GEÓRGIA VÉRAS DE ARAÚJO

RECORRÊNCIA DE SIBILÂNCIA NO LACTENTE:

TRATAMENTO COM PROBIÓTICOS.

RECIFE-PE

2015

Geórgia Véras de Araújo

Recorrência de sibilância no lactente: tratamento com probióticos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

Co-orientador: Prof. Dr. Décio Medeiros Peixoto

Recife-PE

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A663r Araujo, Georgia Véras de.
Recorrência de sibilância no lactente: tratamento com probióticos / Georgia Véras de Araujo. – 2015.
191 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Recife, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Sibilância. 2. Probióticos. 3. Interleucina-10. 4. Interleucina-12. 5. Interferon-gama. I. Sarinho, Emanuel Sávio Cavalcanti (Orientador). II. Título.

610 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-043)

GEÓRGIA VÉRAS DE ARAÚJO

RECORRÊNCIA DE SIBILÂNCIA NO LATENTE: TRATAMENTO COM PROBIÓTICOS

Dissertação ou Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Aprovada em: 25/08/2015

BANCA EXAMINADORA

_____
Profº. Drº. José Ângelo Rizzo (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profº. Drº. Gustavo Falbo Wandalsen (Examinador Externo)
Universidade Federal de São Paulo

_____
Profª. Drª. Gisélia Alves Pontes da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UFPE

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. Dr. Frederico Jorge Ribeiro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

CIÊNCIAS DA SAÚDE

COORDENADOR

Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

VICE-COORDENADOR

Prof. Dr. Brivaldo Markamn Filho

CORPO DOCENTE

Profª. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Profª. Ângela Luiza Pinto Duarte

Profº. Ary Gomes Filho

Profº. Brivaldo Markman Filho

Profº. Bruno Severo Gomes

Profª. Cláudia Diniz Lopes Neto

Profº. Décio Medeiros Peixoto

Profº. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira

Profº. Edgar Guimarães Victor

Profº. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Profº. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

Profª. Emília Chagas Costa

Profª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Profº. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Profº. José Ângelo Rizzo

Profª. Lucila Maria Valente

Profº. Lucio Villar Rabelo Filho

Profº. Marcelo Renato Guerino

Profº. Marcelo Tavares Viana

Profº. Paulo Sérgio Ramos Araújo

Profª. Patrícia Érika de Melo Marinho

Profª. Romualda Castro do Rêgo Barros

Profº. Sandro Gonçalves de Lima

Profª. Simone Cristina Soares Brandão

Dedico esta dissertação de Mestrado à Deus, soberano em tudo;

aos meus pais, Luciano e Maria das Graças,

ao meu esposo, Samuel

e aos meus filhos amados, Gabriel e Israel,

pela compreensão, incentivo e confiança

no meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que tudo providenciou, toda a Honra e Glória!

Ao meu orientador Prof. Dr. Emanuel Sarinho pela dedicação, incentivo e apoio incondicional ao conhecimento científico e ao ensino, um visionário da ciência.

Ao coordenador da Residência Médica em Alergia e Imunologia Prof. Dr. Décio Medeiros, que nos incentiva à pesquisa e nos desperta diariamente aos cuidados com o paciente.

A todos os preceptores dos ambulatórios do Centro de Pesquisas em Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas – UFPE, neste período de formação e aprendizado constantes.

Aos amigos da residência em Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas – UFPE, que fizeram parte desta construção do saber. Hoje, meus eternos amigos.

À Kiara Lilia e funcionários dos ambulatórios destinados ao atendimento infantil, pelos seus cuidados de enfermagem e contribuição para o funcionamento operacional da pesquisa.

Ao Prof. Emídio Albuquerque pela atenção e ensino dos dados estatísticos.

Às amigas de outras instituições e serviços de saúde, que em atenção à pesquisa, encaminharam pacientes para atendimento no Hospital das Clínicas - UFPE.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio e concessão financeira para realização desta pesquisa.

E principalmente aos pacientes, que entregam a plenitude de suas vidas aos nossos cuidados, com tanta confiança e esperança de melhoras. A eles, todo nosso respeito!

"Nossa inteligência nos informa que o homem é capaz de muito, e por esta razão,
esperamos que ele possa ser capaz de modificar sua própria natureza e
transformar suas desarmonias em harmonias.
Somente a vontade humana pode atingir esse ideal."

(Trecho do livro - *The Prolongation of Life: Optimistic Studies* – 1908.)

ELIE METCHNIKOFF

RESUMO

Introdução: A prevalência de sibilância recorrente no lactente tem aumentado em vários países, e esse resultado não pode ser unicamente explicado por fatores hereditários, pois fatores ambientais têm tido papel importante, influenciando o sistema imunológico em fase inicial da vida. Desequilíbrios no balanço Th1/Th2 e Treg, por fatores externos que alteram a microbiota intestinal, favorecem respostas imunes deficientes ou até exacerbadas frente às várias agressões diárias. Através da ação imunoestimulatória *in vitro* dos probióticos, estudos começam a direcionar sua aplicação e avaliar os possíveis benefícios que essas bactérias podem promover. Atualmente, vem sendo realizados estudos com o uso de probióticos na prevenção e tratamento das infecções respiratórias, assim como na asma em crianças maiores, mas estudos para avaliar o comportamento dos probióticos em lactentes sibilantes são necessários. **Objetivos:** Identificar ensaios clínicos randomizados que tiveram como intervenção o uso de probióticos no tratamento das infecções respiratórias na infância; avaliar a ocorrência de sibilância após uso de probióticos como adjuvante no tratamento do lactente sibilante e a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ *in vitro*. **Métodos:** Para o primeiro objetivo específico realizamos uma revisão sistemática com ensaios clínicos randomizados que foram identificados em quatro bases de dados eletrônicas, avaliando o uso de probióticos na redução dos sintomas, na redução da duração da doença e redução de novos episódios de infecções respiratórias superior e inferior em crianças. Para o segundo objetivo específico, realizamos um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, paralelo, placebo-controlado em 60 lactentes sibilantes recorrentes, de seis a 24 meses de idade, no período de Abril de 2014 à Abril de 2015. Os lactentes foram randomizados para receberem diariamente uma mistura de probióticos ou placebo, adicionados ao tratamento convencional com esteroide inalatório durante oito semanas. Realizaram exames antes e após intervenção e foram acompanhados por mais oito semanas de seguimento. **Resultados:** Na revisão sistemática foram analisados 11 ensaios clínicos randomizados que apresentaram grande heterogeneidade em relação às cepas dos probióticos utilizadas, à forma de administração e ao tempo de intervenção. Redução de novos episódios de infecção respiratória foi o desfecho mais identificado em seis ensaios clínicos. No estudo experimental, o uso da mistura de probióticos foi mais propenso em reduzir a ocorrência de sibilância durante o período de intervenção e seguimento em comparação ao grupo placebo, entretanto não houve diferença significativa entre os dois grupos. Houve aumento com significância estatística da citocina IL-10 (P = 0,029) ao estímulo *in vitro* com *Phitohemaglutinina* A e da IL-12 aos estímulos com *Dermatophagoides pteronyssinus* (P = 0,040) e Probióticos (P = 0,032) no grupo que usou probióticos em comparação ao grupo placebo. **Conclusão:** Redução de novos episódios de infecção respiratória foi o desfecho positivo encontrado com o uso de probióticos nos ensaios clínicos randomizados da revisão sistemática. Probióticos exercem um efeito imunoestimulatório com maior expressão *in vitro* das citocinas IL-10 e IL-12, mas não houve benefício clínico entre os grupos que receberam a mistura de probióticos em comparação ao placebo.

Palavras-chave: Sibilância. Probióticos. Interleucina-10. Interleucina-12. Interferon-gama.

ABSTRACT

Introduction: The prevalence of recurrent wheezing in infants has increased in several countries, and this result can not be solely explained by hereditary factors as environmental factors have played an important role in influencing the immune system in early life. Imbalances in the Th1 / Th2 and Treg by external factors that alter the intestinal microbiota, favoring immune responses disabled or even exacerbated front of several daily aggressions. Through in vitro immunostimulatory action of probiotics, studies are beginning to direct their application and evaluate the possible benefits that these bacteria can promote. Currently, studies have been conducted with the use of probiotics in the prevention and treatment of respiratory infections, and asthma in older children, but studies to assess the behavior of probiotics in wheezing infants are needed. **Objectives:** To identify randomized controlled trials that had the intervention the use of probiotics in the treatment of respiratory infections in childhood; to evaluate the occurrence of wheezing after the use of probiotics as an adjunct in the treatment of wheezy infant and expression of IL-10, IL-12 and IFN-γ *in vitro*. **Methodology:** For the first specific goal we conducted a systematic review and randomized clinical trials that have been identified in four electronic databases, evaluating the use of probiotics in reducing symptoms, reducing disease duration and reduced new episodes of upper respiratory infections and lower in children. For the second specific goal, we conducted a randomized, double-blind, parallel, placebo-controlled study in 60 recurrent wheezing infants six to 24 months, from April 2014 to April 2015. Infants were randomized to receive a daily mixture of probiotic or placebo added to conventional treatment with inhaled steroid for eight weeks. Tests performed before and after intervention and were followed by eight weeks of follow-up. **Results:** The systematic review analyzed 11 randomized clinical trials that showed diverse with respect to strains of probiotics used, the form of administration and the intervention time. Reduction of new episodes of respiratory infection was the most frequent outcome in six clinical trials. In the experimental study, the use of the mixture of probiotics was more likely to reduce the occurrence of wheezing during the intervention and follow-up compared to the placebo group, however there was no significant difference between the two groups. There was increased with a statistical significance of IL-10 cytokine (P = 0.029) *in vitro* stimulation with *Phitohemaglutinina A* and IL-12 to the stimuli to house dust mite (P = 0.040) and Probiotics (P = 0.032) in the group using probiotics in compared to the placebo group. **Conclusion:** Reduction of new episodes of respiratory infection was the positive outcome found with the use of probiotics in randomized clinical trials systematic review. Probiotics exert an immunostimulatory effect with higher *in vitro* expression of IL-10 and IL-12 cytokines, but no clinical benefit from the groups receiving the mixture of probiotics compared to placebo.

Keywords: Wheezing. Probiotics. Interleukin-10. Interleukin-12. Interferon-gamma.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULOS	CONTEÚDO	Págs.
Capítulo I	**Figura 1**. Receptores *Toll-like* e *NOD-like* conectados aos padrões moleculares associados aos patógenos.	**27**
	Figura 2. Respostas inata e adaptativa dos probióticos: célula dendrítica como apresentadora de antígenos e estímulo das células T *naive.*	**31**
	Figura 3. Probióticos recolhidos por células dendríticas (CDs) no intestino.	**34**
Capítulo II	**Quadro 1.** Mistura de probióticos contida nos sachês.	**49**
	Figura 4. Fluxograma do ensaio clínico.	**50**
	Figura 5. Níveis de interleucina (IL-10) em tempos e estímulos diferentes e com concentração de probióticos 1,0 x 10^4, 1,0 x 10^5, 1,0 x 10^6, 1,0 x 10^7.	**54**
	Figura 6. Níveis de interleucina (IL-12) em tempos e estímulos diferentes e com concentração de probióticos 1,0 x 10^4, 1,0 x 10^5, 1,0 x 10^6, 1,0 x 10^7.	**55**
	Figura 7. Níveis de citocina (INF-γ) em tempos e estímulos diferentes e com concentração de probióticos 1,0 x 10^4, 1,0 x 10^5, 1,0 x 10^6, 1,0 x 10^7.	**56**
Capítulo III	**Artigo - 1 (Figura 1)** Diagrama de fluxo do processo de seleção dos ensaios clínicos randomizados.	**88**
	Artigo - 2 (Figura 1) Descrição do ensaio clínico: A) Diagrama *CONSORT*; B) Fluxograma dos participantes.	**122**
	Artigo - 2 (Figura 2) Episódios de sibilância	**125**
	Artigo - 2 (Figura 3) Detecção por citometria de fluxo dos níveis de citocina IL-10	**126**
	Artigo - 2 (Figura 4) Níveis de IL-12 detectados no sobrenadante da cultura de células totais	**127**
	Artigo - 2 (Figura 5) Níveis de INF-γ em cultura	**128**

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Págs.
Tabela 1. Variáveis utilizadas no artigo - 2	**43**
(Artigo - 1)	
Tabela 1. Características dos ensaios clínicos randomizados e eventos adversos	**89**
Tabela 2. Avaliação do risco de viés e critério de qualidade nos estudos selecionados	**91**
Tabela 3. Resultados dos desfechos primários dos estudos	**92**
Tabela 4 - Valores das medidas de associação dos desfechos primários positivos nos grupos probióticos dos estudos selecionados	**94**
(Artigo - 2)	
Tabela 1. Características dos lactentes sibilantes do estudo	**123**
Tabela 2. Comparação dos aspectos clínicos entre os grupos de lactentes sibilantes que receberam probióticos ou placebo na visita 1, após 8 semanas e no seguimento até 16 semanas	**124**
Tabela 3. Níveis das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ em diferentes meios de estímulo *in vitro,* antes e após uso de probióticos ou placebo	**129**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla/ abreviação	Significado
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
API	*Asthma Predictive Index*
BDP	Dipropionato de Beclometasona
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	Corticosteróide inalatório
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DC	Células Dendríticas
Der p	*Dermatophagoides pteronyssinus*
DP	Desvio Padrão
ECR	Ensaio Clínico Randomizado
EISL	*Estudio Internacional de Sibilância en Lactentes*
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimento e Agricultura
GALT	*Gut Associated Lymphoid Tissue*
GINA	*Global Initiative for Asthma*
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
IC	Intervalo de Confiança
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IL-10	Interleucina - 10
IL-12	Interleucina - 12
INF-γ	*Interferon - gama*
Kg	Kilograma
L	Litro
Mcg/μm	Micrograma
mg	Miligrama
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
NLR	*Nod-like receptors*

WAO	*World Allergy Organization*
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	*Odds Ratio*
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógeno
PB	Probiótico
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PHA	PhitoHemaglutinina A
PPG-CCS	Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
PRACTTAL	*Practical Allergy Report*
PRR	*Pattern Recognition Receptors*
RN	Recém-nascido
RR	Razão de Risco
SPSS	*Statistical Package for the Social Sciences*
ST	Sangue Total
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	T *helper*
TLR	*Toll-like receptors*
TNF-a	Fator de Necrose Tumoral - *alfa*
Treg célula	Célula T reguladora
UBSF	Unidade Básica de Saúde da Família
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I **18**

1.1 APRESENTAÇÃO **18**

1.2 REVISÃO DA LITERATURA **20**

1.2.1 Lactente sibilante: fenótipos e fatores de risco **20**

1.2.2 Aspectos imunológicos do lactente sibilante: microbiota e imunologia intestinais **23**

1.2.3 Ação dos probióticos na mucosa intestinal e imunidade sistêmica **29**

1.2.4 Probióticos no lactente sibilante **32**

1.2.5 Mistura de probióticos e resposta imunológica **35**

1.3 JUSTIFICATIVA **38**

1.4 HIPÓTESES **38**

1.5 OBJETIVOS **39**

1.5.1 Objetivo Geral **39**

1.5.2 Objetivos Específicos **39**

2 CAPÍTULO II **40**

2.1 MÉTODOS **40**

2.1.1 Delineamento do estudo **40**

2.1.2 População do estudo **40**

2.1.2.1 Critérios de inclusão **41**

2.1.2.2 Critérios de exclusão **41**

2.1.3 Cálculo do tamanho da amostra **42**

2.1.4 Variáveis do estudo **43**

2.1.5 Operacionalização da pesquisa **46**

2.1.5.1 Geração da sequência randomizada de alocação **47**

2.1.5.2 Mascaramento **47**

2.1.5.3 Descrição do Ensaio Clínico **48**

2.1.6 Coleta de dados **51**

2.1.7 Exames *in vivo* e *in vitro* **52**

2.1.8 Avaliação das citocinas **53**
2.1.9 Análise estatística **58**
2.1.10 Aspectos Éticos **59**

3 CAPÍTULO III **61**

3.1 ARTIGO 1 **61**
3.1.1 Folha de rosto **62**
3.1.2 Resumo **63**
3.1.3 Abstract **64**
3.1.4 Introdução **65**
3.1.5 Métodos **66**
3.1.6 Resultados **71**
3.1.7 Discussão **76**
3.1.8 Referências **82**
3.2 ARTIGO 2 **95**
3.2.1 Folha de rosto **96**
3.2.2 Resumo **97**
3.2.3 Abstract **99**
3.2.4 Introdução **101**
3.2.5 Métodos **103**
3.2.6 Resultados **111**
3.2.7 Discussão **113**
3.2.8 Referências **118**

4 CAPÍTULO IV **130**

4.1 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO **130**
Referências **131**
Apêndices **139**
APÊNDICE A – Tabulação das variáveis **139**
APÊNDICE B – Questionário da anamnese **145**
APÊNDICE C – Critérios de elegibilidade **150**
APÊNDICE D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) **152**
APÊNDICE E - Ficha diário do paciente **154**

Anexos **155**

ANEXO A – Questionário escrito do Estudo Internacional sobre Sibilância em Lactentes (QE-EISL) **155**

ANEXO B – Orientações de controle ambiental – HC/UFPE **160**

ANEXO C – Geração da Sequência Randomizada da Alocação **161**

ANEXO D – Viabilidade Microbiológica dos Probióticos **163**

ANEXO E – *Check List* do *CONSORT* **164**

ANEXO F - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa **166**

ANEXO G – Registro pelo *ClinicalTrials.gov* **168**

ANEXO H – Chamada Pública MCTI/CNPq Nº 14/2013 - Universal **169**

ANEXO I – Instruções aos autores para o periódico Jornal de Pediatria **170**

ANEXO J – Parecer do Jornal de Pediatria (JPED) **180**

ANEXO K – Instruções aos autores para o periódico *Clinical & Experimental Allergy* **181**

1 CAPÍTULO I

1.1 APRESENTAÇÃO

A sibilância recorrente é um sinal clínico que reflete o acometimento das vias respiratórias inferiores por uma variedade de doenças, sendo uma das principais causas de morbidade no lactente e importante problema de saúde publica no mundo, devido aos altos custos com tratamento, visitas aos departamentos de emergência e perda de dias de trabalho pelos pais e cuidadores (EL-GAMAL; EL-SAYED, 2011).

Nas últimas décadas, a prevalência de sibilância recorrente tem aumentado em vários países, e esse resultado não pode ser unicamente explicado por fatores hereditários, pois fatores ambientais têm papel importante na interação e modulação do sistema imunológico antes mesmo do nascimento (GARCIA-MARCOS et al., 2010).

No início da vida, as respostas imunes inata e adaptativa se organizam para assegurar a integridade do organismo e encontram principalmente na mucosa intestinal a via inicial destas adaptações (FORCHIELLI; WALKER, 2005). O fenótipo Th2 é predominante na fase inicial do desenvolvimento do sistema imunológico dos lactentes (ALLAN WALKER, 2013). Com a colonização do trato gastrointestinal e formação de sua microbiota, inicialmente com bactérias da mãe e do meio ambiente, e em seguida com a amamentação e introdução de outros alimentos, são gerados estímulos no tecido linfoide intestinal que levam a uma gradual inibição da via Th2 e aumento progressivo da via Th1 (GHADIMI et al., 2008).

Os microrganismos que compõem a microbiota intestinal, a qual inclui espécies autóctones (adquiridas no primeiro ano de vida) e outras espécies alóctones (em trânsito temporário, com origem externa), exercem funções metabólicas, tróficas, de estímulo, de proteção e competição local (PALMER et al., 2007). Modificar a sua composição pode ser uma nova forma de abordar, prevenir e tratar determinadas enfermidades com impacto na saúde e bem-estar do indivíduo (BUTEL, 2014).

Através desta inserção na microbiota intestinal os probióticos, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro, exercendo estímulos no tecido linfoide intestinal com maior expressão das vias Th1 e T regulatória (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

De acordo com as últimas revisões sistemáticas e metanálises, o uso de probióticos em

pacientes com infecções respiratórias, rinite alérgica e eczemas mostraram resultados positivos na prevenção e tratamento, com redução da gravidade dos sintomas e diminuição do uso de medicações (FIOCCHI et al., 2012; HAO et al., 2011; KING et al., 2014; PANDURU et al., 2014; TORLEY et al., 2015). Por outro lado, estudos relacionados à prevenção da asma e sibilância na infância (ensaios clínicos com intervenções perinatais e pós-natais), com diferentes cepas, doses e tempo de intervenção, são escassos e ainda não mostraram resultados favoráveis para indicação clínica (ABRAHAMSSON et al., 2013; AZAD et al., 2013; DAS; NAIK; SINGH, 2013; ELAZAB et al., 2013; JENSEN et al., 2012; ROSE et al., 2010; WEST; HAMMARSTRÖM; HERNELL, 2013).

Os probióticos apresentam padrões moleculares em sua estrutura que são reconhecidos pelos receptores nas células apresentadoras de antígenos como *gatilhos* da resposta imune, produzindo citocinas em mucosa intestinal, que se espera atuarem em sítios distantes, como o trato respiratório. É nesse processo de imunomodulação, iniciada no tecido linfoide intestinal, que os probióticos se apresentam como opção terapêutica (FORSYTHE, 2011).

Para avaliar o uso de probióticos no tratamento da sibilância recorrente do lactente, objetivos específicos foram formulados: identificar ensaios clínicos randomizados que tiveram como intervenção o uso de probióticos no tratamento das infecções respiratórias na infância e realizar um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, paralelo, placebo-controlado para avaliar a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ *in vitro* após uso de probióticos e seu impacto clínico como adjuvante no tratamento do lactente com sibilância recorrente.

De acordo com as normas estabelecidas pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (PPG/CS/UFPE), a presente dissertação foi elaborada em quatro capítulos. O primeiro capítulo consta de uma revisão da literatura construída em cinco tópicos para o entendimento sobre lactente sibilante, imunologia e probióticos. Neste capítulo, o objetivo geral da dissertação é apresentado, e para cada objetivo específico foi construido um artigo original. O segundo capítulo versa sobre os métodos utilizados na elaboração dos dois artigos. O terceiro capítulo consta: artigo 1 - **Probióticos no tratamento das infecções do trato respiratório superior e inferior nas crianças: revisão sistemática baseada em ensaios clínicos randomizados** – aceito para publicação no Jornal de Pediatria (JPED) e o artigo 2 – **Probióticos como adjuvante no tratamento da sibilância recorrente do lactente: um ensaio clínico randomizado controlado** - a ser submetido ao periódico *Clinical Et Experimental Allergy*. No quarto e último capítulo: as conclusões da dissertação e as referências utilizadas na apresentação da dissertação e na elaboração da revisão da literatura, assim como os apêndices e anexos.

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

Introdução

A presente revisão da literatura foi elaborada para oferecer melhor compreensão da dinâmica da resposta imune do lactente sibilante ao uso de probióticos, para tanto foi dividida em tópicos: a) Lactente sibilante: fenótipos e fatores de risco; b) Aspectos imunológicos do lactente sibilante: microbiota e imunologia intestinais; c) Ação dos probióticos na mucosa intestinal e imunidade sistêmica; d) Probióticos no lactente sibilante; e) Mistura de probióticos e resposta imunológica.

1.2.1 Lactente sibilante: fenótipos e fatores de risco

A síndrome do lactente sibilante é caracterizada pela presença de sibilância contínua por um mês ou por três ou mais episódios de sibilância em período de seis meses (KRAWIEC et al., 2001). Constitui uma das principais causas de morbidade no lactente em todo o mundo e em importante desafio na saúde pública, devido aos altos custos para tratamento, visitas ao departamento de emergência, hospitalizações e perda de dias de trabalho pelos pais e cuidadores (DE JONG et al., 2007; MASOLI et al., 2004).

Em estudo multicêntrico envolvendo 30.093 lactentes com idade entre 12 e 15 meses, com participação de 17 centros da América Latina e Europa, o Estudo Internacional de Sibilância em Lactentes (EISL) encontrou prevalência de sibilância no início da vida de 45,2% e de sibilância recorrente de 20,3% (MALLOL et al., 2010). A média da prevalência de sibilância recorrente na América Latina foi de 21,4% e em centros Europeus foi de aproximadamente 15%. No Brasil, o questionário-EISL foi aplicado em sete capitais: Belém (PA), Belo Horizonte (MG), Curitiba (PR), Porto Alegre (RS), São Paulo (SP), Fortaleza (CE) e Recife (PE), evidenciando prevalência de sibilância de 43 a 61% e de sibilância recorrente de 25 a 36,3% (CHONG NETO; MEDEIROS; ROCHA, 2012). Em Recife, o estudo constatou prevalência de sibilância de 43% e recorrência do sintoma em aproximadamente 25% dos lactentes sibilantes (MEDEIROS et al., 2011).

Com relação ao impacto na saúde pública, o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) registrou no período de Janeiro de 2014 até Fevereiro de 2015, um total de 477 internações por *asma* em menores de um ano, sendo 216 (45,3%) na Região Nordeste. Em crianças de um a quatro anos, em mesmo período, houve um total de 2.045 internações por asma, com as Regiões Nordeste e Sudeste apresentando as maiores taxas de internações no Brasil, com 733 (35,8%) e 727 (35,5%), respectivamente (DATASUS, 2015).

A sibilância é um sinal clínico que reflete acometimento das vias respiratórias inferiores por várias doenças, embora a asma seja a mais comum, deve ser sempre diagnóstico de exclusão (KRAWIEC et al., 2001). Os lactentes são propensos a terem sibilância devido a fatores anatômicos e fisiológicos relacionados a uma maior complacência do arcabouço costal, parênquima pulmonar menos complacente, vias aéreas com menor diâmetro e menos poros de comunicação entre os alvéolos e bronquioloalveolares (FREY et al., 2000).

Manifestações recorrentes de tosse, sibilância e dificuldade respiratória, de gravidade e duração variáveis, usualmente desencadeadas por infecções respiratórias virais, devem ser analisadas dentro do diagnóstico diferencial da asma (EL-GAMAL; EL-SAYED, 2011). Infecções pelos vírus sincicial respiratório (VSR), rinovírus humano, metapneumovírus, adenovírus e outros vírus causam quadros de bronquiolite viral, que podem evoluir com persistência da sibilância (MALLOL; AGUIRRE; WANDALSEN, 2010). Outras doenças como tuberculose, fibrose cística e pneumonias atípicas são importantes causas de sibilância recorrente e podem, também, serem confundidas com asma nesta faixa etária (PEDERSEN et al., 2011).

No estudo de coorte de nascidos vivos em Tucson, Arizona, aproximadamente 50% das crianças apresentaram sibilância no início da vida. Dois terços destas crianças iniciaram os sintomas no primeiro ano de vida (sibilantes precoces) e um terço iniciaram após três anos de vida (sibilantes tardios). Dentre os sibilantes precoces, até 50% evoluiram para remissão espontânea do quadro, mas cerca de 50% persistiram sibilando aos seis anos de idade. Crianças com sibilância recorrente têm um risco maior de desenvolver asma persistente no momento em que chegam à adolescência, e crianças atópicas em particular, são mais propensas a continuarem sibilando (MARTINEZ, 1995).

O lactente sibilante pode ser identificado por vários fenótipos de sibilância. A maioria das classificações propostas na literatura foi descrita a partir de estudos de coorte prospectivos e basearam-se principalmente em características atópicas e na idade de prevalência (ADHAM et al., 2008; FRANK et al., 2008; KURUKULAARATCHY et al., 2003; MARTINEZ, 1995; MIDODZI et al., 2008; RUSCONI et al., 1999). No consenso PRACTTAL (*Practical*

Allergy Report), especialistas da Academia Europeia de Alergia e Imunologia Clínica e Academia Americana de Asma, Alergia e Imunologia descrevem quatro padrões distintos de sibilância durante a infância, assim como sua evolução: sibilância transitória (sibilos durante os três primeiros anos de vida e não mais após essa idade); sibilância não atópica (sibilância desencadeada principalmente por vírus que tende a desaparecer com o avançar da idade); asma persistente (sibilância associada a manifestações clínicas de atopia; eosinofilia e/ou níveis séricos elevados de imunoglobulina E (IgE) total ou sensibilização comprovada a alimentos e/ou aeroalérgenos; ter pai e/ou mãe com asma); e sibilância intermitente grave (episódios pouco frequentes de sibilância aguda associados a poucos sintomas fora dos quadros agudos, e com a presença de características de atopia) (BACHARIER et al., 2008).

Entretanto, a literatura ressalta que a classificação dos fenótipos não é fixa, podendo, inclusive, apresentar alterações ao longo dos anos de sibilância. Assim, um paciente que sibila apenas com episódios virais na infância pode se sensibilizar e evoluir com características atópicas e sibilância por múltiplos desencadeantes (GARCIA-MARCOS; MARTINEZ, 2010; SCHULTZ et al., 2010).

Como um dos maiores desafios da pratica clínica é diagnosticar precocemente a asma entre as crianças menores de três anos que sibilam, critérios diagnósticos, baseados em métodos não invasivos, foram propostos. O *Asthma Predictive Index* – API (Índice Preditivo para Asma), utilizando dados do estudo *Tucson*, tornou-se um dos critérios mais utilizado para predizer a evolução da sibilância na idade de 6 a 13 anos. A presença de antecedente familiar de atopia e dermatite atópica no lactente foram considerados critérios maiores, enquanto rinite alérgica, sibilância sem infecções de vias aéreas e eosinofilia $\geq$ 4% foram considerados critérios menores. A presença de um critério maior ou dois menores em lactente com três ou mais episódios de sibilância é considerado alto risco para o diagnóstico de asma. Entre as crianças com índice preditivo positivo, 76% tiveram sintomas de asma entre 6 e 13 anos de vida e, entre as com índice preditivo negativo, 95% não apresentaram sintomas de asma nesta faixa etária (CASTRO-RODRÍGUEZ et al., 2000). Atualmente, com o objetivo de avaliar com maior ênfase o perfil atópico das crianças com sibilância recorrente, o API original recebeu modificações: ao critério maior foi acrescentada sensibilização a um ou mais aeroalérgenos e nos critérios menores, a rinite foi substituída por sensibilização a alimentos como leite, ovo e amendoim (BACHARIER; GUILBERT, 2012).

O conhecimento dos fatores de risco associados aos fenótipos do lactente sibilante ajuda a identificar crianças de alto risco para a persistência da sibilância e que poderiam se beneficiar com intervenções de prevenção primária e secundária (BESSA et al., 2014). De

acordo com o EISL, os fatores de risco mais importantes para recorrência de sibilância no primeiro ano de vida são: história familiar de asma e/ou rinite, tabagismo na gestação, sexo masculino, infecções de vias aéreas superiores nos primeiros três meses de vida, frequência à creche e eczema na infância (CAROLINE et al., 2010). Entre os fatores hereditários, estudos prospectivos apontaram, principalmente, o sexo masculino (MELÉN et al., 2004), a sensibilização precoce a alérgenos (GUILBERT et al., 2004; HERR et al., 2012), os antecedentes pessoais de atopia (BOOKMAN et al., 2011) e as alterações no sistema imunológico, com expressão maior das citocinas T *helper* 2 (SARRIA et al., 2014).

No contexto da investigação, os marcadores de atopia, representados pela presença de eosinofilia periférica, elevação sérica de IgE total e sensibilização à aeroalérgenos e alérgenos alimentares têm colaborado para o diagnóstico precoce de asma neste grupo de lactentes com sibilância recorrente (JUST et al., 2010).

1.2.2 Aspectos imunológicos do lactente sibilante: microbiota e imunologia intestinais

Os vários mecanismos fisiopatológicos implicados no desenvolvimento da sibilância recorrente, ainda não estão totalmente esclarecidos (CAMARA et al., 2004). Alguns vírus como o sincicial respiratório (VSR) e o rinovírus humano C, agentes da bronquiolite viral mais grave, desencadeiam sibilância que persiste por pelo menos dois meses do evento inicial (BOSIS et al., 2008; TEERATAKULPISARN, 2014). O mecanismo pelo qual estes vírus desencadeiam a sibilância recorrente está associado à resposta de células T, caracterizada principalmente pela produção de citocinas Th2, a mesma resposta observada na asma (PÉREZ-YARZA, 2007; WANDALSEN, 2011).

Em indivíduos predispostos, parece haver ativação precoce do sistema imune envolvido com doenças alérgicas, como a asma, em que há formação de imunoglobulinas IgE, tanto para alérgenos alimentares como para a aeroalérgenos, de acordo com a frequência da exposição, intensidade do estímulo e a idade do paciente (GUILBERT et al., 2004).

O fenótipo Th2 é o predominante na fase inicial do desenvolvimento do sistema imunológico dos lactentes. Com a colonização intestinal, há o amadurecimento desse sistema, favorecendo uma gradual inibição da via Th2 e um aumento progressivo da via Th1 (ÖZDEMIR, 2010; PRESCOTT; NOWAK-WĘGRZYN, 2011). Neste processo, o estímulo da colonização intestinal por bactérias comensais é fundamental para o desenvolvimento

adequado do sistema imunológico, contribuindo para o equilíbrio Th1/Th2, expressão das células T regulatórias (Treg), produção de imunoglobulina A (IgA) e indução de tolerância para antígenos alimentares e bacterianos (ABRAHAMSSON et al., 2011). No entanto, em indivíduos geneticamente predispostos, vários elementos contribuem para uma descontinuidade desse processo de tolerância e propiciam a expressão do fenótipo da criança alérgica (HO, 2010).

As respostas imunes inata e adaptativa se organizam para assegurar a integridade do organismo e encontram na mucosa intestinal a via inicial destas adaptações (FORCHIELLI; WALKER, 2005).

O trato gastrointestinal (TGI) concentra o maior número e a maior diversidade de espécies bacterianas que colonizam o corpo humano (ALLAN WALKER, 2013). Embora as bactérias estejam presentes em todo o TGI, o maior número de bactérias reside no ceco e cólon. A população bacteriana do TGI varia de 10^{11} a 10^{14} unidades formadoras de colônia (UFC)/mL no conteúdo intestinal, com 400 a 1.000 espécies diferentes de bactérias, sendo mais de 99% da microbiota representada por apenas 30 a 40 espécies bacterianas (RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2014).

O processo de colonização do TGI pode ser dividido em diferentes estágios. O estágio inicial ocorre durante o parto e nas primeiras horas de vida, o segundo estágio compreende a fase de amamentação e o terceiro estágio reflete a introdução de alimentos e de fatores ambientais que podem influenciar a colonização das bactérias nos primeiros dois anos de vida, ocasião em que se alcança certa estabilidade até a fase adulta do indivíduo (ALLAN WALKER, 2013; RAUTAVA et al., 2012).

O início da colonização do TGI ocorre logo após o nascimento, com bactérias provenientes da mãe e do meio ambiente. Desta forma, o primeiro fator determinante na composição da microbiota intestinal é a forma de nascimento. Crianças nascidas por parto vaginal são colonizadas por bactérias que residem na região perineal materna, inicialmente por bactérias anaeróbias facultativas e posteriormente por anaeróbias como *Bifidobacterium* e *Bacteroides*. As crianças nascidas por parto cesáreo são colonizadas por uma população mais heterogênea de bactérias encontradas no ambiente hospitalar (FORCHIELLI; WALKER, 2005).

Na fase de amamentação, os grupos bacterianos mais frequentes no leite materno são estafilococos, estreptococos, corynebactérias, lactobacilos, micrococos, propionibactérias e bifidobactérias, presentes inicialmente na pele e mamilos da genitora. O predomínio de bifidobactérias em recém-nascidos amamentados com leite materno se deve a presença de

galactoligossacarídeos, que atuam como prebióticos. Já em recém-nascidos alimentados com fórmulas infantis foi observada uma maior concentração de *Clostridium sp, Bacteroides,* enterococos e enterobactérias (RAUTAVA et al., 2012).

O desenvolvimento da microbiota intestinal também é afetado pela região geográfica em que a criança nasce e essa diferença é descrita até mesmo em países de um mesmo continente. A formação da microbiota parece diferir entre crianças que vivem em países desenvolvidos e em desenvolvimento, podendo ser atribuído aos elevados níveis de contaminação ambiental, como sistema de saneamento e esgoto, pelos quais as crianças estão expostas no início da vida (ALLAN WALKER, 2013).

Ao longo do TGI existem diferentes ambientes que variam em potencial de oxirredução, pH, disponibilidade de nutrientes e velocidade de fluxo pelo peristaltismo. Essas diferenças podem alterar a composição da microbiota intestinal. Na cavidade oral encontram-se mais de 400 espécies bacterianas, sendo os gêneros mais comuns: *Streptococcus, Veillonella e Actinomyces.* O esôfago e estômago, devido ao baixo pH, têm uma concentração muito baixa de bactérias, entre 0 a 10^2 UFC/mL de suco gástrico. As bactérias mais encontradas no estômago são: *Lactobacillus, Streptococcus, Peptostreptococcus* (HOVAV, 2014).

No duodeno a composição da microbiota é constituída principalmente por *Lactobacillus* e *Streptococcus.* O segmento jejunal, com um aumento do pH em torno de 8, alberga um maior número de bactérias, cerca de 10^5 a 10^7 UFC/mL de conteúdo intestinal, composta por: *Streptococcus, Lactobacillus, Haemophilus, Veillonela, Bacteroides, Corynebacterium e Actinomyces*. Devido à passagem lenta através do íleo, essa população bacteriana aumenta, em torno de 10^7 a 10^8 UFC/mL de conteúdo intestinal e é no cólon onde se apresenta a maior diversidade e concentração de microrganismos, entre 10^{11} a 10^{14} UFC/mL de conteúdo intestinal (JALANKA-TUOVINEN et al., 2011).

De maneira geral, as bactérias anaeróbias facultativas, como *Escherichia coli, Enterococcus* são as primeiras bactérias a colonizarem o TGI do recém-nascido, devido ao teor de oxigênio inicial encontrada no tubo digestivo. À medida que essas bactérias utilizam o oxigênio, o meio vai se tornando mais adequado para as bactérias anaeróbias estritas como: *Bifidobacterium, Bacteroides e Clostridium* (ALLAN WALKER, 2013; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2014).

A estabilidade da microbiota é um processo ativamente mantido através das inter-relações entre as bactérias e o hospedeiro. Bactérias que residem e convivem harmonicamente com o hospedeiro são chamadas autóctones, já as que não colonizam o intestino, apenas

passam através do TGI provenientes do meio ambiente, são identificadas como alóctones. Fatores externos, como o uso de antibióticos, podem alterar os componentes da microbiota intestinal, em qualidade e quantidade, suprimindo bactérias benéficas como *Bifidobacterias, Streptococcus e Lactobacillus* do lúmen intestinal e levando a um quadro de disbiose (SAVINO et al., 2011).

A mucosa intestinal humana é a principal interface entre o sistema imunológico e o ambiente externo. Nela estão localizados linfócitos intra-epiteliais, principalmente linfócitos T citotóxicos e supressores, e linfócitos B que secretam imunoglobulinas IgA. Como órgão imunológico, o intestino produz a maior parte de anticorpos de todo o organismo, aproximadamente 40mg/Kg de massa corpórea/dia, e contém 80% de todas as células produtoras de anticorpos do organismo. Estes linfócitos estão organizados na mucosa intestinal em estruturas linfoides constituindo o GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) (FORCHIELLI; WALKER, 2005).

O epitélio intestinal é recoberto por uma camada de muco que o separa do lúmen e é composto por mucinas, que são glicoproteínas secretadas pelas células caliciformes, constituindo a primeira barreira de defesa entre o meio externo e as células epiteliais. As células epiteliais polarizadas estão conectadas umas às outras pelas "*tight junctions*", que modulam a permeabilidade do epitélio. Outra barreira importante no mecanismo de defesa não específico é a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células de *Pannet*, presentes nas criptas da mucosa intestinal (GHAFFARIAN, 2012).

Na resposta imune inata, as células de defesa (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) respondem inicialmente através de receptores de reconhecimento de padrões denominados PRR (*pattern recognition receptors*). Os microrganismos, por sua vez, apresentam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que serão reconhecidos pelos PRR. Quando há o reconhecimento de microrganismos pelos macrófagos ocorre ativação de sinais para a fagocitose e resposta inflamatória (MURRAY; WYNN, 2011).

Os microrganismos que atravessam a primeira defesa e resistem aos peptídeos antimicrobianos se aproximam intimamente ao epitélio e são reconhecidos pelos receptores chamados de TLR (*Toll-like receptors*) e NLR (*Nod-like receptors*) (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012). Os receptores de reconhecimento padrão TLR são moléculas transmembrânicas que contêm um domínio externo à membrana e uma cauda intracelular, já os receptores Nod que estão localizados no citosol celular, NLR1 e NLR2, estão envolvidos no reconhecimento de peptideoglicanos, um importante componente da parede celular bacteriana (ROBERTSON; GIRARDIN, 2013). O estímulo destas proteínas, de maneira similar aos TLRs, induz a

produção de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (**Figura 1**).

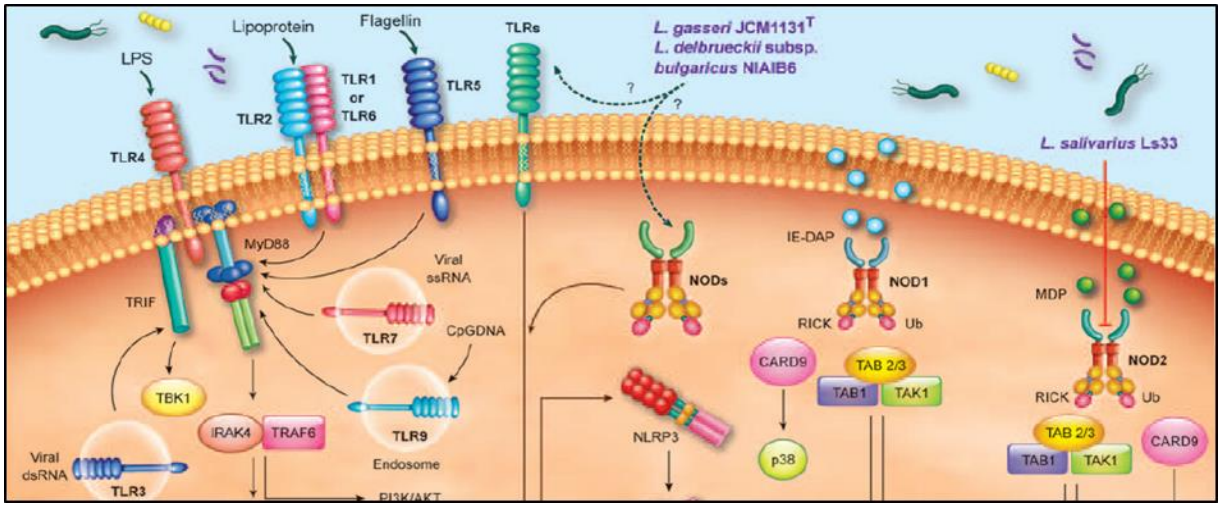


Figura 1. Receptores *Toll-like* e *NOD-like* conectados aos padrões moleculares associados aos patógenos (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

O sistema imune inato reconhece um grande número de estruturas moleculares das bactérias, como os componentes da parede bacteriana (lipopolissacarídeos, peptideoglicanos e ácidos lipoteicoicos) e a flagelina, componente do flagelo bacteriano. Diferentes estruturas ativam diferentes TLRs: o TLR2 reconhece peptideoglicanos e ácidos lipoteicoicos; o TLR3 reconhece RNA de dupla-fita, comum em vírus; o TLR4 é o receptor de lipopolissacarídeos, principal componente da parede de bactérias Gram-negativas; o TLR5 reconhece a flagelina. A ligação de componentes dos microrganismos com esses receptores induz ao recrutamento de proteínas adaptadoras específicas que transduzem o sinal, ativando quinases e fatores de transcrição, como o NF-kB e STAT-1, com subsequente produção de mediadores inflamatórios (LIU; ZHANG; ZHAO, 2010).

As células dendríticas (DC), células apresentadoras de antígenos (APCs), promovem uma conexão entre estruturas celulares presentes no lúmen intestinal e as células da resposta imune adaptativa. Este papel *ponte* é crucial para dar início à resposta imune, pois as células T *näive* não respondem aos antígenos livres, mas aos antígenos que são apresentados pelas APCs, com produção de citocinas (HOVAV, 2014).

As citocinas produzidas são componentes imunológicos chaves que atuam em outros órgãos e estão envolvidas nas respostas direcionadas para a asma, para a sibilância viral e

outras doenças respiratórias. Dentre elas, temos as citocinas do padrão Th1 que são: interleucina-12 (IL-12) e *interferon-gamma* (INF-γ) e a do padrão regulatório, como a interleucina-10 (IL-10) (TRINCHIERI, 2003).

A IL-12 e o INF-γ têm sua importância descrita nas respostas a bactérias intracelulares, além de estarem envolvidas na resposta imune viral. A IL-12 é a principal mediadora entre a resposta imune inata e adaptativa. Foi identificada originalmente como ativadora da função citotóxica das células *Natural Killers* (NK), estimulando a produção de INF-γ, além de diferenciar células T *näive* para Th1 (TRINCHIERI, 2003). O INF-γ, por sua vez, estimula a produção da IL-12 pelas células dendríticas e macrófagos, ativando o que é conhecido como eixo IL-12/INF-γ (BOEHM et al., 1997).

Durante as reações da imunidade inata, a IL-12 é produzida em resposta à sinalização dos TLRs induzida por estímulos microbianos e mediante a conexão entre o ligante do CD40 nas células T com o CD40 nos macrófagos e células dendríticas (SCHULZ et al., 2000). O INF-γ além de ativar os macrófagos e inibir a proliferação de células Th2, age nas células B suprimindo a síntese de IgE (BOEHM et al., 1997).

Não só as citocinas responsáveis pela polarização da via Th1 são importantes no controle da sibilância recorrente, mas também as que controlam e promovem o equilíbrio Th1/Th2. Existem alguns tipos celulares com perfil regulatório, como os macrófagos, células dendríticas e células Treg que estão envolvidos na produção da IL-10. Esta citocina inibe a exacerbação da produção da IL-12 pelas células dendríticas e macrófagos, promovendo o controle das reações da imunidade inata e imunidade mediada por células. O papel da IL-10 na regulação da inflamação alérgica deve-se a sua habilidade de induzir tolerância e inibir a sobrevida de eosinófilos (PUNNONEN et al., 1993).

Estruturas moleculares presentes nas bactérias intestinais estimulam respostas imunes diferentes, o que faz distinguir uma batéria benéfica da patogênica. Alguns lipopolissacarídeos presentes nas paredes de espécies bacterianas, a presença de flagelos bacterianos ou mesmo ácido nucleico viral são indutores de respostas imunes deletérias ao organismo humano (DOGI; WEILL; PERDIGÓN, 2010). Já bactérias benéficas ao organismo tem a característica de induzir sinais que estimulam a produção de citocinas das vias Th1 e Treg. Dentre essas bactérias benéficas, temos os probióticos, considerados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “microrganismos vivos que ingeridos em quantidades suficientes promovem efeitos benéficos no hospedeiro” (FAO et al., 2002).

1.2.3 Ação dos probióticos na mucosa intestinal e imunidade sistêmica

Nos últimos anos, o interesse pelo consumo e investigação dos probióticos aumentou substancialmente, acompanhado por uma crescente evidência clínica dos benefícios atribuídos ao uso destes microrganismos (SANDERS, 2008).

Elie Metchnikoff propôs, posteriormente aos revolucionários ensinamentos microbiológicos de Louis Pasteur, que, para além do seu papel como agentes causadores de doenças, determinadas bactérias, nomeadamente as produtoras de ácido láctico presentes no leite fermentado, poderiam ter efeitos benéficos à saúde humana (ANUKAM; REID, 2007; MACKOWIAK, 2013). O primeiro microrganismo usado com esse objetivo, e descoberto por este microbiólogo russo em 1905, foi o *Lactobacillus bulgaricus* (MACKOWIAK, 2013).

Desde esta descoberta e depois de várias cepas serem usadas em ensaios clínicos, decorreram três décadas até surgir, no ano de 1935, o primeiro produto probiótico comercialmente disponível, um leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* (MACKOWIAK, 2013).

Derivado do grego e significando ‘pró-vida’, o termo probiótico foi proposto em 1965 por Daniel Lilly e Rosalie Stillwell para se referir a qualquer microrganismo com efeito positivo no balanço microbiano intestinal (ANUKAM; REID, 2007).

Os microrganismos que compõem a microbiota intestinal, a qual inclui espécies autóctones e outras espécies alóctones, exercem funções metabólicas, tróficas e de proteção, além de um papel nutricional no aproveitamento de elementos da dieta que poderiam ser perdidos pela excreção (PALMER et al., 2007). Modificar a sua composição pode ser uma nova forma de abordar, tratar e prevenir algumas enfermidades com impacto na saúde e bem-estar do indivíduo (BUTEL, 2014).

Para serem bem sucedidos nas suas funções, os probióticos devem possuir determinadas características que resultem em efeitos benéficos mensuráveis na saúde do hospedeiro: devem ser específicos e compatíveis com o hospedeiro, com um histórico de não patogenicidade e promover segurança para uso humano; devem ser capazes de resistir ao meio físico quando da passagem pelo tubo digestivo, nomeadamente ao pH ácido e à ação biliar; devem estar aptos a aderir e colonizar a mucosa intestinal rapidamente, interagindo com outras espécies; devem ser metabolicamente ativos no intestino, capazes de estimular o sistema imune e produzir substâncias antimicrobianas, ao mesmo tempo que primam por não

interferir na mudança de genes determinantes da resistência aos antibióticos (RAUCH; LYNCH, 2012; THOMAS; OCKHUIZEN; SUZUKI, 2014).

Para beneficiar o hospedeiro, tem enorme relevância o processo de fabricação dos probióticos, o seu armazenamento e sua viabilidade microbiológica, para que as suas propriedades se mantenham ao longo do tempo, sem perda de funcionalidade. Assim, são importantes os probióticos com boas propriedades biológicas, com boa capacidade de multiplicação e apropriados à produção em larga escala, pré-requisitos para veiculação do produto até o consumo (FIOCCHI et al., 2015; SANDERS, 2008).

A seleção da cepa probiótica ótima ou combinação de diferentes cepas, a indicação da doença susceptível de ser beneficiada com o seu uso, a dose do tratamento e sua duração são fatores que ainda não estão bem estabelecidos na literatura e que necessitam de estudos para padronização destes produtos em diversas áreas da saúde (FIOCCHI et al., 2015). Atualmente os probióticos mais usados são as bactérias lactoacidófilas, especialmente os *Lactobacillus spp*. E *Bifidobacterium spp*. E uma levedura não patogênica, a *Saccharomyces boulardii* (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

O mecanismo de ação dos probióticos já vem sendo bem detalhado quanto: a) funcionalidade microbiológica (por exclusão competitiva ou redução ativa de patógenos através da produção de ácidos graxos de cadeia curta e ácidos orgânicos; produção de bacteriocinas, mucinas e defensinas e produção de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio) com o objetivo de estabilizar ou melhorar a homeostase microbiana em áreas do corpo e reduzir a invasão e colonização por patógenos (DELCENSERIE et al., 2008); b) funcionalidade nutricional, com produção de vitaminas que agem em todo o organismo do hospedeiro humano (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015); c) funcionalidade fisiológica, com melhora do trânsito intestinal e das propriedades reológicas das secreções intestinais e respiratórias (DONGARRÀ et al., 2013); d) funcionalidade imunológica, com estímulo à produção de citocinas, como as interleucinas IL-10, IL-12 e INF-γ, além de outras citocinas apresentadas na **Figura 2** (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012; LEBEER; VANDERLEYDEN; DE KEERSMAECKER, 2010; THOMAS; VERSALOVIC, 2010).

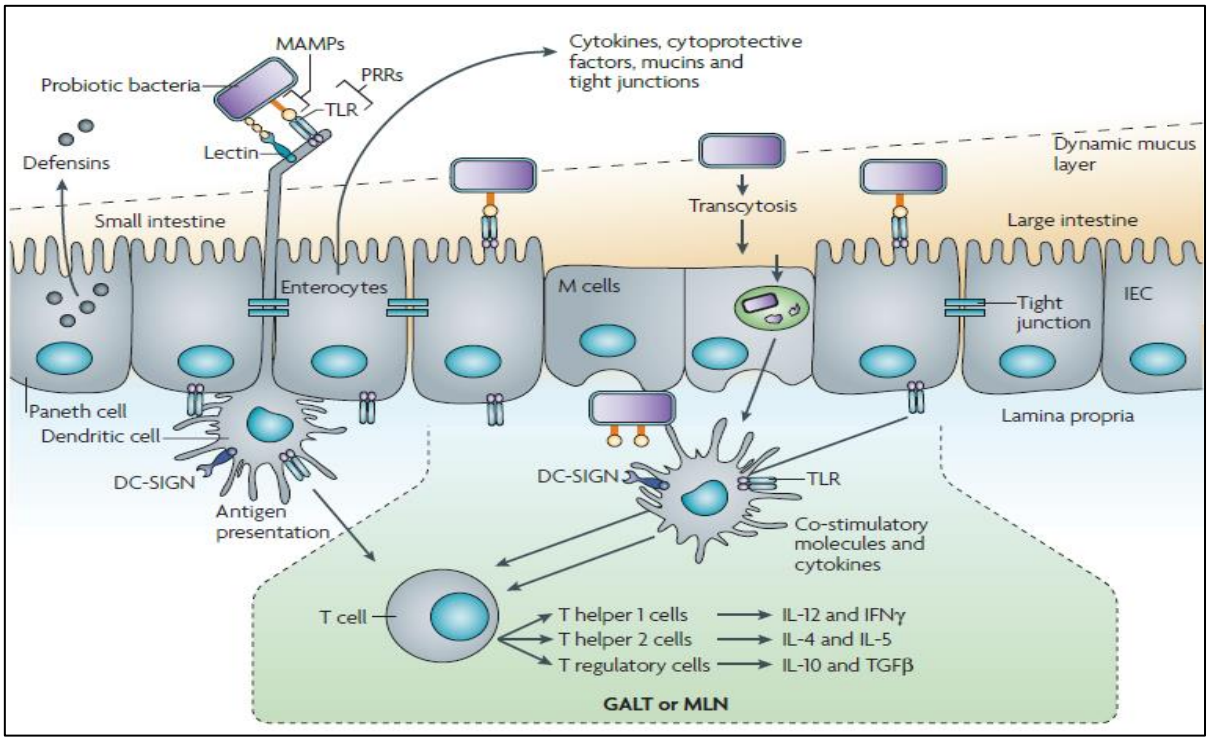


Figura 2. Respostas inata e adaptativa dos probióticos: célula dendrítica como apresentadora de antígenos e estímulo das células T *naive* (LEBEER; VANDERLEYDEN; DE KEERSMAECKER, 2010).

Bactérias como *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrueckii spp. Bulgaricus* and *Bifidobacteria* são importantes componentes da microbiota normal de humanos. Essas bactérias agem como imunomoduladoras participando na geração e manutenção de pelo menos três importantes atividades no sistema imune: atividade antimicrobiana e pró-inflamatória mediada por citocinas Th1, tais como IL-12, TNF-α, INF-γ; atividade anti-inflamatória e de tolerância oral, induzida e mantida por células Treg, tais como IL-10 e TGF-β e estimulação da resposta imune adaptativa, incluindo síntese local e sistêmica de imunoglobulinas IgA e IgG (TRINCHIERI, 2003).

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ou do sangue total são utilizadas como meios de cultura para se analisar o estímulo imunológico que os probióticos exercem *in vitro*, induzindo a produção de várias citocinas (GACKOWSKA et al., 2006). Em ensaio clínico realizado em crianças asmáticas e com rinite alérgica, com idade de seis a 12 anos, o estudo mostrou que *Lactobacillus gasseri* A5 administrado por oito semanas estimulou em PBMC a produção de TNF-α, INF-γ, IL-12 e IL-13 (CHEN et al., 2010).

1.2.4 Probióticos no lactente sibilante

A terapia inalatória com corticosteroide constitui a *pedra angular* do tratamento da sibilância recorrente e da asma em menores de cinco anos. O inalador dosimetrado pressurizado com espaçador valvular (com máscara facial) é o sistema adequado de dispositivo para o uso destas medicações (BACHARIER et al., 2008; PEDERSEN et al., 2011).

Em recente revisão sistemática, com o objetivo de analisar artigos publicados sobre tratamento da sibilância em lactentes e pré-escolares com corticosteroides inalatórios (ICS), incluindo o efeito em subgrupos de pacientes que tiveram as crises de sibilância por *gatilhos múltiplos*, isto é, por vários antígenos e por sibilância viral, concluiu que a terapia com ICS em doses diárias baixas de 100-200µg resulta em melhorias clínicas significativas em lactentes e pré-escolares com suspeita de asma (sibilância por *gatilhos múltiplos*) (MAAS et al., 2009). Apesar de não terem sido estudadas, as doses diárias mais elevadas poderiam estar associadas com efeitos mensuráveis sobre o crescimento (CASTRO-RODRIGUEZ; PEDERSEN, 2013).

Em 2008, o *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) anunciou a sua intenção de apoiar uma nova rede de gerenciamento de ensaios clínicos, com o objetivo de identificar novas abordagens de tratamento da asma em pacientes pediátricos e adultos, conhecida como *AsthmaNet*. No período de sete anos seguintes, finalizado em 2015, três grandes estudos foram publicados para o tratamento na infância: *Best Add-on Therapy Giving Effective Responses* (BADGER), *Step-up Yellow Zone Inhaled Corticosteroids to Prevent Exacerbations* (STICS) e o *Use of beclomethasone dipropionate as rescue treatment for children with mild persistent asthma* (TREXA) (MARTINEZ et al., 2011). A característica principal destes estudos foi a necessidade de identificar a terapia mais efetiva para crianças que tinham sibilância recorrente ou asma (SUTHERLAND; BUSSE, 2014).

Embora a tendência seja considerar a escolha do tratamento específico para cada fenótipo de sibilância, este objetivo, até então, ainda não tem sido alcançado devido à heterogeneidade da classificação dos fenótipos e a escassez de estudos nesta área (BACHARIER et al., 2008).

A maioria dos estudos de intervenções na sibilância recorrente e asma tem sido desenvolvida sobre uma *janela de oportunidades* muito cedo na vida e, portanto, muitas crianças são inseridas nos estudos antes mesmo do nascimento. A justificativa para isso se

deve aos dois principais pontos implicados no desenvolvimento da asma. Em primeiro lugar, a prevenção primária precisa começar antes da ocorrência da doença. Em segundo lugar, há alguma evidência de que os acontecimentos imunológicos ligados à sibilância recorrente, a polarização de respostas de citocinas das células T *helper*, ainda estão em formação, principalmente nos primeiros 18 meses a três anos de vida. Permanece desconhecido se essa plasticidade está associada com uma maior receptividade à modificação ambiental ou por outras intervenções durante este tempo (MARKS, 2011).

A expectativa de estimular e modular a resposta do tecido linfoide intestinal para polarização das células Th1 e Treg levaram alguns pesquisadores a examinarem o papel potencial de cepas probióticas na prevenção primária da asma, sibilância e de outras doenças atópicas na infância (BORCHERS et al., 2009).

Em ensaio clínico randomizado duplo-cego, com 131 crianças (seis a 24 meses de idade) apresentando pelo menos dois episódios de sibilância e história familiar de atopia em parentes de primeiro grau, foi administrado seis meses de *Lactobacillus rhamnosus LGG* e placebo e avaliado o impacto na sensibilização alérgica e asma. Os resultados mostraram menos sensibilizações para aeroalérgenos após seis meses de LGG (p = 0,027) e com seis meses de seguimento (p = 0,03), mas nenhum impacto em relação à asma. A suplementação foi bem tolerada e não ocorreram eventos adversos graves (ROSE et al., 2010).

Metanálise realizada com 25 ensaios clínicos randomizados, crianças e adolescentes do nascimento até 18 anos, para avaliar os efeitos da suplementação de probióticos sobre a prevenção de sensibilização atópica, asma e sibilância em crianças, mostrou que os probióticos foram eficazes na redução dos níveis séricos de IgE total, reduziu o risco de sensibilização atópica quando administrado no período pré-natal e pós-natal, mas não reduziram a asma e sibilância em crianças (ELAZAB et al., 2013).

Em outra metanálise de ensaios clínicos randomizados, incluindo 4.866 lactentes até um ano de vida, com o objetivo de avaliar a associação do uso de probióticos durante a gravidez ou no primeiro ano de vida, mostrou não encontrar nenhuma evidência para apoiar uma associação protetora entre o uso de probióticos perinatal e asma ou sibilância na infância. Ensaios clínicos randomizados até a presente data não produziram provas suficientes para recomendar probióticos para a prevenção primária da asma (AZAD et al., 2013).

Apesar do progresso das pesquisas na prevenção primária da asma, sensibilização alérgica e sibilância em lactentes, ensaios clínicos de probióticos no tratamento da asma e sibilância só foram realizados em crianças maiores, adolescentes e adultos, com resultados que não devem ser extrapolados para lactentes (FIOCCHI et al., 2015). No entanto, há

evidências que a administração oral dos probióticos está envolvida em regular a resposta imune fora do trato gastrointestinal, incluindo a mucosa respiratória. A **Figura 3** ilustra a imunomodulação dos probióticos e a expressão das citocinas produzidas no tecido linfoide intestinal com provável atuação no trato respiratório para as respostas alérgicas e proteção contra infecções respiratórias (FORSYTHE, 2011).

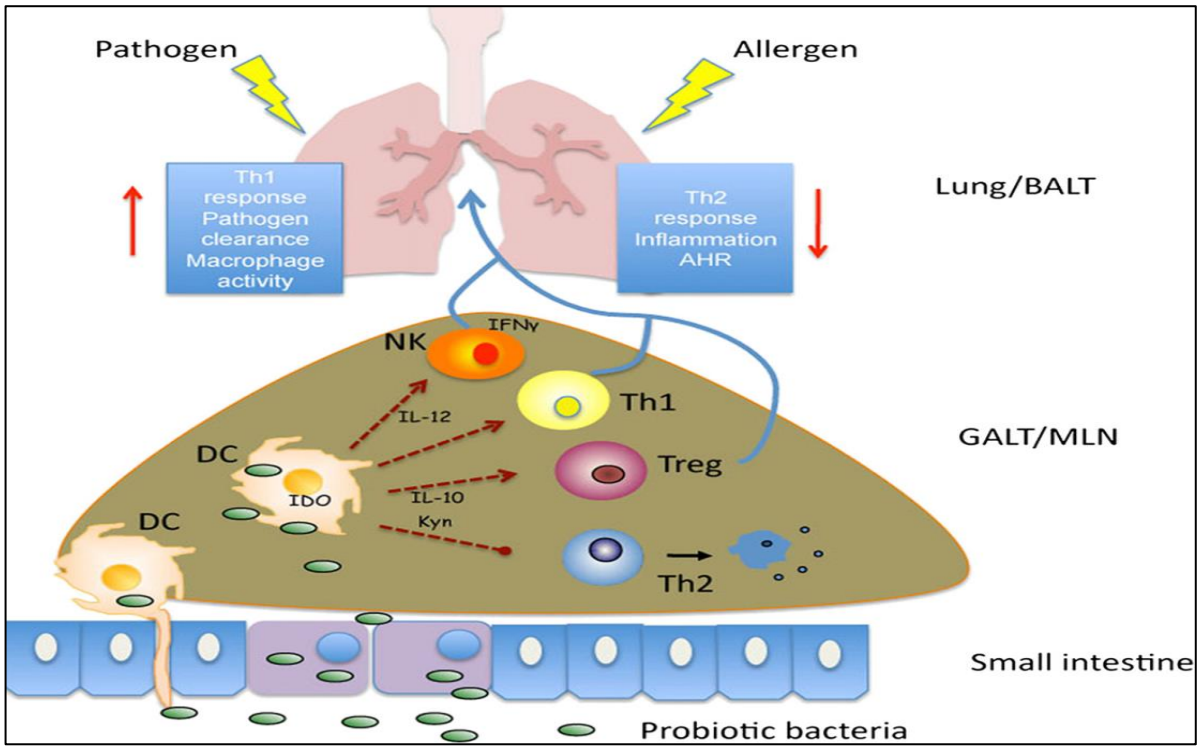


Figura 3. Probióticos recolhidos por células dendríticas (CDs) no intestino. Uma combinação de sinais resulta na produção de Th1 e/ou mediadores de regulação. A IL-12 promove a ativação de células Th1 e a produção de IFN-gama por células NK. A IL-10 promove ativação das células Tregs e esgota as células Th2. Segue o desafio imunológico nas vias respiratórias, células ativadas no GALT trafegam para a mucosa respiratória, onde eles promovem a proteção contra infecções e resposta anti-inflamatória (FORSYTHE, 2011).

Ensaios clínicos com probióticos destinados especificamente ao tratamento da asma são raros e os períodos de seguimento relativamente curtos (geralmente um a dois anos, às vezes quatro a cinco anos) são uma característica destes estudos (FIOCCHI et al., 2012).

Em estudo com 187 pré-escolares, de dois a cinco anos, foi oferecido leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* 10^{10} UFC/mL ou placebo, a cada dia durante 12 meses. Não houve diferença significativa entre os grupos na incidência cumulativa de episódios de asma (GIOVANNINI et al., 2007).

Como opção terapêutica, os probióticos estão disponíveis como suplementos, medicação e produtos fermentados de uso diário como leite e iogurte, por exemplo. A quantidade, qualidade e pureza destes produtos são variáveis em razão da dificuldade no controle de se obter esses microrganismos vivos. Dessa forma, apenas os produtos avaliados em estudos com humanos devem ser recomendados (SANDERS, 2008).

A eficácia dos probióticos depende da capacidade de resistir à passagem pelo TGI e colonizar a mucosa intestinal, a partir de uma ingestão regular que permita manter concentrações eficazes de organismos vivos e viáveis. O número mínimo de microrganismos, para obter efeito benéfico, não é consensual, mas a probabilidade de colonização intestinal é diretamente proporcional à quantidade ingerida destes microrganismos (maior ou igual à ordem de 10^6 UFC/mL) e ao tempo de uso (ÖZDEMIR, 2010).

Partindo da própria definição, presença de microrganismos vivos, as preparações com probióticos levantam a possibilidade de infecção ou colonização patogênica (DOGI; WEILL; PERDIGÓN, 2010). Quando ingeridos por via oral, os probióticos são geralmente seguros e bem tolerados, tendo um risco muito baixo de causar infecções e de propiciar a geração de bactérias agressivas e resistentes, especialmente se usados por indivíduos saudáveis (WALLACE; MACKAY, 2011).

Os efeitos adversos mais comuns são a distensão abdominal e flatulência. Aumento da sede e obstipação foram pontualmente associados a *Saccharomyces boulardii*. Infecções sistêmicas incluindo sepse, endocardite por *Lactobacillus spp.* e abcessos hepáticos por *Lactobacillus GG* foram descritas e relacionadas com o uso destes probióticos em imunodeprimidos. Segundo Williams em 2010, uma bacteremia provocada por *Lactobacillus spp*. tem um risco estimado inferior a 1/1.000.000, mas estados de imunossupressão, hospitalização, algumas comorbidades e antibioticoterapia prolongada aumentam a predisposição. O risco de se desenvolver uma fungemia, tendo como agente etiológico a levedura *Saccharomyces boulardii*, é cerca de 1/5.600.000, risco esse potencializado em doentes críticos e estados de imunossupressão (WILLIAMS, 2010).

1.2.5 Mistura de probióticos e resposta imunológica

A diversidade e resiliência da microbiota intestinal são essenciais para o complexo desenvolvimento e maturação do sistema imunológico do hospedeiro (GACKOWSKA et al.,

2006). A menor exposição de microrganismos ou a colonização intestinal por bactérias patogênicas em fase inicial podem promover distúrbios imunológicos e de tolerância com repercussões em fase tardia da vida (ROBLES; GUARNER, 2013).

Em revisão de artigos publicados sobre o uso de probióticos em humanos e animais, intervenções com múltiplas espécies de bactérias e/ou leveduras apresentaram maior funcionalidade e eficácia do que intervenções com cepa única ou mesmo com múltiplas cepas de uma única espécie bacteriana quando usados em determinadas enfermidades (TIMMERMAN et al., 2004).

Diversas misturas de cepas de probióticos são usadas em estudos experimentais, muitas já são identificadas por suas propriedades de imunomodulação e por seus efeitos benéficos à saúde humana, enquanto outras apresentam limitada evidência (CASELLI et al., 2013).

Probióticos em mistura são utilizados em estudos com animais e humanos em diversas enfermidades. Kefir é um exemplo desta mistura de probióticos. Produto derivado de leite fermentado proveniente do norte do Cáucaso, antiga União Soviética, tem este nome de origem da língua turca *keyif,* que significa "bom sentido". O composto possui uma matriz inerte constituída de polissacarídeos e proteínas, e uma matriz densamente povoada por bactérias das espécies ácido láctica, bactérias ácido acéticas e leveduras (FIGLER et al., 2006).

Em muitos países, produtos relacionados com o kefir são produzidos em forma de fermentado lácteo, *pellets*, cápsulas ou liofilizados em pó. No Brasil, há pelo menos cinco centros de produção de imunobiológicos que adquiriram a matriz original e a adaptaram de acordo com as necessidades de utilização e comercialização. A matriz densa é constituída por várias espécies de bactérias ácido-lácticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras presentes no kefir: *Lb. helveticus, Lb. kefiranofaciens, Lb. paracasei, Lb. kefiri, Lb. delbruecki, Lb. acidophilus. Lb. crispatus, Lb. gallinarum, Lb. fornicalis, Bifidobacterium breve, Lactococcus lactis, Enterococcus faecium, Kluyveromyces marxianus, Kazachstania unispora, Pichia fermentans e Sach. cerevisiae* (LEITE et al., 2012). No Estado de Pernambuco, Brasil, esse composto foi modificado para possuir somente a matriz densa das várias espécies de bactérias.

Embora alguns dos benefícios do uso da mistura de probióticos kefir para à saúde humana estejam mais relacionados às desordens gastrointestinais, efeito imunoestimulatório na mucosa intestinal vem sendo avaliado essencialmente em animais (FIGLER et al., 2006).

Estudo conduzido em ratos, utilizando a matriz bacteriana do kefir por dois, cinco e

sete dias, mostrou o aumento da produção de citocinas IL-1α, INF-γ, TNF-α, IL-6 e IL-10 nos macrófagos peritoneais e nas células aderentes das placas de *Peyer*, caracterizando uma atividade de estímulo imunológico da mistura de probióticos (VINDEROLA et al., 2006).

Em outro estudo, também conduzido em ratos, utilizando a matriz bacteriana do kefir por dois, cinco e sete dias consecutivos, mostrou também um efeito imunomodulador da mistura de probióticos. Dosagem das IgA e IgG foram determinadas por cortes histológicos do intestino delgado e grosso. Citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, INF-γ e TNF-α foram determinadas no fluido intestinal e soro sanguíneo. A IL-6 foi também determinada no sobrenadante de uma cultura de células epiteliais do intestino delgado. O estudo mostrou que houve um aumento de IgA no intestino delgado e grosso, este aumento foi acompanhado por aumento da IL-4, IL-10, IL-12, INF-γ e IL-6 no intestino. Todas as citocinas que tiveram aumento na lâmina própria do intestino também apresentaram aumento no soro do sangue, o que refletiu um efeito de imunoestimulação alcançado inicialmente na mucosa do intestino (VINDEROLA et al., 2006).

Realizando uma busca em bases de dados eletrônicas, sobre resposta imunológica do uso do kefir em humanos, foram encontrados 34 estudos com resultados clínicos e um ensaio clínico randomizado avaliando o comportamento de citocinas proinflamatórias em indivíduos que apresentaram mucosite após quimioterapia para câncer coloretal. Neste estudo, um total de 40 pacientes, com 19 a 75 anos de idade, foram randomizados para receber kefir ou placebo. Níveis séricos das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α apresentaram aumento sem diferença estatística nos dois grupos (TOPUZ et al., 2008).

A propriedade de imunoestimulação que algumas misturas de probióticos exercem na mucosa intestinal de animais e humanos possibilita a identificação de bactérias e/ou leveduras potencialmente envolvidas em gerar benéficos clínicos à saúde humana. Pesquisas com mistura de probióticos, que já se configuram como seguros e que apresentam resultados clínicos em estudos anteriores, permitem serem utilizados em outros estudos de intervenção e até em outras condições clínicas para que novos resultados possam ser avaliados.

1.3 JUSTIFICATIVA

A sibilância recorrente é a expressão clínica do acometimento do trato respiratório inferior por uma variedade de doenças, sendo as infecções respiratórias e a asma as mais frequentemente identificadas nos lactentes. Na magnitude deste problema, existe uma complexa interação entre fatores hereditários e ambientais, que estão diretamente envolvidos no desenvolvimento e modulação do sistema imunológico em fase inicial da vida.

Dentre os fatores ambientais, as alterações na microbiota intestinal afetam profundamente a resposta imune do ser humano. Tendo em vista que a reduzida diversidade da microbiota intestinal, a inserção precoce de bactérias patogênicas ambientais logo ao nascimento e o uso crescente de antibióticos podem favorecer a disbiose intestinal e promover o surgimento de diversas enfermidades, estratégias de intervenções no início da vida permitem estabelecer um equilíbrio nas células imunes Th1/Th2 e Treg e suas citocinas, alcançadas com o uso de microrganismos benéficos conferido aos probióticos.

Diante da possibilidade dos probióticos atuarem como imunomoduladores das respostas imunes iniciadas na mucosa intestinal e com possível reflexo em sítios distantes como o trato respiratório, este estudo propõe avaliar o uso de probióticos como adjuvante ao tratamento do lactente com sibilância recorrente.

1.4 HIPÓTESES

O uso de probióticos no tratamento das infecções respiratórias na infância, importante causa de sibilância no lactente, promove benefícios clínicos.

Probióticos tem impacto clínico positivo como adjuvante no tratamento do lactente sibilante e estimulam *in vitro* citocinas das vias Th1 e T regulatórias (IL-10, IL-12 e INF-γ).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso de probióticos no tratamento da sibilância recorrente do lactente.

1.5.2 Objetivos específicos

- Realizar revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados que utilizaram probióticos no tratamento das infecções respiratórias superior e inferior na infância.

- Avaliar o impacto clínico do uso de uma mistura de probióticos em lactentes com sibilância recorrente e a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ *in vitro*.

2 CAPÍTULO II

2.1 MÉTODOS

- **Métodos da Revisão Sistemática**

Inserido no próprio artigo-1, este tópico apresenta em detalhes o protocolo de pesquisa utilizado, critérios de elegibilidade dos ensaios clínicos randomizados, definições dos termos de busca, estratégia de pesquisa dos estudos nas quatro bases de dados eletrônicas, extração dos dados e avaliação da qualidade e risco de *viés.*

- **Métodos do Ensaio Clínico Randomizado**

Descritos em tópicos que se seguem com o delineamento do estudo, visa apresentar em detalhes todo o processo de construção do artigo-2.

2.1.1 Delineamento do estudo

Estudo experimental, ensaio clínico randomizado duplo-cego, paralelo, placebo controlado, conduzido em lactentes com sibilância recorrente atendidos no Ambulatório do Lactente Sibilante no Centro de Pesquisas em Alergia e Imunologia – Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), no período de Abril de 2014 a Abril de 2015.

2.1.2 População do estudo

A população do estudo foi composta por lactentes, com seis a 24 meses de idade, que apresentavam três ou mais episódios de sibilância em período de seis meses, com a ocorrência de pelo menos uma das exacerbações nos últimos três meses do atendimento inicial.

2.1.2.1 Critérios de Inclusão

- Idade de seis a 24 meses;
- Sibilância recorrente, pelo menos três episódios em seis meses, com pelo menos uma exacerbação nos últimos três meses;
- Não ter sido iniciado tratamento de manutenção com corticosteroide inalatório, até a consulta inicial no ambulatório de lactente sibilante do HC/UFPE.

2.1.2.2 Critérios de Exclusão

- Lactentes que apresentassem: comprometimento nutricional importante (≤ -3 *score* Z), malformações congênitas das vias aéreas, fibrose cística, doenças crônicas em outros sistemas, distúrbios respiratórios perinatais (displasia broncopulmonar), bronquiolite obliterante, alergia à proteina do leite de vaca, tumores intratorácicos, tuberculose pulmonar, imunodeficiências congênitas e prematuridade;
- Exposição prévia, ou em mesmo período do estudo, de outros produtos contendo probióticos;
- Lactente em uso de anti-leucotrienos no período do estudo;
- Uso de antibióticos nas últimas quatro semanas antes de iniciar a intervenção;
- Lactentes matriculados em outros estudos ou ensaios clínicos.

2.1.3 Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho estimado da amostra foi calculado pelo *software* MedCalc, versão 15.4. Na pesquisa de ensaios clínicos randomizados publicados e os não publicados (registrados no *ClinicalTrials*) para avaliação do uso de probióticos no lactente com sibilância, foram encontrados cinco estudos com métodos bastante heterogêneos: quatro ensaios clínicos de intervenção e seguimento que não encontraram diferença significativa dos eventos relacionados com asma no grupo probiótico em relação ao placebo (ABRAHAMSSON et al., 2013; JENSEN et al., 2012; ROSE et al., 2010; WEST; HAMMARSTRÖM; HERNELL, 2013) e um ensaio clínico com intervenção perinatal e pós-natal com associação dos níveis de citocinas Th1/Th2 com sibilância (ABRAHAMSSON et al., 2011).

O presente estudo usou como base para o cálculo do tamanho da amostra um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, com 75 lactentes menores de sete meses (36 lactentes do grupo simbiótico e 39 do grupo placebo) no qual a ocorrência de sibilância foi menor no grupo simbiótico do que no placebo com 2,8% *versus* 30,8% (VAN DER AA et al., 2011). Assumindo um nível de significância < 5%, com um poder do estudo de 80%, o tamanho da amostra calculado foi de 27 pacientes para cada grupo.

Esperando que no seguimento destes pacientes houvesse perdas consideradas de até 10% do número de pacientes do início do estudo, foi acrescentado em cada grupo um percentual de 10% de lactentes sibilantes, perfazendo um tamanho total da amostra de 30 pacientes para cada grupo, número este que pode ser considerado suficiente para se analisar sobre o efeito desejado e rejeitar ou aceitar a hipótese de nulidade.

2.1.4 Variáveis do estudo

Tabela 1. Variáveis utilizadas no artigo - 2

Variáveis	Fatores de risco
Idade	Considerada em meses, na primeira consulta. **Variável:** discreta.
Sexo	Masculino e feminino. **Variável:** nominal.
Peso	Em gramas. **Variável:** contínua.
Estatura	Em centímetros. **Variável:** contínua.
Rinite	Presença de espirros, prurido, obstrução e rinorréia mais que 04 dias na semana e mais de 04 semanas consecutivas, de acordo com o *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma* (ARIA). **Variável:** nominal.
Eczema	Presença de eczemas principalmente na face que geralmente poupam o maçico central e apresentação generalizada (critérios clínicos de Hanifin e Hajka). **Variável:** nominal.
Parto cesariana	Via de nascimento do lactente submetido à consulta. **Variável:** nominal.
Tempo de amamentação exclusiva	Tempo de livre oferta do leite materno pela genitora, sem adição de líquidos ou outros alimentos. **Variável:** discreta (em meses).
Tabagismo na gravidez	Uso de cigarro, em qualquer quantidade, durante a gravidez. **Variável:** nominal.
Tabagismo no domicílio	Uso de cigarro, em qualquer quantidade, por pessoas que residem em mesmo domicílio. **Variável:** nominal.
Frequentar creche	Permanência em um ou dois turnos em creche, por três ou mais dias da semana. **Variável:** nominal.
Exposição aos alérgenos de animais	Presença de animais (gato, cão, pássaros, coelho) em domicílio atualmente. **Variável:** nominal.
Exposição ao mofo ou umidade	Presença de bolor ou ambientes com paredes úmidas ou molhadas permanentemente, em domicílio que reside a maior parte do tempo. **Variável:** nominal.
1º episódio de infecção respiratória	Presença de resfriado (em meses de vida). **Variável:** discreta.

1º episódio de sibilância	Presença de sibilância diagnosticada pelo médico (em meses de vida). **Variável:** discreta.
Internamento pela sibilância	Identificado pelo relato dos pais ou resumo de alta hospitalar. **Variável:** nominal.
Poluição atmosférica no ambiente	Presença de fumaça de fábricas, alto tráfego de veículos, queimada de lixo próximo à residência. **Variável:** nominal.
Número de irmãos (as)	Quantidade de irmãos(as) que residem ou não com o lactente. **Variável:** discreta.
Pessoas que residem em mesma casa	Quantidade de pessoas, familiares ou não, que residem com o lactente em mesmo domicílio. **Variável:** discreta.
Escolaridade da mãe	Definido como educação básica (8 anos ou menos), educação média ou secundária incompletas (9 a 11 anos) e educação média e secundária completa e nível superior (12 ou mais anos). **Variável:** nominal.
Teste cutâneo	Realização do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata em região volar do antebraço. **Variável:** nominal.
Eosinófilos	Contagem em valores absolutos em sangue. **Variável:** discreta.
Dosagem de IgE total	Dosagem sanguínea. **Variável:** discreta.
	Parâmetros clínicos - variáveis dependentes
Dados clínicos da visita 1 (V1), após 8 semanas (V3) e no seguimento até 16 semanas (V4)	Ida à emergência pela sibilância, ocorrência de episódios de sibilância, número de episódios de sibilância, nº de dias de sibilância, dias de B2 para sibilância, uso de corticosteroide oral para sibilância. **Variáveis:** nominal e discreta.
	Citocinas - variáveis dependentes
Resultados da cultura de sangue total de pacientes que usaram a	Citocina produzida por macrófagos, células dendríticas, células T reguladoras cuja função principal é inibir os macrófagos ativados e manter o controle homeostático das reações imunes inatas e adaptativas. **Variáveis:** contínuas. Foram considerados os resultados da citometria de fluxo no Laboratório

mistura de probióticos ou placebo (pré e pós da IL-10)	de análise Aggeu Magalhães-Fiocruz, gerados pelos estímulos: PHA (IL-10) Der p (IL-10) Pb (probiótico) (IL-10) Meio (IL-10).
Resultados da cultura de sangue total de pacientes que usaram a mistura de probióticos ou placebo (pré e pós da IL-12)	Citocina produzida por macrófagos e células dendríticas com função de ativar as células *natural killer* (NK). Estimula a produção de *interferon-gama* pelas células NK, aumentando a atividade citotóxica e promove o desenvolvimento das células Th1. **Variáveis:** contínuas. Foram considerados os resultados da citometria de fluxo no Laboratório de análise Aggeu Magalhães-Fiocruz, gerados pelos estímulos: PHA (IL-12) Der p (IL-12) Pb (IL-12) Meio (IL-12).
Resultados da cultura de sangue total de pacientes que usaram a mistura de probióticos ou placebo (pré e pós do INF-γ)	Citocina produzida pelas células NK, células CD4+ T e células CD8+ T cuja função principal é ativar os macrófagos nas respostas imunes inatas, além de inibir infecções virais. **Variáveis:** contínuas. Foram considerados os resultados da citometria de fluxo no Laboratório de análise Aggeu Magalhães-Fiocruz, gerados pelos estímulos: PHA (INF-γ) Der p (INF-γ) Pb (INF-γ) Meio (INF-γ).

- **Categorização e tabulação das variáveis**

As informações foram digitadas em dois bancos de dados (dupla entrada) para identificar eventuais inconsistências no processo de digitação, utilizando-se o programa *Microsoft Office Excel* 2013 (APÊNDICE A).

2.1.5 Operacionalização da Pesquisa

Os lactentes sibilantes, que tiveram acesso ao ambulatório especializado HC/UFPE por procura espontânea ou por encaminhamento de outros serviços de saúde, foram atendidos seguindo um protocolo de investigação rotineira do serviço.

Nesta consulta inicial foi realizada a investigação clínica com detalhamento da história da sibilância através de um formulário, com perguntas abertas e fechadas (APÊNDICE B). Esse formulário foi construído utilizando algumas questões do Estudo Internacional sobre Sibilância em Lactentes (QE-EISL) (ANEXO A) relacionadas aos fatores de risco hereditários e ambientais. Em mesma consulta foi realizado exame clínico por uma especialista (pneumologista pediátrica) e realização do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata (*Prick Test*) com extratos de aeroalérgenos padronizados para ácaros, epitélio de cão, epitélio de gato, barata e fungos e para alérgenos alimentares como as proteínas do leite de vaca e clara/gema do ovo, por serem os alérgenos mais frequentemente associados à hipersensibilidade na infância. Outros exames como contagem de eosinófilos, dosagem de IgE total sanguínea e radiografia de tórax foram solicitados para serem entregues em consultas seguintes.

Para todos os lactentes que necessitassem de medicações para controle da sibilância recorrente era iniciado corticosteroide inalatório (dipropionato de beclometasona HFA – 50mcg spray) em doses de 100mcg/dia, para o tratamento convencional estabelecido nos *guidelines* e recomendações científicas (*International consensus on ICON pediatric asthma, PRACTALL, Global Strategy for the Diagnosis and Management of Asthma in Children 5 years and Younger*). Foi fornecido durante a consulta um espaçador (AgaChamber – com máscara) e instruções adequadas de uso durante a consulta. Orientações escritas do controle ambiental (já disponíveis no Centro de Pesquisas em Alergia e Imunologia HC/UFPE) foram fornecidas (ANEXO B), além do plano de ação escrito com medicações de resgate (B2 adrenérgico – salbutamol) para eventuais intercorrências de sibilância até a obtenção adequada do controle.

Os lactentes sibilantes, ainda em atendimento ambulatorial de rotina, foram identificados quanto aos critérios de elegibilidade (APÊNDICE C) para participarem do estudo. Os pais e/ou responsável legal dos menores considerados elegíveis foram detalhadamente informados dos objetivos, etapas, riscos e benefícios do ensaio clínico e

convidados a participar, os que concordaram com a participação dos seus filhos (as) assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE D).

2.1.5.1 Geração da Sequência Randomizada de Alocação

Os lactentes sibilantes foram designados aleatoriamente para o grupo probiótico ou grupo placebo, usando técnica de randomização simples com números iguais de participantes para cada grupo.

A randomização foi gerada pelo programa computacional: *Randomization Plan* com acesso ao site - http://www.randomization.com realizado por uma profissional fisioterapeuta (CSFRL) não envolvida no estudo (ANEXO C).

O mecanismo utilizado para implementar a sequência de alocação randomizada foi através de recipientes numerados sequencialmente. Estes recipientes armazenavam os produtos probióticos ou placebo com as mesmas características organolépticas e em mesma quantidade. A numeração dos recipientes e a ocultação da sequência também foram realizadas pela mesma profissional (CSFRL), não envolvida no estudo, que gerou a randomização e a manteve em sigilo até o final do estudo.

Os recipientes foram entregues pela pesquisadora do ensaio clínico e por uma estudante de iniciação científica de Medicina da UPE (BPSS), na sequência da alocação randomizada.

2.1.5.2 Mascaramento

Tanto para os pais ou responsáveis legais dos lactentes sibilantes inscritos no estudo, quanto para a pesquisadora do ensaio clínico, para os técnicos laboratoriais e para o assessor estatístico foi realizado o mascaramento. Ao final do estudo, para avaliar se os pais e/ou responsável legal ou os pesquisadores envolvidos no estudo se mantiveram “cegos”, foram convidados a tentar adivinhar as designações do tratamento que foram distribuídos aos lactentes sibilantes. Caso uma proporção maior que o esperado acertasse, a discussão do

artigo original sobre os achados deveria incluir uma avaliação sobre os potenciais *48ieses* desse “descegamento” parcial.

2.1.5.3 Descrição do Ensaio Clínico

Os lactentes sibilantes considerados elegíveis ao estudo tiveram um período de observação de duas semanas para realizarem e fornecerem os exames de rotina (contagem de eosinófilos, dosagem de IgE total sanguínea e radiografia de tórax).

Na visita 1 (V1), foi realizada a primeira coleta de sangue para cultivo do sangue total e posterior detecção dos níveis de citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ no sobrenadante de cultura. Em seguida os pais e/ou responsável legal receberam os recipientes numerados sequencialmente contendo em cada recipiente 60 sachês de probióticos ou de placebo com as mesmas características de cor, cheiro, sabor, consistência e quantidade.

A mistura de probióticos (kefir, BioLogicus Co. Ltda., Recife-PE, Brasil) foi composta por vários tipos de bactérias ácido-lácticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras da matriz densa do kefir (Quadro 1). Esta mistura foi submetida a um processo de fermentação em leite bovino e liofilização, e o produto final embalado em sachês de 1g, lacrados, rotulados e identificados com os requisitos de armazenamento e posologia. As concentrações finais apresentaram contagens na ordem de 1,0 x 10^8 UFC/g para bactérias ácidos lácticas e 1,0 x 10^6 UFC/g para leveduras. Testes de qualidade e viabilidade microbiológica (ANEXO D) foram fornecidos pelo laboratório de pesquisa ao final do estudo e a mistura de probióticos fornecida é encontrada comercialmente disponível em todo o país.

O placebo foi amido de mandioca, não apresentando nenhuma carga microbiana, com odor, cor, sabor e textura similares aos da amostra que continha probióticos. Igualmente foram embalados contendo 1g em sachês plásticos lacrados, rotulados e identificados com os requisitos de armazenamento e posologia, os quais poderiam ser mantidos em ambiente ventilado, longe de umidade ou calor excessivo, ou armazenados no refrigerador.

LACTOBACILOS	*L. brevis – L. cellobiosus – L. acidophilus – L. casei ssp.alactosus – L. casei ssp.rhamnosus – L. casei – L. paracasei ssp.paracasei – L. helveticus ssp.lactis – L. delbrueckii ssp.lactis - L. delbrueckii ssp.bulgaricus – L. latis – L. fructivorans – L. rilgardii – L. kefir – L. kefiranofaciens – L. kefirgranum ssp. – L. parakefir ssp.*
LACTOCOCCOS/ STREPTOCOCCOS	*L. lactis ssp.lactis – L. lactis var. diacetylactis – L. lactis ssp.cremoris – S. salivarius ssp.thermophilus – S. lactis – Enterococcus durans – Leuconostoc cremoris – L. mesenteroides.*
LEVEDURAS	*Kluyveromyces lactis – K. marxianus var.marxianus – K. bulgaricus – K. fragilis – Candida kefir – C. pseudotropicalis – C. tenuis – C. rancens – Saccharomyces lactis – S. carlsbergensis – S. ssp.torulopsis holmii.*
ACETOBACTER	*Acetobacters acetl – A. rasens*

Quadro 1. Mistura de probióticos contido nos sachês.

Foram fornecidas instruções aos pais e/ou responsável legal de como utilizar e armazenar o recipiente contendo os 60 sachês. O uso de cada sachê contendo 1g do produto da intervenção (probióticos ou placebo) consistia em dissolver o conteúdo em pó em uma colher de suco, leite ou iogurte e oferecer a criança, preferencialmente na primeira refeição do dia, uma vez ao dia durante 60 dias – um sachê de 1g para cada dia. Para um possível controle do uso dos produtos, os pais e/ou responsável legal traziam os sachês vazios nas visitas (V2 e V3), após 30 dias e 60 dias de intervenção, respectivamente, como forma de demonstrar o cuidado dos pais em seguir as recomendações e orientações de uso. Assim como em todos os estudos de intervenção a certeza de que os sachês foram administrados de forma correta permanecerá questionável.

Na sequência, foi entregue a ficha intervenção-diário do lactente aos pais e fornecido explicações de como preencher. Durante 60 dias do uso do produto, os pais e cuidadores da criança iriam anotar os episódios de "chiado", dias de duração, se conduziram a criança ao atendimento à emergência e quais as medicações que foram utilizadas na emergência e em casa (APÊNDICE E).

O tratamento com o corticosteroide inalatório foi mantido e orientado aos pais e cuidadores que não suspendessem, apesar do uso do produto (probióticos ou placebo) que estava sendo fornecido.

A visita 2 (V2) ocorreu após quatro semanas de iniciada a intervenção, neste momento era realizado avaliação médica e conferida regularidade do uso da medicação inalatória (beclometasona – 100mcg/dia) e do produto fornecido (probióticos ou placebo). A ficha intervenção-diário era avaliada quanto ao correto preenchimento caso a criança apresentasse novos episódios de sibilância.

Com oito semanas de intervenção, na visita 3 (V3), foi realizada a segunda e última coleta de sangue para cultivo do sangue total e detecção dos níveis de citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ no sobrenadante de cultura. Os lactentes foram submetidos à nova avaliação médica, a ficha intervenção-diário foi recebida e fornecida a ficha seguimento-diário para as próximas oito semanas de avaliação (Figura 4). Neste momento, todos os lactentes sibilantes foram orientados a manterem seus corticosteroides inalatórios em mesma dose, como parte das recomendações e consensos que orientam um tempo de oito a 12 semanas de tratamento para reavaliação e ajuste das doses (Figura 4).

Na última visita do ensaio clínico (V4), foi realizada nova avaliação médica e recebida a ficha seguimento-diário do paciente. Foram ajustadas as doses dos corticosteroides inalatórios para mais ou menos, a depender da gravidade e frequência das crises de sibilância.

Todos os lactentes encontram-se atualmente assistidos com consultas agendadas para prosseguimento da avaliação clínica.

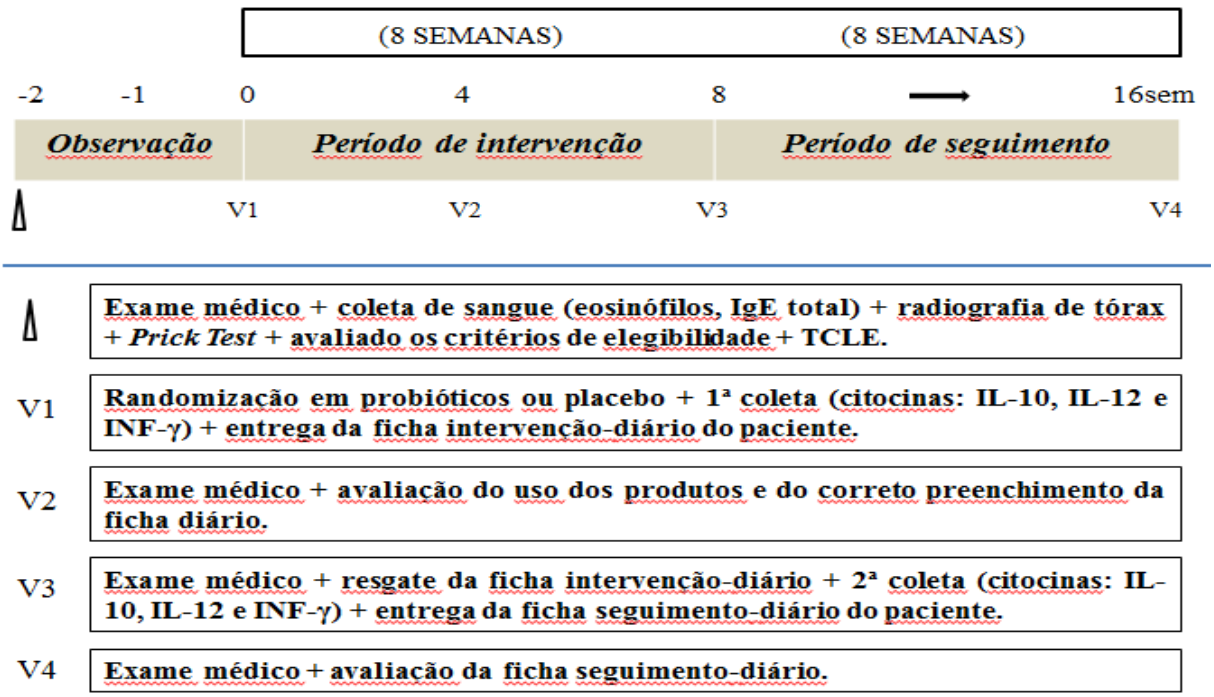


Figura 4. Fluxograma do ensaio clínico.

2.1.6 Coleta de dados

- **Formulário da anamnese**

Construído com algumas perguntas do QE-EISL, acrescido de dados gerais de identificação e informações sócio-demográficas, este formulário é um instrumento de investigação utilizado no Ambulatório do Lactente Sibilante HC/UFPE.

- **Avaliação clínica**

Os lactentes sibilantes tiveram avaliação médica a cada consulta realizada (visitas 1, 2, 3 e 4). Orientações ambientais eram reforçadas e o uso do corticosteroide inalatório (dipropionato de beclometasona HFA 50mcg – 02 jatos por dia) e do espaçador com máscara facial (*AgaChamber,* Agaplastic) foram verificados em cada visita, solicitando que os pais e/ou responsável legal demonstrassem a forma de administrar no lactente. A escolha deste corticosteroide inalatório foi motivada pelo fácil acesso e distribuição gratuita nas farmácias de todo o país por contemplar o programa Farmácia Popular do Brasil.

Um plano de ação escrito para tratamento das crises de sibilância foi também fornecido e na prescrição constava o uso da medicação (salbutamol spray 100mcg), administrado com o uso do espaçador, na dose de dois a três jatos de 4/4 horas durante uma intercorrência de sibilância.

- **Avaliação antropométrica**

Todos os lactentes sibilantes tiveram seu peso e estatura avaliados pela equipe médica e foram devidamente colocados nos gráficos para definição da situação nutricional. Foram usadas balanças digitais para peso (em gramas) e antropômetros.

Para o peso foi utilizado balança do tipo eletrônica, com divisões de 10g e capacidade de até 16kg. Para aferição dessa medida a criança ficou despida e descalça. Para a estatura a criança ficou deitada e, com o auxílio de régua antropométrica sobre uma superfície plana, foi feita a medição em centímetros.

2.1.7 Exames *in vivo* e *in vitro*

- **Teste cutâneo de hipersensibilidade imediata**

Para o teste cutâneo de hipersensibilidade imediata (*Prick Test*), realizado pela pesquisadora, foi inicialmente conduzida a higienização da pele com álcool à 70%. Após secagem, foi colocada uma gota de extrato padronizado de cada antígeno estudado (FDA *Allergenic*®), na face volar do antebraço da criança com a distância de 2cm de cada extrato. Em seguida ao gotejamento, foi realizado punctura com lanceta estéril para penetração do extrato na epiderme. O teste de controle positivo foi com solução de cloridrato de histamina a 9% e o controle negativo com solução fisiológica 0,9%.

O teste foi considerado positivo quando o maior diâmetro da pápula formada foi superior a 3mm do controle negativo. A leitura com paquímetro foi realizada após 15 minutos da punctura. Os extratos de aeroalérgenos foram: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, fungo mix (*Alternaria alternata* e *Aspergillus fumigatus*), barata mix (*Periplaneta americana* e *Blatella germanica*), epitélios de cão e gato; os alérgenos alimentares foram: alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina, caseína, clara e gema de ovo.

- **Dosagem de IgE total e contagem de eosinófilos sanguíneos**

Sangue venoso dos lactentes sibilantes foi coletado no Laboratório Marcelo Magalhães (Recife–PE), para realização da dosagem de IgE total e da contagem de eosinófilos no leucograma. Para a dosagem de IgE total foram utilizados 3mL em tubo sem anticoagulante e para o leucograma foram necessários 4mL de sangue, total de sangue desta coleta: 7mL.

O método utilizado para o leucograma foi o Coulter (Coulter® LH 750 hematology analyzer, Beckman Coulter, Inc.) – com revisão da lâmina, tendo como valores de referência para eosinófilos: absoluto (0 – 500/mm^3) e relativo (1 – 7%) e sendo considerado aumentado quando > 500/mm^3. Para a dosagem de IgE total foi utilizado o método de eletroquimioluminescência com valor de referência considerado elevado para a faixa etária de seis a 24 meses > 60 UI/mL.

2.1.8 Avaliação das citocinas

- **Otimização das cinéticas**

Para a realização da cultura de sangue e posterior dosagem das citocinas dos lactentes sibilantes, foi necessário antes identificar o melhor tempo, a concentação de probióticos ideal para o estímulo e a melhor resposta das citocinas com a realização das cinéticas (Tempo *versus* Resposta) e (concentrações dos Probióticos *versus* Resposta).

Após consentimento e assinatura do TCLE pelos pais e/ou responsável legal, o sangue de seis indivíduos (três crianças com sibilância recorrente e três crianças saudáveis do ambulatório de pediatria geral) foi coletado para estabelecer o tempo e a concentração ótima de cultivo para detecção das citocinas. Inicialmente 100 microlitros de sangue total (ST) colhidos em tubos contendo heparina sódica (BD *Vacutainer*®) foram depositados em placas de 24 poços de cultura (*Corning Costar*®) na presença de meio de cultivo RPMI 1640 contendo L-glutamina – 2,05mm e bicarbonato de sódio – 2g/L (LGC Biotecnologia®) e enriquecido com soro bovino fetal (SIGMA) a 10% e solução de penicilina – 100 U/mL e estreptomicina – 100µg/mL (SIGMA) em diferentes estímulos de cultivo: *Phytohemagglutinin A* (PHA) (GIBCO™/*Invitrogen Corporation*) 5µg/mL, antígenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) (*FDA Allergenic*) 10µg/mL, mistura de probióticos (Pb) a 1,0 x 10^7 UFC/mL, 1,0 x 10^6 UFC/mL, 1,0 x 10^5 UFC/mL e 1,0 x 10^4 UFC/mL; e sem nenhum estímulo (Meio). O volume final das culturas foi de 1,0mL.

As placas foram incubadas em temperatura de 37°C na presença de 5% de CO_2 por 16h, 24h e 48h. Após esses períodos de cultivo, os sobrenadantes de cultura foram coletados e centrifugados (200xg por 2 minutos) e armazenados a -20°C até a realização do ensaio para a detecção das citocinas. A escolha do melhor tempo e da concentração de probiótico foi baseada na obtenção da relação das médias de detecção das citocinas dos pacientes/médias de detecção das citocinas dos controles. Desta forma, a concentração ótima da mistura de probióticos (Pb) foi 1,0 x 10^5 UFC/mL e o melhor tempo de cultivo foi 16h (Figura 4, Figura 5 e Figura 6).

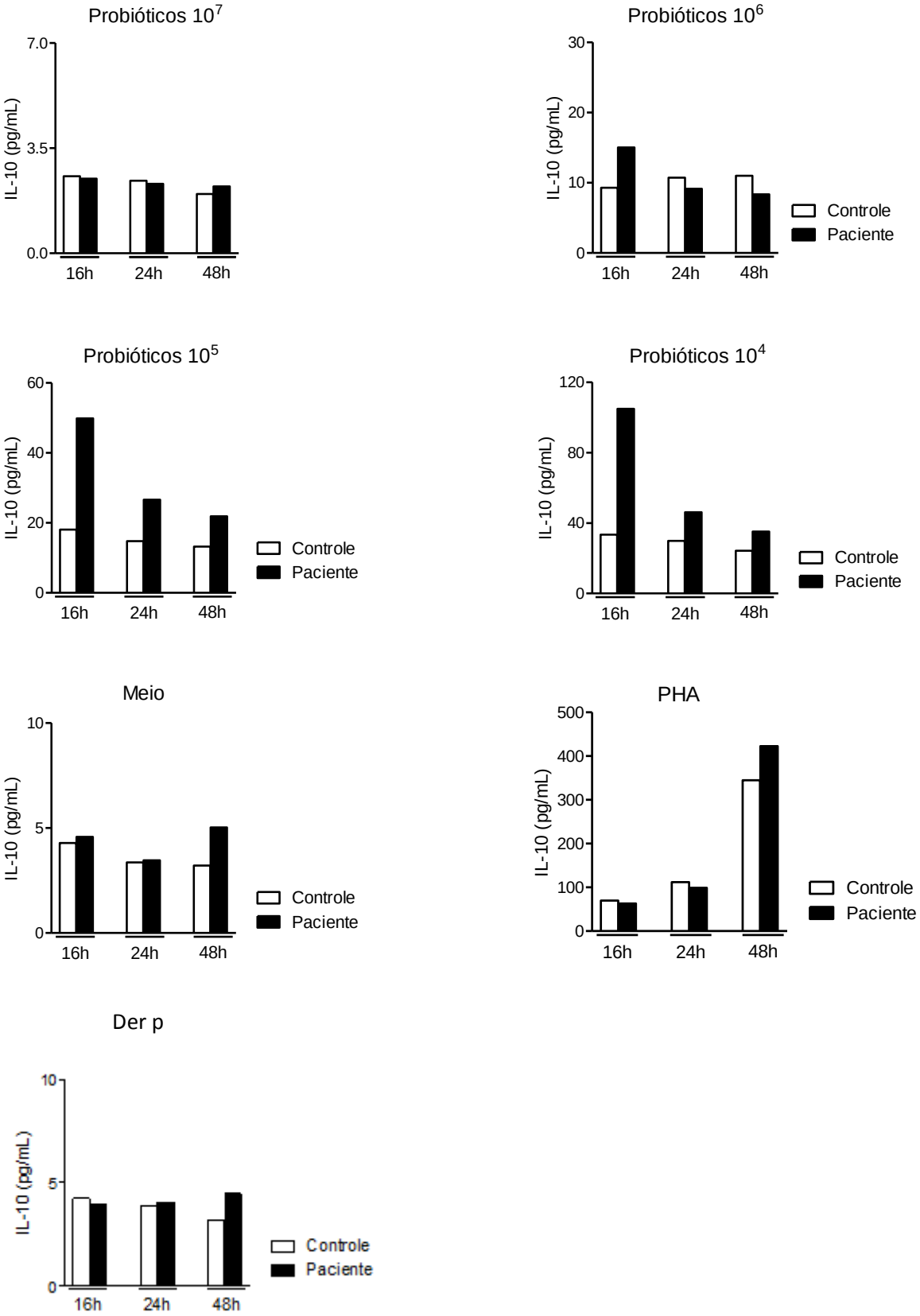


Figura 5. Níveis de interleucina (IL-10) em tempos e estímulos diferentes e com concentração de probióticos 1,0 x 10^4, 1,0 x 10^5, 1,0 x 10^6, 1,0 x 10^7.

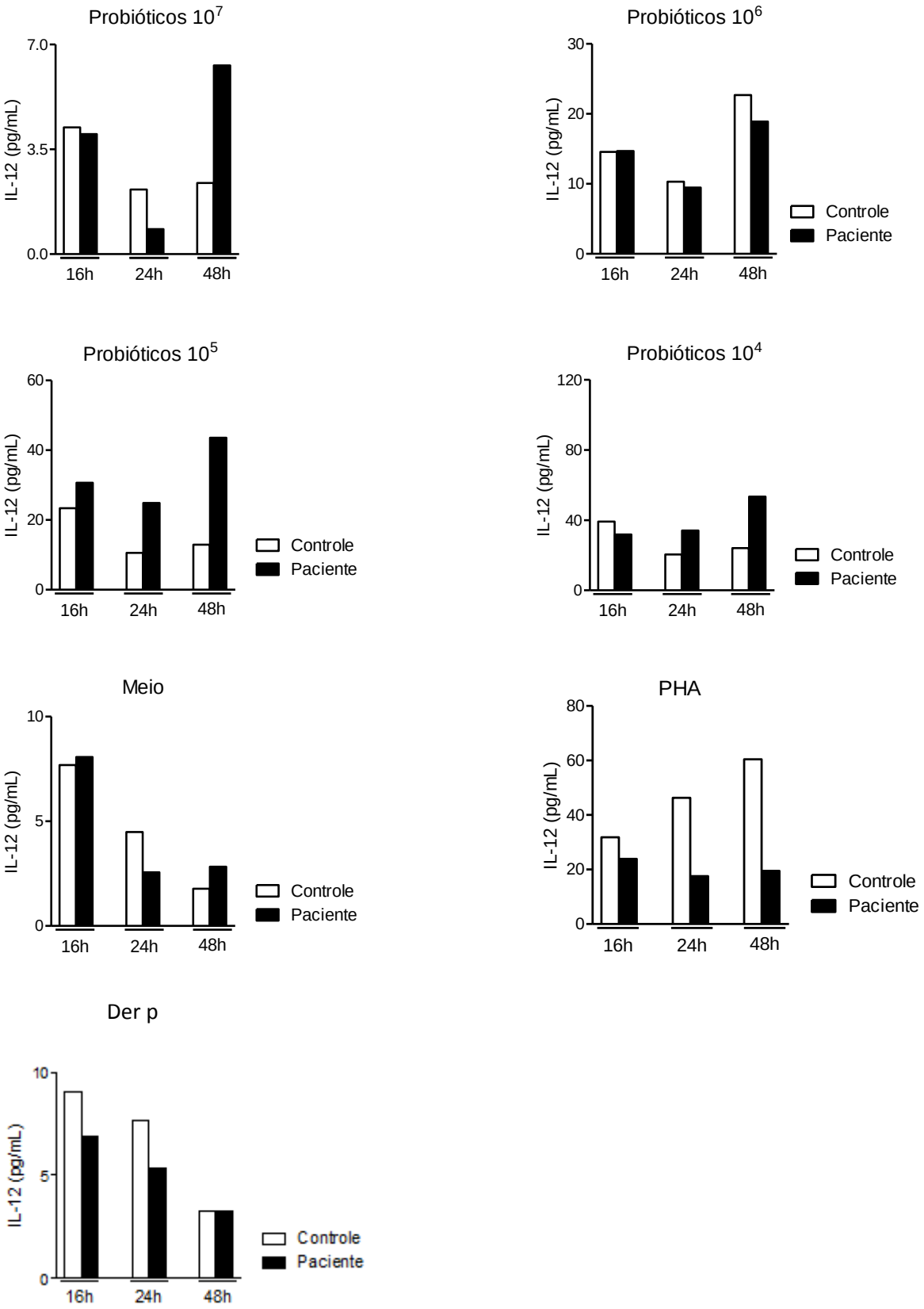


Figura 6. Níveis de interleucina (IL-12) em tempos e estímulos diferentes e com concentração de probióticos 1,0 x 10^4, 1,0 x 10^5, 1,0 x 10^6, 1,0 x 10^7.

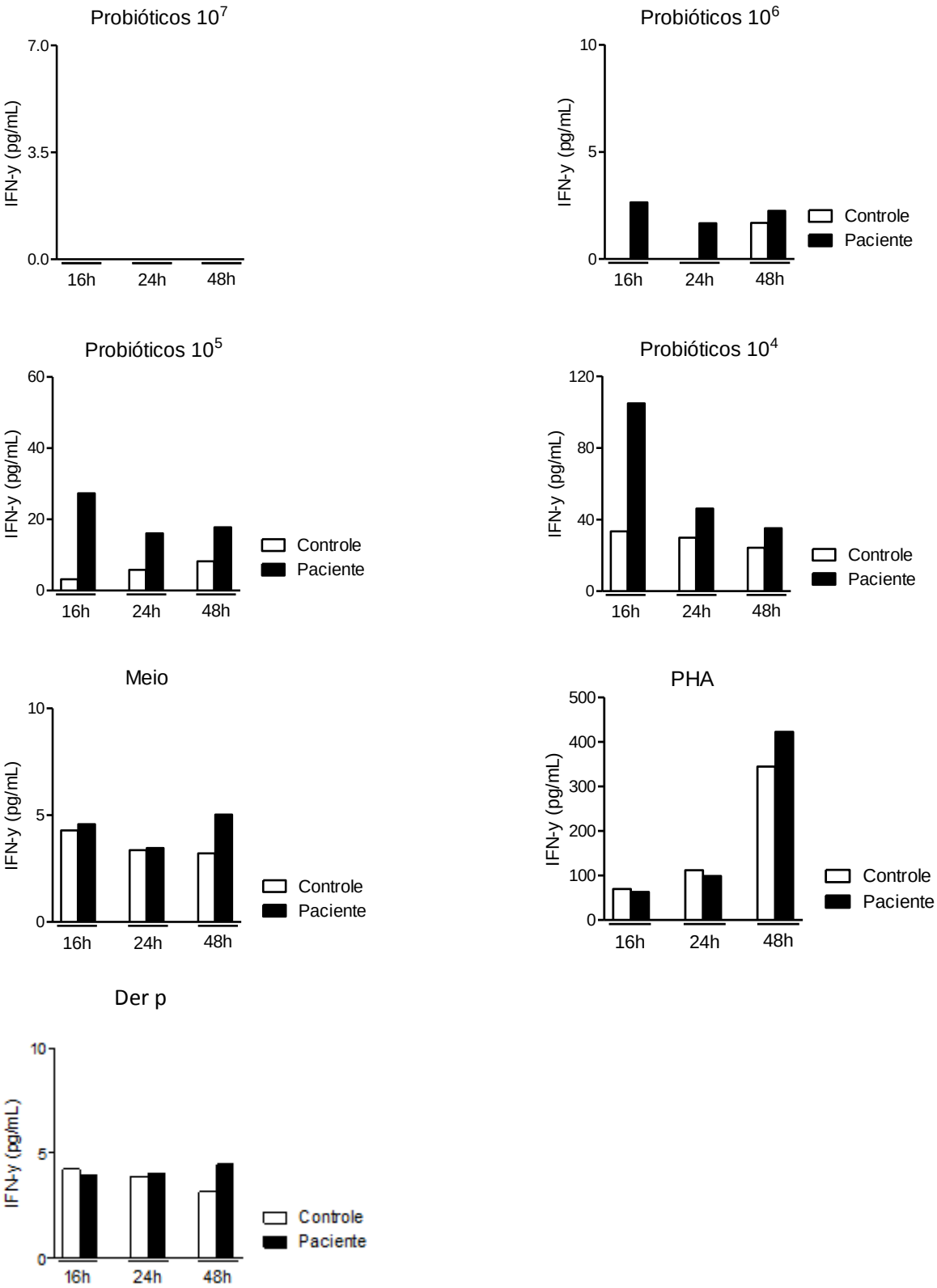


Figura 7. Níveis de citocina (INF-γ) em tempos e estímulos diferentes e com concentração de probióticos 1,0 x 10^4, 1,0 x 10^5, 1,0 x 10^6, 1,0 x 10^7.

- **Coletas sanguíneas para dosagens de citocinas**

As coletas de sangue para cultura e posterior dosagens das citocinas foram realizadas em dois momentos: na visita 1 (V1) – 4,0mL e após 60 dias na visita 3 (V3) – 4,0mL.

- **Cultivo do sangue total**

Um 57ililitro de sangue total foi depositado em placas de 24 poços de cultura na presença de 1mL de meio RPMI 1640 contendo L-glutamina – 2,05mm e bicarbonato de sódio – 2g/L (LGC Biotecnologia®) e enriquecido com soro bovino fetal (SIGMA) a 10% e solução de penicilina – 100 U/mL e estreptomicina – 100µg/mL (SIGMA) em diferentes condições de cultivo: *Phytohemagglutinin* A (PHA) (5µg/mL), antígenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) (10µg/mL), mistura de probióticos (Pb) a 1,0 x 10^5 UFC/mL e sem nenhum estímulo (Meio) durante o período de 16h de cultivo. As placas foram incubadas a 37°C na presença de 5% de CO_2 por 16h. Ao final desse cultivo, os sobrenadantes de cultura foram coletados e centrifugados (200xg por 2 minutos) para serem armazenados a -20°C até a realização do ensaio para a detecção das citocinas.

- **Detecção dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura**

Os níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura foram quantificados através do sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) *Flex Sets*, seguindo a instrução do fabricante BD™ (*Becton Dickson Biosciences*, San Diego, EUA). Primeiro, 25µL da mistura de *beads* de captura, marcadas com anticorpos monoclonais anti-IL-12/IL23p40, anti-IL-10 e anti-IFN-γ (*Becton Dickson Biosciences*, San Diego, EUA) com diferentes intensidades de fluorescências (canais FL3 ou FL4) foram transferidos para tubos de citometria (*Corning Costar*®) destinados às amostras a serem testadas e ao controle negativo. Em seguida, 25 µL das amostras de sobrenadante foram adicionados aos seus respectivos tubos, que foram incubadas por 1h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente foram adicionados 25µL do reagente de detecção contendo anticorpos anti-citocinas alvos conjugadas à *Phycoerythrin* (canal FL2). As misturas foram incubadas por 2h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 0,5mL de solução de lavagem e centrifugadas a 200xg por 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e 300µL de solução tampão foram adicionados para ressuspender as esferas.

As *beads* foram adquiridas dentro de 24h utilizando o citometro de fluxo *FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems*™) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CpqAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises foram realizadas através do *Software* FCAP *Array* versão 3.01 (*Becton Dickson*), onde uma curva-padrão é elaborada utilizando uma diluição seriada dos padrões de citocinas. O limiar de detecção da IL12/IL23p40 dado pelo kit é de 40 – 10.000pg/mL e das demais citocinas é de 10 – 2.500pg/mL. Os resultados das dosagens das citocinas foram expressos em pg/mL.

2.1.9 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados em forma de tabelas e gráficos com suas respectivas frequências absoluta e relativa. As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão. Para as variáveis quantitativas foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.

Analisando os fatores de risco no grupo probiótico e no grupo placebo foram utilizados o Teste qui-quadrado e o Teste exato de Fisher para as variáveis categóricas e o Teste *t* Student para as variáveis numéricas.

Para comparar os resultados clínicos intergrupos, nas visitas (V1, V3 e V4), foram utilizados os testes não paramétricos qui-quadrado e Teste exato de Fisher para as variáveis nominais e Teste de Mann-Whitney para as variáveis discretas.

Para avaliação dos valores das citocinas IL-10, Il-12 e INF- γ nos grupos probióticos e placebo, nas visitas (V1 e V3), foram utilizados o Teste *t* Student pareado e Wilcoxon. Na comparação das citocinas intergrupos foram utilizados o Teste *t* Student e o Teste de Mann-Whitney.

Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança, considerando significativos os valores de $p \leq 0{,}05$. Foram utilizados os *Softwares* SPSS 22.0 para *Windows*® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e o Excel 2013.

2.1.10 Aspectos Éticos

Os pais e/ou responsável legal tiveram todas as informações necessárias, prestadas pela médica pesquisadora, sobre a que se propunha o estudo e os que concordaram, assinaram o TCLE. Os pais poderiam, no entanto, negar-se a participar ou retirar-se do estudo em qualquer fase da pesquisa sem que houvesse detrimento no atendimento da criança.

Nas situações de perda de seguimento ou na presença de efeitos adversos ao uso dos produtos, a criança poderia ser retirada do estudo, sem que fosse excluída da análise final. O estudo poderia ser interrompido ou a pesquisa encerrada caso apresentasse qualquer efeito secundário inesperado e de alto risco ou em situações que impossibilitassem a coleta de dados no momento apropriado.

Aos pais foi informado que a pesquisa teria garantia do sigilo absoluto e confidencialidade das informações prestadas e que os resultados poderiam ser divulgados publicamente, entretanto a identidade dos filhos (as) seria preservada. Foi exposto ainda que não haveria despesa pessoal ou compensação financeira relacionada à participação do menor.

Quanto ao uso dos probióticos, a empresa BioLogicus já vem comercialmente realizando a venda de seus produtos no mercado local, regional e nacional, com publicações de trabalhos científicos no cenário nacional e internacional. Os produtos probióticos e placebo foram adquiridos de forma comercial, diretamente na empresa, localizada dentro do complexo Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP), Recife, Brasil.

O ensaio clínico seguiu as regras estabelecidas pelo *Consolidated Standards of Reporting Trials* (*CONSORT 2010 Statement*) e seu *Check List* preenchido (ANEXO E).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) no. **466/12** do Ministério da Saúde, sob o registro CAAE – **15798013.0.0000.5208** (ANEXO F).

Foi obtido o Registro de Ensaios Clínicos pelo *ClinicalTrials.gov* do *National Institutes of Health* (NIH) dos EUA, com identificador de número **NCT 02113072**, com todas as informações completas (ANEXO G).

O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através da contemplação do Edital de Chamada Pública do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação MCTI/CNPq Nº 14/2013 - Universal - Universal 14/2013 - Faixa C – com benefício de R$ 65.000,00 (ANEXO H).

Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora principal, no Centro de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas – UFPE, localizado no segundo andar, pelo período mínimo de cinco anos.

3 CAPÍTULO III

3.1 ARTIGO 1

O artigo de revisão sistemática foi aceito para publicação no **J Pediatr (Rio J)** - *no prelo* - e pode ser acessado no *site*: **(http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2015.03.002)**

O presente artigo visou atender a um dos objetivos específicos da dissertação identificando ensaios clínicos randomizados em quatro bases de dados eletrônicas até Janeiro de 2015. Descrevemos toda a estratégia de busca, avaliação da qualidade dos ensaios clínicos e os resultados em relação ao efeito dos probióticos sobre a redução, duração e ocorrência de novos episódios de infecções respiratórias superior e inferior, e como desfecho secundário os possíveis eventos adversos do uso destes suplementos em crianças saudáveis, com diferentes cepas de probióticos.

Artigo 1

Probióticos no tratamento das infecções do trato respiratório superior e inferior nas crianças: revisão sistemática baseada em ensaios clínicos randomizados

Probióticos e infecções respiratórias nas crianças

Georgia V Araujo[a,*], Mário H de O Junior[b], Décio M Peixoto[c], Emanuel SC Sarinho[c]

Autor correspondente

Georgia Véras de Araujo

Av. Prof. Morais Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.

CEP: 50670-901

Fones: (81) 2126-8000/ (81) 3268-9336

e-mail: georgiaveras@uol.com.br

Resumo

Objetivos: Avaliar o efeito do uso de probióticos na redução dos sintomas, da duração da doença e da ocorrência de novos episódios de infecções respiratórias superior e inferior em crianças saudáveis.

Fontes de dados: Com a finalidade de identificar ensaios clínicos randomizados elegíveis, dois revisores acessaram quatro bases de dados eletrônicas [Medline/PubMed, Scopus (Elsevier), Web of Science e Cochrane (The Cochrane Library)], além do *ClinicalTrials.gov*, até Janeiro de 2015. Foram utilizados descritores, por meio da ferramenta *Medical Subject Headings*, seguindo um mesmo protocolo de busca.

Síntese dos dados: Os estudos apresentaram grande heterogeneidade em relação às cepas de probióticos, à forma de administração, ao tempo de uso e aos desfechos. Identificamos 11 ensaios clínicos randomizados, revisados por pares, que analisaram um total de 2.417 crianças até 10 anos incompletos. Na análise dos estudos, redução de novos episódios de doença foi o desfecho favorável ao uso dos probióticos no tratamento das infecções respiratórias na criança. Importante salientar que essas pesquisas foram realizadas, em sua maioria, em países desenvolvidos, com condições de saneamento, de assistência à saúde e de regulamentação rigorosa ao uso de probióticos bem estabelecidos e organizados. Quanto aos efeitos adversos, pouco relatados, configuram os probióticos como seguros.

Conclusões: Apesar do resultado encorajador - redução de novos episódios de infecções respiratórias - destacamos a necessidade de pesquisas futuras, principalmente em países em desenvolvimento, onde as taxas de infecções respiratórias na criança são maiores quando comparadas aos dos países de elevada renda *per capita* identificados nesta revisão.

Palavras-chave: Crianças, infecções do trato respiratório, probióticos.

Abstract

Objectives: Evaluate the effect of probiotics on the symptoms, duration of disease and the occurrence of new episodes of upper and lower respiratory infections in healthy children. **Sources:** In order to identify eligible randomized controlled trials, two reviewers accessed four electronic databases [Medline/PubMed, Scopus (Elsevier), Web of Science and Cochrane (The Cochrane Library)], as well as ClinicalTrials.gov until January 2015. Descriptors were used by Medical Subject Headings tool, following the same search protocol.

Summary of the findings: Studies showed diverse with respect to strains of probiotics, the mode of administration, the time of use and outcomes. We identified 11 randomized clinical trials, peer-reviewed, which analyzed a total of 2.417 children up to 10 years incomplete. In the analysis of the studies, reduction of new episodes of illness was a favorable outcome to the use of probiotics in the treatment of respiratory infections in children. Important to note that these studies were conducted, mostly in developed countries, with sanitation conditions, health care and strict regulations on the use of probiotics well established and organized. The adverse effects reported bit, configured as safe probiotics.

Conclusions: Despite the encouraging result - reducing new episodes of respiratory infections - highlight the need for further research, especially in developing countries, where rates of respiratory infections in children are higher when compared to the per capita high-income countries identified in this review.

Keywords: children, respiratory tract infections, probiotics.

Introdução

As infecções do trato respiratório são comuns na infância e contribuem substancialmente para a morbidade pediátrica e mortalidade em todo o mundo.[1] O impacto econômico e social destas infecções é expressivo, constituindo importante desafio na saúde pública, devido aos altos custos para o tratamento, hospitalizações, absenteísmo escolar e perda de dias de trabalho pelos pais e cuidadores.[2]

A grande variedade de agentes etiológicos, uso inadequado e em larga escala dos antibióticos, aumento da resistência bacteriana, disponibilidade reduzida de vacinas para a maioria dos vírus e bactérias desafiam o surgimento de terapias eficientes e adequadas para o tratamento deste agravo.[3]

Desde sua apresentação, por Eli Metchnikoff em 1907,[4] os probióticos vêm sendo cada vez mais usados com o objetivo de beneficiar o sistema imune do hospedeiro humano.[5] Definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas como parte de alimento, conferem efeitos benéficos ao hospedeiro através da sua microbiota intestinal",[6] os probióticos vem encontrando uso em larga escala nos tratos respiratório, gastrointestinal, urogenital, nas doenças alérgicas, auto-imunes e cânceres.[7-11]

Recentes revisões sistemáticas e metanálises têm relatado um positivo, embora modesto, efeito dos probióticos em termos de prevenção das infecções do trato respiratório,[12-17] somente uma metanálise avaliou a efetividade dos probióticos na duração das condições respiratórias na criança e no adulto, restringindo-se aos ensaios clínicos randomizados que utilizaram apenas os probióticos do género *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.[18]

Desta forma, o objetivo da presente revisão sistemática é explorar e descrever ensaios clínicos que apresentam como desfecho primário o efeito dos probióticos sobre a redução, duração e ocorrência de novos episódios de infecções respiratórias superior e inferior, e como desfecho secundário os possíveis eventos adversos do uso destes suplementos em crianças saudáveis, com diferentes cepas de probióticos.

Métodos

Protocolo de pesquisa

Conduzimos nossa revisão sistemática, através de um protocolo de pesquisa que foi redigido para guiar a execução de todas as etapas, utilizando abordagens metodológicas descritas no Manual Cochrane para Revisões sistemáticas (*Cochrane Handbook for Systematic Reviewers*)[19] e relatados de acordo com os itens de informação para revisões sistemáticas e metanálises.[20]

Critérios de elegibilidade

Estudos elegíveis para inclusão nesta revisão sistemática foram ensaios clínicos randomizados controlados (ECR) de qualquer duração (estudos fase III), comparando cepas de probióticos, únicas ou combinadas, consumidas por qualquer forma de administração, com placebo ou "não tratamento" em crianças aparentemente saudáveis (do nascimento até 10 anos incompletos), que desenvolveram infecção respiratória superior ou inferior aguda em algum momento durante o estudo. Estudos abertos ou cegos foram elegíveis, desde que os pacientes fossem randomizados. As cepas dos probióticos poderiam ser administradas em qualquer dose e associadas ou não com outros ingredientes funcionais (como prebióticos e vitaminas) ou antibióticos, desde que o comparador incluísse os mesmos produtos, de modo que o efeito

global poderia ser atribuído ao probiótico usado. Para serem elegíveis para inclusão, os estudos teriam de estar publicados nas línguas portuguesa, inglesa ou espanhola e os resultados deveriam apresentar um ou mais de um dos objetivos do estudo: a redução dos sintomas da doença, redução da duração, redução ou não da ocorrência de novos episódios e a presença de algum evento adverso.

Os critérios de exclusão foram: ensaios clínicos com perdas de seguimento maiores que 20%; estudos em animais; estudos sobre prevenção de infecções respiratórias; estudos em crianças que apresentassem alguma imunodeficiência adquirida, congênita ou doença crônica; publicações tipo comentários, editoriais ou cartas; estudos com resultados de outros órgãos acometidos que não fosse o trato respiratório; estudos com busca duplicada, anais de congressos, desenhos de estudos inapropriados (exemplos: estudos observacionais, estudos não randomizados) e estudos em outras línguas que não as mencionadas previamente. Cada artigo identificado foi inicialmente analisado pelo título e resumo, e os artigos elegíveis foram selecionados para leitura completa.

Definições dos termos de busca

Utilizamos inicialmente os seguintes termos e palavras-chave: (probiotics) AND (respiratory tract infections) AND (infant) AND (children), com as seguintes definições: *probiotics* - incluiu todas as cepas de bactérias e/ou leveduras potencialmente benéficas ao hospedeiro, administrados por qualquer veículo; *respiratory tract infections*: superior (resfriado comum, otites média, faringites e sinusites) e inferior (bronquites e pneumonias); *infant AND children*: todas as crianças do nascimento até 10 anos incompletos, caracterizando a não inserção de adolescentes.

Estratégia de pesquisa dos estudos

A busca eletrônica foi conduzida até Janeiro de 2015 nas bases de dados: Medline/PubMed, Scopus (Elsevier), Web of Science (Thomson Reuters Scientific) e Cochrane BVS (The Cochrane Library), com estratégias de busca adaptada para cada base de dados:

Medline/PubMed:

("probiotics"[MeSH Terms] OR "probiotics"[All Fields]) AND ("respiratory tract infections"[MeSH Terms] OR ("respiratory"[All Fields] AND "tract"[All Fields] AND "infections"[All Fields]) OR "respiratory tract infections"[All Fields]) AND ("infant"[MeSH Terms] OR "infant"[All Fields]) AND ("child"[MeSH Terms] OR "child"[All Fields] OR "children"[All Fields]).

Seguindo para detalhar as infecções do trato respiratório: ("probiotics"[MeSH Terms] OR "probiotics"[All Fields]) AND ("common cold"[MeSH Terms] OR ("common"[All Fields] AND "cold"[All Fields]) OR "common cold"[All Fields]) AND ("child"[MeSH Terms] OR "child"[All Fields] OR "children"[All Fields]). A condução dos demais termos foi realizada substituindo a palavra “common cold” por “otitis media”, “sinusitis”, “pharyngitis”, “bronchitis” e “pneumonia” de forma sequencial.

Scopus (Elsevier):

("Probiotics" AND "respiratory tract infections" AND "infant" AND "children"), seguindo a substituição do "respiratory tract infections" por “common cold”, “otitis media”, “sinusitis”, “pharyngitis”, “bronchitis” e “pneumonia” de forma sequencial.

Web of Science (Thomson Reuters Scientific):

Com artigos capturados de 1945 até Janeiro de 2015. Utilizando a seguinte estratégia de busca: (Probiotics* AND respiratory tract infections* AND infant* AND Children*), seguindo a substituição do respiratory tract infections* por common cold*, otitis media*, sinusites*, pharyngitis*, bronchitis* e pneumonia* de forma sequencial.

Cochrane BVS (Biblioteca Virtual de Saúde):

(Probiotics and respiratory tract infections and infant AND children) seguindo a substituição do respiratory tract infections por common cold, otitis media, sinusitis, pharyngitis, bronchitis e pneumonia de forma sequencial.

Foram 52 buscas nas bases de dados, sendo treze em cada, utilizando os termos de forma separada e sequencial, para melhor acurácia e precisão.

Extração dos dados

Utilizamos duas etapas do processo para identificar e selecionar os estudos: primeiro, dois revisores (GVA e MHO) identificaram, de forma independente, os títulos e resumos de cada estudo para avaliar se correspondiam aos critérios de inclusão. Segundo, os artigos selecionados foram obtidos na versão – texto completo, em seguida foram revisados independentemente, para determinar os critérios de inclusão e exclusão. Quaisquer discrepâncias foram resolvidas através de um consenso e/ou consultando um terceiro revisor. Quando possível, autores foram contactados, por e-mail, em caso de dúvidas, na ausência de dados específicos ou informação adicional.

Informações sobre estudos em curso ou recentemente concluídos, investigação e pesquisa inédita relatada na literatura cinzenta foram obtidos através de pesquisa em registros de ensaios (*ClinicalTrials.com*) e selecionados os principais procedimentos de conferências (3 anos antes da data da pesquisa).

Ainda realizou-se busca manual através das referências dos estudos pré-selecionados e de revisões publicadas sobre o tema.

Os seguintes itens foram coletados: características dos estudos incluidos, como condição clínica, detalhes da intervenção e comparação; avaliação de risco de viés e critério de qualidade dos estudos selecionados. A redução dos sintomas, da duração dos episódios de

doença e da possibilidade de reduzir novos episódios das afecções do trato respiratório foram analisados como desfechos primários e se a utilização dos probióticos desencadeou algum evento adverso como desfecho secundário.

Avaliação da qualidade e risco de viés

Nós também avaliamos os estudos pelo risco global de viés (baixo, alto ou indefinido) com base na ferramenta de risco de viés da Cochrane (*Cochrane Collaboration's risk of bias tool*).[21] Para os fins desta revisão, um estudo foi considerado ter um "baixo risco de viés" quando todos os principais critérios de qualidade (ou seja, método de randomização, ocultação da alocação e mascaramento/cegamento), bem como mais outros critérios adicionais (semelhança entre os grupos intervenção e comparação, desistência dos pacientes dos estudos e análise da intenção-de-tratar) foram adequadamente cumpridos; um "risco indefinido de viés" quando a maioria dos critérios-chave não foram relatados ou não foram claros; e um "risco elevado de viés" quando um ou mais dos principais critérios não se encontravam de forma adequada. A categoria "algum risco de viés" foi atribuída quando todos os aspectos dos critérios-chave foram adequados, mas que (1) uma análise de intenção-de-tratar não foi realizado e quando um critério não foi cumprido ou (2) quando dois critérios fundamentais foram adequados, mas uma análise de intenção-de-tratar não foi realizada.

Na análise da qualidade dos estudos randomizados, utilizamos as recomendações GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*).[22] Devido a grande heterogeneidade dos ensaios clínicos, os dados dos estudos foram avaliados qualitativamente, sem emprego de metanálise, seguindo as diretrizes PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*).[23] Para evitar o viés de publicação, estudos não publicados foram identificados, mas não obedeceram aos critérios de inclusão da presente revisão sistemática.

Resultados

De um total de 569 citações identificadas nas quatro principais bases de dados eletrônicas [PubMed/Medline, Scopus (Elsevier), Web of Science e Cochrane BVS – Library], nós incluímos 11 ensaios clínicos randomizados (ECRs), revisados por pares, que analisaram um total de 2.417 crianças do nascimento até 10 anos incompletos. Os critérios de inclusão foram preenchidos por onze ECRs, que serviram para identificação dos desfechos primário e secundário da presente revisão sistemática. O processo de seleção dos estudos pode ser visualizado na Figura 1.

Onze ECRs foram analisados quanto ao autor/ano, país do estudo, idade dos participantes, condição clínica, detalhes da intervenção e comparação, números randomizados e incluídos na análise e eventos adversos, como descrito na Tabela 1. Foram incluídos nesta revisão sistemática os seguintes ensaios clínicos: Cohen *et al*.;[24] Hatakka *et al*.;[25] Hatakka *et al*.;[26] Kumpu *et al*.;[27] Leyer *et al*.;[28] Rautava *et al*.;[29] Roos *et al*.;[30] Skovbjerg *et al*.;[31] Taipale *et al*.;[32] Tano *et al*.;[33] e Tapiovaara *et al*.,[34] que foram realizados na sua grande totalidade em dois países: Finlândia e Suécia, os demais ensaios foram realizados em outros dois diferentes países: China e França. A duração do tratamento com probióticos variou de 10 dias a 12 meses, embora a maioria dos ensaios foram realizados por cerca de 6 a 7 meses, durante os meses de inverno.

A avaliação da qualidade dos estudos está resumida na Tabela 2, em que todos os ensaios utilizaram métodos corretos de aleatorização, como uma lista de randomização gerada por computador ou por um número aleatório. Apropriado sigilo da alocação foi relatado na maioria dos estudos, incluindo o uso de envelopes fechados,[24,25,27,30,31,33] e/ou o uso de recipientes/embalagens codificadas que eram idênticos na aparência.[26,28,29,32,34] Os indivíduos foram incluídos sequencialmente, de acordo com a lista de randomização, a ocultação foi

corretamente realizada em sete estudos. [26-29,32-34] Entre os onze ensaios que foram identificados como duplo-cego, descrições detalhadas dos métodos de cegamento foram fornecidas em seis ECRs.[24,29,31-34]

Em geral, os onze ensaios clínicos foram considerados como tendo um risco "baixo" de viés, com poucos estudos mostrando o sigilo de alocação e o cegamento com "baixo" risco com algumas áreas de incerteza. Como todos os critérios de qualidade foram bem indicados, alguns estudos mostraram que a análise de intenção-de-tratar apresenta um risco indefinido, ou por não ter sido conduzido ou por não ter sido citado em mais da metade dos ensaios.[27,29-34] Nenhum estudo mostrou "alto" risco de viés nos principais critérios analisados.

Nos ensaios clínicos que incluíram "resfriados", "gripes", "infecções do trato respiratório" e "otite média aguda", todos os autores dos estudos relataram descrições claras dos sinais, sintomas e diagnósticos destas condições. Em seis dos ensaios,[24-26,28,32,34] um médico confirmou o diagnóstico da infecção, e em outros cinco ensaios,[27,29-31,33] os sinais e/ou sintomas foram relatadas pelos participantes em um diário, sendo o diagnóstico confirmado pelo julgamento de um investigador do estudo.

Nos ensaios incluidos, três desfechos principais foram relatados: **redução dos sintomas da doença**; **redução da duração dos episódios de doença**; **redução de novos episódios da doença**. Os resultados dos estudos realizados em crianças são relatados na Tabela 3, em que mostra também o número total e percentagem de pacientes que fizeram uso de antibiótico durante o estudo, tanto no grupo probiótico quanto no grupo placebo e o número total e percentagem de pacientes que tiveram pelo menos um episódio da doença.

Para melhor avaliação dos desfechos primários, a Tabela 4 acrescenta os valores: *Odds Ratio* (OR), intervalo de confiança (IC 95%) e valores de *p* extraídos dos artigos selecionados e que refletem os resultados positivos dos grupos probióticos em relação aos grupos placebos nos ensaios clínicos randomizados.

Avaliação da redução dos sintomas da doença

Entre os estudos incluídos, cinco ECRs[24,28,31-33] informaram sobre ter ocorrido ou não a redução dos sintomas da doença, definido como a redução dos sinais e sintomas ou persistência sem melhora da doença, observados pelo médico envolvido na pesquisa ou de outro médico solicitado nos cuidados da criança e pelo diário de saúde do paciente preenchido pelos pais ou cuidadores. Os dados foram categorizados em "sim" havendo redução dos sinais e sintomas, geralmente apresentados em percentagens nos estudos, "não" quando a percepção dos médicos ou pais e cuidadores não identificaram melhora do padrão de apresentação da doença e "não relatado (NR)" quando o estudo não descrevia este resultado.

Tendo em conta que todos os estudos foram randomizados em 1:1 no grupo probiótico e placebo, os números de participantes são aproximadamente os mesmos, e, portanto, a percepção, de melhora ou não dos sintomas, reflete de forma aproximada as diferenças dos resultados em cada grupo, tendo em vista que todos apresentavam os mesmos critérios de elegibilidade definidos em cada estudo. A revisão sistemática revelou que o grupo probiótico de três ECRs teve redução dos sintomas de sua doença.[28,31,33] No estudo de Leyer *et al*.,[28] nos grupos de probióticos, único ou combinado, houve redução da febre de 53,0% e 72,7%, redução da tosse de 41,4% e 62,1% e de rinorréia de 28,2% e 58,8%, respectivamente, em relação ao grupo placebo. No estudo de Skovbjerg *et al*.,[31] utilizando probiótico em spray, o grupo probiótico teve menos fluido e mais ar no ouvido médio, ou seja, sinais de melhora ou cura em 36,8% *versus* 5,8% em relação ao grupo placebo. No estudo de Tano *et al*.,[33] também usando probiótico em spray, houve redução da otalgia de 10% e da secreção do ouvido médio de 12% do grupo probiótico em relação ao placebo.

Avaliando o critério – duração dos sintomas – a maioria dos ECRs[25-27,29,30,34] não relataram dados que pudessem ser utilizados na presente revisão e dois estudos (Cohen *et al*. e

Taipale *et al*.)[24,32] não evidenciaram diferença da redução dos sintomas no grupo probiótico e placebo.

Avaliação da duração dos episódios de doença

Definido como a soma total de duração dos episódios de doença (em dias) dividido pelo número total de episódios de doença experimentados pelos participantes do estudo. Os resultados mostram que somente três estudos[25,27,28] foram incluídos na análise, com sete ECRs que não relataram este desfecho.[24,29-34] No estudo de Hatakka *et al*.,[25] a duração dos episódios foi de 4,9 dias (95% de IC, 4,4 - 5,5) *versus* 5,8 dias (95% de IC, 5,3 - 6,4) no grupo probiótico e placebo, respectivamente; no estudo de Kumpu *et al*.,[27] foi de 4,7 dias (95% de IC, 4,5-4,9) *versus* 5,6 dias (95% IC, 5,4 – 5,9), respectivamente; e no estudo de Leyer *et al*.,[28] a redução foi de 32% no grupo de probiótico com cepa única e de 48% no grupo de probiótico com cepas combinadas, em relação ao grupo placebo. Somente um estudo, Hatakka *et al*.[26] mostraram que a diferença em relação a duração dos episódios de OMA (otite média aguda) de 5,6 dias (95% de IC, 3,5 – 9,4) *versus* 6,0 dias (95% de IC, 4,0 – 10,5) no grupo probiótico e placebo, respectivamente, não alcançou significância estatística (p = n.s.).

Avaliação da redução de novos episódios da doença

Caracterizado como "sim" quando houve redução de novos episódios de doença ou redução na incidência da doença e "não" quando não houve significância estatística. Entre os estudos incluídos para este desfecho, seis ECRs[25,27-30,32] apresentaram em seus resultados que o grupo probiótico favorece a redução de novos episódios da doença quando comparado estatisticamente ao grupo placebo. Dois estudos (Skovbjerg *et al*. e Tapiovaara *et al*.)[31,34] não relataram esses dados em suas conclusões e três estudos[24,26,33] mostraram que os grupos probiótico e placebo não diferiram na redução da ocorrência de novos episódios da doença.

Analisando ainda a necessidade do uso do antibiótico nas ocorrências bacterianas das doenças estudadas, cinco ECRs[25-27,29,32] descreveram o número total e a percentagem de pacientes tratados pelo menos uma vez com antibiótico nos grupos probiótico e placebo. Em dois estudos (Hatakka *et al*. e Kumpu *et al*.)[25,27] não houve diferença entre os grupos, em outros dois (Hatakka *et al*. e Rautava *et al*.)[26,29] a prescrição de antibióticos foi mais evidenciada no grupo placebo, seis estudos não relataram este desfecho.[24,26,30,31,33,34]

Para além dos cinco ensaios clínicos que evidenciaram o uso mais frequente de antibiótico no grupo placebo, um estudo[32] que comparou *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12, em tabletes inseridos na chupeta, com um placebo, em 69 crianças de 1 a 2 meses de idade, na Finlândia, mostrou que o uso do antibiótico foi maior no grupo probiótico 10 (29%) do que no grupo placebo 8 (23%). Os autores relataram que essa diferença pode ser atribuída ao fato da amamentação exclusiva ter sido maior no grupo placebo do que no grupo probiótico, conferindo maior proteção quanto ao risco de infecções respiratórias. No entanto, há uma incerteza em relação a esse resultado.

Eventos adversos

A administração de probióticos parece ter um bom perfil de segurança, pois a maioria dos ECRs[25,28,29,31,32,34] não identificaram eventos adversos e não houve relato em somente um estudo.[26] Dois ensaios clínicos[24,27] mostraram eventos adversos leves como: perda de apetite para leite, regurgitação, pele seca, dor abdominal esporádica, diarreia, náusea, rash cutâneo e constipação. Outros dois estudos[30,33] que utilizaram a intervenção e comparação em *spray* nasal, houve uma criança que teve pneumonia no grupo placebo e foi encorajada a parar o tratamento;[30] e no outro estudo, os grupos placebo e tratamento foram acometidos de forma leve por rinite, tosse, rash cutâneo, vômito e epistaxe, o que pode ser inerente a forma e técnica de uso do dispositivo.[33]

Discussão

Nós identificamos uma série de ensaios clínicos randomizados (ECRs), de moderada à alta qualidade em sua maioria, que avaliaram o uso dos probióticos nas infecções do trato respiratório superior e inferior na criança. A forma de apresentação, as doses, as diferentes cepas, os diferentes mecanismos e tempo de administração dos probióticos fizeram com que esses estudos apresentassem grande heterogeneidade e alterações na análise de sensibilidade, dificultando a realização de uma concomitante metanálise. Analisando os desfechos primários desta revisão, quanto à redução dos sintomas, da duração do tempo da afecção e de novos episódios da doença, este último se destacou por ter sido o objetivo da grande maioria dos ECRs, mostrando que em seis estudos houve redução de novos episódios de infecções respiratórias, três outros não observaram diferença em seus resultados e dois não relataram este desfecho. Encontramos também um número reduzido de ensaios clínicos que apresentaram eventos adversos com o uso dos probióticos, com quadros leves que não necessitaram de cuidados hospitalares.

Considerando os valores das medidas de associação dos desfechos primários positivos, a presente revisão mostra que na redução dos sintomas, os três ensaios clínicos[28,31,33] apresentaram tendência a significância estatística, com *p*-valores próximos a 0,05, apesar de uma maior amplitude do intervalo de confiança (IC 95%) observada nos estudos de Leyer *et al*.[28] e Skovbjerg *et al*.[31]. Na análise da redução da duração dos episódios de doença, somente o estudo de Kumpu *et al*.[27] apresentou significância estatística, o estudo de Leyer *et al*.[28] apesar do *p*-valor 0,04 ter nível de significância, mostra um amplo intervalo de confiança; e na redução de novos episódios da doença, dos seis ensaios clínicos[25,27-30,32], os estudos de Leyer *et al*.[28] e Taipale *et al*.[32] apresentaram *p*-valores e intervalos de confiança significantes, dois outros estudos[25,27] não mostraram dados significantes e os estudos de Rautava *et al*.[29] e

Roos *et al*.[30] apresentaram maior amplitude do intervalo de confiança, apesar do *p*-valores com significância estatística.

No que concerne ao entendimento do termo - infecções respiratórias – estas são geralmente consideradas infecções do trato respiratório superior e inferior, no entanto, as definições dos termos apresentaram variações entre os estudos. No julgamento por Hatakka *et al*.,[25] otite média aguda e sinusite foram relatados como infecções respiratórias superiores e bronquite aguda e pneumonia como infecções respiratórias inferiores. Em outro estudo, Kumpu *et al*.[27] consideraram infecções respiratórias como sinusite, otite, resfriado comum, pneumonia e bronquite, sem esclarecer a frequência de cada ocorrência em separado.

Em muitos países, as crianças experimentam de 3 a 6 episódios de infecções respiratórias por ano e 40% delas poderiam até sofrer de pelo menos um episódio de otite média aguda, que é uma das mais comuns infecções e complicações bacterianas, e uma das principais razões para o tratamento com antibióticos na infância.[35,36] Assim, uma redução de novos episódios de infecções respiratórias, com menor tempo de duração e redução dos sintomas, poderia ter grande importância clínica, maior impacto na saúde pública, e consequências econômicas positivas, principalmente nos países em desenvolvimento.

Probióticos são microrganismos vivos oferecidos como suplemento alimentar que atuam no intestino do organismo hospedeiro regulando a microbiota intestinal ou modulando a microbiota em outros segmentos do corpo humano.[37] Dessa forma, agem melhorando a imunidade local e sistêmica, competem com patógenos invasores da integridade local e restauram os microrganismos que conferem segurança e manutenção da saúde do indivíduo. Muitos estudos vêm mostrando o real benefício e segurança dos probióticos na infância,[38-40] sendo atualmente elevados à categoria de Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS) para consumo, conforme compilado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), e com inclusão rotineira às fórmulas infantis em alguns países desenvolvidos.[41]

Neste complexo entendimento dos resultados dos probióticos apontados na literatura científica, destacamos os diversos mecanismos de ação que são esperados no organismo humano: a] funcionalidade microbiológica (por exclusão competitiva ou redução ativa de patógenos através da produção de ácidos graxos de cadeia curta e ácidos orgânicos; produção de bacteriocinas e produção de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio) com o objetivo de estabilizar ou melhorar a homeostase microbiana em uma área do corpo e reduzir a invasão e colonização por patógenos; b] funcionalidade nutricional (com produção de vitaminas que agem em todo o organismo do hospedeiro humano); c] funcionalidade fisiológica (com melhora do trânsito intestinal e das propriedades reológicas das secreções respiratórias) e d] funcionalidade imunológica (com produção de citocinas – interleucinas (IL)-10 e interferon (INF)-ɣ que modulam beneficamente a imunidade da mucosa respiratória).[42,43] Através dos receptores padrões de reconhecimento (PRRs), tais como: receptores Toll-like (TLRs) e receptores NOD-like (NLDs) os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) geram nas células dendríticas respostas imunes, principalmente nas células Th1 ou Tregulatória (Treg) com produção de IL-12 e IL-10, respectivamente, com funções de proteção imune contra vírus e bactérias e com funções tolerogênicas para que não haja agressão ao próprio hospedeiro humano.[44-46]

Recentemente, os membros do Comitê da *European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN)[47] e a Academia Americana de Pediatria (AAP)[48] revisaram as evidências para o uso de probióticos em lactentes e crianças, e concluíram que as fórmulas probióticas suplementadas para lactentes saudáveis não levantaram preocupações de segurança em relação ao crescimento em estatura e aos efeitos adversos. Por outro lado, não observaram, dados relacionados com a segurança do uso de probióticos à longo prazo, assim como não identificaram uniformidade de doses, de cepas e do tempo de uso nos ensaios clínicos randomizados.

Fazendo uma busca de todas as revisões sistemáticas e metanálises na literatura, relacionada com o uso de probióticos e infecções do trato respiratório, encontramos que existem seis revisões sistemáticas direcionadas para a prevenção,[12-17] bastante heterogêneas, tanto na população estudada: crianças e adultos, como no segmento respiratório avaliado: infecções de vias aéreas superiores e inferiores, quanto ao tipo e cepas de probióticos analisados. Destas revisões, o estudo de Saeterdal *et al*.,[16] é um sumário dos achados da revisão de Hao *et al*.,[15] detalhando as tabelas do artigo que não foram devidamente analisadas. Três realizaram metanálises,[12,13,15] identificando os efeitos benéficos dos probióticos exclusivamente na prevenção das infecções respiratórias. Nas revisões sobre prevenção, Kang *et al*.[12] concluíram, com base na avaliação de dez ensaios clínicos em indivíduos de todas as idades, que há modesto efeito dos probióticos na prevenção dos resfriados comuns; Liu *et al*.,[13] analisando quatro ECRs com uso apenas de uma cepa de probiótico, concluíram que a administração de *Lactobacillus rhamnosus* GG tem o potencial de reduzir a incidência de otite média aguda, de infecções respiratórias superiores e do uso de antibiótico; na revisão de Vouloumanou *et al*.,[14] avaliando 14 ECRs, concluíram que os probióticos podem ter um efeito benéfico na gravidade e na duração dos sintomas, mas não parece reduzir a incidência de infecções respiratórias; na metanálise de Hao *et al*.,[15] com também 14 ECRs avaliando indivíduos de todas as idades, concluíram que probióticos foram melhor do que placebo, na redução de episódios de infecções respiratórias superiores e no uso de antibiótico. No recente estudo de Ozen *et al*.,[17] analisando 14 ECRs conduzidos na população pediátrica, concluíram que uma redução mínima de 5 - 10% na incidência de infecções das vias aéreas superiores teria um importante impacto clínico e econômico.

Na única metanálise que avaliou os probióticos exclusivamente no tratamento de infecções respiratórias, King *et al*.[18] incluíram crianças de 1 a 12 anos de idade, além de adultos e idosos, tendo esta revisão analisado estudos com somente duas cepas de probióticos.

Foram vinte ECRs, sendo dez estudos com crianças, e os resultados foram avaliados de forma generalizada, com redução de um dia na duração das doenças. Nenhum comentário de revisões sistemáticas anteriores - relacionadas com o tratamento das infecções respiratórias exclusivamente na criança – nos forneceram dados resumidos sobre a redução dos sintomas da doença, redução da duração dos episódios e de novos episódios de infecções respiratórias, e esta revisão fornece novas evidências para estes desfechos.

Esta revisão teve como princípio avaliar a melhor evidência atual disponível na literatura a fim de elucidar os benefícios dos probióticos no tratamento das infecções respiratórias em crianças saudáveis. Foram incluídos ensaios clínicos controlados e randomizados com protocolos bem definidos, tentando-se, ao máximo, controlar os possíveis viéses. Tivemos a preocupação de avaliar a qualidade dos estudos pela ferramenta de risco de viés da Cochrane (*Cochrane Collaboration's risk of bias tool*) e pelo GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*),[21,22] atualmente sendo considerado um instrumento mais adequado e preciso que os critérios Jadad.[49]

Mesmo com todos os cuidados em produzir esta revisão sistemática, algumas limitações puderam ser identificadas: em primeiro lugar, três ensaios clínicos registrados no *ClinicalTrials.gov*, incluindo cerca de 650 pacientes, estão em fase de andamento e não puderam ser incluídos na avaliação por falta de dados conclusivos. Futuramente devem ser analisados em uma atualização, podendo assim, contribuir para identificar os reais benefícios obtidos até o momento; em segundo, enquanto a maioria dos autores dos estudos relataram descrições claras dos sinais e sintomas, o diagnóstico confirmado por um médico foi realizado em somente metade dos ensaios. É possível que as infecções agudas possam ter sido subdiagnosticadas ou mais diagnosticadas em alguns desses ensaios clínicos, ou seja, tal como acontece com todos os comentários das revisões sistemáticas, é possível que a adição de publicações no futuro possa alterar os resultados; o terceiro aspecto a ser considerado é que os

ECRs divergiram em relação às doses, ao tempo de uso e as formas de administração. Encontramos respostas clínicas em tempos curtos, assim como em tempos prolongados do uso dos probióticos, o que nos faz inferir que o efeito desejado depende da complexidade da infecção, do sítio ativado, das cepas de probióticos utilizadas e das concentrações administradas em unidades formadoras de colônias (UFC) dos probióticos.

Embora alguns estudos publicados tenham mostrado que a administração de probióticos promovam um efeito benéfico em reduzir a ocorrência de novos episódios de infecções respiratórias, principalmente naqueles pacientes com história clínica de infecções repetidas, percebe-se que ainda há muitas lacunas na nossa compreensão e, portanto, muitas perguntas ainda não respondidas no que concerne a cepa ou cepas do probiótico mais indicado, as doses necessárias, aos regimes de administração, ao tempo de uso ideal e a segurança do uso prolongado. Há uma necessidade, no exercício da prática pediátrica, de se estabelecer, pelos guidelines e comitês científicos, protocolos padronizados de uso dos probióticos para tratamento das principais infecções respiratórias na criança. Destacamos, também, a necessidade de pesquisas futuras, principalmente em países em desenvolvimento, onde as taxas de infecções respiratórias na infância são maiores quando comparadas aos dos países de elevada renda *per capita* identificados nesta revisão.

Referências

1. Hardelid P, Dattani N, Cortina-Borja M, Gilbert R. Contribution of respiratory tract infections to child deaths: a data linkage study. BMC Public Health. 2014;14:1191.
2. Díez-Domingo J, Pérez-Yarza EG, Melero JA, Sánchez-Luna M, Aguilar MD, Blasco AJ, et al. Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search. BMC Infectious Diseases. 2014;14:544.
3. Andrews T, Thompson M, Buckley DI, Heneghan C, Deyo R, Redmond N, et al. Interventions to Influence Consulting and Antibiotic Use for Acute Respiratory Tract Infections in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE. 2012;7:e30334.
4. Metchnikoff E. Optimistic studies New York: The prolongation of life. Putman's sons. 1908:161-83.
5. Lilly DM, Stillwell RH. Science. 1965;147:747-8.
6. Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. April 30, May 1; London Ontario, Canada; 2002. [cited 2014 Aug 18]. Available from: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf.
7. Ritchie ML, Romanuk TN. A Meta-Analysis of Probiotic Efficacy for Gastrointestinal Diseases. PLoS ONE. 2012;7:e34938.
8. Berin MC. Bugs versus Bugs: Probiotics, Microbiome and Allergy. Int Arch Allergy Immunol. 2014;163:165–7.
9. Patel S, Goyal A. Evolving Roles of Probiotics in Cancer Prophylaxis and Therapy. Probiotics & Antimicro. Prot. 2013;5:59–67.

10. Abad CL, Safdar N. the Role of *Lactobacillus* probiotics in the treatment or prevention of urogenital infections – A Systematic Review. Journal of Chemotherapy. 2009;21:243-52.
11. Savilahti E, Kukkonen K, Kuitunen M. Probiotics in the Treatment and Prevention of Allergy in Children. WAO Journal. 2009;2:69–76.
12. Kang E-J, Kim SY, Hwang I-H, Ji Y-J. The effect of probiotics on prevention of common cold: a meta-analysis of randomized controlled trial studies. Korean J Fam Med. 2013;34:2–10.
13. Liu S, Hu PW, Du X, Zhou T, Pei X. *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for preventing respiratory infections in children: A Meta-analysis of Randomized, Placebo-controlled Trials. Indian Pediatrics. 2013;50:377-81.
14. Vouloumanou EK, Makris GC, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. Int J Antimicrob Agents. 2009;34:197.e1-10.
15. Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. The Cochrane Database of Systematic Reviews. [Cited 2011 Sep 7]:CD006895. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.
16. Sæterdal I, Underland V, Nilsen ES. The effect of probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. Glob Adv Health Med. 2012;1:124-5.
17. Ozen M, Kocabas SG, Dinleyici EC. Probiotics for the prevention of pediatric upper respiratory tract infections: a systematic review. Expert Opin Biol Ther. 2015;15:9-20.
18. King S, Glanville J, Sanders ME, Fitzgerald A, Varley D. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute

respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. British Journal of Nutrition. 2014;112:41–54.

19. Higgins JPT, Green S (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 5.1.0; (updated March 2011). The Cochrane Collaboration. Available from: http://www.cochrane.org/training/cochrane-handbook. [accessed 07.05.14].
20. Centre for Reviews and Dissemination. Systematic reviews of clinical tests. In: Centre for Reviews and Dissemination, editor. Systematic review: CRD's guidance for undertaking reviews in health care. York: University of York; 2009. p.127.
21. Higgins JP, Altman DG, Gotzsche PC, Juni P, Moher D, Oxman AD, et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. BMJ. 2011;343:d5928.
22. Schünemann HJ, Oxman AD, Brozek J, Glasziou P, Jaeschke R, Vist GE, et al. Grading quality of evidence and strength of recommendations for diagnostic tests and strategies. BMJ. 2008;336:1106-10.
23. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JP, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. BMJ. 2009;339:b2700.
24. Cohen R, Martin E, La Rocque F, Thollot F, Pecquet S, Werner A, et al. Probiotics and Prebiotics in Preventing Episodes of Acute Otitis Media in High-risk Children: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study. Pediatr Infect Dis J. 2013;32: 810–4.
25. Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. BMJ. 2001;322:1-5.

26. Hatakkaa K, Blomgrenc K, Pohjavuoria S, Kaijalainene T, Poussaf T, Leinonene M, et al. Treatment of acute otitis media with probiotics in otitis-prone children - A double-blind, placebo-controlled randomised study. Clinical Nutrition. 2007;26:314–21.
27. Kumpu M, Kekkonen RA, Kautiainen H, Järvenpää S, Kristo A, Huovinen P, et al. Milk containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and respiratory illness in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. European Journal of Clinical Nutrition. 2012;66:1020–3.
28. Leyer GJ, Li S, Mubasher ME, Reifer C, Ouwehand AC. Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. Pediatrics. 2009;124:e172-9.
29. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy – a randomised, double-blind, placebo-controlled study. British Journal of Nutrition. 2009;101:1722–6.
30. Roos K, Håkansson EG, Holm S. Effect of recolonisation with "interfering" *α streptococci* on recurrences of acute and secretory otitis media in children: randomised placebo controlled trial. BMJ. 2001;322:1-4.
31. Skovbjerg S, Roos K, Holm SE, Håkansson EG, Nowrouzian F, Ivarsson M, et al. Spray bacteriotherapy decreases middle ear fluid in children with secretory otitis media. Arch Dis Child. 2009;94:92–8.
32. Taipale T, Pienihäkkinen K, Isolauri E, Larsen C, Brockmann E, Alanen P, et al. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. British Journal of Nutrition. 2011:105:409–16.
33. Tano K, Håkansson EG, Holm SE, Hellström S. A nasal spray with *alpha-haemolytic streptococci* as long term prophylaxis against recurrent otitis media. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2002;62:17–23.

34. Tapiovaara L, Lehtoranta L, Swanljung E, Mäkivuokko H, Laakso S, Roivainen M, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG in the middle ear after randomized, double-blind, placebo-controlled oral administration. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. 2014;78:1637–41.
35. Laurent C, Dugue AE, Brouard J, Nimal D, Dina J, Parienti J-J, et al. Viral epidemiology and severity of respiratory infections in infants in 2009 a prospective study. Pediatr Infect Dis J. 2012;31:827-31.
36. Venekamp RP, Sanders S, Glasziou PP, Del Mar CB, Rovers MM. Antibiotics for acute otitis media in children. Cochrane Database of Systematic Reviews. [Cited 2013 Jan 31]: CD000219. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/ 10.1002/14651858.
37. Hernell O, West CE. Clinical effects of probiotics: scientific evidence from a paediatric perspective. British Journal of Nutrition. 2013;109:S70–5.
38. Esposito S, Rigante D, Principi N. Do children's upper respiratory tract infections benefit from probiotics? BMC Infectious Diseases. 2014;14:194.
39. Morais MB, Jacob CM. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. J Pediatr (Rio J). 2006;82:S189-97.
40. Vandenplas Y, Veereman-Wauters G, De Greef E, Peeters S, Casteels A, Mahler T, et al. Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. J Pediatr (Rio J). 2011;87:292-300.
41. Generally Recognized as Safe (GRAS) [Internet]. Ingredients, Additives, GRAS & Packaging Guidance Documents & Regulatory Information. EUA. U.S. Food and Drug Administration; 2006 [cited 2014 Nov 26]. Available from: http:// www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/gras/default.htm

42. Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. J Pediatr (Rio J). 2015;91:6-21.

43. Villena J, Chiba E, Tomosada Y, Salva S, Marranzino G, Kitazawa H, et al. Orally administered Lactobacillus rhamnosus modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). BMC Immunology. 2012;13:53.

44. Baba N, Samson S, Bourdet-Sicard R, Rubio M, Sarfati M. Selected commensal-related bacteria and Toll-like receptor 3 agonist combinatorial codes synergistically induce interleukin-12 production by dendritic cells to trigger a T helper type 1 polarizing programme. Immunology. 2009:128:e523-31.

45. Forsythe P. Probiotics and lung diseases. CHEST. 2011;139:901-8.

46. Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. Translational research. 2012;160:258–66.

47. Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, Mihatsch W, Moreno L, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011;52:238–50.

48. Thomas DW, Greer FR; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Probiotics and prebiotics in pediatrics. Pediatrics. 2010;126:1217–31.

49. Jadad AR, Moore RA, Caroll D. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? Control Clinical Trials. 1996;17:1-12.

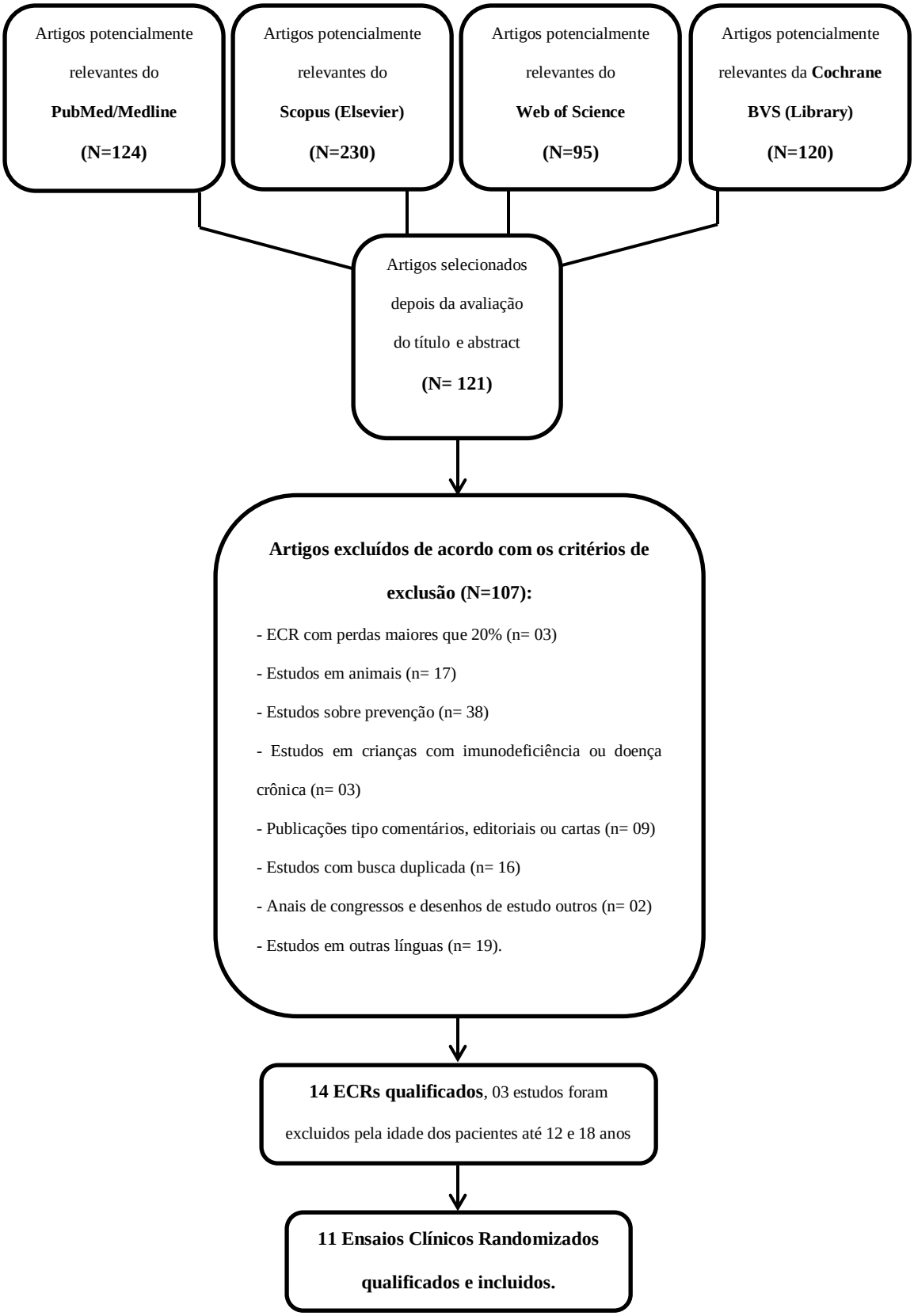


Figura 1 - Diagrama de fluxo do processo de seleção dos ensaios clínicos randomizados para inclusão na revisão sistemática.[23]

Tabela 1 - Características dos ensaios clínicos randomizados e eventos adversos

Autor/ano	País do estudo	Idade dos participantes do estudo	Condição clínica	Intervenção		Comparação		Eventos adversos
				Detalhes	Número randomizado (incluidos na análise)	Detalhes	Número randomizado (incluidos na análise)	
Cohen *et al.*[24] (2013)	França	7 a 13 meses de idade	Otite Média Aguda (OMA)	NAN ® 3 com proB (*Streptococcus thermophilos* NCC 2496: 1 x 10^7 ufc/g , *Streptococcus salivarius* DSM 13084: 2,5 x 10^7 ufc/g, *Lactobacillus rhamnosus* LPR CGMCC 1.3724: 1 x 10^7 ufc/g) e preB (Raftilose/ Raftiline) – por 300 a 630ml/dia.	112 (112)	NAN ® 3 formula de seguimento sem probióticos ou prebióticos.	112 (112)	- Perda de apetite para leite - Regurgitação - Pele seca - Diarréia crônica - Dor abdominal - Constipação
Hatakka *et al.*[25] (2001)	Finlândia	1 a 6 anos de idade	ITR (otites, sinusites, bronquites e pneumonia)	Leite com *Lactobacillus* (Gefilus, Valio, Riihimäki, Finland) contendo 1% gordura e 5-10x10^5 ufc/ml da cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) – por 200ml/dia.	296 (252)	Leite sem probióticos.	298 (261)	Não apresentou
Hatakka *et al.*[26] (2007)	Finlândia	10 meses a 6 anos de idade	OMA	Probiotico (*L. rhamnosus* GG, ATCC 53103; *L. rhamnosus* LC 705; *Bifidobacterium breve* 99; *Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii* JS, 8–9 x 10^9 ufc/capsula gelatinosa.	155 (135)	Capsula gelatinosa contendo celulose microcristalina.	154 (134)	NR
Kumpu *et al.*[27] (2012)	Finlândia	2 a 6 anos de idade	Infecções respiratórias	Leite contendo 1% gordura e a cepa *L. rhamnosus* GG (53103) 6,7 x 10^5 a 1,9 x 10^6 ufc./ml – por 400ml/dia.	261 (251)	Leite sem probióticos.	262 (250)	- Náusea - Dor abdominal leve - Rash cutâneo
Leyer *et al.*[28] (2009)	China	3 a 5 anos de idade	Resfriados e gripes	Duas intervenções: 1. *L acidophilus* NCFM (ATCC 700396) de 5,0 x 10^9 ufc/g – sachê adicionado a 120 ml de leite. 2. 50% de cada*: L. acidophilus* NCFM e *B. animalis subsp lactis* Bi-07 (ATCC PTA-4802), com dose de 1.0 x 10^{10} ufc/g – sachê adicionado a 120 ml de leite.	Grupo 1: 110 (110) Grupo 2: 112 (112)	Sucrose em pó – sachê.	104 (104)	Não apresentou
Rautava *et al.*[29]	Finlândia	2 a 65 dias de vida	ITR ou OMA	Cápsulas continham entre 1 x	38 (32)	Fórmula de seguimento	43 (40)	Não apresentou

(2009)				10^9 e 1 x 10^{10} ufc/g de *Lactobacillus rhamnosus* GG (53103) e *B. lactis* Bb-12.		Enfamil® em cápsula.		
Roos *et al.*[30] (2001)	Suécia	6 meses a 6 anos de idade	OMA	Três cepas de *Streptococci* em iguais proporções: *S. sanguis* (02 cepas), *S. mitis* (02 cepas) e *S. oralis* (01 cepa) 5 x 10^6 ufc/ml - liofilizados no leite desnatado, reconstituído em cloreto de sódio a 0,9% imediatamente antes da utilização - em spray nasal.	53 (53)	Leite em pó desnatado reconstituído em cloreto de sódio a 0,9% em spray nasal .	55 (55)	- Pneumonia
Skovbjerg *et al.*[31] (2009)	Suécia	1 a 8 anos de idade	OMA secretora	Duas intervenções: 1. *S sanguinis* cepa 89a (NCIMB 40104) liofilizados em leite desnatado e ressuspensas em solução salina com 5 x 10^9 ufc/ml. 2. *L rhamnosus* cepa LB21, (NCIMB 40564) liofilizados em leite desnatado e ressuspensas em solução salina com 5 x 10^9 ufc/ml – em spray nasal.	Grupo 1: 20 (19) Grupo 2: 20 (18)	Leite em pó desnatado reconstituído em cloreto de sódio a 0,9% em spray nasal .	20 (17)	Não apresentou
Taipale *et al.*[32] (2011)	Finlândia	1 a 2 meses de idade	ITR + OMA	*Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 (DSM 15 954): 5 x 10^9 ufc/g + xilitol de 100 a 300mg - por chupeta que contém uma bolsa na qual é inserido o tablete.	55 (34)	Xilitol de 100 a 300mg - por chupeta que contém uma bolsa na qual é inserido o tablete.	54 (35)	Não apresentou
Tano *et al.*[33] (2002)	Suécia	9 meses a 46 meses de idade	OMA recorrente	Uma suspensão de 10% de leite desnatado e 0,9% NaCl com cinco cepas selecionadas *de Streptococci alpha-haemolytic* (contendo mais do que 10^7 ufc /ml: : *S. sanguis* (02 cepas), *S. mitis* (02 cepas) e *S. oralis* (01 cepa) – em spray nasal.	21 (16)	Leite em pó desnatado reconstituído em cloreto de sódio a 0,9% em spray nasal .	22 (20)	- Rinite não alérgica - Tosse - Rash cutâneo - Vômito - Epistaxe leve
Tapiovaara *et al.*[34] (2014)	Finlândia	1 a 5 anos de idade	OMA recorrente ou prolongada	Cápsulas contendo *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) 8-9 x 10^9 ufc – dissolvidos em produto lácteo.	20 (14)	Capsula contendo celulose microcristalina.	20 (17)	Não apresentou

ITR = infecção do trato respiratório; NR = não relatado; OMA = otite média aguda. ufc = unidades formadoras de colônias.

Tabela 2 - Avaliação do risco de viés[a] e critério de qualidade nos estudos selecionados

Ensaios clínicos	A randomização foi realizada de forma adequada?	O sigilo de alocação de tratamento foi adequado?	Os cuidadores de saúde, os participantes do estudo e os avaliadores dos resultados eram cegos para alocação de tratamento?	Os grupos foram semelhantes no início do estudo, em termos de fatores prognósticos, gravidade da doença?	Houve algum desequilíbrio inesperado e/ou desistência entre os grupos? Se sim, eles foram explicados ou ajustados?	Existe alguma evidência que sugere que os autores mediram mais resultados do que eles relataram?	Será que o estudo inclui análise de intenção-de-tratar? Foi apropriado?	Qualidade de evidência dos estudos[b]
Cohen *et al.*[24]	A	B(?)	A	A	A	A	A	Alta
Hatakka *et al.*[25]	A	B(?)	B(?)	B(?)	A	A	A	Moderada
Hatakka *et al.*[26]	A	A	B(?)	B(?)	A	A	A	Alta
Kumpu *et al.*[27]	A	A	B(?)	B(?)	D	A	D	Baixa
Leyer *et al.*[28]	A	A	B(?)	A	A	A	A	Alta
Rautava *et al.*[29]	A	A	A	B(?)	A	A	D	Moderada
Roos *et al.*[30]	A	B(?)	B(?)	A	A	B(?)	D	Baixa
Skovbjerg *et al.*[31]	A	B(?)	A	A	A	A	D	Moderada
Taipale *et al.*[32]	A	A	A	A	A	B(?)	D	Moderada
Tano *et al.*[33]	A	A	A	A	A	A	D	Alta
Tapiovaara *et al.*[34]	A	A	A	A	A	A	D	Alta

[a] Cochrane risk-of-bias tool foi usada para avaliar o risco de viés para cada estudo - A: baixo risco; B (?): baixo risco com algumas áreas de incerteza; C: alto risco; D: Risco indefinido.
[b] GRADE – Alta qualidade: é muito improvável que mude a nossa confiança na estimativa; Moderada: mais pesquisas são susceptíveis de ter um impacto importante sobre a confiança do efeito; Baixa: mais pesquisas são propensas a ter um impacto importante sobre a nossa confiança na estimativa do efeito e é provável que mude a estimativa; Muito baixa: estamos muito incertos sobre a estimativa.

Tabela 3 - Resultados dos desfechos primários dos estudos

Estudo	Condição clínica	Duração do tratamento	Número total e (%) tratados pelo menos uma vez com antibiótico [Grupo Probiótico]	Número total e (%) tratados pelo menos uma vez com antibiótico [Grupo Placebo]	Número total e (%) de participantes com pelo menos um episódio de doença. [Grupo Probiótico]	Número total e (%) de participantes com pelo menos um episódio de doença. [Grupo Placebo]	Redução dos sintomas da doença	Redução da duração dos episódios de doença	Redução de novos episódios da doença
Cohen *et al.*[24]	OMA	12 meses	NR	NR	80 (71,4%)	80 (71,4%)	não	NR	não
Hatakka *et al.*[25]	ITR (OMA, sinusites, bronquites e Pneumonias)	30 semanas	180 (65%)	179 (64%)	104(41,2%)	134 (51,3%)	NR	sim	sim
Hatakka *et al.*[26]	OMA + IRS	6 meses	45 (33%)	65 (48%)	97 (72%)	87 (65%)	NR	não	não
Kumpu *et al.*[27]	Infecções respiratórias	7 meses	89 (35%)	86 (34%)	238 (95%)	246 (94%)	NR	sim	sim
Leyer *et al.*[28]	Resfriados e gripes	6 meses	NR	NR	NR	NR	sim	sim	sim
Rautava *et al.*[29]	ITR ou OMA	10 a 12 meses (até 12 meses de vida)	10 (31%)	16 (40%)	ITR: 22 (69%) OMA: 7 (22%)	ITR: 31 (78%) OMA: 20 (50%)	NR	NR	sim
Roos *et al.*[30]	OMA	3 meses	NR	NR	21 (40%)	28 (51%)	NR	NR	sim
Skovbjerg *et al.*[31]	OMA secretora	10dias	NR	NR	NR	NR	sim	NR	NR

Taipale *et al.*[32]	ITR (sinusite, bronquite, pneumonia) + OMA	6 a 7 meses (até 8 meses de vida)	10 (29%)	8 (23%)	ITR: 22 (65%) OMA: 9 (26%)	ITR: 33 (94%) OMA: 6 (17%)	não	NR	sim
Tano *et al.*[33]	OMA recorrente	4 meses	NR	NR	7 (44%)	8 (40%)	sim	NR	não
Tapiovaara *et al.*[34]	OMA recorrente ou prolongada	3 semanas	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

ITR = infecção do trato respiratório; NR = não relatado; OMA = otite média aguda.

Tabela 4 - Valores das medidas de associação dos desfechos primários positivos nos grupos probióticos dos estudos selecionados

Desfechos primários	*Odds Ratio* (OR)	Intervalo de Confiança (IC 95%)	*P* valor
REDUÇÃO DOS SINTOMAS			
Leyer *et al.*[28]	0,55	(0,28 – 0,99)	0,045
Skovbjerg *et al.*[31]	0,15	(0,08 – 0,65)	0,040
Tano *et al.*[33]	0,83	(0,55 – 0,98)	0,050
REDUÇÃO DA DURAÇÃO DOS EPISÓDIOS			
Hatakka *et al.*[25]	0,86	(0,70 – 1,06)	0,160
Kumpu *et al.*[27]	0,83	(0,78 – 0,88)	<0,001
Leyer *et al.*[28]	0,50	(0,26 – 0,98)	0,040
REDUÇÃO DE NOVOS EPISÓDIOS DA DOENÇA			
Hatakka *et al.*[25]	0,75	(0,52 – 1,09)	0,130
Kumpu *et al.*[27]	0,97	(0,94 – 1,00)	0,098
Leyer *et al.*[28]	0,23	(0,10 – 0,45)	<0,001
Rautava *et al.*[29]	0,51	(0,27 – 0,95)	0,022
Roos *et al.*[30]	0,90	(0,60 – 1,85)	0,040
Taipale *et al.*[32]	0,69	(0,53 – 0,89)	0,014

3.2 ARTIGO 2

O ensaio clínico randomizado será submetido ao periódico ***Clinical Et Experimental Allergy*.**

Visando atender a um dos objetivos da dissertação, realizamos um ensaio clínico randomizado para avaliar os parâmetros clínicos da ocorrência de sibilância na visita 1, após oito semanas (V3) e no seguimento até 16 semanas (V4) e a expressão das citocinas das vias Th1 e Treg *in vitro* em lactentes sibilantes recorrentes que usaram uma mistura de probióticos ou placebo adicionados ao tratamento convencional. Os níveis das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ foram avaliados na visita 1 (V1) e após oito semanas (V3) de uso de probióticos ou placebo. Os resultados foram apresentados em figuras e tabelas inseridas no artigo.

Artigo 2

Probióticos como adjuvante no tratamento da sibilância recorrente do lactente: um ensaio clínico randomizado controlado

Probióticos e sibilância recorrente no lactente

G. V. Araujo[1],

Correspondência:

Dra. Georgia Véras de Araujo

Centro de Pesquisas em Alergia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Morais Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.

CEP: 50670-901

Fones: (81) 2126-8000/ (81) 3268-9336

Fax: (81) 3467-2701

e-mail: georgiaveras@uol.com.br

Resumo

Conhecimento A coadministração de probióticos com esteroide inalatório tem sido sugerido como um potencial tratamento para a sibilância recorrente do lactente.

Objetivos Avaliar se a suplementação com probióticos pode melhorar parâmetros clínicos da ocorrência de sibilância e estimular a expressão das citocinas das vias T *helper* 1 (Th1) e T regulatória.

Métodos Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, paralelo, placebo-controlado realizado em 60 lactentes (idade de 6 – 24 meses) com sibilância recorrente (Trial number: NCT02113072). Os sujeitos elegíveis do estudo, em tratamento com doses baixas de dipropionato de beclometasona, receberam uma mistura de probióticos (kefir) ou placebo diariamente por 8 semanas. Registros dos cartões diários e avaliações médicas dos parâmetros clínicos foram realizados nas 16 semanas de estudo. Contagem de eosinófilos no sangue, dosagem de IgE total sérica e teste cutâneo de hipersensibilidade imediata foram inicialmente determinados. Níveis das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ no sobrenadante da cultura de sangue foram avaliados por citometria de fluxo antes e após 8 semanas de tratamento para comparação em ambos os grupos.

Resultados O uso da mistura de probióticos foi mais propenso em reduzir a ocorrência de sibilância durante a intervenção (46,7% *versus* 60,7%) e durante o seguimento (30,0% *versus* 42,9%) em comparação ao grupo placebo, entretanto não houve diferença significativa entre os dois grupos. Houve diferenças significativas dos níveis de IL-10 *in vitro*, com $P = 0,029$ e dos níveis de IL-12, em dois diferentes estímulos na cultura de sangue dos lactentes que receberam a mistura de probióticos em comparação ao placebo, com $P = 0,040$ e $P = 0,032$. Por outro lado, níveis de INF-γ não mostraram diferença significativa entre os grupos em tratamento.

Conclusão e Relevância Clínica A suplementação de probióticos no tratamento da sibilância do lactente não acrescentou efeitos clínicos significativos, entretanto foi detectado efeito imunoestimulatório em células sanguíneas destes lactentes, com aumento dos níveis de IL-10 e IL-12 *in vitro*.

Palavras chaves: Lactente. Sibilância. Probióticos. Imunomodulação. Interleucina-10. Interleucina-12. Interferon-gama.

Abstract

Background Co-administration of probiotics with inhaled steroid has been suggested as a potential treatment for recurrent wheezing in infants.

Objectives Assess whether the probiotic supplementation can improve clinical parameters of the occurrence of wheezing and stimulate the expression of cytokines of the way T *helper*-1 and regulatory T.

Methods A randomized clinical trial, double-blind, parallel, placebo-controlled conducted in 60 infants (aged 6-24 months) with recurrent wheezing (Trial number: NCT02113072). Eligible subjects of the study in treatment with lower doses of beclomethasone dipropionate, received a mix of probiotics (kefir) or placebo daily for 8 weeks. Records of diary cards and medical evaluations of clinical parameters were performed in the 16-week study. Eosinophil count in the blood, serum total IgE levels and skin test immediate hypersensitivity were initially determined. Levels of IL-10, IL-12 and IFN-γ in the supernatant of the blood culture were evaluated by flow cytometry before and after 8 weeks of treatment compared in both groups.

Results The use of the mixture of probiotics was more likely to reduce the occurrence of wheezing during the intervention (46.7% *versus* 60.7%) and during follow-up (30.0% *versus* 42.9%) compared to the placebo group, however there was no significant difference between the two groups. There were significant differences IL-10 levels *in vitro*, $P = 0.029$ and IL-12 levels in two different stimuli on blood culture of infants who received the mixture of probiotics compared with placebo, $P = 0.040$ and $P = 0.032$. Moreover, INF-γ levels showed no significant difference between the treatment groups.

Conclusion and Clinical Relevance Probiotic supplementation on infants treatment of wheezing not added significant clinical effects, however immunostimulatory effect was detected in blood cells of these infants with increased IL-10 and IL-12 *in vitro*.

Keywords: Infant. Wheezing. Probiotics. Immunomodulation. Interleukin-10. Interleukin-12. Interferon-gamma.

Introdução

Identificada por fenótipos clínicos diferentes, a sibilância recorrente do lactente tem aumentado em vários países do mundo [1], representando grave problema de saúde pública por elevados custos e por repercussões na qualidade de vida do lactente e seus familiares [2]. Esse aumento de prevalência não pode ser explicado unicamente por fatores hereditários, pois fatores ambientais exercem importante influência nas respostas imunes inata e adaptativa no início da vida do indivíduo [3].

O pressuposto fundamental do modelo da origem do desenvolvimento da saúde e doença (DoHAD) é que fatores ambientais interagem no sistema imune no início da vida e geram consequências que se tornam expressivas nas várias fases posteriores da vida do ser humano [4]. Nesta complexa formação imunológica, o fenótipo T *helper* 2 (Th2) é predominante na fase inicial, mas com a colonização e interação com a microbiota das mucosas, agindo principalmente no tecido linfoide associado ao intestino (GALT), há gradual inibição da via Th2 e estímulo da via Th1 e T regulatória, gerando um equilíbrio e tolerância no sistema imune [5, 6]. Assim, fatores como a menor diversidade de microrganismos intestinais [7], uso indiscriminado de antibióticos em fase tenra da vida [8], aquisição de bactérias patogênicas do ambiente hospitalar ao nascimento [9], desmame precoce [10], entre outros, promovem alterações na microbiota intestinal alterando o processo de maturação, homeostase e tolerância imunes [11]. É neste processo de disbiose intestinal, com alterações dos estímulos imunológicos, que os probióticos estão sendo inseridos como recurso preventivo e terapêutico em diversas enfermidades [12, 13].

Probióticos produzem bacteriocinas e espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, que agem na exclusão competitiva e redução ativa de bactérias patogênicas no intestino; estimulam a produção de citocinas, através da ligação aos receptores de

reconhecimento de padrões (PRRs) *Toll-like* e *Nod-like* presentes nas células do GALT, atuando na imunomodulação [14].

De acordo com as recentes revisões sistemáticas e metanálises, o uso de probióticos em pacientes com infecções respiratórias [15, 16], rinite alérgica [17, 18] e eczemas [19, 20], tem mostrado benefícios na prevenção e tratamento com redução da gravidade dos sintomas, da ocorrência de novos episódios e do uso de medicações de controle. Em contraste, apenas poucos estudos do uso de probióticos na sibilância do lactente foram direcionados a prevenção da asma e sensibilização alérgica e seus resultados tem sido controversos [21, 22].

Na avaliação do comportamento imunoestimulatório dos probióticos, em revisão sistemática realizada por Özdemir, a introdução de diferentes cepas probióticas pode gerar diferentes respostas de citocinas. Em 06 estudos, com diferentes cepas (*Bifidobacterium bifidum/infantis* e *Lactobacillus lactis/casei/acidophilus/reuteri e rhamnosus GG*) houve maior produção da IL-10 favorecendo o equilíbrio das vias Th1/Th2 e 01 estudo mostrando balanço Th1/Th2 desfavorável com o uso de *Lactobacillus plantarum*. Em outros 02 estudos, *Bifidobacterium lactis/bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* estimularam maior produção da citocina INF-γ, de perfil Th1, evidenciando resultados dos estímulos *in vitro* [23].

O presente ensaio clínico visa avaliar o impacto clínico do uso de uma mistura de probióticos (Kefir; BioLogicus Co. Ltda., Recife, Brasil) como adjuvante no tratamento do lactente sibilante, no que se refere a ocorrência de episódios de sibilância, idas à emergência, uso de medicações de resgate nos episódios de sibilância e detectar a expressão das citocinas IL-10 (de padrão T regulatório), IL-12 e INF-γ (de padrão Th1) em cultura de células sanguíneas fazendo um comparativo com o grupo placebo. Este estudo também pretende identificar se o suplemento de probióticos pode adicionar vantagens ao tratamento convencional com esteroide inalatório na sibilância recorrente do lactente.

Materiais e Métodos

Desenho do estudo

Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, paralelo, placebo-controlado realizado entre Abril de 2014 e Abril de 2015 com lactentes apresentando sibilância recorrente. As intervenções foram realizadas com esteroide inalatório como tratamento convencional para todos os lactentes e a mistura de probióticos ou placebo como suplementos. O ensaio clínico seguiu as orientações do *Consolidated Standards of Reporting Trials* (*CONSORT* 2010 *Statement*). O desfecho primário do estudo foi avaliar a ocorrência de episódios novos, o número de episódios e número de dias de sibilância, ida à emergência, dias de uso do B_2 adrenérgico e do uso de corticoide oral como medicações de resgate da crise de sibilância, durante o período de intervenção de 8 semanas e de seguimento de 8 semanas. O desfecho secundário foi analisar a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ em sobrenadante da cultura de sangue total destes lactentes, antes e após 8 semanas de uso de probióticos ou placebo. Este ensaio clínico foi realizado no Centro de Pesquisas em Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas, na Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Brasil, de acordo com as diretrizes estabelecidas na Declaração de Helsinki. Todos os procedimentos envolvendo seres humanos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco, com número CAAE: 15798013.0.0000.5208 e registrado no ClinicalTrials.gov com o identificador: NCT02113072. O Termo de consentimento informado e escrito foi obtido dos pais ou responsável legal de todos os lactentes matriculados no estudo.

Participantes

Este estudo envolveu lactentes com idade de 6 a 24 meses, que apresentavam sibilância recorrente: pelo menos três episódios em seis meses, com pelo menos uma exacerbação nos últimos três meses e que não tinha iniciado tratamento de manutenção com esteroide inalatório até a consulta inicial. Para os critérios de exclusão foram considerados: lactente que apresentasse comprometimento nutricional com *escore* Z -2; malformações congênitas das vias aéreas; fibrose cística; doenças crônicas em outros sistemas; distúrbios respiratórios perinatais crônicos como displasia broncopulmonar; bronquiolite obliterante; alergia à proteina do leite de vaca; tumores intratorácicos; tuberculose pulmonar; imunodeficiências congênitas e prematuridade; exposição prévia, ou em mesmo período do estudo, de outros produtos contendo probióticos; uso de antileucotrienos no período do estudo; uso de antibióticos nas últimas 4 semanas antes de iniciar a intervenção e lactentes matriculados em outros estudos ou ensaios clínicos.

Avaliação clínica

Na consulta clínica inicial foi realizado o detalhamento da história da sibilância através de um formulário, com perguntas abertas e fechadas, construído com algumas questões do Estudo Internacional sobre Sibilância em Lactentes (QE-EISL) relacionadas aos fatores de risco hereditários e ambientais [24]. Exame clínico foi realizado por uma especialista (pneumologista pediátrica) e prosseguiu com teste cutâneo de hipersensibilidade imediata (*Prick Test*) com extratos de aeroalérgenos padronizados para ácaros, epitélio de cão, epitélio de gato, barata e fungos e para alérgenos alimentares como as proteínas do leite de vaca e clara/gema do ovo (FDA Allergenic®, H$_{Ø}$rsholm, Denmark). O teste foi considerado positivo quando o diâmetro da pápula formada foi ≥ 3 mm do controle negativo (com NaCl a 0,9%). Outros exames como contagem de eosinófilos no sangue, dosagem de IgE total sanguínea e

radiografia de tórax foram também solicitados inicialmente. Valores de referência para eosinófilos: absoluto (0 – 500/mm^3), sendo considerado aumentado quando > 500/mm^3 (Coulter® LH 750 hematology analyzer, Beckman Coulter, Helsinki, FIN). Para a dosagem de IgE total sérica foi utilizado o método de eletroquimioluminescência com valor de referência considerado elevado > 60 UI/mL.

Para os lactentes sibilantes recorrentes foi iniciado esteroide inalatório dipropionato de beclometasona (BDP) HFA 50 μg spray, em doses baixas de 100 μg/dia como tratamento convencional [25] e fornecido espaçador com máscara (AgaChamber®, Agaplastic, RJ, Brasil) com instruções adequadas de uso, orientações do controle ambiental, além do plano de ação escrito com medicações de resgate com B_2-agonista de curta ação (salbutamol 100 μg) para eventuais intercorrências de sibilância, até a obtenção adequada do controle.

Cálculo Amostral

Foi utilizado como base para o cálculo do tamanho da amostra um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, no qual a ocorrência de sibilância foi menor no grupo que usou um simbiótico 2,8% em comparação ao placebo com 30,8% [26]. Assumindo um nível de significância < 5%, com um poder do estudo de 80%, o tamanho da amostra estimado foi de 27 pacientes para cada grupo. Esperando que no seguimento destes pacientes houvesse perdas consideradas de até 10% do número de pacientes do início do estudo, foi acrescentado um percentual de 10% de lactentes sibilantes, perfazendo um tamanho total da amostra de 30 pacientes para cada grupo.

Randomização e mascaramento

Um total de 74 lactentes sibilantes foram matriculados no estudo no período de um ano. Este relativo longo tempo pretendeu excluir o viés de seleção sazonal (períodos chuvosos, em que aumentam as infecções respiratórias, dos períodos ensolarados).

A randomização foi gerada pelo programa computacional: *Randomization Plan* com acesso ao site - http://www.randomization.com realizado por uma profissional fisioterapeuta (CSFRL) não envolvida no estudo, usando técnica de randomização simples com números iguais de 30 participantes para cada grupo. O mecanismo utilizado para implementar a sequência de alocação randomizada foi através de recipientes numerados sequencialmente. Estes recipientes armazenavam os produtos probióticos ou placebo com as mesmas características organolépticas e em mesma quantidade. A numeração dos recipientes e a ocultação da sequência também foram realizadas pela mesma profissional que gerou a randomização e a manteve em sigilo até o final do estudo. Tanto os responsáveis legais dos lactentes sibilantes inscritos no estudo, quanto a pesquisadora do ensaio clínico, os técnicos laboratoriais e os estatísticos foram cegados. Ao final do estudo, para avaliar se os responsáveis legais ou os investigadores do estudo se mantiveram cegos, foram convidados a tentar adivinhar as designações do tratamento que foram distribuídos aos lactentes sibilantes. Caso uma proporção maior que o esperado acertasse, deveria incluir uma avaliação sobre os potenciais vieses desse "descegamento" parcial.

Preparação dos probióticos e placebo

A mistura de probióticos (BioLogicus, Recife, Brasil) foi composta pela matriz densa do kefir [27, 28], constituida por vários tipos de bactérias ácido-lácticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras, com as seguintes espécies: *Lb. helveticus, Lb. kefiranofaciens, Lb. paracasei, Lb. kefiri, Lb. delbruecki, Lb. acidophilus. Lb. crispatus, Lb. gallinarum, Lb. fornicalis,*

Bifidobacterium breve, Lactococcus lactis, Enterococcus faecium, Kluyveromyces marxianus, Kazachstania unispora, Pichia fermentans e Sach.cerevisiae. Esta mistura de probióticos foi submetida a um processo de fermentação em leite bovino e liofilização e o produto final embalado em sachês de 1g, lacrados, rotulados e identificados com os requisitos de armazenamento e posologia. As concentrações finais apresentaram contagens na ordem de 1,0 x 10^8 UFC/g para bactérias ácidos lácticas e 1,0 x 10^6 UFC/g para leveduras. O placebo foi amido de mandioca, não apresentando nenhuma carga microbiana, com odor, cor, sabor e textura similares aos probióticos. Igualmente foram embalados contendo 1g em sachês plásticos lacrados, os quais poderiam ser mantidos em ambiente ventilado, longe de umidade ou calor excessivo, ou armazenados no refrigerador.

Para certificar que os probióticos permaneciam viáveis durante a estocagem e uso, análises microbiológicas das cepas fornecidas foram testadas e verificadas quanto à viabilidade. De Abril de 2014 até Janeiro de 2015, contabilizando aproximadamente 300 dias, as bactérias lácticas apresentavam 1,5 x 10^8 UFC/g e as leveduras 1,3 x 10^5 UFC/g ao final do estudo.

Descrição do ensaio clínico

Um período de observação de 2 semanas foi necessário para realização dos exames iniciais. Na visita 1 (V1), foi realizada a primeira coleta de sangue para avaliação das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ *in vitro*. A alocação randomizada dos lactentes foi realizada com a distribuição dos recipientes numerados sequencialmente contendo, em cada recipiente, 60 sachês de probióticos ou de placebo que seriam utilizados durante 8 semanas. O uso de cada sachê contendo 1g do produto (mistura de probióticos ou placebo) consistia em dissolver o conteúdo em pó em uma colher de suco ou leite e oferecer a criança, preferencialmente na primeira

refeição do dia, uma vez ao dia durante 60 dias. Para um possível controle do uso dos produtos, os pais e/ou responsável traziam os sachês vazios nas visitas (V2 e V3), após 30 dias e 60 dias respectivamente, como forma de demonstrar o cuidado em seguir as recomendações e orientações de uso. Na sequência, foi entregue a ficha/cartão intervenção-diário do lactente aos pais e fornecido explicações de como preencher. Durante 60 dias do uso do produto, os pais e cuidadores da criança iriam anotar os episódios e dias de duração da sibilância, se conduziram a criança ao atendimento à emergência e quais as medicações que foram utilizadas na emergência e em domicílio. A visita 2 (V2) ocorreu após 4 semanas de iniciada a intervenção, neste momento era realizado avaliação médica e a ficha/cartão intervenção-diário era revisada quanto ao correto preenchimento.

Na visita 3 (V3), após 8 semanas de uso dos probióticos ou placebo, foi realizada a segunda coleta de sangue, para detecção dos níveis de citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ no sobrenadante de cultura de sangue total. Os lactentes foram submetidos à nova avaliação médica e a ficha/cartão intervenção-diário foi recebida e fornecida a ficha/cartão seguimento-diário para as próximas 8 semanas de seguimento. Todos os lactentes sibilantes mantiveram seus esteroides inalatórios em mesma dose até o final do estudo.

Na última visita do ensaio clínico (V4), após 16 semanas, foi realizada nova avaliação médica e avaliado a ficha/cartão seguimento-diário do paciente. Foram ajustadas as doses dos esteroides inalatórios para mais ou menos, a depender da gravidade e frequência das crises de sibilância e todos os lactentes foram agendados para prosseguimento da avaliação clínica.

Análises das citocinas

Após consentimento e assinatura do TCLE pelos pais e/ou responsável legal, o sangue de seis indivíduos não incluídos no estudo (três crianças com sibilância recorrente e três crianças

saudáveis) foi coletado para estabelecer o tempo e a concentração ótima de cultivo para detecção das citocinas. Foi realizada a otimização das cinéticas "tempo *versus* resposta" e "concentração *versus* resposta" dos probióticos na cultura de sangue. Desta forma, a concentração ótima da mistura de probióticos (Pb) foi de 1,0 x 10^5 UFC/mL e o melhor tempo de cultivo foi 16h.

Amostras de sangue periférico dos lactentes incluídos no ensaio foram coletadas em tubos com heparina sódica (BD Vacutainer®, Becton Dickinson, New Jersey, EUA) para a análise das citocinas: 1,0 mL de sangue total foi depositado em placas de 24 poços de cultura (Corning Costar®, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) na presença de 1,0 mL de meio RPMI 1640 contendo L-glutamina - 2,05 mm e bicarbonato de sódio - 2 g/L (LGC Biotecnologia®, Teddington, Middlesex, UK) e enriquecido com soro bovino fetal (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) a 10% e solução de penicilina - 100 U/mL e estreptomicina – 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) em diferentes condições de cultivo: Phytohemagglutinin A (PHA) (Gibco™/Invitrogen Corporation, New York, EUA) 5 µg/mL, antígenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) (FDA Allergenic®) 10 µg/mL, mistura de probióticos (Pb) (kefir, BioLogicus) a 1,0 x 10^5 UFC/mL e sem estímulo (Meio) durante o período de 16h de cultivo. As placas foram incubadas a 37°C na presença de 5% de CO_2 por 16h. Ao final desse cultivo, os sobrenadantes de cultura foram coletados e centrifugados (200xg por 2 minutos) para serem armazenados a -20°C até a realização do ensaio para a detecção das citocinas.

Níveis de citocinas no sobrenadante de cultura foram quantificados através do sistema Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets, seguindo a instrução do fabricante BD™ (Becton Dickson Biosciences, San Diego, EUA). Primeiro, 25 µL da mistura de beads de captura, marcadas com anticorpos monoclonais anti-IL-12/IL23p40, anti-IL-10 e anti-IFN-γ (Becton Dickson Biosciences) com diferentes intensidades de fluorescências (canais FL3 ou FL4)

foram transferidos para tubos de citometria (Corning Costar®) destinados às amostras a serem testadas e ao controle negativo. Em seguida, 25 µL das amostras de sobrenadante foram adicionados aos seus respectivos tubos, que foram incubadas por 1h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente foram adicionados 25 µL do reagente de detecção contendo anticorpos anti-citocinas alvos conjugadas à Phycoerythrin (canal FL2). As misturas foram incubadas por 2h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 0,5 mL de solução de lavagem e centrifugadas a 200xg por 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e 300 µL de solução tampão foram adicionados para ressuspender as esferas. As beads foram adquiridas dentro de 24h utilizando o citometro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems™) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises foram realizadas através do Software FCAP Array versão 3.01 (Becton Dickson), onde uma curva-padrão é elaborada utilizando uma diluição seriada dos padrões de citocinas. O limiar de detecção da IL12/IL23p40 dado pelo kit é de 40 - 10.000 pg/mL e das demais citocinas é de 10 - 2.500 pg/mL. Os resultados das dosagens das citocinas foram expressos em pg/mL.

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados em forma de tabelas e gráficos com suas respectivas frequências absoluta e relativa. As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão. Foi verificada a normalidade de distribuição através do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Foram utilizados o teste qui-quadrado e o teste exato de Fisher para as variáveis categóricas e o teste t Student para as variáveis numéricas de cada grupo probiótico ou

placebo para as características biológicas e demográficas. Os resultados clínicos intergrupo foram comparados nas visitas V1, V3 e V4 pelo teste qui-quadrado e teste exato de Fisher para as variáveis nominais e teste de Mann-Whitney para as variáveis discretas. Foram utilizados os testes t Student pareado e Wilcoxon para avaliação dos níveis de citocinas IL-10, Il-12 e INF- γ intragrupo nas visitas V1 e V3 e o teste t Student e o teste de Mann-Whitney para comparação das citocinas intergrupos. Todos os testes foram aplicados com intervalo de confiança de 95%, considerando significativos os valores de $p \leq 0,05$. Foi utilizado o Software SPSS 22.0 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Resultados

Dos 74 lactentes sibilantes inscritos, 60 foram incluídos no ensaio clínico para aleatoriamente receberem a mistura de probióticos (30 pacientes) ou placebo (30 pacientes). Houve perda de 02 pacientes que faziam uso de BDP + placebo na quinta semana de tratamento de acordo com os períodos do estudo e detalhado no diagrama *CONSORT* (Fig. 1).

A Tabela 1 apresenta as características descritivas dos 60 lactentes que preencheram os critérios de inclusão. O processo de randomização garantiu uma boa comparabilidade entre os dois grupos. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada para quaisquer das variáveis demográficas, clínicas e de sensibilização alérgica.

Impacto nos parâmetros clínicos

Nas visitas (V3 e V4) foram anotados os registros clínicos das fichas/cartões intervenção e seguimento diários, preenchidas pelos responsáveis legais dos pacientes. Foram analisados seis parâmetros de evolução clínica entre os grupos probióticos e placebo. Na Tabela 2

observamos que após 8 semanas de tratamento com BDP + probióticos ou BDP + placebo, não houve diferença estatística significativa entre os grupos quanto a ocorrência de episódios de sibilância, ida à emergência e uso de corticoide oral para as crises. De modo semelhante, não houve diferença destes parâmetros no período de seguimento, fase em que mantinham o uso exclusivo do BDP.

Ao analisar os números de episódios de sibilância e os dias de sibilância, assim como os dias de uso de B_2-adrenérgico de curta ação, não houve diferença estatística entre os grupos após 8 semanas (V3) e no final do estudo (V4) Fig. 2.

Impacto na produção de citocinas

A cultura de sangue total recebeu estímulos com *Phytohemaglutinina* A (PHA), antígeno *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) e mistura de probióticos (Pb). A Fig. 3 mostra os níveis da citocina de padrão T regulatório, a IL-10, antes da intervenção (V1) e após 8 semanas de tratamento (V3). Houve diferença estatística significativa dos níveis de IL-10, com estímulo PHA, no grupo que recebeu probióticos em comparação ao placebo [78,7 pg/mL (47,6; 103,5) *vs*. 52,3 pg/mL (41,0; 79,6) com $P = 0,029$]. Para nossa descoberta inesperada, na Fig. 4, também observamos que após o tratamento com a mistura de probióticos, os níveis da citocina IL-12, de padrão Th1, em dois diferentes meios de cultura, apresentou diferença estatística significativa quando comparado com o grupo controle (BDP + placebo), ao estímulo com Der p [292,8 pg/mL (231,1; 377,5) *vs*. 226,5 pg/mL (127,6; 306,5) com $P = 0,040$] e ao estímulo com Pb [30,1 pg/mL (20,6; 43,9) *vs*. 21,3 pg/mL (10,8; 32,2) com $P = 0,032$].

Na análise dos resultados da Fig. 5, após 8 semanas de intervenção, não houve diferença significativa nos níveis de INF-γ entre os grupos de estudo.

Níveis das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ foram avaliados intragrupo antes e após uso dos probióticos ou placebo, em diferentes estímulos, como mostrado na Tabela 3.

Discussão

Neste estudo, verificou-se que a ingestão diária da mistura de probióticos durante 8 semanas, como aditivo ao tratamento para controle da sibilância no lactente, não produziu resultados significativos aos parâmetros clínicos de redução de sibilância, entretanto, pode-se observar aumento significativo das citocinas IL-10 de padrão T regulatório e IL-12 de padrão Th1 em cultura de células destes lactentes.

Existem pelo menos três hipóteses relativas aos conhecidos efeitos imunoestimulatórios dos probióticos: podem alterar o perfil de citocinas Th2, em condições atópicas, devido ao seu efeito adjuvante Th1 [29, 30]; podem induzir um subconjunto de linfócitos T reguladores, tais como Th3, Th1 e Treg natural, e, portanto suprimir uma futura resposta inflamatória alérgica [31-33]; e probióticos podem interagir com as células da resposta imune inata na mucosa gastrointestinal e, assim, alcançar tolerância imunológica sistêmica [34-36]. Entretanto, o mecanismo subjacente para que estas modificações no sistema imune das mucosas possam refletir em respostas clínicas ainda permanecem desconhecidas.

A maioria das análises *in vitro* das propriedades de imunomodulação de cepas bacterianas são realizadas através de medições dos níveis de citocinas no sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ou nas culturas de células totais [37]. A aplicação de cepas probióticas em animais vem demonstrando que há uma correlação significativa de citocinas que são produzidas na mucosa intestinal e são identificadas posteriormente no soro e em outras mucosas em sítios distantes do local de produção [38, 39].

Em estudo conduzido em ratos, a administração por via oral do *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 (Lr1505) foi capaz de aumentar os níveis de IFN-γ, IL-10 e IL-12 no trato respiratório e o número de células T $CD3^{+}CD4^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ nos pulmões. No modelo experimental de inflamação pulmonar, com base na administração de partículas virais artificiais, o uso oral de Lr1505 reduziu as lesões pulmonares e a produção de TNF-α, IL-6, IL-8 e MCP-1 no trato respiratório após o desafio com o patógeno, além de ter induzido a um aumento significativo de IL-10, IL-12 e INF- γ no soro e pulmões de ratos tratados. Portanto, o Lr1505 induziu mobilização de células do intestino e promoveu alterações no perfil de citocinas que foram capazes de modular beneficamente a imunidade da mucosa respiratória [38]. Em outro estudo, a administração de *Lactobacillus plantarum* G-137 estimulou macrófagos e células dendríticas a produzirem citocinas de células Th1 em ratos que receberam o vírus da gripe A (H1N1) intranasal. Os títulos virais no pulmão foram significativamente inferiores em ratos tratados com o probiótico do que os controles e um nível significativo de IFN-β foi detectado no soro destes ratos [39]. Esses estudos mostraram que haveria uma mobilização de células intestinais e produção de citocinas que seriam capazes de modular de forma benéfica a imunidade da mucosa respiratória. Entretanto, estudos avaliando a aplicação de probióticos em humanos ainda não conseguem demonstrar esta "via de conexão" entre o estímulo originado no tecido intestinal e a resposta clínica em sítios distantes do organismo.

A imunomodulação da mucosa respiratória, por probióticos administrados por via oral, tem de fato um mecanismo complexo, provavelmente relacionado com cepas específicas, sítios específicos de atuação, doses, tempo de administração e características próprias da resposta imunológica do indivíduo que aguardam ainda serem identificados [40-43].

Ensaios clínicos com o uso de probióticos nas afecções do trato respiratório apresentam resultados clínicos diferentes. Na avaliação das infecções respiratórias, possível

causa de sibilância recorrente, recente metanálise identificou, em 10 ensaios clínicos realizados em crianças de 1 a 12 anos de idade, que o uso de probióticos conseguia obter redução de um dia na duração dos sintomas, o que poderia repercutir em menor possibilidade de agravamento da doença nesta faixa etária [16]. Quanto ao uso de probióticos na prevenção da asma, outra importante causa de sibilância recorrente, três recentes estudos: o *Clinical Use of Probiotics in Pediatric Allergy* (CUPPA) – um *Position Paper* da Organização Mundial de Alergia (WAO) [17]; em metanálise de 20 ECRs, incluindo 4866 crianças, avaliando a suplementação de probióticos durante a gravidez e/ou infância [21]; e em revisão de 25 estudos, incluindo crianças do nascimento até 18 anos de vida, avaliando a administração de probióticos na atopia e asma [44], concluíram que não há suficiente evidência para recomendar o uso de probióticos na prevenção primária da sibilância e asma.

Em nosso estudo, o uso da mistura de probióticos não promoveu mudanças significativas nos parâmetros clínicos avaliados em comparação ao uso do placebo, portanto, algumas limitações precisam ser analisadas. Limitações quanto à magnitude do efeito, que pode não ter sido suficiente para ser detectado nos sujeitos do estudo, especialmente pelo produto ter sido adicionado como adjuvante ao tratamento recomendado com esteróide inalatório. Limitações quanto ao uso de uma mistura de probióticos, que apesar de já ter sido usada em experimentos em animais e em ensaios clínicos em humanos [45, 46], ainda não tinha sido testada em crianças menores. Limitações quanto a dose e tempo de uso para se obterem o efeito desejado, pois não existe uma uniformidade de uso entre os estudos publicados e recomendações de consensos e *guidelines* ainda se fazem necessários. Deve ser considerado também que o estudo não teve objetivo de avaliar como os probióticos poderiam agir de forma diferente nos muitos fenótipos de sibilância do lactente. Outra limitação que o estudo poderia trazer seria o viés de recordação dos sintomas pelos pais ou cuidadores, que foi

minimizado com agendamento das visitas com brevidade, além da avaliação da ficha/cartão diário na intervenção e seguimento do paciente.

Em conclusão, apesar de ainda não serem identificados benefícios clínicos significativos, este ensaio clínico evidenciou que o uso da mistura de probióticos acende uma perspectiva de imunomodulação promovida pela produção de citocinas de padrão Th1 e T regulatório que puderam ser verificadas por aumento das citocinas IL-10 e IL-12 em cultura de células destes lactentes sibilantes recorrentes. Esforços devem ser considerados em analisar, em estudos futuros, as complexas e dinâmicas interações entre a ação dos probióticos *in vitro* e a ação dos mesmos no tecido linfoide intestinal, bem como o diálogo deste com o sistema imune da mucosa em outros sítios distantes. Abordagens e estudos coordenados por pesquisadores de vários centros, que uniformizem os métodos em redes colaborativas, considerando a complexidade do tema, são necessários.

Agradecimentos

Os autores agradecem a fisioterapeuta Catarina Souza Ferreira Rattes Lima que realizou a sequência randomizada de alocação e manteve em sigilo a randomização gerada até o final do estudo, a estudante de medicina Bianca Priscila Sales dos Santos da Universidade de Pernambuco, Recife-Brasil, pela sua presença constante nas consultas com os pacientes.

Financiamento

O financiamento deste projeto foi obtido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através da contemplação do edital do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências

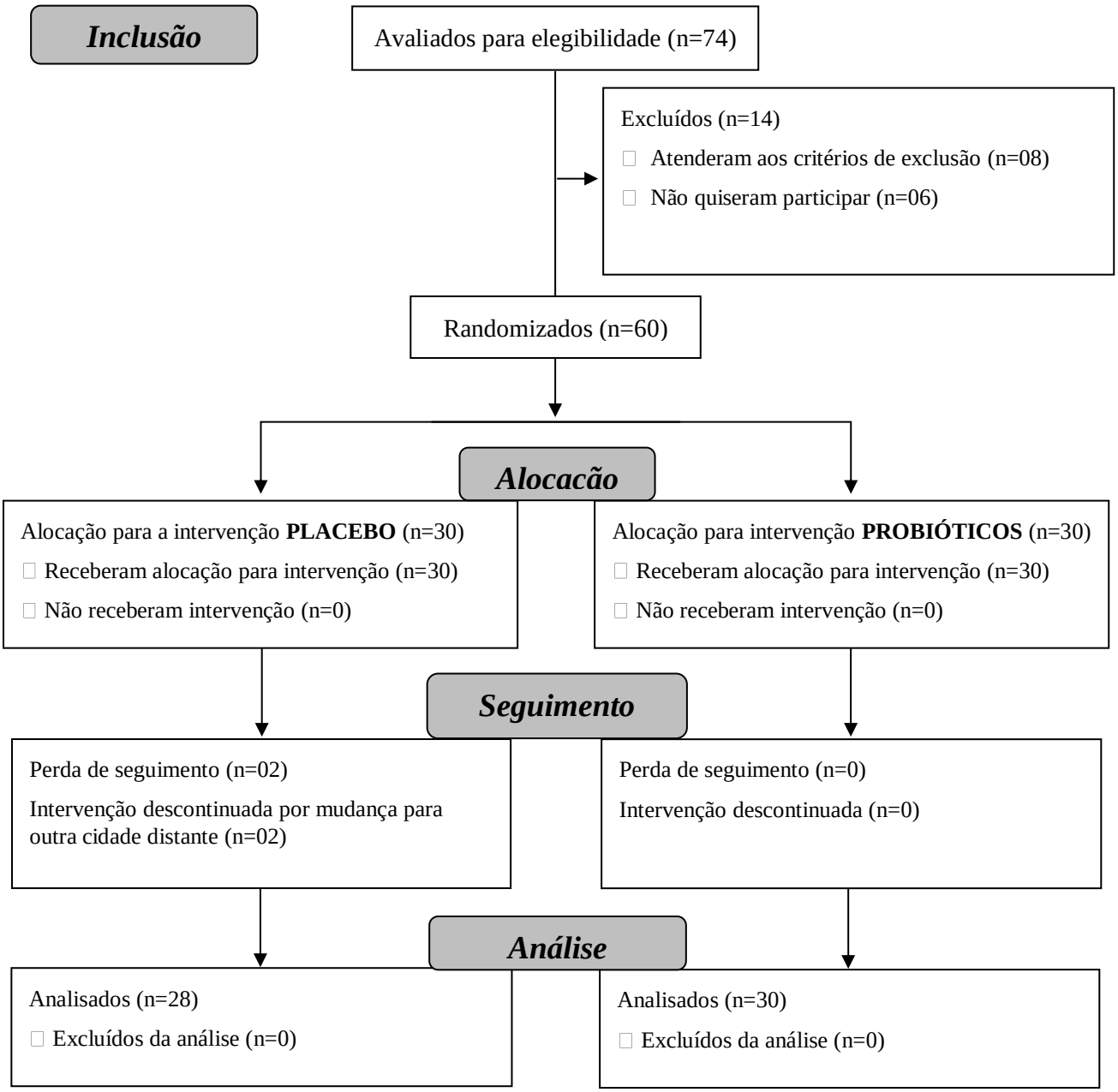
1. Mallol J, García-Marcos L, Solé D, Brand P. International prevalence of recurrent wheezing during the first year of life: variability, treatment patterns and use of health resources. *Thorax* 2010; 65(11):1004–9.
2. Garcia-Marcos L, Mallol J, Solé D, Brand PLP. International study of wheezing in infants: risk factors in affluent and non-affluent countries during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21(5):878–88.
3. El-Gamal Y M, E-Sayed SS. Wheezing in infancy. *WAO Journal* 2011; 9:85-90.
4. Halfon N, Larson K, Lu M, Tullis E, Russ S. Lifecourse health development: Past, present and future. *Matern Child Health J* 2014; 18(2):344–65.
5. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998; 160: 4730-7.
6. Walker WA. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann Nutr Metab* 2013; 63(2):8–15.
7. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-M€uller G, 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; 128:646-52.
8. Buccigrossi V, Nicastro E, Guarino A. Functions of intestinal microflora in children. *Curr Opin Gastroenterol* 2013; 29:31-8.
9. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 9:565–76.
10. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5(7):e177.
11. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012; 489:231-41.
12. Rauch M, Lynch S V. The potential for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. *Curr Opin Biotechnol* 2012; 23(2):192–201.
13. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol* 2013; 6(1):39–51.

14. Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *J Pediatr (Rio J)* 2015; 91(1):6–21.
15. Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 9(2):CD006895.
16. King S, Glanville J, Sanders ME, Fitzgerald A, Varley D. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr* 2014; 112(1):41–54.
17. Fiocchi A, Burks W, Bahna SL, Bielory L, Boyle RJ, Cocco R, et al. Clinical Use of Probiotics in Pediatric Allergy (CUPPA): A World Allergy Organization Position Paper. *World Allergy Organ J* 2012; 5(11):148–67.
18. Das RR, Singh M, Shafiq N. Probiotics in Treatment of Allergic Rhinitis. *World Allergy Organ J* 2010; 3(9):239–44.
19. Panduru M, Panduru NM, Sălăvăstru CM, Tiplica G-S. Probiotics and primary prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled studies. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 232–42.
20. Torley D, Futamura M, Williams HC, Thomas KS. What's new in atopic eczema? An analysis of systematic reviews published in 2010-11. *Clin Exp Dermatol* 2015; 38(5):449–56.
21. Azad MB, Coneys JG, Kozyrskyj AL, Field CJ, Ramsey CD, Becker AB, et al. Probiotic supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2013; 347:f6471.
22. Das RR, Naik SS, Singh M. Probiotics as additives on therapy in allergic airway diseases: a systematic review of benefits and risks. *Biomed Res Int* 2013; 2013:231979.
23. Özdemir Ö. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: An update from laboratory and clinical data. *Clin Exp Immunol* 2010; 160(3):295–304.
24. Bianca a C Dela, Wandalsen GF, Miyagi K, Camargo L, Cezarin D, Mallol J, et al. International Study of Wheezing in Infants (EISL): validation of written questionnaire for children aged below 3 years. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19(1):35–42.
25. Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, Custovic A, Gern J, Lemanske R, et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 67(8):976–97.

26. Van der Aa LB, Van Aalderen WMC, Heymans HAS, et al. Synbiotics prevent asthma-like symptoms in infants with atopic dermatitis. *Allergy* 2011; 66(2):170–7.
27. Figler M, Mózsik G, Schaffer B, Gasztonyi B, Ács P, Szili B, et al. Effect of special Hungarian probiotic kefir on faecal microflora. *World J Gastroenterol* 2006; 12(7):1129-32.
28. Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Thangavel D, Farnworth E, Matar C. Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology* 2006; 211:149–56.
29. Pochard P, Gosset P, Grangette C, et al. Lactic acid bacteria inhibit Th2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:617–23.
30. Prescott SL, Dunstan JA, Hale J, et al. Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma responses in very young children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1557–64.
31. Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 2005; 174:3237–46.
32. Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, et al. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 38:165–72.
33. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:1260–7.
34. Hart AL, Lammers K, Brigidi P, et al. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004; 53:1602–09.
35. Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, Siren J, Matikainen S, Julkunen I. Streptococcus pyogenes and Lactobacillus rhamnosus differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2004;75:764–71.
36. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:2880–85.

37. Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol* 2008; 10(1):37–54.
38. Villena J, Chiba E, Tomosada Y, Salva S, Marranzino G, Kitazawa H, et al. Orally administered Lactobacillus rhamnosus modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly (I:C). *BMC Immunology* 2012; 13:53-67.
39. Maeda N, Nakamura R, Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Kase T, et al. Oral administration of heat-killed Lactobacillus plantarum L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *International Immunopharmacology* 2009; 9:1122–25.
40. Dogi C a, Weill F, Perdigón G. Immune response of non-pathogenic gram(+) and gram(-) bacteria in inductive sites of the intestinal mucosa study of the pathway of signaling involved. *Immunobiology* 2010; 215(1):60–9.
41. Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, Charbonnel N, Alamé J, Tridon A, et al. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic lactobacillus rhamnosus lcr35. *PLoS One* 2011; 6(4):1–12.
42. Thomas LV, Ockhuizen T, Suzuki K. Exploring the influence of the gut microbiota and probiotics on health: a symposium report. *The British Journal of Nutrition* 2014; 112(Suppl 2):1–18.
43. Alonso VR, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *The British Journal of Nutrition* 2013; 109:21–6.
44. Elazab N, Mendy a., Gasana J, Vieira ER, Quizon a., Forno E. Probiotic Administration in Early Life, Atopy, and Asthma: A Meta-analysis of Clinical Trials. *Pediatrics* 2013; 132(3):e666–76.
45. Romanin D, Serradell M, Maciel DG, Lausada N, Garrote GL, Rumbo M. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 140:102–8.
46. Vinderola G, Perdigo G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *Journal of Dairy Research* 2006; 73:472–9.

A)



B)

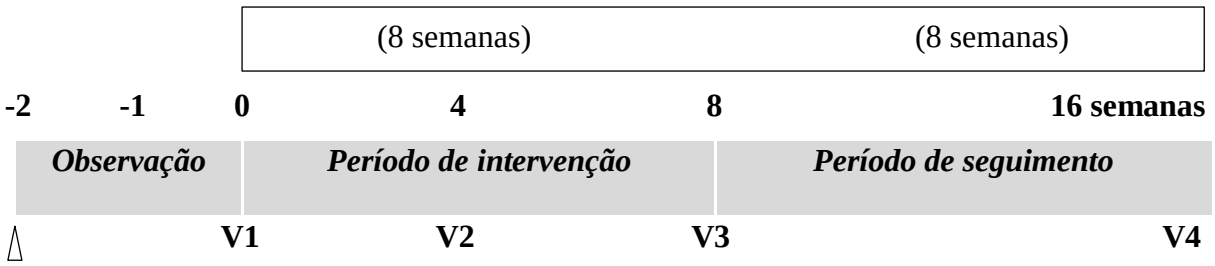


Fig. 1. Descrição do ensaio clínico: A) Diagrama *CONSORT*; B) Fluxograma do estudo.

Tabela 1. Características dos lactentes sibilantes do estudo

Variáveis	Grupo		*P*-valor
	BDP + Probiótico (30) n (%)	BDP + Placebo (30) n(%)	
Idade (meses)	13 ± 4,68 DP**	11 ± 5,13	0,286‡
Peso (g)	10906 ± 2155	9778 ± 1386	0,200‡
Estatura (cm)	75,65 ± 5,70	74,07 ± 6,32	0,313‡
Sexo			
Masculino	18 (60,0)	12 (40,0)	0,197*
Feminino	12 (40,0)	18 (60,0)	
Tabagismo na gravidez	2 (6,7)	3 (10,0)	1,000*
Parto Cesariana	17 (56,7)	19 (63,3)	0,792*
Tempo de amamentação			
< 4 meses de vida	19 (63,3)	17 (56,6)	0,820*
4 e 5 meses de vida	6 (20,0)	8 (26,7)	
≥ 6 meses de vida	5 (16,7)	5 (16,7)	
Tabagismo no domicílio	9 (30,0)	11 (36,7)	0,784*
Frequentar creche	5 (16,7)	3 (10,0)	0,706†
Exposição aos alérgenos de animais	10 (33,3)	11 (36,7)	1,000*
Exposição ao mofo ou umidade	18 (60,0)	18 (60,0)	1,000*
1º episódio de infecção respiratória			
< 3 meses de vida	14 (46,7)	13 (43,3)	1,000*
1º episódio de sibilância			
< 3 meses de vida	10 (33,3)	10 (33,3)	1,000*
Internamento pela sibilância	18 (60,0)	21 (70,0)	0,588*
Poluição atmosférica no ambiente	17 (56,7)	22 (73,3)	0,279*
Nº Irmãos/ãs			
Nenhum	9 (30,0)	10 (33,3)	0,725†
≥ 1	21 (70,0)	20 (66,7)	
Pessoas que residem em mesma casa			
Dois	2 (6,7)	2 (6,7)	0,888†
≥ 3	28 (93,3)	28 (93,3)	
Escolaridade da mãe			
8 anos a 11 anos	11 (36,7)	10 (33,4)	0,420†
12 ou mais anos	19 (63,3)	20 (66,6)	
Rinite	4 (13,3)	5 (16,7)	1,000†
Eczema	1 (3,3)	0 (0,0)	1,000†
Teste cutâneo			
Positivo	3 (10,0)	1 (3,3)	0,612†
Negativo	27 (90,0)	29 (96,7)	
Eosinófilos sangue			
< 500	20 (66,7)	17 (56,6)	0,523†
≥ 500	10 (33,3)	13 (43,4)	
IgE total sangue			
Normal (< 60)	22 (73,3)	21 (70,0)	1,000*
Aumentado (≥ 60)	8 (26,7)	9 (30,0)	

*Teste Qui-Quadrado, †Teste Exato de Fisher, ‡Teste *t* Student.
**DP: Desvio Padrão

Tabela 2. Comparação dos aspectos clínicos entre os grupos de lactentes sibilantes que receberam probióticos ou placebo na visita 1, após 8 semanas e no seguimento até 16 semanas

Variáveis	Visita 1			Após 8 semanas (V3)		*P*-valor	Durante seguimento até 16 semanas (V4)		*P*-valor
	(30) BDP + Probiótico n (%)	(30) BDP + Placebo 30 n(%)		(30) BDP + Probiótico + n (%) (IC 95%)	(28) BDP + Placebo + n(%) (IC 95%)		(30) BDP + Probiótico - n (%) (IC 95%)	(28) BDP + Placebo - n (%) (IC 95%)	
Ocorrência de sibilância	30 (100)	30 (100)	-	14 (46,7) (29,54 - 64,41)	17 (60,7) (41,99 - 77,32)	0,419*	9 (30,0) (15,73 - 47,97)	12 (42,9) (25,68 – 61,44)	0,456*
Ida à emergência	30 (100)	30 (100)	-	5 (16,7) (6,37 - 33,15)	6 (21,4) (9,17 - 39,34)	0,899*	2 (6,7) (1,13 - 20,32)	5 (17,9) (6,85 - 35,24)	0,246†
Uso de corticoide oral para sibilância	30 (100)	30 (100)	-	6 (20,0) (8,53 - 37,03)	10 (35,7) (19,77 – 54,48)	0,296*	3 (10,0) (2,61 - 24,85)	6 (21,4) (9,17 – 39,34)	0,290†

*Teste Qui-Quadrado, †Teste Exato de Fisher.

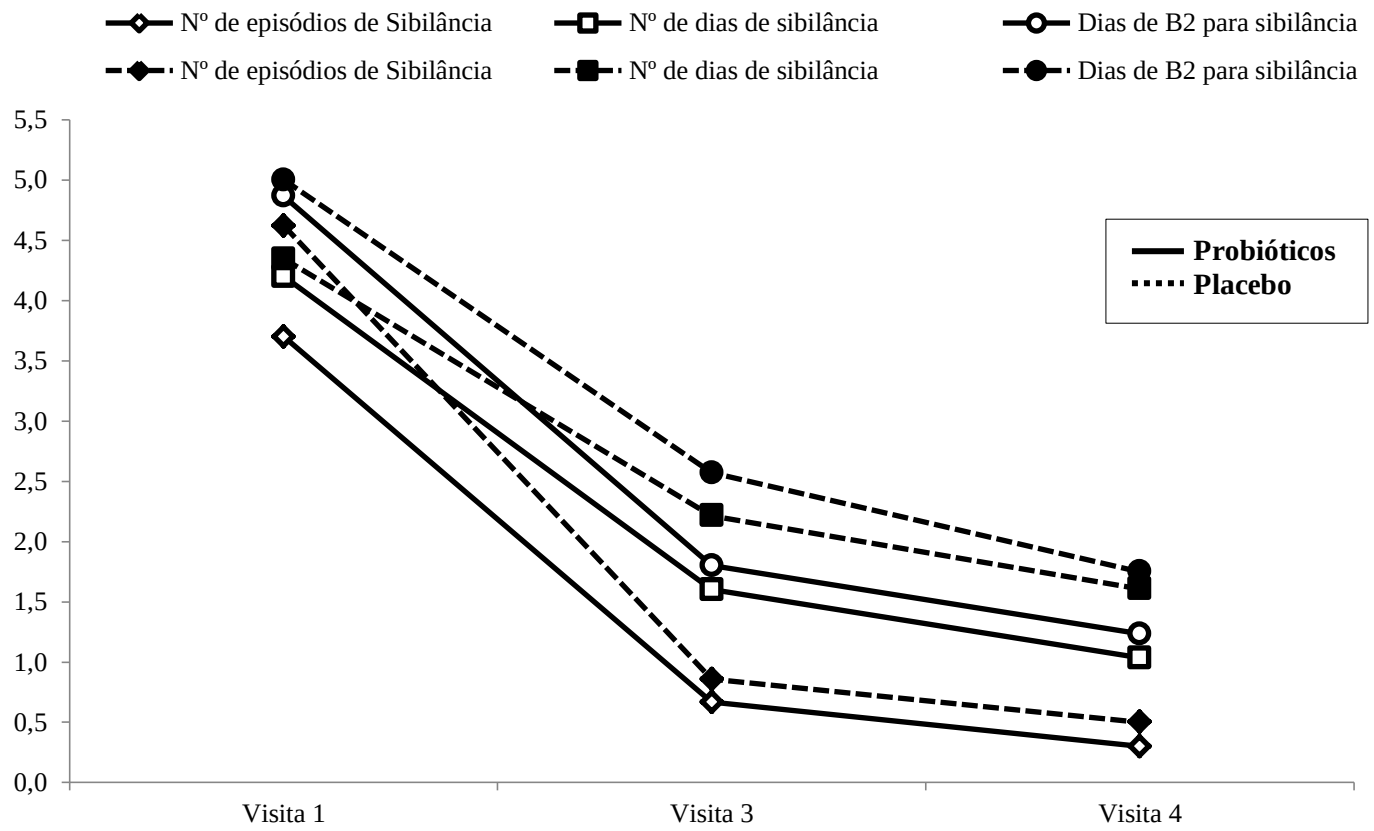


Fig. 2. Média do número de episódios de sibilância, do número de dias de sibilância e do número de dias de uso do B2-adrenérgico nos grupos, em diferentes momentos: antes e após uso de probióticos ou placebo e no seguimento. Não houve diferença estatística entre os grupos.

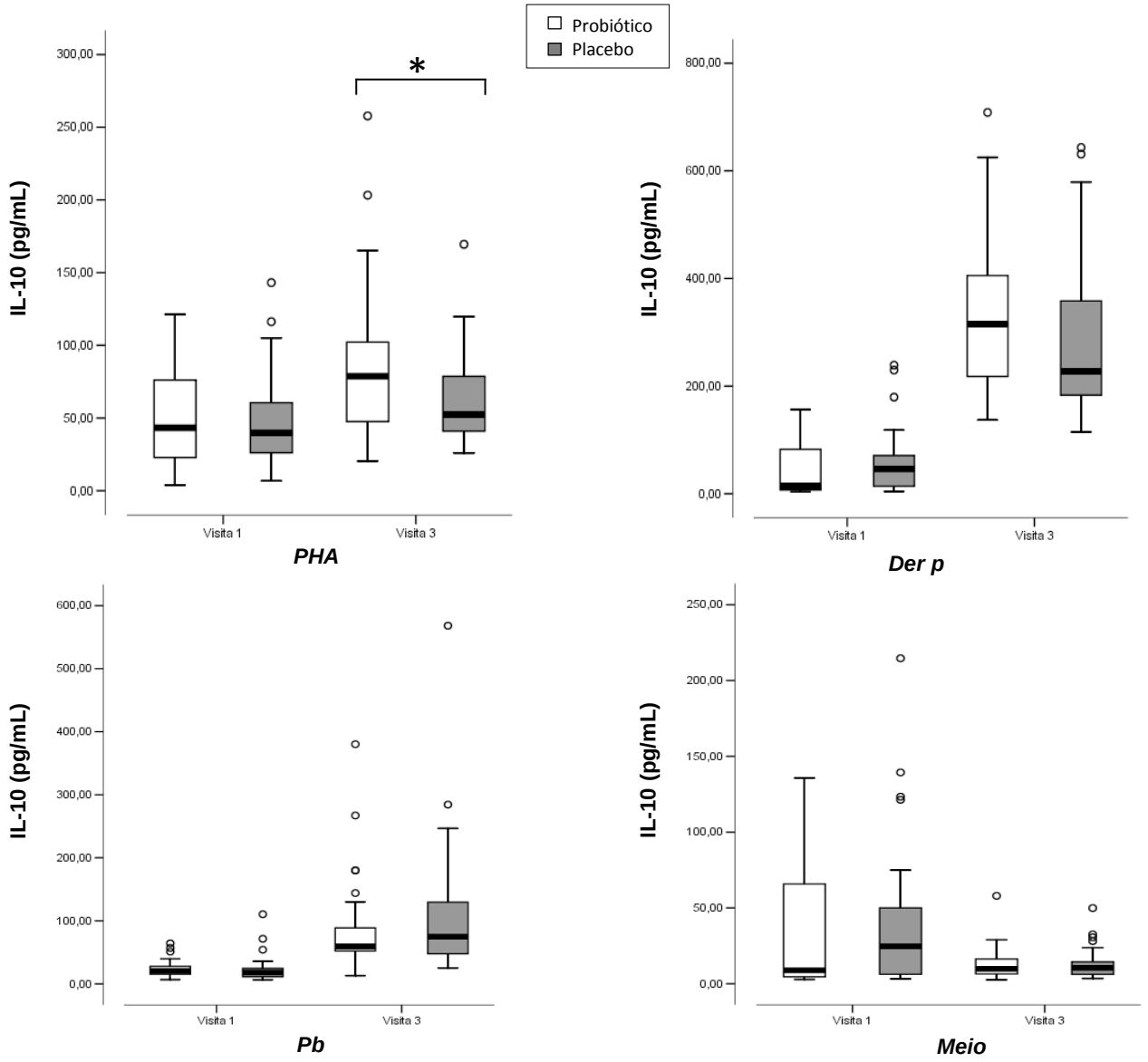


Fig. 3. Detecção por citometria de fluxo dos níveis de citocina IL-10 no sobrenadante de cultura de sangue total em diferentes estímulos *Phytohemaglutinina* A (PHA), antígeno *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), mistura de probióticos (Pb) e meio sem estímulo. O nível de IL-10 sob estímulo com PHA *in vitro* foi significativamente maior no grupo que fez uso de probióticos em comparação ao grupo placebo (visita 3). Boxes representados pelos quartis Q1 (percentil 25) e Q3 (percentil 75), pela mediana e pontos o*utliers*. Diferença estatisticamente significativa foi indicada por asterico, que denota $P < 0.05$ por comparação entre os grupos.

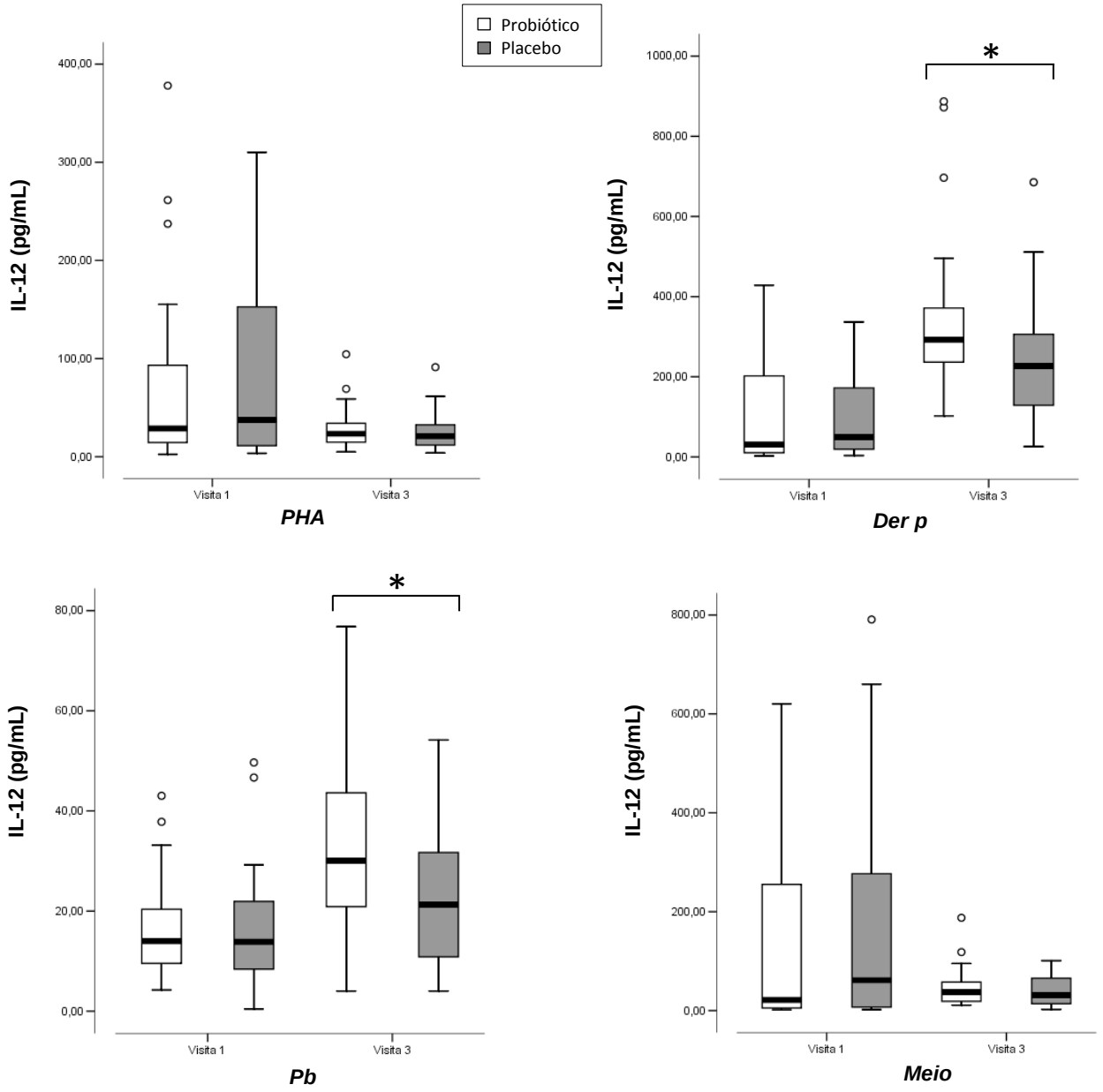


Fig. 4. Níveis de IL-12 detectados no sobrenadante da cultura de células totais em diferentes estímulos *Phytohemaglutinina* A (PHA), antígeno *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), mistura de probióticos (Pb) e meio sem estímulo. Diferença significativa dos níveis de IL-12 nos estímulos com Der p e Pb em lactentes sibilantes que fizeram uso de probióticos em comparação ao placebo na visita 3. Boxes representados pelos quartis Q1 (percentil 25) e Q3 (percentil 75), pela mediana e pontos o*utliers*. Diferença estatisticamente significativa foi indicada por asterico, que denota $P < 0.05$ por comparação entre os grupos.

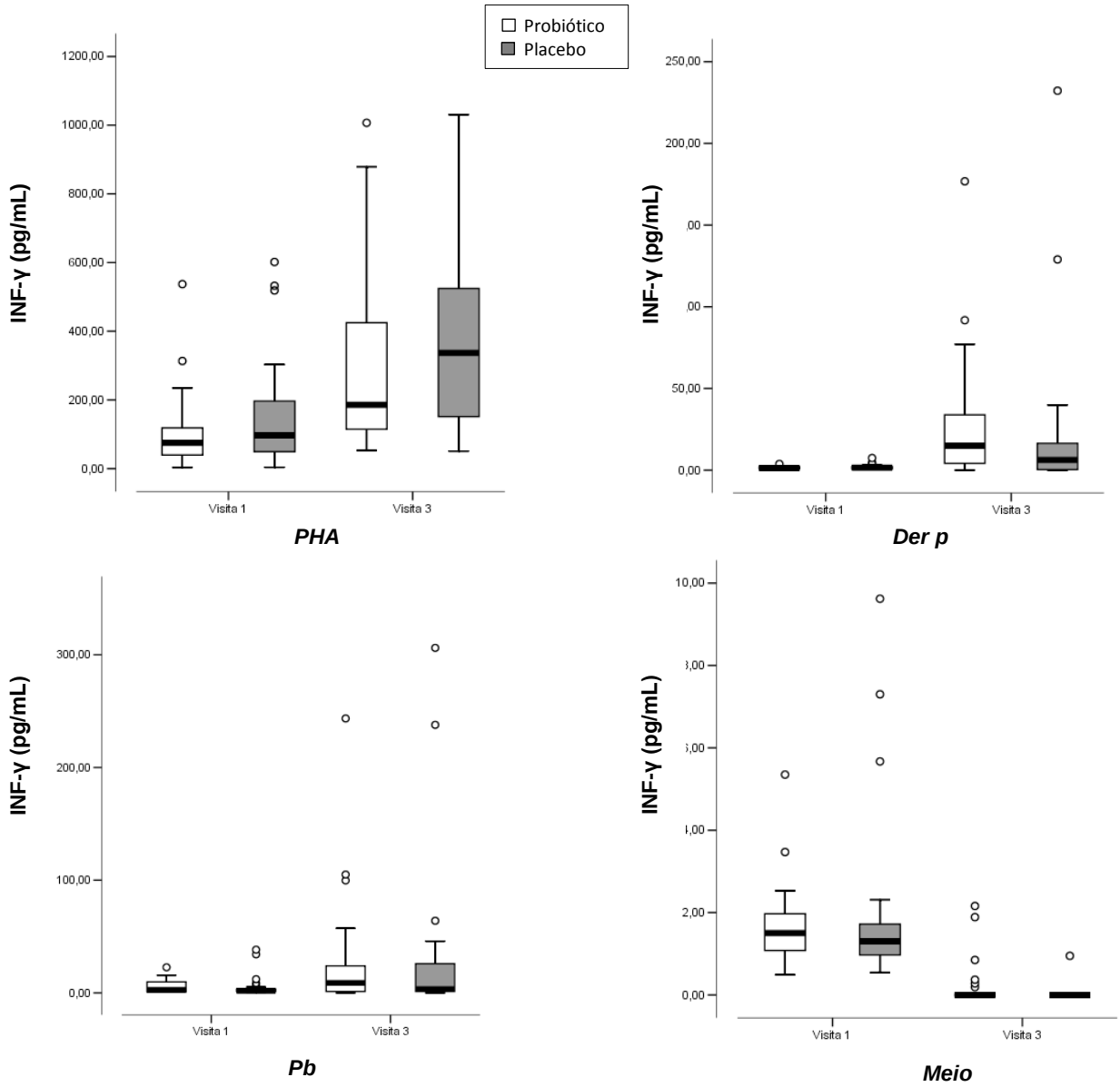


Fig. 5. Níveis de INF-γ não apresentaram diferença significativa na cultura de sangue total de pacientes que receberam probióticos e placebo. Detecção dos níveis de INF-γ por citometria de fluxo no sobrenadante da cultura de células totais em diferentes estímulos *Phytohemaglutinina* A (PHA), antígeno *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), mistura de probióticos (Pb) e meio sem estímulo. Boxes representados pelos quartis Q1 (percentil 25) e Q3 (percentil 75), pela mediana e pontos o*utliers*.

Tabela 3. Níveis das citocinas IL-10, IL-12 e INF-γ em diferentes meios de estímulo *in vitro*, antes e após uso de probióticos ou placebo

	Grupo BDP + Probiótico			**Grupo BDP + Placebo**		
Variáveis	**Visita 1**	**Visita 3**	***(P*-valor)**	**Visita 1**	**Visita 3**	***(P*-valor)**
	Mediana (Q1; Q3)	**Mediana (Q1; Q3)**		**Mediana (Q1; Q3)**	**Mediana (Q1; Q3)**	
PHA (IL-10)	43,4 (22,6; 76,5)	78,7 (47,6; 103,5)	< 0,001*	39,7 (26,9; 60,1)	52,3 (41,0; 79,6)	0,040†
Der p (IL-10)	14,2 (6,9; 83,2)	315,4 (216,6; 405,5)	< 0,001†	46,4 (15,1; 73,9)	227,9 (182,4; 360,7)	< 0,001†
Pb (IL-10)	20,8 (14,9; 28,0)	59,6 (51,7; 92,4)	< 0,001†	18,0 (11,6; 27,0)	74,6 (47,1; 135,0)	< 0,001†
Meio (IL-10)	8,8 (4,5; 67,2)	9,9 (6,5; 16,4)	0,111†	24,6 (6,5; 49,9)	10,6 (5,9; 14,7)	0,019†
PHA (IL-12)	28,7 (14,2; 96,4)	23,4 (14,8; 35,3)	0,109†	37,6 (11,9; 151,4)	21,1 (11,6; 32,8)	0,011†
Der p (IL-12)	30,4 (10,2; 202,9)	292,8 (231,1; 377,5)	< 0,001*	49,4 (19,4; 170,8)	226,5 (127,6; 306,5)	< 0,001†
Pb (IL-12)	14,0 (9,4; 21,0)	30,1 (20,6; 43,9)	< 0,001*	13,9 (8,6; 24,7)	21,3 (10,8; 32,2)	0,029†
Meio (IL-12)	21,7 (5,2; 256,2)	37,8 (18,4; 57,9)	0,213†	61,4 (7,2; 247,0)	30,9 (13,4; 66,4)	0,043†
PHA (IFN-γ)	76,0 (38,2; 121,0)	186,1 (114,9; 429,2)	< 0,001†	97,3 (52,9; 196,4)	336,7 (143,9; 529,0)	< 0,001†
Der p (IFN-γ)	1,3 (1,1; 2,0)	14,9 (3,9; 34,1)	0,001*	1,5 (0,9; 2,0)	6,2 (0,3; 16,5)	0,001†
Pb (IFN-γ)	2,4 (1,2; 9,8)	8,7 (1,2; 24,6)	0,006†	2,0 (1,3; 3,8)	3,3 (1,2; 26,7)	0,122†
Meio (IFN-γ)	1,5 (1,1; 2,0)	0,0 (0,0; 0,0)	< 0,001†	1,3 (1,0; 1,7)	0,0 (0,0; 0,0)	< 0,001†

*Teste *t* Student Pareado, †Teste de Wilcoxon.

4 CAPÍTULO IV

4.1 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

- Na análise dos estudos da revisão sistemática, redução de novos episódios de infecção foi o desfecho favorável ao uso dos probióticos no tratamento das infecções respiratórias na criança. Importante destacar que esses ensaios clínicos foram realizados, em sua maioria, em países desenvolvidos, com condições de saneamento, de assistência à saúde e de regulamentação rigorosa ao uso de probióticos bem estabelecidos, havendo, portanto, a necessidade de pesquisas futuras em países em desenvolvimento, onde as taxas de infecções respiratórias na infância são maiores quando comparadas aos dos países de elevada renda *per capita* identificados nesta revisão.

- No ensaio clínico randomizado, a mistura de probióticos foi mais propensa em reduzir a ocorrência de sibilância durante a intervenção (46,7% *versus* 60,7%) e durante o seguimento (30,0% *versus* 42,9%) em comparação ao grupo placebo, entretanto não houve diferença significativa entre os dois grupos. Houve diferença significativa dos níveis de IL-10 *in vitro*, em estímulo com *Phytohemaglutinina* A, no grupo que recebeu probióticos *versus* placebo (P = 0,029) e dos níveis de IL-12, em dois diferentes estímulos, na cultura de sangue dos lactentes que receberam a mistura de probióticos em comparação ao placebo, com P = 0,040 e P = 0,032.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSSON, T. R. et al. A Th1/Th2-associated chemokine imbalance during infancy in children developing eczema, wheeze and sensitization. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 41, n. 12, p. 1729–1739, 2011.

ABRAHAMSSON, T. R. et al. No effect of probiotics on respiratory allergies: A seven-year follow-up of a randomized controlled trial in infancy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 24, n. 6, p. 556–561, 2013.

ADHAM, M. et al. Wheezing phenotypes from birth to adolescence: a cohort study in Pelotas, Brasil, 1993 - 2004. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 6, p. 185–196, 2008.

ALLAN WALKER, W. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 63, n. SUPPL.2, p. 8–15, 2013.

ANUKAM, K. C.; REID, G. Probiotics : 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff ' s Observation Brief history of Elie Metchnikoff Probiotics beyond fermented dairy products. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, v. 30, n.5, p. 466–474, 2007.

AZAD, M. B. et al. Probiotic supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 347, n. 5, p. f6471, 2013.

BACHARIER, L. B. et al. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. **Allergy**, v. 63, n. 1, p. 5–34, 2008.

BACHARIER, L. B.; GUILBERT, T. W. Diagnosis and management of early asthma in preschool-aged children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 2, p. 287–296, 2012.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160–174, 2012.

BESSA, O. A A C. et al. Prevalence and risk factors associated with wheezing in the first year of life. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 2, p. 190–196, 2014.

BOEHM, U., et al. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, n. 3, p. 749-795, 1997.

BOOKMAN, E. B. et al. Gene-environment interplay in common complex diseases: forging an integrative model-recommendations from an NIH workshop. **Genetic Epidemiology**, v. 225, n. 35, p. 217–225, 2011.

BORCHERS, A.T. et al. Probiotics and immunity. **J Gastroenterol**, v. 44, n. 3, p. 26–46, 2009.

BOSIS, S. et al. Role of respiratory pathogens in infants hospitalized for a first episode of wheezing and their impact on recurrences. **Clinical Microbiology and Infection Diseases**, v. 14, n. 7, p. 677–684, 2008.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Medicine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 1, p. 1–8, 2014.

CAMARA, A. A et al. Risk factors for wheezing in a subtropical environment: role of respiratory viruses and allergen sensitization. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 551–557, 2004.

CAROLINE, A. et al. Lactente sibilante : prevalência e fatores de risco Wheezing infant : prevalence and risk factors. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 33, n. 2, p. 43–50, 2010.

CASELLI, M. et al. Actual concept of "probiotics": is it more functional to science or business? **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 10, p. 1527–1540, 2013.

CASTRO-RODRIGUEZ, J. A; PEDERSEN, S. The role of inhaled corticosteroids in management of asthma in infants and preschoolers. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 19, n. 1, p. 54–59, 2013.

CASTRO-RODRIGUEZ, J. A; RODRIGO, G. J. Efficacy of inhaled corticosteroids in infants and preschoolers with recurrent wheezing and asthma: a systematic review with meta-analysis. **Pediatrics**, v. 123, n. 3, p. e519–25, 2009.

CASTRO-RODRÍGUEZ, J. A. et al. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, n. 4 I, p. 1403–1406, 2000.

CHEN, Y.-S. et al. Randomized placebo-controlled trial of lactobacillus on asthmatic children with allergic rhinitis. **Pediatric Pulmonology**, v. 45, n. 11, p. 1111–1120, 2010.

CHONG NETO, HJ; MEDEIROS, D; ROCHA, LA. Abordagem do paciente em Alergia e Imunologia. Ed. Medbook. **Abordagem e investigação do lactente sibilante.** Capítulo 33, seção IV, p. 437-447, São Paulo, 2012.

DAS, R. R.; NAIK, S. S.; SINGH, M. Probiotics as additives on therapy in allergic airway diseases: a systematic review of benefits and risks. **BioMed Research International**, v. 23, n. 9, p. 1-10, 2013.

DE JONG, B. M. et al. Determinants of health care utilization for respiratory symptoms in the first year of life. **Medical Care**, v. 45, n. 8, p. 746–752, 2007.

DELA BIANCA, AC et al. International Study of Wheezing in Infants (EISL): Validation of Written Questionnaire for Children Aged Below 3 Years. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v.19, n.1, p.35-42, 2009.

DELCENSERIE, V. et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 37–54, 2008.

DOGI, C. A; WEILL, F.; PERDIGÓN, G. Immune response of non-pathogenic gram(+) and gram(-) bacteria in inductive sites of the intestinal mucosa study of the pathway of signaling involved. **Immunobiology**, v. 215, n. 1, p. 60–69, 2010.

DONGARRÀ, M. L. et al. Mucosal immunology and probiotics. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 13, n. 1, p. 19–26, 2013.

ELAZAB, N. et al. Probiotic Administration in Early Life, Atopy, and Asthma: A Meta-analysis of Clinical Trials. **Pediatrics**, v. 132, n. 3, p. e666–e676, 2013.

EL-GAMAL, Y. M.; EL-SAYED, S. S. Wheezing in infancy. **The World Allergy Organization journal**, v. 4, n. 5, p. 85–90, 2011.

FAO, J. et al. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. **World Health Organization**, p. 1–11, 2002.

FIGLER, M. et al. Effect of special Hungarian probiotic kefir on faecal microflora. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 7, p. 1129-1132, 2006.

FIOCCHI, A. et al. Clinical Use of Probiotics in Pediatric Allergy (CUPPA): A World Allergy Organization Position Paper. **The World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 11, p. 148–167, 2012.

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. 1–13, 2015.

FORCHIELLI, M. L.; WALKER, W. A. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. **The British Journal of Nutrition**, v. 93,n. Suppl 1, p. S41–S48, 2005.

FORSYTHE, P. Probiotics and lung diseases. **Chest**, v. 139, n. 4, p. 901–908, 2011.

FRANK, P. I. et al. Long term prognosis in preschool children with wheeze: longitudinal postal questionnaire study 1993-2004. **BMJ**, v. 336, n. 7658, p. 1423–1426, 2008.

FREY, U. et al. Alterations in airway wall properties in infants with a history of wheezing disorders. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 6, p. 1825–1829, 2000.

GACKOWSKA, L. et al. Combined effect of different lactic acid bacteria strains on the mode of cytokines pattern expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. Suppl 9, p. 13–21, 2006.

GARCIA-MARCOS, L.; MARTINEZ, F. D. Multitrigger versus episodic wheeze in toddlers: New phenotypes or severity markers? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 3, p. 489–490, 2010.

GHADIMI, D. et al. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. **Immunobiology**, v. 213, n. 8, p. 677–692, 2008.

GHAFFARIAN, R. M. S. Models and Methods to Evaluate Transport of Drug Delivery Systems Across Cellular Barriers. **J Vis Exp**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

GIOVANNINI, M., et al. A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. **Pediatr Res.**, v. 62, n. 7, p. 1-4, 2007.

GUILBERT, T. W. et al. Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 6, p. 1282–1287, 2004.

HAO, Q. et al. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. **Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)**, v. 9, n. 2, p. CD006895, 2011.

HERR, M. et al. Risk factors and characteristics of respiratory and allergic phenotypes in early childhood. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 2, p. 389–396.e4, 2012.

HO, S.-M. Environmental epigenetics of asthma: an update. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 3, p. 453–465, 2010.

HOVAV, A-H. Dendritic cells of the oral mucosa. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 1, p. 27–37, 2014.

JALANKA-TUOVINEN, J. et al. Intestinal microbiota in healthy adults: Temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e23035, 2011.

JENSEN, M. P. et al. Early probiotic supplementation for allergy prevention: Long-term outcomes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 5, p. 1209–1211, 2012.

JUST, J. et al. Impact of innate and environmental factors on wheezing persistence during childhood. **The Journal of Asthma**, v. 47, n. 4, p. 412–416, 2010.

KING, S. et al. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. **The British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 1, p. 41–54, 2014.

KRAWIEC, M. E. et al. Persistent wheezing in very young children is associated with lower respiratory inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, n. 6, p. 1338–1343, 2001.

KURUKULAARATCHY, R. J. et al. Characterization of wheezing phenotypes in the first 10 years of life. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, n. 5, p. 573–578, 2003.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 171–184, 2010.

LEITE, A. M. O., et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiol**, v. 31, n. 7, p. 215–221, 2012.

LIU, G.; ZHANG, L.; ZHAO, Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 2, p. 168-175, 2010.

MAAS, T. et al. Mono and multifaceted inhalant and/or food allergen reduction interventions for preventing asthma in children at high risk of developing asthma. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 7, n. 3, p. 209-211, 2009.

MACKOWIAK, P. A. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the Intestinal Microbiome and the Quest for Long Life. **Frontiers in Public Health**, v. 1, n. 13, p. 52-54, 2013.

MALLOL, J. et al. International prevalence of recurrent wheezing during the first year of life: variability, treatment patterns and use of health resources. **Thorax**, v. 65, n. 11, p. 1004–1009, 2010.

MALLOL, J.; AGUIRRE, V.; WANDALSEN, G. Common cold decreases lung function in infants with recurrent wheezing. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 38, n. 3, p. 110–114, 2010.

MARKS, G. B. The allergic paradox: A key to progress in primary prevention of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 4, p. 789–790, 2011.

MARTINEZ, F. D. Asthma and Wheezing in the first six years of life. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 3, p. 133-138, 1995.

MARTINEZ, F. D. et al. Use of beclomethasone dipropionate as rescue treatment for children with mild persistent asthma (TREXA): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9766, p. 650–657, 2011.

MASOLI, M. et al. Program G. The global burden of asthma: excutive summary of the GINA Dissemination Committee Report. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 469–478, 2004.

MEDEIROS, D et al. Prevalência de sibilância e fatores de risco associados em crianças no primeiro ano de vida, residentes no Município de Recife, Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 27, n. 8, p. 1551-1559, 2011.

MELÉN, E. et al. Influence of male sex and parental allergic disease on childhood wheezing: role of interactions. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, n. 6, p. 839–844, 2004.

MIDODZI, W. K. et al. Predictors for wheezing phenotypes in the first decade of life. **Respirology**, v. 13, n. 4, p. 537–545, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS). **DATASUS, 2015**. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def. Acesso em: 07/02/2015.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011.

ÖZDEMIR, O. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: An update from laboratory and clinical data. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 3, p. 295–304, 2010.

ÖZDEMIR, O. Preventative and Therapeutic Role of Probiotics in Various Allergic and Autoimmune Disorders: An Up-to-Date Literature Review of Essential Experimental and Clinical Data. **Journal of Evidence - Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 18, n. 2, p. 121-151, 2012.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.

PANDURU, M. et al. Probiotics and primary prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled studies. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 2, n. 29, p. 232–242, 2014.

PAPADOPOULOS, N. G. et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma. **Allergy**, v. 67, n. 8, p. 976–997, 2012.

PEDERSEN, S. E. et al. Global strategy for the diagnosis and management of asthma in children 5 years and younger. **Pediatric Pulmonology**, v. 46, n. 1, p. 1–17, 2011.

PÉREZ-YARZA, E. G. et al. The Association Between Respiratory Syncytial Virus Infection and the Development of Childhood Asthma. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 8, p. 733–739, 2007.

PRESCOTT, S.; NOWAK-WĘGRZYN, A. Strategies to prevent or reduce allergic disease. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 59, n. suppl 1, p. 28–42, 2011.

PUNNONEN, J., et al. IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4 induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. **J. Immunol.**, v. 151, n. 3, p. 1280-1289, 1993.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; DE VOS, W. M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 17, p. 996–1047, 2014.

RAUCH, M.; LYNCH, S. V. The potential for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 192–201, 2012.

RAUTAVA, S. et al. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology Nature Publishing Group**, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2012.144>

ROBERTSON, S. J.; GIRARDIN, S. E. Nod-like receptors in intestinal host defense: controlling pathogens, the microbiota, or both? **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 29, n. 1, p. 15–22, 2013.

ROBLES ALONSO, V.; GUARNER, F. Linking the gut microbiota to human health. **The British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 7, p. S21–26, 2013.

ROSE, M. A. et al. Efficacy of probiotic Lactobacillus GG on allergic sensitization and asthma in infants at risk. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 40, n. 9, p. 1398–1405, 2010.

RUSCONI, F. et al. Risk factor for early, persistent, and late-onset wheezing in young children. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 3, p. 1617–1622, 1999.

SANDERS, M. E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. Suppl 2, p. S58–S61; 2008.

SARRIA, E. E. et al. Atopy, cytokine production, and airway reactivity as predictors of pre-school asthma and airway responsiveness. **Pediatric Pulmonology**, v. 49, n. 2, p. 132–139, 2014.

SAVINO, F. et al. Faecal microbiota in breast-fed infants after antibiotic therapy. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 100, n. 1, p. 75–78, 2011.

SCHULTZ, A. et al. The transient value of classifying preschool wheeze into episodic viral wheeze and multiple trigger wheeze. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 99, n. 1, p. 56–60, 2010.

SCHULZ, O., et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12/p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. **Immunity**, v. 13, n. 4, p. 453-462, 2000.

SUTHERLAND, E. R.; BUSSE, W. W. Designing clinical trials to address the needs of childhood and adult asthma: The National Heart, Lung, and Blood Institute's AsthmaNet. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 1, p. 34–38.e1, 2014.

TEERATAKULPISARN, J. Rhinovirus infection in children hospitalized with acute bronchiolitis and its impact on subsequent wheezing or asthma: a comparison of etiologies. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 32, n. 8, p. 226–234, 2014.

THOMAS, C. M.; VERSALOVIC, J. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. **Gut Microbes**, v. 1, n. 3, p. 148–163, 2010.

THOMAS, L. V; OCKHUIZEN, T.; SUZUKI, K. Exploring the influence of the gut microbiota and probiotics on health: a symposium report. **The British Journal of Nutrition**, v. 112, n. Suppl 2, p. S1–S18, 2014.

TIMMERMAN, H.M., et al. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 8, p. 219-233, 2004.

TOPUZ, E. et al. Effect of oral administration of kefir on serum proinflammatory cytokines on 5-FU induced oral mucositis in patients with colorectal cancer. **Invest New Drugs**, v. 26, n. 8, p. 567–572, 2008.

TORLEY, D. et al. What's new in atopic eczema? An analysis of systematic reviews published in 2010-11. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 38, n. 5, p. 449–456, 2015.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 1, p. 6–21, 2015.

VAN DER AA, L. B. et al. Synbiotics prevent asthma-like symptoms in infants with atopic dermatitis. Allergy: **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 66, n. 2, p. 170–177, 2011.

VINDEROLA, G. et al. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology**, v. 211, n. 35, p. 149-156, 2006.

VINDEROLA, G. et al. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 17, p. 472-479, 2006.

WANDALSEN, G. Cytokines profile and acute bronchiolitis. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 39, n. 1, p. 1-2, 2011.

WALLACE, T. C.; MACKAY, D. The Safety of Probiotics: Considerations following the 2011 U . S . Agency for Health Research and Quality Report 1. **The Journal of Nutrition**, v. 2, n. 30, p. 1923–1924, 2011.

WEST, C. E. et al. Probiotic effects on T-cell maturation in infants during weaning. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 42, n. 4, p. 540–549, 2012.

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.

WILLIAMS, N. T. Probiotics. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 67, n. 6, p. 449–458, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabulação das variáveis

VARIÁVEIS	Categorização
Idade	(valor absoluto em meses)
Sexo	Masculino = 1 Feminino = 2
Peso	(valor absoluto em g)
Estatura	(valor absoluto em cm)
Rinite	Sim = 1 Não = 2
Eczema	Sim = 1 Não = 2
Parto cesariana (Pergunta 20 do QE-EISL)	Sim = 1 Não = 2
Tempo de amamentação (Pergunta 34 do QE-EISL)	< 4 meses de vida = 1 4 e 5 meses de vida = 2 ≥ 6 meses de vida = 3
Tabagismo na gravidez (Pergunta 16 do QE-EISL)	Sim = 1 Não = 2
Tabagismo no domicílio (Pergunta 14 do QE-EISL)	Sim = 1 Não = 2
Frequentar creche (Pergunta 21 do QE-EISL)	Sim = 1 Não = 2
Exposição aos alérgenos de animais (Pergunta 28 do QE-EISL)	Sim = 1 Não = 2
Exposição ao mofo ou umidade (Pergunta 39 do QE-EISL)	Sim = 1 Não = 2
1º episódio de infecção respiratória (Pergunta 36 do QE-EISL)	< 3 meses de vida = 1 ≥ 3 meses de vida = 2
1º episódio de chiado	< 3 meses de vida = 1

(Pergunta 03 do QE-EISL)	≥ 3 meses de vida = 2
Internamento pelo chiado (Pergunta 10 do QE-EISL)	Sim = 1 Não = 2
Poluição atmosférica no ambiente (Pergunta 38 do QE-EISL)	Sim = 1 Não = 2
Nº Irmãos/ãs (Pergunta 41 do QE-EISL)	Nenhum = 0 Um = 1 Dois = 2 Três = 3 Quatro ou mais = 4
Pessoas que residem em mesma casa (Pergunta 42 do QE-EISL)	Dois = 1 Três = 2 Quatro = 3 Cinco = 4 Seis ou mais = 5
Escolaridade da mãe (Pergunta 33 do QE-EISL)	8 anos ou menos = 1 9 a 11 anos = 2 12 ou mais anos = 3
Teste cutâneo de hipersensibilidade imediata (*Prick Test*)	Positivo = 1 Negativo = 2
Eosinófilos no sangue	< 500 = 1 ≥ 500 = 2
IgE total no sangue	Normal (até 60) = 1 Aumentado (≥ 60) = 2
Radiografia de Tórax	Normal = 1 Alterado = 2
Ida à emergência pelo chiado (visita 1)	Sim = 1 Não = 2
Ocorrência de chiado (Visita 1)	Sim = 1 Não = 2
Nº de episódios de chiado nos últimos 2-3 meses (Visita 1)	(valor absoluto)
Nº de dias de chiado em cada crise	(valor absoluto)

(Visita 1)	
Dias de B2-miméticos inalatórios para o chiado (Visita 1)	(valor absoluto)
Uso costicosteroide oral para o chiado (Visista 1)	Sim = 1 Não = 2
Ida à emergência nas primeiras 8 semanas de intervenção (V3)	Sim = 1 Não = 2
Ocorrência de episódios de sibilância nas primeiras 8 semanas de intervenção (V3)	Sim = 1 Não = 2
Nº de episódios de sibilância nas primeiras 8 semanas (V3)	(valor absoluto)
Nº de dias de sibilância nas primeiras 8 semanas (V3)	(valor absoluto)
Dias de B2-miméticos inalatórios para sibilância nas primeiras 8 semanas (V3)	(valor absoluto)
Uso costicosteroide oral para sibilância nas primeiras 8 semanas (V3)	Sim = 1 Não = 2
Ida à emergência após 8 semanas de intervenção até 16 semanas (V4)	Sim = 1 Não = 2
Ocorrência de episódios de sibilância após 8 semanas de intervenção até 16 semanas (V4)	Sim = 1 Não = 2
Nº de episódios de sibilância após 8 semanas de intervenção até 16 semanas (V4)	(valor absoluto)
Nº de dias de sibilância após 8 semanas de intervenção até 16 semanas (V4)	(valor absoluto)
Dias de B2-miméticos inalatórios para sibilância após 8 semanas de intervenção até 16 semanas (V4)	(valor absoluto)
Uso corticosteroide oral para sibilância após 8 semanas de intervenção até 16 semanas (V4)	Sim = 1 Não = 2

PLACEBO	VALORES
PHA Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
PHA Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
PHA Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Placebo (PRÉ-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
PHA Placebo (PÓS-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Placebo (PÓS-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Placebo (PÓS-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Placebo (PÓS-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL

PHA Placebo (PÓS-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Placebo (PÓS-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Placebo (PÓS-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Placebo (PÓS-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
PHA Placebo (PÓS-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Placebo (PÓS-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Placebo (PÓS-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Placebo (PÓS-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
PROBIÓTICO	**VALORES**
PHA Probiótico (PRÉ-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Probiótico (PRÉ-tRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Probiótico (PRÉ- TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Probiótico (PRÉ-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
PHA Probiótico (PRÉ-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Probiótico (PRÉ- TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Probiótico (PRÉ- TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Probiótico (PRÉ-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL

PHA Probiótico (PRÉ-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Probiótico (PRÉ-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Probiótico (PRÉ-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Probiótico (PRÉ-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
PHA Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IL-10)	(valor absoluto) pg/mL
PHA Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IL-12)	(valor absoluto) pg/mL
PHA Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Der p Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Pb Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL
Meio Probiótico (PÓS-TRATAMENTO IFN-GAMA)	(valor absoluto) pg/mL

APÊNDICE B – Questionário de Anamnese

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS – UFPE
CENTRO DE PESQUISA EM ALERGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA

QUESTIONÁRIO – ENTREVISTA

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome da criança _____**Registro:**_____

Endereço_____

II. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

1. Idade (meses) ☐
2. Gênero: 1.MASC. ☐ 2. FEM. ☐
3. Peso atual (em gramas): ☐
4. Quanto mede em cm: ☐
5. Rinite alérgica: 1.SIM ☐ 2.NÃO ☐
6. Dermatite atópica: 1.SIM ☐ 2.NÃO ☐

III. QUEIXA PRINCIPAL E HISTORIA DA DOENÇA ATUAL

CRISES DE SIBILÂNCIA
IDA A EMERGÊNCIA PELO CHIADO: **SIM =** ☐ **NÃO =** ☐
OCORRÊNCIA DE CHIADO: **SIM =** ☐ **NÃO =** ☐
NÚMERO DE EPISÓDIOS DE CHIADO NOS ÚLTIMOS 2-3 MESES:
NÚMERO DE DIAS DE CHIADO EM CADA CRISE:
DIAS DE BETA2-MIMETICOS INALATÓRIOS PARA O CHIADO:
USO DE CORTICOSTEROIDE ORAL PARA O CHIADO: **SIM =** ☐ **NÃO =** ☐

IV. ANTECEDENTES PESSOAIS E FAMILIARES (*EISL* - PARTE DO QUESTIONARIO ORIGINAL)

1. Seu bebê nasceu por cesariana (parto cesareana)?

☐ 1.SIM ☐ 2.NÃO

2. Por quantos meses você deu somente leito do peito para o seu bebê (sem dar sucos, papinha ou outro tipo de leite)?

☐ MESES

3. A mãe do bebê fumou durante a gravidez?

☐ 1.SIM ☐ 2.NÃO

4. Alguma pessoa fuma dentro da casa (pai, mãe, avós, tios)?

☐ 1.SIM ☐ 2.NÃO

5. Seu bebê teve chiado no peito ou bronquite ou sibilâncias nos seus primeiros 12 meses de vida?

☐ 1.SIM ☐ 2.NÃO

6. Seu bebê recebeu tratamento com:

Corticóides orais (Predsim, Prelone, Decadron)

☐ 1. SIM ☐ 2. NÃO ☐ 3. NÃO SEI

Antileucotrienos (Singulair)

☐ 1. SIM ☐ 2. NÃO ☐ 3. NÃO SEI

7. Nestes últimos 12 meses o chiado no peito (sibilância) do seu bebê foi tão forte a ponto de ser necessário levá-lo a um serviço de emergência (Hospital, Clínica ou Posto de Saúde)?

☐ 1.SIM ☐ 2.NÃO

8. Seu bebê foi à creche este ano?

☐ 1.SIM ☐ 2.NÃO

9. Você tem algum bicho de estimação na sua casa atualmente? (cachorro, gato, passarinho,coelho)?

☐ 1.SIM ☐ 2. NÃO

Se Sim: ☐ 1. Cachorro ☐ 2. Gato ☐ 3. Outros

10. Existe mofo (bolor) ou manchas de umidade em sua casa?

☐ 1.SIM 2.NÃO

11. Com que idade seu bebê se resfriou pela primeira vez?

☐ MESES

12. Com que idade seu bebê teve o primeiro episódio de chiado no peito (primeira bronquite)?

☐ MESES

13. Seu bebê recebeu tratamento com corticóides (cortisonas) inalados (bombinhas) por exemplo: Symbicort, Flixotide, Seretide, Clenil, Beclosol, Budesonida, Busonid, Pulmicort,Beclometasona, Fluticasona etc..)

☐1.SIM ☐ 2.NÃO ☐ 3.NÃO SEI

14. Seu bebê já foi hospitalizado (internado em hospital) por bronquite?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

15. Você considera que o lugar onde você vive é um lugar com poluição atmosférica (fumaça de fábricas, alto tráfego de veículos, etc.)

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

16. Quantos irmãos ou irmãs o seu bebê tem?

☐ 1. Um ☐ 2. Dois ☐ 3. Três ☐ 4. Quatro ou mais

17. Quantas pessoas (adultos e crianças) vivem atualmente na sua casa?

☐ 1. Dois ☐ 2. Três ☐ 3. Quatro ☐ 4. Cinco ☐ 5. Seis ou mais

18. Marque qual o seu grau de escolaridade

☐ 1.Educação básica, primária ou nenhuma (8 anos ou menos).

☐ 2.Educação média ou secundária incompleta (9 a 11 anos).

☐ 3.Educação média ou secundária completa e nível superior (12 ou mais anos)

19. TESTE CUTÂNEO DE SENSIBILIDADE IMEDIATA (PRICK TEST):

☐ 1.Positivo ☐ 2. Negativo

ALÉRGENOS **ALIMENTOS**

Controle Positivo		**Barata**		**Alfa-lactoalbumina**	
Controle Negativo		**Epitélio de cão**		**Beta- lactoglobulina**	
D. pteronyssinus		**Epitélio de gato**		**Caseina**	
D. farinae		**Fungos**		**Gema do ovo**	
B. tropicalis				**Clara do ovo**	

Se positivo, qual o alérgeno? ☐

20. RESPOSTA CLÍNICA APÓS INTERVENÇÃO:

VISITAS À EMERGÊNCIA **V3 e V4**	**1. Sim V3:** ☐	**Não V3:** ☐
	2. Sim V4: ☐	**Não V4:** ☐

21. EPISÓDIOS DE SIBILÂNCIA:

SIBILÂNCIA NAS PRIMEIRAS 8 SEMANAS DA INTERVENÇÃO	**SIBILÂNCIA NAS SEMANAS SEGUINTES ATÉ 16 SEMANAS**
1. SIM = ☐ **2. NÃO =** ☐	**1. SIM =** ☐ **2. NÃO =** ☐
22.NÚMERO DE EPISÓDIOS:	**22.NÚMERO DE EPISÓDIOS:**
23.DIAS COM SIBILÂNCIA:	**23.DIAS COM SIBILÂNCIA:**
24.DIAS DE BETA2-MIMETICOS INALATÓRIOS:	**24.DIAS DE BETA2-MIMETICOS INALATÓRIOS:**
25.USO DE CORTICOSTEROIDE ORAL:	**25.USO DE CORTICOSTEROIDE ORAL:**

EXAMES:

26. EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS (VALOR ABSOLUTO): ☐

27. DOSAGEM IgE TOTAL: ☐

28. RADIOGRAFIA DE TÓRAX: 1.NORMAL ☐ 2.ALTERADO ☐

29.

CITOCINAS ANTES DA INTERVENÇÃO					CITOCINAS APÓS 2 MESES DA INTERVENÇÃO				
	Meio	**PHA**	**Der p**	**PB**		**Meio**	**PHA**	**Der p**	**PB**
IL-10:					**IL-10:**				
IL-12:					**IL-12:**				
INF-ɣ:					**INF-ɣ:**				

APÊNDICE C – Critérios de elegibilidade

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS – UFPE
CENTRO DE PESQUISA EM ALERGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA

Hospital das Clínicas UFPE

LISTA DE CHECAGEM PARA ELEGIBILIDADE AO ESTUDO

NOME:_____ REGISTRO: _____

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Idade de seis meses a 2 anos incompletos. ☐
- Sibilância recorrente, com pelo menos um episódio nos últimos três meses. ☐
- Não ter ainda iniciado o uso do corticosteroide inalatório antes da primeira consulta. ☐

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Pacientes que apresentarem: desnutrição, malformações congênitas das vias aéreas, fibrose cística, doenças crônicas em outros sistemas, distúrbios respiratórios perinatais, bronquiolite obliterante, alergia à proteina do leite de vaca, tumores intratorácicos, tuberculose pulmonar, imunodeficiências congênitas e prematuridade. ☐
- Exposição prévia, ou em mesmo período do estudo, de outros produtos contendo probióticos. ☐
- Lactente em uso de anti-leucotrienos. ☐
- Uso de antibiótico nas últimas quatro semanas. ☐
- Estar participando de outro estudo ou ensaio clínico. ☐

CONCLUSÃO:

ELEGÍVEL ☐

NÃO ELEGÍVEL ☐

SE ELEGÍVEL, CONCORDA EM PARTICIPAR?

SIM ☐
NÃO ☐

APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS – UFPE
CENTRO DE PESQUISA EM ALERGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA

Hospital das Clínicas UFPE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o(a) seu/sua filho(a), ou menor de idade que está sob sua responsabilidade, para participar como voluntário(a) da pesquisa: **Recorrência de sibilância no lactente: prevenção com probióticos**. Esta pesquisa é orientada pelo (a) Prof. Emanuel Sarinho e está sob a responsabilidade da pesquisadora Georgia Véras de Araújo, residente na Rua Irmã Maria David, 200 no Bairro de Casa Forte em Recife-PE, com CEP 52061-070. Possui fone: **(81) 9273-3926** e E-mail: georgiaveras@uol.com.br para contato da pesquisadora responsável, inclusive ligações a cobrar.
Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que o(a) seu/sua filho(a) faça parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é da pesquisadora responsável. Em caso de recusa o(a) Sr.(a) ou o(a) seu/sua filho(a) não serão penalizados(as) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

A pesquisa tem por finalidade verificar se as crianças (com menos de dois anos de idade), que tomam os probióticos têm menos crises de “cansaço”. Probióticos são alimentos que contém bactérias vivas que trazem benefícios para a saúde de quem toma (melhora o sistema imunológico, a prisão de ventre, aumenta a absorção de vitaminas e podem diminuir a alergia em crianças).
Você (pai, mãe ou responsável) será solicitado(a) a responder a algumas perguntas e depois seu/sua filho(a) será submetido(a) a um exame médico durante a consulta e exames laboratoriais, que poderão ser solicitados, no início e com dois meses. Durante realização de exames laboratoriais, quando necessário, poderá trazer desconforto no ato da coleta.
Após retorno com duas semanas você receberá um alimento, que pode ou não ter probióticos para oferecer a seu/sua filho(a) durante oito semanas: 1(uma) vez ao dia. Seu filho(a) irá usar o probiótico durante oito semanas e depois será reavaliado(a) após oito semanas, compreendendo um total de (04)quatro meses do estudo. Quem vai determinar se seu/sua filho(a) vai usar fórmula com probióticos ou sem probióticos é o acaso – como quando se joga uma moeda para o ar e vê se é “cara ou coroa”. No fim deste período seu/sua filho(a) será submetido(a) a novo exame médico e o responsável responderá a algumas perguntas.
O responsável deve anotar o dia que seu/sua filho(a) cansou e o que precisou fazer (dar remédio em casa, levar a emergência ou qualquer atendimento que a criança possa vir a ter). Você deve entrar em contato com a pesquisadora sempre que achar necessário.
Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária e se você concordou em participar, poderá retirar sua autorização a qualquer momento. Isto não trará nenhum prejuízo para o seu relacionamento com os pesquisadores nem ao atendimento, cuidado, acompanhamento

e tratamento oferecidos normalmente nesta instituição.
A criança pode melhorar das crises de cansaço com o uso do probiótico e o estudo poderá servir de modelo para usar este novo tratamento para outras crianças que “cansam”. Há a possibilidade de não haver melhora das crises de cansaço. Seu/sua filho(a) terá o benefício de receber o probiótico e melhorar das crises de cansaço. Pode haver os seguintes riscos: engasgos, precisando de cuidados na hora de tomar o alimento; a criança pode sentir-se constrangida se não gostar do sabor; o alimento estragar, se não utilizado corretamente, conforme orientações. Esse alimento não traz outros riscos para a saúde da criança.
Os dados e exames colhidos nesta pesquisa são confidenciais e o nome de seu/sua filho(a) não será divulgado(a) de nenhuma forma, sendo armazenados pela pesquisadora durante o período mínimo de 5 anos. Os dados serão utilizados para a preparação e publicação dos resultados da pesquisa e para o conhecimento da comunidade científica.
Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Sala 4 – Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

_____

(GEÓRGIA VÉRAS DE ARAÚJO - PESQUISADORA)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/CPF/_____, abaixo-assinado, responsável pelo(a) menor _____, autorizo a sua participação no estudo, como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele(a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de seu acompanhamento/assistência/tratamento.
Local e data: Hospital das Clínicas, _____/_____/_____.
Nome e Assinatura do (da) responsável: _____
Nome do (da) menor: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e concordância do sujeito em participar.
02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome	Nome
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE E - Ficha diário do paciente

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS – UFPE
CENTRO DE PESQUISA EM ALERGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA

Hospital das Clínicas UFPE

Ficha diário do paciente

Data da crise de "cansaço" ou "chiado"	Dias com "chiado" no peito	Ida à emergência	Tratamento necessário
		Não: Sim:	
		Não: Sim:	
		Não: Sim:	
		Não: Sim:	
		Não: Sim:	
		Não: Sim:	
		Não: Sim:	

ANEXOS:

ANEXO A - Questionário escrito do Estudo Internacional sobre Sibilância em Lactentes (QE-EISL)

Nº do Questionário ☐

Prezada (o) mãe (pai ou responsável): Por favor preencha (responda) o questionário abaixo sobre problemas respiratórios que o seu bebê teve no primeiro ano de vida (desde que nasceu até que tenha completado um ano de vida). Pedimos encarecidamente que NÃO deixe quadradinhos em branco.

Pessoa que irá preencher os dados: 1. Mãe ☐ 2.Pai ☐ 3.Outro ☐ _____

Nome da criança _____

IDADE (meses) ☐ SEXO: 1.Fem ☐ 2.Masc ☐

Endereço_____Data de hoje ____/____/____ Telefone para contato: _____

Data de nascimento (dia -mês -ano / exemplo 15-11-03): ____/____/____

Peso ao nascer (em quilogramas): ☐

Quanto pesa agora quilogramas: ☐

Quanto mediu ao nascer cm ☐ Quanto mede agora cm ☐

Em que país seu bebê nasceu?_____

Por favor coloque um X no quadradinho que corresponda a sua resposta correta.

1. Seu bebê teve chiado no peito ou bronquite ou sibilâncias nos seus primeiros 12 meses de vida?

☐ 1.SIM ☐ 2.NÃO

Se você respondeu NÃO, por favor vá à pergunta de número 12

2. Quantos episódios de chiado no peito (bronquite ou sibilâncias) ele teve no primeiro ano de vida?

☐ 1.Nenhum ☐ 2.Menos de 3 episódios ☐ 3. 3 a 6 episódios ☐ 4.Mais de 6 episódios

3. Com que idade seu bebê teve o primeiro episódio de chiado no peito (primeira bronquite)?

_____

4. Seu bebê recebeu tratamento com medicamentos inalados para aliviar o chiado no peito (broncodilatadores) por nebulizadores ou inaladores (bombinhas), por exemplo: Salbutamol, Aerolin, Berotec, Brycanil ?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO ☐ 3.NÃO SEI

5. Seu bebê recebeu tratamento com corticóides (cortisonas) inalados (bombinhas) Por exemplo:, Symbicort, Flixotide, Seretide, Clenil, Beclosol, Budesonida, Busonid, Pulmicort,Beclometasona, Fluticasona etc..)

☐1.SIM ☐ 2.NÃO ☐ 3.NÃO SEI

6. Seu bebê recebeu tratamento com:

Corticóides orais (Predsim, Prelone, Decadron)

☐1.SIM ☐ 2.NÃO ☐ 3.NÃO SEI

Antileucotrienos (Singulair)

☐1.SIM ☐ 2.NÃO ☐ 3.NÃO SEI

7. Nestes últimos 12 meses quantas vezes você acordou durante a noite devido à tosse, ou chiado no peito do seu bebê?

☐ 1.Nunca ☐ 2.Raras vezes (menos de 1 vez ao mês) ☐ 3.Algumas vezes (algumas semanas em alguns meses) ☐ 4.Freqüentemente (2 ou mais noites por semana, quase todos os meses)

8. Nestes últimos 12 meses o chiado no peito (sibilâncias) do seu bebê foi tão forte a ponto de ser necessário levá-lo a um serviço de emergência (Hospital, Clínica ou Posto de Saúde)?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

9. Nestes últimos 12 meses o chiado no peito (sibilância) do seu bebê foi tão intenso a ponto de você vê-lo com muita dificuldade para respirar (com falta de ar)?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

10. Seu bebê já foi hospitalizado (internado em hospital) por bronquite?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

11. Algum médico lhe disse alguma vez que seu bebê tem asma?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

12. Seu bebê já teve Pneumonia?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

13. Seu bebê já foi hospitalizado por pneumonia?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

14. Alguma pessoa fuma dentro da sua casa (pai, mãe, avós, tios)?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

15. Você fuma?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

16. A mãe do bebê fumou durante a gravidez?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

17. Seu bebê tem familiares com asma?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

Se Sim: ☐ 1. Mãe ☐ 2. Pai ☐ 3. Irmãos

18. Seu bebê tem familiares com alergia no nariz ou rinite alérgica?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

Se Sim: ☐ 1. Mãe ☐ 2. Pai ☐ 3. Irmãos

19. Seu bebê tem familiares com alergia de pele (dermatite alérgica)?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

Se Sim: ☐ 1. Mãe ☐ 2. Pai ☐ 3. Irmãos

20. Seu bebê nasceu por cesariana (parto cesareana)?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

21. Seu bebê foi à creche este ano?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

22. Com que idade seu bebê entrou na creche? _____meses

23. Com que freqüência você dá ao seu bebê algum dos seguintes produtos (não feitos em casa): iogurte, pudim, salgadinhos (chips), chocolate, refrigerantes, suco de frutas de caixinha ou de garrafa, geléia artificial.

☐ 1.Nunca ☐ 2.Uma vez por semana ☐ 3.Uma vez ao mês ☐ 4.Todos os dias da semana

24. Que tipo de aquecedor ou calefação você utiliza na sua casa?

☐ 1.Não uso ☐ 2.estufa a gás ☐ 3. estufa elétrica ☐ 4.lenha 5.carvão
☐ 6.parafina ☐ 7. outro ☐

25. Que tipo de combustível você usa para cozinhar na sua casa?

☐ 1.Gás encanado ☐ 2.gás de bujão ☐3.eletricidade ☐ 4.carvão
☐ 5.madeira ☐ 6.outro

26. Você tem ar condicionado em sua casa?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

27. Você tinha algum animal de estimação (cachorro, gato, passarinho, coelho) em sua casa quando seu filho nasceu?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

Se Sim: ☐ 1. Cachorro ☐ 2. Gato ☐ 3. Outros

28. Você tem algum bicho de estimação na sua casa atualmente? (cachorro, gato, passarinho,coelho)?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

Se Sim: ☐ 1. Cachorro ☐ 2. Gato ☐ 3. Outros

29. Você tem carpete na sua casa?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

30. Você tem banheiro com pia, chuveiro e vaso sanitário dentro de casa?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

31. A cozinha da sua casa (ou o lugar onde a comida é preparada) é dentro da casa?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

32. Você tem telefone (fixo ou celular)?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

33. Marque qual o seu grau de escolaridade

☐ 1.Educação básica, primária ou nenhuma (8 anos ou menos).

☐ 2.Educação média ou secundária incompleta (9 a 11 anos).

☐ 3.Educação média ou secundária completa e nível superior (12 ou mais anos)

34. Por quantos meses você deu somente leito do peito para o seu bebê (sem dar sucos, papinha ou outro tipo de leite)? _____ Meses

35. Quantos resfriados (episódios de espirros, tosse e secreção nasal com ou sem febre) seubebê teve no primeiro ano de vida (escreva o número no quadradinho)?

☐episódios

36. Com que idade seu bebê se resfriou pela primeira vez? (escreva a idade em meses no quadradinho) ☐ meses

37. Seu bebê tem ou teve alguma alergia de pele durante o primeiro ano de vida? (manchas vermelhas na pele com coceira, alergia à fralda, alergia à picada de mosquito, comida, metais, etc.).

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

38. Você considera que o lugar onde você vive é um lugar com poluição atmosférica (fumaça de fábricas, alto tráfego de veículos, etc.)

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

Se Sim: ☐ 1. Muito ☐ 2. Moderado ☐ 3. Pouco

39. Existe mofo (bolor) ou manchas de umidade em sua casa?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

40. Seu bebê tem as vacinas em dia (as que correspondem ao primeiro ano)?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

41. Quantos irmãos ou irmãs o seu bebê tem ?

☐ 1. Um ☐ 2. Dois ☐ 3. Três ☐ 4. Quatro ou mais

42. Quantas pessoas (adultos e crianças) vivem atualmente na sua casa?

☐ 1. Dois ☐ 2. Três ☐ 3. Quatro ☐ 4. Cinco ☐ 5. Seis ou mais

43. Você (a mãe) tem atualmente um trabalho remunerado?

☐1.SIM ☐ 2.NÃO

44. Qual é a raça do seu bebê?

☐ 1.Branca ☐ 2. Negra (mulato, pardo) ☐ 3.Asiática (japonês, chinês...)

☐ 4.Outra: _____

ANEXO – B Orientações de controle ambiental – HC/UFPE

CENTRO DE PESQUISAS EM
ALERGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA
EM PEDIATRIA
Disciplina de Pediatria
HOSPITAL DAS CLÍNICAS/UFPE

ORIENTAÇÕES PARA PACIENTES COM ALERGIA

O alérgico não é um "doente" e sim uma pessoa "hiperreativa", ou seja, a pele e mucosas do nariz, pulmão e olhos são mais sensíveis que a das outras pessoas. Assim, é fundamental adotar-se medidas de higiene ambiental para prevenir e diminuir essa sensibilidade. Recomenda-se a observação dos seguintes tópicos, que devem ser cumpridos na melhor medida possível:

1- Escolher para morar em lugar ensolarado, sem umidade, mofo e infiltrações de água, longe de indústrias que soltem poeiras ou fumaças e de depósitos de lixo.

2- Cuidados com quarto de dormir:

a) Retirar móveis estofados desnecessários, carpetes, cortinas, briquedos de pelúcia, colcha de chenile e tudo o que possa acumular poeira.
b) As cortinas devem ser substituídas por persianas laváveis ou devem ser utilizadas cortinas de tecido leve, que possam ser lavadas a cada 15 dias no máximo.
c) Os cobertores devem ser substituídos por ededrons (enchimento de acrílico) que possam ser lavados quinzenalmente.
d) Forrar colchões e travesseiros de todas as camas com tecido emborrachado ou napa (existem no mercado capas anti-ácaros disponíveis). Caso não seja possível utilizar capa, expor o colchão ao sol, durante 3 horas, uma vez por semana. As partes expostas das camas, não recorbetas com as capas, deverão ser limpas com frequência. Pelo menos uma vez por mês retirar o colchão e limpar o estrado da cama.
e) O chão deve ser de material liso. Evitar pisos revestidos com alcatifas e tapetes.
f) Se necessário usar ventilador, limpá-lo com pano úmido diariamente.
g) Lavar mosqueteiros duas vezes por semana e trocar roupas de cama três vezes por semana.
h) Manter o quarto bem arejado e ensolarado.

Ambulatório de Alergia e Imunologia Infantil
Hospital das Clínicas - 1° andar
Av. Prof. Moraes Rego S/N CEP 50.670-420
Tel/Fax: (0**81) 2126.3918/3917

3- Cuidados com a casa:

a) Para limpar o piso, utilizar pano úmido.
b) Evitar usar vassouras ou espanadores, para não levantar poeira.
c) Não usar material de limpeza com cheiro forte (cera, querosene, lustra-móveis desinfetantes, inseticidas).
d) Limpar a mobília do quarto e da casa com pano úmido com frequência superior a três vezes por semana.
e) A criança não deve estar presente no horário da limpeza da casa.
f) Construções ou reformas devem ser evitadas ou o paciente deve ser retirado da casa Durante a excução das mesmas.
g) Evitar umidade, mofo, exposição à chuva. Nos locais onde haja mofo, borrifar água sanitária ou vinagre diluído em igual parte de água.
h) Evitar contato com animais domésticos (cão, gato, aves). Se a remoção do animal não for Possível, o mesmo deve ficar fora de casa e deve ser lavado o mais freqüentemente possível (uma vez por semana pelo menos).
I) NÃO FUMAR e cozinhar com lenha ou carvão dentro de casa.
j) Não utilizar talco, sabonetes ou xampus com odor forte. Usar produtos neutros (glicerinados, sem perfume).

4- Ter vida ao ar livre (passeios frequentes em praias, campos e parques).

5- Praticar esportes.

ANEXO C – Geração da sequência randomizada de alocação

(SEQUÊNCIA DA RANDOMIZAÇÃO MANTIDA EM SIGILO ATÉ A CONCLUSÃO DO ESTUDO)

A Randomization Plan from http://www.randomization.com

1. Placebo
2. Placebo
3. Probiótico
4. Probiótico
5. Probiótico
6. Probiótico
7. Placebo
8. Probiótico
9. Probiótico
10. Probiótico
11. Placebo
12. Probiótico
13. Probiótico
14. Probiótico
15. Probiótico
16. Placebo
17. Probiótico
18. Placebo
19. Placebo
20. Probiótico
21. Probiótico
22. Placebo
23. Placebo
24. Placebo
25. Probiótico
26. Probiótico
27. Placebo
28. Placebo
29. Probiótico
30. Placebo
31. Placebo
32. Probiótico
33. Probiótico
34. Placebo
35. Probiótico
36. Probiótico
37. Probiótico
38. Placebo
39. Placebo
40. Probiótico
41. Probiótico
42. Placebo
43. Placebo
44. Placebo
45. Placebo
46. Probiótico

47. Probiótico_____
48. Placebo_____
49. Placebo_____
50. Probiótico_____
51. Probiótico_____
52. Placebo_____
53. Placebo_____
54. Probiótico_____
55. Placebo_____
56. Placebo_____
57. Placebo_____
58. Probiótico_____
59. Placebo_____
60. Placebo_____

ANEXO D - Viabilidade Microbiológica dos Probióticos

BioLogicus

Análise Microbiológica 0001/2015

Tipo de Amostra: Probióticos BioLogicus
Análise: Bactérias e Leveduras
Amostra destinada a Teste Clínico

Contagem Microbiológica UFC/g

TEMPO (Dias)	Data	LINHAGENS	CONTAGEM
0	11/04/2014	Bactérias Lácticas	$1,0 \times 10^8$
		Leveduras	$1,6 \times 10^5$
30	12/05/2014	Bactérias Lácticas	$3,0 \times 10^8$
		Leveduras	$1,4 \times 10^5$
60	11/06/2014	Bactérias Lácticas	$2,5 \times 10^8$
		Leveduras	$1,3 \times 10^5$
90	11/07/2014	Bactérias Lácticas	$2,0 \times 10^8$
		Leveduras	$1,5 \times 10^5$
120	11/08/2014	Bactérias Lácticas	$1,8 \times 10^8$
		Leveduras	$1,3 \times 10^5$
150	12/09/2014	Bactérias Lácticas	$1,6 \times 10^8$
		Leveduras	$1,2 \times 10^5$
180	10/10/2014	Bactérias Lácticas	$1,0 \times 10^8$
		Leveduras	$1,0 \times 10^5$
240	12/11/2014	Bactérias Lácticas	$1,1 \times 10^8$
		Leveduras	$1,2 \times 10^5$
270	12/12/2014	Bactérias Lácticas	$2,0 \times 10^8$
		Leveduras	$1,0 \times 10^5$
300	12/01/2015	Bactérias Lácticas	$1,5 \times 10^8$
		Leveduras	$1,3 \times 10^5$

Responsável Técnico:
Clarissa Sá

BioLogicus Indústria e Comércio de Produtos Naturais S.A.
Av. Professor Luis Freire, 700 Bl C, Sl 15 e 16 . Curado
Tel: +55 81 3183.4245 . +55 81 3183.4295
CEP: 50740-540 . Recife . PE . Brasil
Site: www.biologicus.com.br

ANEXO E - *Check list* do *CONSORT*

Seção/Tópico	Item No	Itens da Lista	Relatado na página
Título e Resumo			
	1a	Identificar no título como um estudo clínico randomizado	96
	1b	Resumo estruturado de um desenho de estudo, métodos, resultados e conclusões para orientação específica	97
Introdução			
Fundamentação e	2a	Fundamentação científica e explicação do raciocínio	101
objetivos	2b	Objetivos específicos ou hipóteses	102
Métodos			
Desenho	3a	Descrição do estudo clínico (como paralelo) incluindo a taxa de alocação	103
Participantes	4a	Critérios de elegibilidade para participantes	104
	4b	Informações e locais de onde foram coletados os dados	103
Intervenções	5	As intervenções de cada grupo com detalhes suficientes que permitam a replicação, incluindo como e quando foram administrados	104
Desfechos	6a	Desfechos primários e secundários, incluindo como e quando elas foram avaliados	103
	6b	Quaisquer alterações nos desfechos após o estudo clínico ter sido iniciado, com as razões	----
Amostra	7a	Como foi determinado o tamanho da amostra	105
Randomização:			
Seqüência	8a	Método utilizado para geração de sequência randomizada de alocação	105
	8b	Tipos de randomização, detalhes de qualquer restrição (tais como randomização por blocos e tamanho do bloco)	106
Alocação e ocultação	9	Mecanismo utilizado para implementar a sequência de alocação randomizada (como recipientes numerados sequencialmente), descrevendo os passos seguidos para a ocultação da sequência até as intervenções serem atribuídas	106
Implementação	10	Quem gerou a sequência de alocação randomizada, quem inscreveu os participantes e quem atribuiu as intervenções aos participantes	106
Cegamento	11a	Se realizado, quem foi cegado após as intervenções serem atribuídas (ex. Participantes, cuidadores, assessores de resultado) e como	106
	11b	Se relevante, descrever a semelhança das intervenções	106
Métodos estatísticos	12a	Métodos estatísticos utilizados para comparar os grupos para desfechos primários e secundários	110

Resultados			
Fluxo de participantes (diagrama)	13a	Para cada grupo, o número de participantes que foram randomicamente atribuídos, que receberam o tratamento pretendido e que foram analisados para o desfecho primário	111
	13b	Para cada grupo, perdas e exclusões após a randomização, junto com as razões	122
Recrutamento	14a	Definição das datas de recrutamento e períodos de acompanhamento	122
Dados de Base	15	Tabela apresentando os dados de base demográficas e características clínicas de cada grupo	123
Números analisados	16	Para cada grupo, número de participantes (denominador) incluídos em cada análise e se a análise foi realizada pela atribuição original dos grupos	123
Desfechos e estimativa	17a	Para cada desfecho primário e secundário, resultados de cada grupo e o tamanho efetivo estimado e sua precisão (como intervalo de confiança de 95%)	124
	17b	Para desfechos binários, é recomendada a apresentação de ambos os tamanhos de efeito, absolutos e relativos	125
Análises auxiliares	18	Resultados de quaisquer análises realizadas	125
Danos	19	Todos os importantes danos ou efeitos indesejados em cada grupo	111
Discussão			
Limitações	20	Limitações do estudo clínico, abordando as fontes dos potenciais viéses, imprecisão, e, se relevante, relevância das análises	115
Generalização	21	Generalização (validade externa, aplicabilidade) dos achados do estudo clínico	116
Interpretação	22	Interpretação consistente dos resultados, balanço dos benefícios e danos, considerando outras evidências relevantes	116
Outras informações			
Registro	23	Número de inscrição e nome do estudo clínico registrado	97
Protocolo	24	Onde o protocolo completo do estudo clínico pode ser acessado, se disponível	97
Fomento	25	Fontes de financiamento e outros apoios (como abastecimento de drogas), papel dos financiadores	117

ANEXO F - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos CEP-CCS-UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RECORRÊNCIA DE SIBILÂNCIA NO LACTENTE: FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO COM PROBIÓTICOS.

Pesquisador: Geórgia Véras de Araújo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 15798013.0.0000.5208

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: EMENDA

Justificativa: Prezados,

Data do Envio: 30/01/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 518.805

Data da Relatoria: 07/02/2014

Apresentação da Notificação:

A EMENDA foi apresentada para avaliação referente a alterações nos tópicos designados, de forma detalhada. O TCLE anterior, já anexado, previa realização de exames nos pacientes.

Objetivo da Notificação:

O pesquisador solicita a aprovação da EMENDA da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O TCLE anterior, já anexado, previa realização de exames nos pacientes e incluindo os riscos e

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

benefícios.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A EMENDA foi apresentada de forma adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Sem recoimendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer da EMENDA da pesquisa, tendo a mesma sido avaliada e aprovada para continuar a coleta de dados.

RECIFE, 31 de Janeiro de 2014

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

ANEXO G – Registro pelo *ClinicalTrials.gov*

ClinicalTrials.gov PRS
Protocol Registration and Results System

ClinicalTrials.gov Protocol and Results Registration System (PRS) Receipt
Release Date: 12/03/2014

Recurrent Wheezing in Infants: Risk Factors and Prevention With Probiotics.

This study has been completed.

Sponsor:	Universidade Federal de Pernambuco
Collaborators:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Information provided by (Responsible Party):	Geórgia Véras de Araújo, Universidade Federal de Pernambuco
ClinicalTrials.gov Identifier:	NCT02113072

Purpose

The purpose of this study is to evaluate whether Probiotics promote reduction of recurrent wheezing in infants, stimulating the immune system to Th1 response.

Condition	Intervention	Phase
Respiratory Tract Diseases Wheezing	Drug: Beclomethasone Drug: Probiotics Drug: Placebo	Phase 3

Study Type: Interventional
Study Design: Treatment, Parallel Assignment, Double Blind (Subject, Investigator), Randomized, Safety/Efficacy Study
Official Title: Recurrent Wheezing in Infants: Risk Factors and Prevention With Probiotics, a Randomized Clinical Trial, Double-blind, Placebo Controlled.

Further study details as provided by Geórgia Véras de Araújo, Universidade Federal de Pernambuco:

Primary Outcome Measure:

- Recurrent wheezing and cytokine assay. [Time Frame: After 2 months of using probiotic, will be assessed the recurrence of wheezing and cytokine assay.] [Designated as safety issue: Yes]

  After eight weeks of using probiotics, infants will undergo new measurement of cytokines IL-10, IL-12 and INF-γ, with the objective to evaluate the immune response of probiotics in both groups.

  Before and at the end of each period, the patient will undergo physical examination and parents or guardians to an interview, to assess the occurrence of wheezing attacks.

  These data will be analyzed to assess whether supplementation with probiotics reduces the frequency of wheezing in infants.

Enrollment: 60
Study Start Date: April 2014
Primary Completion Date: August 2014

ANEXO H – Chamada Pública MCTI/CNPq Nº 14/2013 – Universal

Edital: Chamada Pública MCTI/CNPq Nº 14/2013 - Universal - Universal 14/2013 - Faixa C - até R$ 120.000,00
Beneficiário: Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho
Processo: 472100/2013-0
Título: RECORRÊNCIA DE SIBILÂNCIA NO LACTENTE: FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO COM PROBIÓTICOS.
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco / UFPE - PE

TERMO DE ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO A PROPOSTA DE NATUREZA CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E/OU DE INOVAÇÃO

Processo: 472100/2013-0

Titulo do Projeto: RECORRÊNCIA DE SIBILÂNCIA NO LACTENTE: FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO COM PROBIÓTICOS.
Instituição de Vínculo: Universidade Federal de Pernambuco/UFPE-PE
CNPJ: 24134488000108
Instituição de Execução: Universidade Federal de Pernambuco
CNPJ: 24134488000108
Chamada: Universal 14/2013

Eu, Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho, 147.395.854-72, declaro conhecer, concordar e atender integralmente às exigências Nº CPF (ou PASSAPORTE, se estrangeiro) da Chamada acima especificada e às Condições Gerais para Apoio Financeiro que regem a concessão dos recursos especificados abaixo: AUXÍLIO FINANCEIRO

Custeio: R$ 65.000,00
Valor Global: R$ 65.000,00

ANEXO I - Instruções aos autores para o periódico Jornal de Pediatria

Jornal de Pediatria | Instruções aos autores

O Jornal de Pediatria é a publicação científica da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP), com circulação regular desde 1934. Todo o conteúdo do Jornal de Pediatria está disponível em português e inglês no site http://www.jped.com.br, que é de livre acesso. O Jornal de Pediatria é indexado pelo Index Medicus/ MEDLINE (http://www.pubmed.gov), SciELO (http://www.scielo.org), LILACS (http://www.bireme.br/abd/P/lilacs.htm), EMBASE/ Excerpta Medica (http://www.embase.com), Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) Data Bases (http://www.siicsalud.com), Medical Research Index (http://www.purplehealth.com/medical-research-index.htm) e University Microfilms International.

O Jornal de Pediatria publica resultados de investigação clínica em pediatria e, excepcionalmente, de investigação científica básica. Aceita-se a submissão de artigos em português e inglês. Na versão impressa da revista, os artigos são publicados em inglês. No site, todos os artigos são publicados em português e inglês, tanto em HTML quanto em PDF. A grafia adotada é a do inglês americano. Por isso, recomenda-se que os autores utilizem a língua com a qual se sintam mais confortáveis e confiantes de que se comunicam com mais clareza. Se um determinado artigo foi escrito originalmente em português, não deve ser submetido em inglês, a não ser que se trate de uma tradução com qualidade profissional. Observação importante: A língua oficial de publicação do Jornal de Pediatria é o inglês e todo o site de submissão é apresentado exclusivamente em inglês.

Processo de revisão (Peer review) Todo o conteúdo publicado pelo Jornal de Pediatria passa por processo de revisão por especialistas (peer review). Cada artigo submetido para apreciação é encaminhado aos editores, que fazem uma revisão inicial quanto aos padrões mínimos de exigência do Jornal de Pediatria e ao atendimento de todas as normas requeridas para envio dos originais. A seguir, remetem o artigo a dois revisores especialistas na área pertinente, selecionados de um cadastro de revisores. Os revisores são sempre de instituições diferentes da instituição de origem do artigo e são cegos quanto à identidade dos autores e ao

local de origem do trabalho. Após receber ambos os pareceres, o Conselho Editorial os avalia e decide pela aceitação do artigo sem modificações, pela recusa ou pela devolução aos autores com as sugestões de modificações. Conforme a necessidade, um determinado artigo pode retornar várias vezes aos autores para esclarecimentos e, a qualquer momento, pode ter sua recusa determinada. Cada versão é sempre analisada pelo Conselho Editorial, que detém o poder da decisão final.

Tipos de artigos publicados

O Jornal de Pediatria aceita a submissão espontânea de artigos originais, artigos especiais e cartas ao editor. Artigos originais incluem estudos controlados e randomizados, estudos de testes diagnósticos e de triagem e outros estudos descritivos e de intervenção, bem como pesquisa básica com animais de laboratório. O texto deve ter no máximo 3.000 palavras, excluindo tabelas e referências; o número de referências não deve exceder 30. O número total de tabelas e figuras não pode ser maior do que quatro.

Artigos que relatam ensaios clínicos com intervenção terapêutica (clinical trials) devem ser registrados em um dos Registros de Ensaios Clínicos listados pela Organização Mundial da Saúde e pelo International Committee of Medical Journal Editors. Na ausência de um registro latino-americano, o Jornal de Pediatria sugere que os autores utilizem o registro www.clinicaltrials.gov, dos National Institutes of Health (NIH). O número de identificação deve ser apresentado ao final do resumo.

Artigos especiais são textos não classificáveis nas demais categorias, que o Conselho Editorial julgue de especial relevância. Sua revisão admite critérios próprios, não havendo limite de tamanho ou exigências prévias quanto à bibliografia.

Cartas ao editor devem comentar, discutir ou criticar artigos publicados no Jornal de Pediatria. O tamanho máximo é de 1.000 palavras, incluindo no máximo seis referências bibliográficas. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada junto com a carta.

São publicados, mediante convite, editoriais, comentários e artigos de revisão. Autores não convidados podem também submeter ao Conselho Editorial uma proposta para publicação de artigos dessas classificações. Editoriais e comentários, que geralmente se referem a artigos selecionados, são encomendados a autoridades em áreas específicas. O Conselho Editorial também analisa propostas de comentários submetidas espontaneamente.

Artigos de revisão são avaliações críticas e ordenadas da literatura em relação a temas de importância clínica, com ênfase em fatores como causas e prevenção de doenças, seu diagnóstico, tratamento e prognóstico – em geral são escritos, mediante convite, por profissionais de reconhecida experiência. Meta-análises são incluídas nesta categoria. Autores não convidados podem também submeter ao Conselho Editorial uma proposta de artigo de revisão, com um roteiro. Se aprovado, o autor pode desenvolver o roteiro e submetê-lo para publicação. Artigos de revisão devem limitar-se a 6.000 palavras, excluindo referências e tabelas. As referências bibliográficas devem ser atuais e em número mínimo de 30.

Orientações gerais

O arquivo original – incluindo tabelas, ilustrações e referências bibliográficas – deve estar em conformidade com os "Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas", publicado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (http://www.icmje.org).

Cada seção deve ser iniciada em nova página, na seguinte ordem: página de rosto, resumo em português, resumo em inglês, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas (cada tabela completa, com título e notas de rodapé, em página separada), figuras (cada figura completa, com título e notas de rodapé, em página separada) e legendas das figuras. A seguir, as principais orientações sobre cada seção:

Página de rosto

A página de rosto deve conter todas as seguintes informações:

a) título do artigo, conciso e informativo, evitando termos supérfluos e abreviaturas; evitar também a indicação do local e da cidade onde o estudo foi realizado;
Instruções aos autores
b) título abreviado (para constar no topo das páginas), com máximo de 50 caracteres, contando os espaços;
c) nome de cada um dos autores (primeiro nome e o último sobrenome; todos os demais nomes aparecem como iniciais);
d) apenas a titulação mais importante de cada autor;
e) endereço eletrônico de cada autor;
f) informar se cada um dos autores possui currículo cadastrado na plataforma Lattes do CNPq;
g) a contribuição específica de cada autor para o estudo;

h) declaração de conflito de interesse (escrever "nada a declarar" ou a revelação clara de quaisquer interesses econômicos ou de outra natureza que poderiam causar constrangimento se conhecidos depois da publicação do artigo);
i) definição de instituição ou serviço oficial ao qual o trabalho está vinculado para fins de registro no banco de dados do Index Medicus/MEDLINE;
j) nome, endereço, telefone, fax e endereço eletrônico do autor responsável pela correspondência;
k) nome, endereço, telefone, fax e endereço eletrônico do autor responsável pelos contatos pré-publicação;
l) fonte financiadora ou fornecedora de equipamento e materiais, quando for o caso;
m) contagem total das palavras do texto, excluindo resumo, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas e legendas das figuras;
n) contagem total das palavras do resumo;
o) número de tabelas e figuras.

Resumo

O resumo deve ter no máximo 250 palavras ou 1.400 caracteres, evitando o uso de abreviaturas. Não se devem colocar no resumo palavras que identifiquem a instituição ou cidade onde foi feito o artigo, para facilitar a revisão cega. Todas as informações que aparecem no resumo devem aparecer também no artigo. O resumo deve ser estruturado conforme descrito a seguir:

Resumo de artigo original

Objetivo: informar por que o estudo foi iniciado e quais foram as hipóteses iniciais, se houve alguma. Definir precisamente qual foi o objetivo principal e informar somente os objetivos secundários mais relevantes.

Métodos: informar sobre o delineamento do estudo (definir, se pertinente, se o estudo é randomizado, cego, prospectivo, etc.), o contexto ou local (definir, se pertinente, o nível de atendimento, se primário, secundário ou terciário, clínica privada, institucional, etc.), os pacientes ou participantes (definir critérios de seleção, número de casos no início e fim do estudo, etc.), as intervenções (descrever as características essenciais, incluindo métodos e duração) e os critérios de mensuração do desfecho.

Resultados: informar os principais dados, intervalos de confiança e significância estatística dos achados.

Conclusões: apresentar apenas aquelas apoiadas pelos dados do estudo e que contemplem os objetivos, bem como sua aplicação prática, dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares.

Resumo de artigo de revisão

Objetivo: informar por que a revisão da literatura foi feita, indicando se enfatiza algum fator em especial, como causa, prevenção, diagnóstico, tratamento ou prognóstico.

Fontes dos dados: descrever as fontes da pesquisa, definindo as bases de dados e os anos pesquisados. Informar sucintamente os critérios de seleção de artigos e os métodos de extração e avaliação da qualidade das informações.

Síntese dos dados: informar os principais resultados da pesquisa, sejam quantitativos ou qualitativos.

Conclusões: apresentar as conclusões e suas aplicações clínicas, limitando generalizações ao escopo do assunto em revisão.

Após o resumo, inclua de três a seis palavras-chave que serão usadas para indexação. Utilize termos do Medical Subject Headings (MeSH), disponíveis em http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html. Quando não estiverem disponíveis descritores adequados, é possível utilizar termos novos.

Abreviaturas

Devem ser evitadas, pois prejudicam a leitura confortável do texto. Quando usadas, devem ser definidas ao serem mencionadas pela primeira vez. Jamais devem aparecer no título e nos resumos.

Texto

O texto dos artigos originais deve conter as seguintes seções, cada uma com seu respectivo subtítulo:

a) Introdução: sucinta, citando apenas referências estritamente pertinentes para mostrar a importância do tema e justificar o trabalho. Ao final da introdução, os objetivos do estudo devem ser claramente descritos.

b) Métodos: descrever a população estudada, a amostra e os critérios de seleção; definir claramente as variáveis e detalhar a análise estatística; incluir referências padronizadas sobre os métodos estatísticos e informação de eventuais programas de computação. Procedimentos, produtos e equipamentos utilizados devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a reprodução do estudo. É obrigatória a inclusão de declaração de que todos os procedimentos tenham sido aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da instituição a que se vinculam os autores ou, na falta deste, por outro comitê de ética em pesquisa indicado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde.

c) Resultados: devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica. As informações contidas em tabelas ou figuras não devem ser repetidas no texto. Usar gráficos em vez de tabelas com um número muito grande de dados.

d) Discussão: deve interpretar os resultados e compará-los com os dados já descritos na literatura, enfatizando os aspectos novos e importantes do estudo. Discutir as implicações dos achados e suas limitações, bem como a necessidade de pesquisas adicionais. As conclusões devem ser apresentadas no final da discussão, levando em consideração os objetivos do trabalho. Relacionar as conclusões aos objetivos iniciais do estudo, evitando assertivas não apoiadas pelos achados e dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares. Incluir recomendações, quando pertinentes. O texto de artigos de revisão não obedece a um esquema rígido de seções. Sugere-se uma introdução breve, em que os autores explicam qual a importância da revisão para a prática pediátrica, à luz da literatura médica. Não é necessário descrever os métodos de seleção e extração dos dados, passando logo para a sua síntese, que, entretanto, deve apresentar todas as informações pertinentes em detalhe. A seção de conclusões deve correlacionar as ideias principais da revisão com as possíveis aplicações clínicas, limitando generalizações aos domínios da revisão.

Agradecimentos

Devem ser breves e objetivos, somente a pessoas ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas que não tenham preenchido os critérios de autoria. Integrantes da lista de agradecimento devem dar sua autorização por escrito para a divulgação de seus nomes, uma vez que os leitores podem supor seu endosso às conclusões do estudo.

Referências bibliográficas

As referências devem ser formatadas no estilo Vancouver, também conhecido como o estilo Uniform Requirements, que é baseado em um dos estilos do American National Standards Institute, adaptado pela U.S. National Library of Medicine (NLM) para suas bases de dados. Os autores devem consultar Citing Medicine, The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed) para informações sobre os formatos recomendados para uma variedade de tipos de referências. Podem também consultar o site "sample references"
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html), que contém uma lista de exemplos extraídos ou baseados em Citing Medicine, para uso geral facilitado; essas amostras de referências são mantidas pela NLM. As referências bibliográficas devem ser numeradas e ordenadas segundo a ordem de aparecimento no texto, no qual devem ser identificadas pelos algarismos arábicos respectivos sobrescritos.

Para listar as referências, não utilize o recurso de notas de fim ou notas de rodapé do Word. Artigos aceitos para publicação, mas ainda não publicados, podem ser citados desde que indicando a revista e que estão "no prelo". Observações não publicadas e comunicações pessoais não podem ser citadas como referências; se for imprescindível a inclusão de informações dessa natureza no artigo, elas devem ser seguidas pela observação "observação não publicada" ou "comunicação pessoal" entre parênteses no corpo do artigo.

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados conforme recomenda o Index Medicus; uma lista com suas respectivas abreviaturas pode ser obtida através da publicação da NLM "List of Serials Indexed for Online Users", disponível no endereço http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html. Para informações mais detalhadas, consulte os "Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas". Este documento está disponível em http://www.icmje.org/.

Abaixo, apresentamos alguns exemplos do modelo adotado pelo Jornal de Pediatria:

Artigos em periódicos:

1. Até seis autores:

Araújo LA, Silva LR, Mendes FA. Digestive tract neural control and gastrointestinal disorders in cerebral palsy. J Pediatr (Rio J). 2012;88:455-64.

2. Mais de seis autores:

Ribeiro MA, Silva MT, Ribeiro JD, Moreira MM, Almeida CC, Almeida-Junior AA, et al. Volumetric capnography as a tool to detect early peripheric lung obstruction in cystic fibrosis patients. J Pediatr (Rio J). 2012;88:509-17.

3. Organização como autor:

Mercier CE, Dunn MS, Ferrelli KR, Howard DB, Soll RF; Vermont Oxford Network ELBW Infant Follow-Up Study Group. Neurodevelopmental outcome of extremely low birth weight infants from the Vermont Oxford network: 1998-2003. Neonatology. 2010;97:329-38.

4. Sem autor:

Informed consent, parental permission, and assent in pediatric practice. Committee on Bioethics, American Academy of Pediatrics. Pediatrics. 1995;95:314-7.

5. Artigos com publicação eletrônica ainda sem publicação impressa:

Carvalho CG, Ribeiro MR, Bonilha MM, Fernandes Jr M, Procianoy RS, Silveira RC. Use of off-label and unlicensed drugs in the neonatal intensive care unit and its association with severity scores. J Pediatr (Rio J). 2012 Oct 30. [Epub ahead of print]

Livros:

Blumer JL, Reed MD. Principles of neonatal pharmacology. In: Yaffe SJ, Aranda JV, eds. Neonatal and Pediatric Pharmacology. 3rd ed. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins; 2005. p. 146-58.

Trabalhos acadêmicos:

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant, MI: Central Michigan University; 2002.

CD-ROM:

Anderson SC, Poulsen KB. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

Homepage/website:

R Development Core Team [Internet]. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2003 [cited 2011 Oct 21]. Available from: http://www.R-project.org

Documentos do Ministério da Saúde:

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde: cuidados gerais. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. v. 1. 192p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

Apresentação de trabalho:

Bugni VM, Okamoto KY, Ozaki LS, Teles FM, Molina J, Bueno VC, et al. Development of a questionnaire for early detection of factors associated to the adherence to treatment of children and adolescents with chronic rheumatic diseases - "the Pediatric Rheumatology

Adherence Questionnaire (PRAQ)". Paper presented at the ACR/ARHP Annual Meeting; November 5-9, 2011; Chicago, IL.

Tabelas

Cada tabela deve ser apresentada em folha separada, numerada na ordem de aparecimento no texto, e conter um título sucinto, porém explicativo. Todas as explicações devem ser apresentadas em notas de rodapé e não no título, identificadas com letras sobrescritas em ordem alfabética. Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas e não usar espaços para separar colunas. Não usar espaço em qualquer lado do símbolo ±.

Instruções aos autores Figuras (fotografias, desenhos, gráficos, etc.)

Todas as figuras devem ser numeradas na ordem de aparecimento no texto. Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas, inclusive acerca das abreviaturas utilizadas. Figuras reproduzidas de outras fontes já publicadas devem indicar esta condição na legenda, assim como devem ser acompanhadas por uma carta de permissão do detentor dos direitos. Fotos não devem permitir a identificação do paciente; tarjas cobrindo os olhos podem não constituir proteção adequada. Caso exista a possibilidade de identificação, é obrigatória a inclusão de documento escrito fornecendo consentimento livre e esclarecido para a publicação. Microfotografias devem apresentar escalas internas e setas que contrastem com o fundo.

As ilustrações são aceitas em cores para publicação no site. Contudo, todas as figuras serão vertidas para o preto e branco na versão impressa. Caso os autores julguem essencial que uma determinada imagem seja colorida mesmo na versão impressa, solicita-se um contato especial com os editores. Imagens geradas em computador, como gráficos, devem ser anexadas sob a forma de arquivos nos formatos jpg, gif ou tif, com resolução mínima de 300 dpi, para possibilitar uma impressão nítida; na versão eletrônica, a resolução será ajustada para 72 dpi. Gráficos devem ser apresentados somente em duas dimensões, em qualquer circunstância. Desenhos, fotografias ou quaisquer ilustrações que tenham sido digitalizadas por escaneamento podem não apresentar grau de resolução adequado para a versão impressa da revista; assim, é preferível que sejam enviadas em versão impressa original (qualidade profissional, a nanquim ou impressora com resolução gráfica superior a 300 dpi). Nesses casos, no verso de cada figura deve ser colada uma etiqueta com o seu número, o nome do primeiro autor e uma seta indicando o lado para cima.

Legendas das figuras

Devem ser apresentadas em página própria, devidamente identificadas com os respectivos números.

Lista de verificação

Como parte do processo de submissão, os autores são solicitados a indicar sua concordância com todos os itens abaixo; a submissão pode ser devolvida aos autores que não aderirem a estas diretrizes.

1. Todos os autores concordam plenamente com a Nota de Copyright.
2. O arquivo de submissão foi salvo como um documento do Microsoft Word.
3. A página de rosto contém todas as informações requeridas, conforme especificado nas diretrizes aos autores.
4. O resumo e as palavras-chave estão na língua de submissão (inglês ou português), seguindo a página de rosto.
5. O texto é todo apresentado em espaço duplo, utiliza fonte tamanho 12 e itálico em vez de sublinhado para indicar ênfase (exceto em endereços da internet). Todas as tabelas, figuras e legendas estão numeradas na ordem em que aparecem no texto e foram colocadas cada uma em página separada, seguindo as referências, no fim do arquivo.
6. O texto segue as exigências de estilo e bibliografia descritas nas normas de publicação.
7. As referências estão apresentadas no chamado estilo de Vancouver e numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto.
8. Informações acerca da aprovação do estudo por um conselho de ética em pesquisa são claramente apresentadas no texto, na seção de métodos.
9. Todos os endereços da internet apresentados no texto (p.ex., http://www.sbp.com.br) estão ativos e prontos para serem clicados.

ANEXO J - Parecer do Jornal de Pediatria: Artigo submetido em 30/01/2015 e aceito em 19/03/2015.

Date: Apr 07, 2015
To: "Georgia Veras Araujo" georgiaveras@uol.com.br,sgueiros@uol.com.br
From: "Jornal de Pediatria" jped@jped.com.br
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: JPED-D-15-00054R3
Title: Probióticos no tratamento das infecções do trato respiratório superior e inferior nas crianças: revisão sistemática baseada em ensaios clínicos randomizados
Jornal de Pediatria

Dear Georgia,

Informamos com satisfação que seu artigo "Probióticos no tratamento das infecções do trato respiratório superior e inferior nas crianças: revisão sistemática baseada em ensaios clínicos randomizados" foi aceito para publicação e está programado para a edição nº 5 (Set/Out), ano de 2015, do Jornal de Pediatria. Essa programação ainda pode ser alterada de acordo com a necessidade da Editora.

Precisamos ainda de 2 pequenas alterações que devem ser feitas no arquivo anexo (Veja em "View Review attachments"): colocar a chamada para a figura 1 no texto e colocar a data de acesso ao site, pois consta apenas a data de atualização. Por favor envie por e-mail para jped@jped.com.br

Solicitamos aos autores, também, enviarem a carta de submissão anexa, assinada, via correio, de preferência até o dia 15/04. O endereço está na carta (Veja em "View Review attachments").

Como o artigo ainda passará por diversas revisões de formato, linguagem e tradução, talvez ainda seja necessário pedir algumas informações aos autores, por isso pedimos manter seu e-mail atualizado, também para o envio das provas em pdf, posteriormente.

Agradecemos escolher o Jornal de Pediatria para enviar seu artigo.

Atenciosamente,

Maria de Fátima Machado
Editorial Assistance
Jornal de Pediatria
jped@jped.com.br
+55(51)3328.9520
+55(51)3392.5308

****
For further assistance, please visit our customer support site at http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO K - Instruções aos autores para o periódico *Clinical Et Experimental Allergy*

Author Guidelines

NEW: CrossCheck Plagiarism Software

We would like to inform our authors that we now detect plagiarism easily. The journal to which you are submitting your manuscript employs the CrossCheck plagiarism screening system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Ethical policy and guidelines

Please read the Ethical Policies of *Clinical & Experimental Allergy*.

Clinical & Experimental Allergy encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the International Committee of Medical Journal Editors.

Clinical & Experimental Allergy will not consider papers that have been accepted for publication or published elsewhere. Copies of existing manuscripts with potentially overlapping or duplicative material should be submitted together with the manuscript, so that the Editors can judge suitability for publication. The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds.

Authors are required to provide details of the relevant ethical approval committee together with the ethics approval number in the Methods section of their paper at submission stage.

Authors are required to provide a statement confirming whether the informed consent was written or verbal. If the consent was verbal, please provide us with details of the measures taken to document the process. In cases where minors are participants in the study, a statement must be provided confirming whether written informed consent was obtained from the parents of the participants.

The editors expect that the majority of papers published in *Clinical & Experimental Allergy* will have obtained ethical approval for work on humans and animals and in the case of human studies, informed written consent. There may be some exceptions (for example retrospective

reviews of anonymised clinical records), in which case a letter (translated into English if necessary) from the relevant ethics committee stating that ethical permission was not required must be included.

Clinical trials should be registered and publications must include the registration number and name of the trial register. If these are not available, please provide an explanation.

For more detailed ethical guidelines please visit:

http://authorservices.wiley.com/bauthor/publicationethics.asp

Submission of manuscripts. Manuscripts should be submitted online through the CEA ScholarOne Manuscripts website at http://mc.manuscriptcentral.com/cea.

The Journal will accept for publication suitable manuscripts dealing with the aetiology, diagnosis and treatment of allergic (and related) diseases. These might include the study of methods of controlling allergic reactions, human and animal models of hypersensitivity and other aspects of basic and applied clinical allergy in its broadest sense including clinical trials.

The Journal also publishes solicited and unsolicited review articles on subjects of topical interest to experimental and clinical allergists. It does not in general publish papers of a primarily methodological nature. Editorials are by invitation only. The Journal does not publish case reports; authors of case reports are encouraged to submit to Wiley's open access journal *Clinical Case Reports*.

Papers are accepted on the understanding that no substantial part has been, or will be, published elsewhere, in whole or in part, and once papers have been accepted they remain the copyright of the Journal.

Genetic association studies. Papers reporting genetic association studies will be expected to conform to the guidelines set out by Hall and Blakey (Hall IP, Blakey JD. Thorax 2005; 60:357-9.)

For the recommendations of *Clinical & Experimental Allergy* for studies that include airway function measurements in mouse models, please see: Inman MD. Trends and recommendations in studies of mouse airway function. Clin Exp Allergy 2010;40:524-7. Briefly, the recommendations are as follows. Some journals have taken the view that Penh

measurements are not acceptable unless they have been validated by direct measurements in the particular model system being used in the study. This is not the position of *Clinical & Experimental Allergy*. While we recognize the limitations of the technique and it is important that authors take these limitations into account when presenting their paper, mandatory usage of direct measurement systems will not be required for submission. The need for direct airway function measurements will be assessed on an individual basis and the editors reserve the right to request direct measurements when deemed important to the overall message of the paper. This is particularly likely to be the case when a novel functional finding is being reported.

Correspondence and Reply. If space is available and the subject is of sufficient interest, correspondence concerning recent publications in the journal is occasionaly published. Because of space limitations, publication will depend on priority rating and letters that confirm previously published material without adding significant new information are less likely to be published. The authors of the original work will be invited to respond to any letters commenting on their manuscript. In the first instance authors who wish to comment on a published paper must submit the letter electronically to the Editorial Office (catherine@bsaci.org). Correspondence should **not** be submitted online.

Electronic files of the manuscript contents must be uploaded at the CEA ScholarOne Manuscripts website at http://mc.manuscriptcentral.com/cea, and the onscreen steps should be followed to submit the manuscript to the Editorial Office. **Manuscripts that do not conform to guidelines will be delayed in processing.** Online submission ensures the quickest possible review and allows authors to track the progress of their papers online. If authors are not able to submit their manuscript online they should contact the Editorial Office by email (catherine@bsaci.org), or by telephone at 44 (0)1865 476 542.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions: http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services

http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html

and visit

http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: http://www.wiley.com/go/funderstatement.
For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:
Creative Commons Attribution License OAA
To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services:
http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html
and visit

http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html.

A Conflict of Interest form should accompany every submission and is available from the 'Instructions and Forms' section of the ScholarOne Manuscripts submission website at http://mc.manuscriptcentral.com/cea. This is a statement *signed by all the authors* indicating that the material is original and has not been submitted for publication elsewhere, that all authors have contributed significantly to the research and preparation, revision and final production of the manuscript and approve its submission.
Please note that, following the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), *Clinical and Experimental Allergy* requires authors to have registered their clinical trials on a publicly accessible database. Please see the ICMJE website (http://www.icmje.org) for details of the registration process.

Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley InterScience, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Manuscripts should be typed (double spacing) in A4 page format. The manuscript should be written in clear and concise English. Authors whose primary language is not English should obtain assistance with writing to avoid grammatical problems and delays in processing. Under normal circumstances articles should not exceed 10 printed pages (approximately 5000 words,

with no more than 8 illustrations (tables and/or figures). Longer articles are accepted at the discretion of the Editors.

The manuscript should be organized as follows: Title page, Abstract, Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References. Each section should begin on a new page. Pages should be numbered. The generic terms for all drugs and chemicals should be used.

The title page should include the full title of the paper, a condensed title for a running head, the list of authors and institutional affiliations, and the name, address, telephone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author who should be contacted regarding the manuscript.

Abstract: this should be no longer than 300 words and should summarise the results and conclusions concisely. Acronyms, references and tabular data should not be included. The abstract should be organized with the following subheadings: Background: why was the study performed? Objective: what is the purpose of the study? Methods: what were the principal methods used? Results: What are the most important findings? Conclusions & Clinical Relevance: What is the most important conclusion drawn, and what is the clinical relevance of the results?

Introduction: containing the reasons for doing the work.

Materials and Methods: sufficient information must be included to permit repetition of experimental work.

Results: these should be given concisely; the use of tables and figures to illustrate the same results will only rarely be allowed.

Discussion: the presentation of results should be separated from a discussion of their significance. This section should not repeat results.

Acknowledgements, conflict of interest, etc.: general acknowledgements for consultations, statistical analyses, and the like, including full names of individuals involved, as well as noting financial or other support of the research.

A conflict of interests statement must be included at the end of the manuscript. All authors must declare any relevant competing interests. The disclosure applies only to authors who have financial relationships with companies that have an interest in the subject matter of their manuscript. If appropriate, the statement should also be included at the end of the manuscript. If no conflict of interests exists, please include a statement to that effect. The Journal subscibes to the doctrine of BMJ Journals which states '*A competing interest exists when professional judgment concerning a primary interest (such as patients' welfare or the validity of the research) may be influenced by a secondary interest (such as financial gain or personal rivalry). It may arise for the authors of an article when they have a financial interest that may influence - probably without their knowing - their interpretation of their results or those of others. There is nothing inherently unethical about a conflict of interest but they should be acknowledged and openly stated*'.

References (see below)

Figure legends, tables and figures

Ethics. All human and animal studies must be approved by an appropriate ethics committee or review board (depending on local arrangements), and a statement to this effect should be included in the methods section, or the reasons why it was not necessary if this is the case. The statement should include the name of the ethics committee and its approval number for the study concerned. All clinical investigations must have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki (http://www.wma.net).

Units and abbreviations. The Journal recognizes the adoption of the Systéme International d'Unités (SI Units) proposed in Units, Symbols and Abbreviations (1972) published by the Royal Society of Medicine, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE.

Abbreviations included in the list published *Clin Exp Allergy* 2004; **34**:160-2 need not be written in full. Other abbreviations should only be used when they occur frequently. Please go to this link for the list.

References. It is the author's responsibility to ensure the accuracy of the references. Authors are expected to perform a comprehensive search of the literature to gather the most current articles relative to the subject matter. References in the manuscript text should follow the Vancouver style. They should appear as numbers in square brackets or they may follow

authors' names in the text if necessary. The reference list should show the references in numerical (not alphabetical) order. The full title of the paper should be given with first and last page numbers. The journal should be abbreviated according to the system adopted by *Index Medicus*.

For example:

Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R, Hargreave FE. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relations to late asthmatic response and change in airway caliber. J Allergy Clin Immunol 1982;70:170-7.

When the quotation is from a book the following format should be used, giving the relevant page or chapter number:

Antia FP. Clinical dietetics and nutrition. 2nd Edn. London: Oxford University Press, 1973.

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: WB Saunders, 1974:457-72.

Work that has not been accepted for publication and personal communications should not appear in the reference list. Work that has been accepted for publication should be included in the reference list stating the journal in which it is to appear.

References in Articles

We recommend the use of a tool such Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here:

http://www.refman.com/support/rmstyles.asp

Illustrations. Figures should be numbered (Arabic numerals) in the order they appear in the text. Legends to the figures should be typed on a separate sheet. For online submission and review purposes you may submit a PDF file. If your paper is accepted it is important that all electronic artwork is supplied to the editorial office in the correct format and resolution. It is recommended that you consult the publisher's Illustration guidelines at

http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp if you need advice on any aspect of preparing your artwork.

Tables should be typed on separate pages. They should be numbered consecutively with Arabic numerals, have a brief title, and be cited in the text. It should be possible to understand the information in a table without reading the text. The information in a very small table can be presented more economically as one or two sentences of text. Units should appear in parentheses in the column headings but not in the body of the table. Words or numerals should be repeated on successive lines; ditto should not be used.

Pre-Submission English-language editing and manuscript preparation
If you are not a native English speaker, we strongly recommend that you have your manuscript professionally edited before submission. Expert help (with translation, language editing, formatting, and figure preparation) to ensure that your manuscript is ready for submission can be found here: http://wileyeditingservices.com/en/. Professional editing is not compulsory, but will mean that reviewers are better able to read and assess your manuscript. Use of these resources does not guarantee acceptance or preference for publication in this journal.

Accepted Articles *Clinical & Experimental Allergy* now offers Accepted Articles for all articles within a short time of acceptance. Further to acceptance in *Clinical & Experimental Allergy*, the manuscripts of articles are immediately made publicly available online. 'Accepted Articles' have been peer-reviewed and accepted for formal publication, but have not been subject to copyediting, composition or proof correction. The service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Accepted Articles appear in PDF format only and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online at http://www.doi.org/faq.html

Neither the editors nor Wiley-Blackwell can be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in Accepted Articles; nor do the views and opinions expressed necessarily reflect those of the editors or Wiley-Blackwell.

Page proofs. Page proofs will be submitted to the contributor for minor corrections and should be returned to the journal production office within 3 days. Major alterations from the text cannot be accepted. The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs may be sent by fax if no e-mail address is available.

Offprints. Authors will be provided with electronic offprints of their paper. Paper offprints may be ordered at prices quoted on the order form that accompanies proofs, provided that the form is returned with the proofs. The cost is higher if the order form arrives too late for the main print run. Electronic offprints are sent to the corresponding author at his or her email address unless advised otherwise. Please ensure that the name, address and email address of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the corresponding author.

Data sharing. The journal supports the efforts to encourage open sharing of publication-related data. The journal adheres to the beliefs that authors should include in their publications the data, algorithms, or other information that is central or integral to the publication or make it freely and readily accessible; use public repositories for data whenever possible; and make patented material available under a licence for research use. For more information, see the NAS website:

http://books.nap.edu/books/0309088593/html/1.html.

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit:

http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp

NEW: Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit http://authorservices.wiley.com/bauthor/ for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Author material archive policy. Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all submitted hard copy and electronic material two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor at time of acceptance.

Clinical & Experimental Allergy collaborates with Wiley's open access journal *Immunity, Inflammation and Disease*, to enable rapid publication of good quality research that we are unable to accept for publication in *Clinical & Experimental Allergy*. Authors will be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the Editor of *Immunity, Inflammation and Disease*. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. The Editor of *Immunity, Inflammation and Disease* will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. *Immunity, Inflammation and Disease* is a Wiley Open Access journal and article publication fees apply. For more information please go to www.immunityinflammationdisease.com.