50% e, ainda, um nível de significância de 5% e um poder de teste de 80%, o tamanho amostral total é de 72 indivíduos, sendo 36 para cada grupo.

1.5. Randomização

Os pacientes serão aleatoriamente alocados em dois grupos: GP e GC, **através do método de alocação por blocos de tamanho 4 a 6.**

1.6. Cegamento

Os pacientes e os pesquisadores responsáveis pela avaliação não saberão da alocação, pois os grupos serão divididos em A e B. Após o término da coleta e antes da análise dos dados, um envelope lacrado contendo a associação verdadeira do placebo e probiótico aos grupos será enviada aos pesquisadores responsáveis. Estes somente abrirão os envelopes após a análise estatística completa dos dados adquiridos durante a coleta.

2. Materiais e Métodos

2.1 Protocolo de tratamento

Os pacientes receberão a mistura de probióticos (Probiatop®, composto pelas cepas *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*) ou placebo (colágeno hidrolisado) na dose de 2 gramas (2 sachês) uma vez ao dia, sem o conhecimento prévio pelo pesquisador/avaliador. Os pacientes serão orientados a diluir 2 sachês em 100mL de água e ingerir pela manhã, diariamente. O placebo deverá apresentar as mesmas condições de cor e consistência que a medicação estudada. O período de tratamento **será 3 meses**, com acompanhamento durante o período de 5 meses. Durante e após o período da pesquisa, os pacientes manterão seus acompanhamentos nos Ambulatórios de Alergia, Otorrinolaringologia do HCRP e do CSE Sumarezinho.

2.2 Avaliação clínica

Os pacientes serão diagnosticados clinicamente através das recomendações do ARIA. O controle da RA será avaliado pelo escore TNSS (corresponde aos últimos 7 dias da avaliação) e a qualidade de vida será avaliada pelo PRQLQ. Serão realizadas **6 avaliações (baseline, 1, 2 e 3 meses após início da intervenção e 1 e 2 meses após o final da mesma)**.

2.3 Avaliação laboratorial

Dosagem de citocinas

Será coletado 5mL de sangue periférico dos pacientes, por profissionais treinados do Departamento de Puericultura e Pediatria do HCFMRP-USP, para avaliação dos seguintes marcadores inflamatórios: IL1 β , IFN- γ , IL4, IL5, IL6, IL10, IL13, IL17, TGF- β e TNF- α .

Após a coleta, o sangue será centrifugado a 4°C, 2.500rpm, por 10 min. A partir dessa amostra será obtido o plasma de cada paciente, que será congelado a -70°C, armazenado em um biorrepositório denominado PROBRA (probióticos rinite alérgica) sob a responsabilidade da Biomédica Luciana Rodrigues. Posteriormente, as citocinas descritas serão dosadas pelo método ELISA (kit Duoset R&D Systems, Minneapolis-MN, USA), com placas de alta afinidade, de acordo com as recomendações do fabricante. As avaliações serão realizadas no início do estudo e ao final da intervenção (0 e 3 meses).

Dosagem de IgE total

Será realizada em 2 momentos (0 e 3 meses após início da intervenção). Aqueles que já tiverem a dosagem em prontuário (antes da intervenção) não necessitarão coletar novamente.

A IgE sérica total representa o anticorpo produzido após o contato com determinado antígeno sensibilizante, capaz de induzir a degranulação de mastócitos e consequente liberação de histamina, culminando com a reação alérgica. As dosagens de IgE total serão realizadas por meio de ensaio fluoroenzimático automatizado (Phadia ImmunoCap System, Uppsala, Sweden), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados serão expressos em kU/L e serão considerados elevados quando forem superiores a 100 kU/L.

Prick-teste

Será realizado em 2 momentos (0 e 3 meses após início da intervenção). Aqueles que já tiverem realizado o procedimento antes da intervenção não necessitarão realizar novamente.

Será realizado através de uma lanceta descartável, introduzindo extratos antigênicos na epiderme, que avaliarão a sensibilização para *Dermatophagoides pteronyssimus* (Dpt), *Dermatophagoides farinae* (Df), *Blomia tropicalis* (Bt), *Blatella germânica* (Bg), *Periplaneta americana* (Pa), epitélio de cão, epitélio de gato.

Em todos os momentos do estudo, os pacientes terão acesso aos pesquisadores responsáveis para quaisquer intercorrências.

Um comitê externo formado por três profissionais não envolvidos com o estudo, será responsável pelo monitoramento externo.

VI. Análise Estatística

Trata-se de um ensaio clínico aleatorizado, duplo-cego e controlado que avaliará a eficácia de probióticos no controle da RA. As respostas serão consideradas como relativas ao basal (observação futura dividida pelo basal x 100). Após essas transformações, as médias serão comparadas ajustando-se modelos lineares de efeitos mistos. As incidências de controle de doença serão comparadas por meio de riscos relativos estimados pelo ajuste de modelos de regressão log-binomial.

O software utilizado para essas análises foram o SAS versão 9.4 e R versão 4.1.1.

VII. Aspectos Éticos

Todos os procedimentos especificados no projeto serão submetidos ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os pacientes selecionados serão informados sobre o estudo pelo pesquisador responsável, com explicação detalhada sobre a intervenção e sobre os procedimentos que serão realizados. A liberdade de não participarem será assegurada, garantindo que esta opção não afetará seu seguimento e plano terapêutico. As intervenções utilizadas neste protocolo não irão interferir, nem atrasar o tratamento dos mesmos. O responsável pelo participante poderá ter acesso aos resultados da pesquisa, caso seja do seu interesse.

O prontuário eletrônico do HCRP do participante será consultado para registro das informações da pesquisa e para avaliação da história médica e medicações concomitantes, além da avaliação e registro de exames laboratoriais. Apenas os pesquisadores envolvidos terão acesso ao prontuário e em todo o momento, a confidencialidade das informações registradas e contidas no prontuário será assegurada. Somente os dados relevantes para o estudo vigente serão avaliados durante a consulta ao prontuário eletrônico.

Este estudo será conduzido de acordo com as Boas Práticas para Pesquisa Clínicas (<http://www.ich.org/home.html>), com início após aprovação do protocolo da pesquisa no CEP.

Será solicitada, por profissionais treinados, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE para todos os responsáveis dos participantes e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – TALE para as crianças alfabetizadas participantes, de acordo com a Resolução CNS 466/12. Serão obtidas duas vias do termo, sendo uma retida pelo responsável e outra arquivada pelo pesquisador.

VIII. Orçamento

	Número	Custo (cada)	Custo (total)
Probióticos ^a (caixa com 30 unidades)	180	R\$ 70,00	R\$ 12.600,00
Placebo ^a	180	R\$ 35,00	R\$ 6.300,00
IgE total ^b	120	R\$ 16,97	R\$ 2.036,40
Testes cutâneos (extratos) ^c	60	R\$ 150,00	R\$ 9.000,00
Testes cutâneos (caixas de lancetas) ^c	12	R\$ 125,00	R\$ 1.500,00
Dosagem de marcadores de tolerância imunológica e	8	R\$ 2.920,15	R\$ 23.361,15

inflamação (Kits para ELISA) ^c			
Material para coleta de sangue (scalps - caixa) ^c	3	R\$ 245,70	R\$ 737,10
Material para coleta de sangue (tubos – caixa com 100 unidades) ^c	1	R\$ 114,50	R\$ 114,50
Maca ^d	1	R\$ 360,00	R\$ 360,00
Caneta (caixa) ^c	1	R\$ 25,70	R\$ 25,70
Papel sulfite A4 (pacote) ^c	2	R\$ 13,00	R\$ 26,00
Total			56.060,85

a. As amostras de Probiatop®, placebo e os kits para dosagem das citocinas serão doadas pela Farmoquímica S/A. Os kits para citocinas serão os mesmos a serem utilizados no projeto intitulado “Estudo randomizado, duplo-cego controlado, sobre eficácia de probióticos combinados no tratamento da asma em crianças e adolescentes”, já aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CAAE: 65936122.9.0000.5440).

b. Estes exames já são realizados rotineiramente como parte do seguimento ambulatorial e não serão realizados somente para fins desta pesquisa. Desta forma, não gerarão custos adicionais para o hospital.

c. Estes exames e materiais serão financiados pelo Departamento de Pediatria.

d. Os equipamentos já existem no hospital e, portanto, não haverá custos adicionais.

IX. Cronograma

O estudo terá a duração aproximada de 60 meses:

- Meses 1–12 (agosto de 2023 até 2024) – revisão bibliográfica, aprovação pelo CEP e fase piloto.
- Meses 12–42 (agosto de 2024 até fevereiro 2026) – inclusão dos pacientes, execução do protocolo de tratamento e coleta de dados.
- Meses 42–60 (fevereiro 2026 até julho 2028) – análise dos dados, redação, qualificação e defesa da tese.

Referências

1. Alm, Bernt et al. Early protective and risk factors for allergic rhinitis at age 4 1/2 yr. *Pediatric Allergy and Immunology*, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 398–404, 2011.
2. Anania, Caterina et al. Treatment with a probiotic mixture containing bifidobacterium animalis subsp. Lactis bb12 and enterococcus faecium 13 for the prevention of allergic rhinitis symptoms in children: A randomized controlled trial. *Nutrients*, [s. l.], v. 13, n. 4, 2021.
3. Ansotegui, Ignacio J. et al. A WAO — ARIA — GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. *World Allergy Organization Journal*, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 100091, 2020
4. Arroyave WD, et al. Impermeable dust mite covers in the primary and tertiary prevention of allergic disease: a meta-analysis *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 1-12. ASHER, I. et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys www.thelancet.com. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.thelancet.com>.
5. Avdeeva, Klementina S.; Reitsma, Sietze; Fokkens, Wytke J. Direct and indirect costs of allergic and non-allergic rhinitis in the Netherlands. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, [s. l.], v. 75, n. 11, p. 2993–2996, 2020.
6. Barnes, M L, et al. The minimal clinically important difference in allergic rhinitis. *Clinical e experimental allergy*, 2009.
7. Bergmann, Karl Christian et al. First evaluation of a symbiotic food supplement in an allergen exposure chamber in birch pollen allergic patients. *World Allergy Organization Journal*, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 100494, 2021
8. Berkowitz RB, McCafferty F, Lutz C, Bazelmans D, Godfrey P, Meeves S, et al. Onset of action of fexofenadine hydrochloride 60 mg/pseudoephedrine hydrochloride 120 mg in subjects aged 12 years with moderate to severe seasonal allergic rhinitis: a pooled analysis of two single-dose, randomized, double-blind, placebo-controlled allergen exposure unit studies. *Clin Ther*. 2006
9. Bisgaard H, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128 (3)
10. Chervinsky P, Nayak A, Rooklin A, Danzig M. Efficacy and safety of

- desloratadine/pseudoephedrine tablet, 2.5/120 mg two times a day, versus individual components in the treatment of patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.* 2005;26(5):391-396.
11. Cocco RR, Souza FS, Sarni RO, Mallozi MC, Solé D. O papel da nutrição no primeiro ano de vida sobre a prevenção de doenças alérgicas. *Rev. bras. alergologia imunopatol.* 2009; 32(2): 68-71.
 12. Del Giudice, M. M. et al. Bifidobacterium mixture (B longum BB536, B infantis M-63, B breve M-16V) treatment in children with seasonal allergic rhinitis and intermittent asthma. *Italian Journal of Pediatrics*, v. 43, n. 1, 7 mar. 2017.
 13. Downie, S. R., et al. “Symptoms of Persistent Allergic Rhinitis during a Full Calendar Year in House Dust Mite-sensitive Subjects”. *Allergy*, vol. 59, nº 4, abril de 2004, p. 406–14
 14. Eigenmann PA. Evidence of preventive effect of probiotics and prebiotics for infantile eczema. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; 13:426–431.
 15. Ellis, Anne K. et al. The Allergic Rhinitis - Clinical Investigator Collaborative (AR-CIC): Nasal allergen challenge protocol optimization for studying AR pathophysiology and evaluating novel therapies. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–10, 2015.
 16. Foolad N, Armstron AW. Prebiotics and probiotics: the prevention and reduction in severity of atopic dermatitis in children. *Benef Microbes* 2014; 24:1-10. Halken S, et al. EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: Prevention of allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2017.
 17. Glacy J, Putnam K, Godfrey S, Falzon L, Mauger B, Samson D, et al. Treatments for seasonal allergic rhinitis. Rockville: Agency for Healthcare Research and Quality; 2013.
 18. Global strategy for asthma management and prevention. A GINA pocket guide for health professionals. Version 3, Fontana, WI: Global Initiative for Asthma; 2021
 19. Ha, J.; Lee, S. W.; Yon, D. K. Ten-year trends and prevalence of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis among the Korean population, 2008– 2017. *Clinical and Experimental Pediatrics*, v. 63, n. 7, p. 278–283, 1 jul. 2020.
 20. Heine RG. Preventing atopy and allergic disease. *Nestle Nutr Inst Workshop* 2014; 78:141-53.
 21. Hosseini S, Shokouhi Shoormasti R, Akramian R, Movahedi M, Gharagozlou M, Foroughi N, et al. Skin Prick Test Reactivity to Common Aero and Food Allergens among Children with Allergy Children. *Iran J Med Sci* 2014; 39 (1).
 22. Iemoli E, et al. Probiotics in Adult Atopic Dermatitis. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46(1).

23. Ishida, Y. et al. Clinical effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on perennial allergic rhinitis: A double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 2, p. 527–533, 2005.
24. Juniper, E. F. et al. Measuring quality of life in children with rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* [s.l.: s.n.].
25. Khan SJ, Dharmage SC, Matheson MC, Gurrin LC. Is the atopic march related to confounding by genetics and early-life environment? A systematic review of sibship and twin data. *Allergy*, 2018; 73 (1): 17-28.
26. Kim, Min Jeong et al. Safety evaluations of *bifidobacterium bifidum* BGN4 and *bifidobacterium longum* BORI. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 1–22, 2018.
27. Kramer MF, Heath MD. Probiotics in the Treatment of Chronic Rhinoconjunctivitis and Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy (Cairo)*. 2014; 2014: 983635.
28. Manzotti G, Heffler E, Fassio F, obotSS Group. Multi-strain symbiotic preparations as a novel adjuvant approach to allergic rhinitis. *Columbia International Publishing Journal of Contemporary Immunology*. 2014;1(2):67–80.
29. Meng, Yifan; Wang, Chengshuo; Zhang, Luo. Recent developments and highlights in allergic rhinitis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, [s. l.], v. 74, n. 12, p. 2320–2328, 2019.
30. Nasipitz, Charles K; Cruz, Álvaro A. ARIA: atualizações. *Rev. bras. Alerg. Imunopatol.* – Vol. 31, Nº3, 2008
31. Onseca, João A. et al. ARIA 2019: An integrated care pathway for allergic rhinitis in Portugal. *Acta Medica Portuguesa*, [s. l.], v. 33, n. 12, 2020
32. Özdemir Ö, Erol AYG. Preventative and Therapeutic Probiotic Use in Allergic Skin Conditions: Experimental and Clinical Findings. *BioMed Research International* 2013; 1-17.
33. Pawankar R, Holgate ST, Canonical GW, Lockey RF, Blaiss M, editors. The WAO white book on allergy (update 2013) Milwaukee (WI): White Book on Allergy; 2013. <https://www.worldallergy.org/wao-white-book-on-allergy>.
34. Peng G-C, Hsu C-H. The efficacy and safety of heat-killed *Lactobacillus paracasei* for treatment of perennial allergic rhinitis induced by house-dust mite. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16(5):433- 438.
35. Pfaar O, Calderon MA, Andrews CP, Angjeli E, Bergmann KC, Bonlokke JH, et al. Allergen exposure chambers: harmonizing current concepts and projecting the needs for the future—an EAACI position paper. *Allergy* 2017; 72: 1035-42.

36. Rautava, Samuli; Kalliomaki, Marko; Isolauri, Erika. New therapeutic strategy for combating the increasing burden of allergic disease: Probiotics - A Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 31–37, 2005.
37. Report of Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba 2001.
38. Rochat MK, Illi S, Ege MJ, et al. Allergic rhinitis as a predictor for wheezing onset in school-aged children. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 1170–5
39. Roudsari MR, Karimi R, Mortazavian AM. Health effects of probiotics on the skin. *Food Science and Nutrition* 2013.
40. Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC. Prevenção Das Doenças Alérgicas. In: Naspitz CK. *Guia De Alergia, Imunologia e Reumatologia em Pediatria*. Barueri, SP: Manole, 2006. P. 3-8.
41. Watts AM, West NP, Smith PK, et al. Probiotics and allergic rhinitis: a Simon two-stage design to determine effectiveness. *J Altern Complement Med* 2016; 22:1007-12.
42. West CE, Hammarström M-L, Hernell O. Probiotics in primary prevention of allergic disease – follow-up at 8–9 years of age. *Allergy* 2013; 68:1015–1020.
43. Zajac AE, Adams AS, Turner JH. A systematic review and meta- analysis of probiotics for the treatment of allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5(6):524.
43. Zhang, Yuan; Lan, Feng; Zhang, Luo. Advances and highlights in allergic rhinitis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, [s. l.], v. 76, n. 11, p. 3383–3389, 2021

