

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

ANA CAROLINA GARCIA DE LAS BALLONAS CAMPOLINA

**MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES COM ESPONDILOARTRITE AXIAL:
CORRELAÇÃO COM MARCADORES DE PERMEABILIDADE INTESTINAL,
CLÍNICOS E DIETÉTICOS**

Belo Horizonte
2022

ANA CAROLINA GARCIA DE LAS BALLONAS CAMPOLINA

**MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES COM ESPONDIARTRITE AXIAL:
CORRELAÇÃO COM MARCADORES DE PERMEABILIDADE INTESTINAL,
CLÍNICOS E DIETÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientadora: Prof. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite

Belo Horizonte
2022

043

Campolina, Ana Carolina Garcia de Las Ballonas.

Microbiota intestinal de pacientes com espondiartrite axial: correlação com marcadores de permeabilidade intestinal, clínicos e dietéticos [manuscrito] / Ana Carolina Garcia de Las Ballonas Campolina. – 2022.

84 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Caetano de Faria. Co-orientadora: Prof. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Espondilite Anquilosante. 3. Microbioma Gastrointestinal. 4. Inflamação. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ANA CAROLINA GARCIA DE LAS BALLONAS CAMPOLINA. Aos vinte e nove dias do mês de março de 2022 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Microbiota Intestinal de pacientes com Espondiloartrite Axial: Correlação com marcadores de permeabilidade intestinal, clínicos e dietéticos", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Rafael Rezende (Harvard Medical School), aprovada; Dra. Adriana César Bonomo (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz), aprovada; Dra. Simone Correa da Silva (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Angélica Thomaz Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de março de 2022.

Dr. Rafael Rezende (Harvard Medical School) *Rafael Rezende*

Dra. Adriana César Bonomo (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz) *Adriana Cesar Bonomo*

Dra. Simone Correa da Silva (Universidade de São Paulo)

Dra. Angélica Thomaz Vieira (UFMG) *Angélica Thomaz Vieira*

Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Coorientadora (UFMG)

Ana Maria Caetano de Faria

Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)

Leda Quercia Vieira

Dedico este trabalho a todos profissionais de saúde que se dedicam de coração para reduzir as dores do corpo e da alma de seus pacientes. E a todos os mestres que contribuíram para minha formação acadêmica ao longo da vida e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, e sempre, a Aquele que é a causa inicial de tudo, a luz que direciona nossos caminhos: Deus. Essência do amor, que sempre me deu muito mais do que mereço, como acréscimo de alegria, em sua infinita misericórdia.

Aos meus pais, que têm minha eterna gratidão e amor, base de tudo que tenho e sou hoje. Me ensinaram com seus erros e acertos, vários valores essenciais, como a importância da honestidade, independência e perseverança. Esta conquista é uma homenagem a todo amor que me dedicaram e tudo que me ajudaram a construir.

A meus irmãos, amigos e meu marido, pelo apoio e por entenderem que não pude estar ao lado deles ao longo destes 7 anos (mestrado + doutorado), como sempre tentei estar antes, e que compreenderam que era um sacrifício necessário para uma causa maior. Junto com meus pais, são meu tesouro mais valioso na vida.

Gostaria de agradecer em especial também, às mestres, mulheres fortes e sensacionais, que tenho enorme gratidão e foram a base essencial na construção da minha carreira acadêmica e da minha estória na pesquisa.

Primeiramente a minha Professora de imunologia na faculdade Maria José Ferreira Morato por tanta dedicação ao me introduzir neste mundo tão surpreende e intrigante da imunologia, o qual me apaixonei à “primeira vista”. Pensa numa professora que quase todo final de aula, ficava quase uma hora só para tirar minhas dúvidas.

À professora Juliana Estanislau, e seu enorme coração, que me recebeu de coração aberto, 8 anos após minha formação, com uma dúvida da clínica e que foi a porta inicial para minha entrada na vida de pesquisa. Além de toda sua contribuição quando eu era sua monitora na faculdade na disciplina de imunologia.

À professora Denise Carmona, que traz nos seus olhos e sorriso o amor de guiar, e que fez de uma dúvida da clínica, brotar uma semente adormecida, a paixão pela pesquisa, e quando dei por mim, já estava inserida neste mundo.

À professora Jacqueline Isaura Alvarez Leite, em especial, por ter me recebido mesmo estando tantos anos longe da vida acadêmica e trabalhando, sem poder me dedicar com exclusividade. Jacque Me deu ensinamentos valiosos e tenho uma gratidão enorme por ter me dado a oportunidade de realizar dois grandes sonhos: a pesquisa e ser professora.

Em especial também, a minha orientadora Professora Ana Maria Caetano de Farias, uma gratidão enorme. Cara, que mulher e pesquisadora sensacional. A primeira vez que a ouvi falar sobre imunologia de mucosas, me apaixonei pelo tema e já iniciei uma enorme admiração por ela. O que mais me admira na Ana é que mesmo sendo um gênio, ela é altamente humilde, e trata todos sempre com muito respeito, carinho e cuidado. Ela traz um carinho nos olhos ao nos orientar, um amor em nos ensinar, uma dedicação a pesquisa e ensino que são exemplares. Se eu já amava a imunologia, ela me fez amar mais ainda e especialmente a pesquisa. Eu sempre imaginava como deve ter sido a sensação de pessoas que tiveram a oportunidade de estudar com seus ídolos na área que amam, e hoje, eu sei esta sensação. Ana, você é minha eterna mestre, ídolo e modelo a seguir na vida e na carreira.

Em seguida, gostaria de agradecer a outros colegas que também colaboraram nesta minha trajetória.

Ao Dr, Gustavo Resende e toda sua equipe da reumatologia no Hospital das Clínicas de Belo Horizonte. Profissionais fantásticos, que atendem com carinho e muito conhecimento seus pacientes. Me receberam com muita atenção e carinho e me confirmaram a área clínica a qual quero me focar, a reumatologia. À professora Gilda por gentilmente nos ter ajudado a armazenar as amostras de fezes. E agradeço em especial ao Gustavo, que foi como um co-orientador ao longo do doutorado e sua colaboração foi essencial na pesquisa.

Ao prof. Aristoteles Goes, grande microbiologista e pesquisador, que também agiu como um co-orientador no meu doutorado, sempre ensinando num enorme entusiasmo e amor a pesquisa. Atencioso e também foi essencial na pesquisa.

A professora Tatiani Uceli Maioli por todo conhecimento passado, por ser sempre solícita em ajudar quando precisava e oferecer seu laboratório na faculdade de nutrição de apoio e pela sua colaboração na pesquisa.

A todos colegas do meu laboratório LIB, em especial a Giovanna, Ju, Nat, Marcos, Caixeta, Leandro e Dani Reis. E destacando, o Lucas Hanniel, meu ex-IC agora mestrando. Lucas, coração puro, dedicado e de um futuro brilhante pela frente, foi meu fiel escudeiro, participando de todas as etapas da pesquisa, desabafos e risadas.

A Julia, minha “velha-IC”, como ela dizia, que entrou no final, mas foi de grande ajuda e sempre sorrindo e dedicada.

Aos meus amigos do laboratório Labin, por sempre me receberem com carinho e atenção. Pelas risadas aos longos destes 7 anos. Especialmente a Paola, que sempre colabora nas minhas pesquisas, e “jogou muito bingo” comigo no doutorado.

A todos os professores do departamento, como a Patiu, Angélica, Flávio e outros, pela atenção e ensinamentos passados.

A professora Dra. Maria de Lourdes de Abreu, pelo carinho e atenção com que nos permitiu usar seu laboratório na faculdade de medicina de apoio.

A Prof. Dra. Adriana Kakehasi, Dr. Rodrigo Kato, Dr. Marcelo Tomé, Dra. Andreia Teixeira e sua equipe, pela colaboração.

Ao Orlando (in memoriam) e ao Alexandre da secretaria do departamento pela atenção e cordialidade.

A empresa BÜHLMANN e seu representante Robson, pela doação dos kits de calprotectina e auxílio técnico.

A sociedade Brasileira de Reumatologia, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

“(…) Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.” Fernando Pessoa

RESUMO

As espondiloartrites (EpA) axiais são um grupo de doenças inflamatórias sistêmicas crônicas com localização principal no esqueleto axial - coluna vertebral e articulações sacroilíacas. Estudos mostraram uma forte sobreposição genética entre EpA e doenças inflamatórias intestinais indicando uma relação entre eventos desencadeados no intestino e inflamação nas enteses e articulações. Evidências crescentes também sugerem que a microbiota intestinal está envolvida no início e na progressão da EpA axial. Nosso objetivo neste estudo foi comparar a microbiota de indivíduos com EpA axial em relação a controles saudáveis e analisar possíveis associações entre a microbiota intestinal, a permeabilidade intestinal e parâmetros clínicos da doença. Para isto, foram selecionados 21 pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG/EBSERH) e 21 pacientes saudáveis recrutados pelas redes sociais. Foram coletadas amostras de fezes e sangue além de dados antropométricos e dietéticos de todos os participantes do estudo. Nossos resultados mostraram que pacientes com EpA axial apresentam marcadores séricos de aumento da permeabilidade intestinal, de translocação bacteriana, de inflamação intestinal e níveis da citocina inflamatória IL-17 aumentados em relação ao grupo controle saudável. Além disto, esses pacientes apresentaram também um maior percentual de gordura corporal e menor ingestão de folato e manganês. Ao avaliar o perfil da microbiota intestinal entre os grupos, observamos que a espondiloartrite axial estava associado com alterações na abundância de 10 gêneros que foram consideradas como prováveis biomarcadores nestes pacientes com EpA axial. Os gêneros com maior abundância foram *Acidaminococcus*, *Ruminococcus_gauvreauii_group*, *Howardella*, *Klebsiella*, *Methanobrevibacter*, *UBA1819* e *Veillonella*. Ao mesmo tempo, os gêneros *Eubacterium_xylanophilum_group*, *Bilophila* e *Lachnoclostridium* estavam significativamente reduzidos no grupo EpA axial em relação ao controle. Também observamos correlações significativas entre alguns destes gêneros entre si e destes com metadados coletados.

PALAVRAS-CHAVE: Espondiloartrite axial, Microbiota Intestinal, Permeabilidade Intestinal, Inflamação

ABSTRACT

Axial spondyloarthritis (SpA) are a group of chronic systemic inflammatory diseases primarily located in the axial skeleton - spine and sacroiliac joints. Studies have shown a strong genetic overlap between SpA and inflammatory bowel diseases indicating a relationship between events triggered in the gut and inflammation in the entheses and joints. Growing evidence also suggests that the gut microbiota is involved in the initiation and progression of axial SpA. Our objective in this study was to compare the microbiota of individuals with axial SpA compared to healthy controls and to analyze possible associations between the intestinal microbiota, intestinal permeability and clinical parameters of the disease. For this, 21 patients from the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (HC-UFMG/EBSERH) and 21 healthy patients recruited through social networks were selected. Stool and blood samples were collected in addition to anthropometric and dietary data from all study participants. Our results showed that patients with axial SpA have serum markers of increased intestinal permeability, bacterial translocation, intestinal inflammation and increased levels of the inflammatory cytokine IL-17 compared to the healthy control group. In addition, these patients also had a higher percentage of body fat and a lower intake of folate and manganese. When evaluating the intestinal microbiota profile between the groups, we observed that axial spondyloarthritis was associated with changes in the abundance of 10 genera that were considered likely biomarkers in these patients with axial SpA. The most abundant genera were *Acidaminococcus*, *Ruminococcus_gauvreauii_group*, *Howardella*, *Klebsiella*, *Methanobrevibacter*, *UBA1819* and *Veillonella*. At the same time, the genera *Eubacterium_xylanophilum_group*, *Bilophila* and *Lachnoclostridium* were significantly reduced in the axial SpA group compared to the control. We also observed significant correlations between some of these genera and between them and the metadata collected.

KEY WORDS: Axial spondyloarthritis, Intestinal Microbiota, Intestinal Permeability, Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfil de gordura corporal aumentada em pacientes com espondiloartrite axial.....	43
Figura 2 - Indivíduos com espondiloartrite axial apresentaram níveis elevados de IL1-7 circulantes e presença de inflamação intestinal.....	44
Figura 3 - Indivíduos com espondiloartrite axial apresentaram permeabilidade intestinal aumentada.....	45
Figura 4 - Pacientes com espondiloartrite axial não apresentaram alteração na diversidade alfa quando comparados aos indivíduos controle saudáveis.....	46
Figura 5 - Pacientes com espondiloartrite axial apresentaram alteração na diversidade beta quando comparados aos indivíduos controle saudáveis.....	46
Figura 6 - Pacientes com espondiloartrite axial têm táxons com diferentes abundâncias relativas.....	47
Figura 7 - Pacientes com espondiloartrite axial mostrando 10 gêneros alterados.....	48
Figura 8 - Separação entres os grupos espondiloartrite axial e controle saudável em dois clusters, com exceção de dois indivíduos, e correlação da doença com o marcador de translocação de bactérias e/ou produtos bacterianos (LBP).....	49
Figura 9 - Existência de uma correlação entre os 10 gêneros alterados nos pacientes com espondiloartrite axial, marcadores de permeabilidade intestinal, perfil de gordura corporal, ingestão de fibras e metadados que avaliam o impacto da doença no paciente...	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos pacientes com espondiloartrite axial (EpA axial) e controles saudáveis da cidade de Belo Horizonte.....	40
Tabela 2 - Ingestão de calorias, macronutrientes e micronutrientes entre os pacientes com espondiloartrite axial e os indivíduos saudáveis do estudo.....	42

LISTA DE SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
AGCR	Ácido graxo de cadeia de cadeia ramificada
ASDAS	<i>Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score</i>
ASQoL	Questionário de Qualidade de vida
BASDAI	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index</i>
BASFI	Índice Funcional de Bath
CA	Circunferência abdominal
Cm	Centímetros
CD14	Grupamento de diferenciação 14
CHO	Carboidrato
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EA	Espondilite anquilosante
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EpA	Espondiloartrite
ERAP	Aminopectidase associada ao retículo endoplasmático
EVA	Escala visual analógica
FABP2	Proteína ligadora de ácidos graxos 2
FOXP3	Forkhead box P3
G	Gramma
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
GWAS	Estudos de associação genômica ampla
HLA	Antígeno leucocitário humano
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	Célula linfóide inata
IL1-RA	Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-17i	Inibidor de IL-17
IMC	Índice de massa corporal
INF	Interferon
iTreg	Célula T reguladora induzida

Kcal	Calorias
Kg	Quilograma
LAP	Peptídeo associado de latência
LBP	Proteína ligadora de lipopolissacarídeos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
μL	Microlitro
NGS	Sequenciamento de nova geração
nm	Nanômetro
nTreg	Célula T reguladora natural
RNA	Ácido ribonucleico
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR2	Receptor do tipo Toll 2
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFi	Inibidor de TNF
Treg	Célula T reguladora
UFMG	Universidade Federal de Minas Geraos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Espondiloartrite axial	18
1.2 Tratamento da espondiloartrite axial	221
1.3 Microbiota intestinal	252
1.4 Microbiota e doenças	265
1.5 Microbiota intestinal e espondiloartrite axial	276
1.6 Eixo Intestino-Articulações/Ossos	217
2 HIPÓTESE E RELEVÂNCIA DO ESTUDO	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Delineamento do Estudo	32
4.2 Tamanho Amostral	33
4.3 Questionários	33
4.3.1 Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)	33
4.3.2. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS)	33
4.3.3 <i>Health Assessment Questionnaire</i> modificado para espondiloartropatias (HAQ-S)	34
4.3.4 Bath As Functional Index (BASFI)	34
4.3.5 Ankylosing Spondylitis Quality of Life (ASQoL)	34
4.3.6 Registro Alimentar	35
4.4 Avaliação Antropométrica	35
4.5 Análises Imunológicas e Bioquímicas no Soro	36
4.5.1 Coleta de sangue	36
4.5.2 Medida dos níveis séricos da citocina IL-17	36
4.5.3 Avaliação da Permeabilidade intestinal	36
4.6 Dosagem de calprotectina fecal	37
4.7 Análise da microbiota intestinal	37
4.7.1 Extração de DNA das fezes	38
4.7.2 Sequenciamento metagenômico de amplicon de 16s rRNA	38
4.8 Análises Estatísticas	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Diferenças no aporte nutricional entre pacientes com EpA e controles saudáveis se resumiram ao consumo de folato e manganês	41
5.2 O perfil de gordura corporal estava aumentado nos pacientes com EpA axial em relação ao controle saudável	43

5.3 Os níveis do marcador de inflamação intestinal calprotectina e da citocina inflamatória IL-17 estavam aumentados em pacientes com EpA axial em relação ao controle saudável	43
5.4 Aumento da permeabilidade intestinal em pacientes com EpA axial	44
5.5 Perfil da microbiota intestinal alterado em pacientes com EpA axial.....	45
5.6 Agrupamento e correlações entre os metadados coletados e microbiota	48
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICES.....	71
APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - voluntário com espondiloartrite axial.	71
APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - voluntário saudável	74
APÊNDICE 3 - Registro alimentar de 72 horas.....	76
APÊNDICE 4 – Termo de Constituição de Biorrepositório.....	77
APÊNDICE 5 – Correlação entre os 10 gêneros alterados, marcadores indiretos de permeabilidade intestinal, dados antropométricos, uso de imunobiológicos, presença do alelo HLA-B27, ingestão de macronutrientes, micronutrientes e valor dos questionários aplicados que avaliam o impacto da doença no paciente com EpA axial.....	79
ANEXOS.....	79
ANEXO 1 – Parecer 2.912.519 do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	80
ANEXO 2 - Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)....	81
ANEXO 3 – Health Assessment Questionnaire for the Spondyloarthropathies	82
ANEXO 4 - Índice Funcional de <i>Bath</i> (BASFI)	83
ANEXO 5 – Questionário de Qualidade de vida (ASQoL).....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espondiloartrite axial

O grupo da espondiloartites (EpA) é composto pela artrite psoriásica, artrites associadas às doenças inflamatórias intestinais, artrite reativa, espondiloartrites indiferenciadas e EpA axiais sendo a espondilite anquilosante (EA) a mais comum nesse grupo (BABAIE et al., 2018; REZAIEMANESH et al., 2018; ZHANG et al., 2018a). A EpA é uma doença imunologicamente mediada, caracterizada por inflamação crônica axial e manifestações periféricas como entesite, dactilite e artrite. Quando atinge predominantemente a coluna espinhal e a sacroilíaca, é classificada como EpA axial. A EpA axial pode ser dividida em não-radiográfica e radiográfica, sendo esta última conhecida como espondilite anquilosante (EA). Entretanto, a doença pode acometer também outras partes do corpo como articulações periféricas, olhos, intestino, entre outros. Quando o envolvimento de manifestações periféricas é predominante, ela é classificada como EpA periférica (REZAIEMANESH et al., 2018).

A prevalência mundial da EpA axial é em torno de 0,1 a 1,4% afetando principalmente homens na idade entre 20 e 30 anos (ZHANG et al., 2018b). A etiologia da doença ainda não está esclarecida, entretanto acredita-se que fatores genéticos e fatores ambientais estejam envolvidos sendo esta classificada dentro do grupo das doenças autoimunes (REZAIEMANESH et al., 2018).

A EpA axial apresenta-se com sintomas característicos como dor nas costas e no quadril associada com rigidez matinal que reduz após exercício, oligoartrite em grandes articulações dos membros inferiores (tornozelos, joelhos e coxofemorais), inflamações nas inserções dos tendões e/ou ligamentos nos ossos (entesites) e uveíte (BABAIE et al., 2018; ZHANG et al., 2018a). Existe uma associação da EpA axial com inflamação intestinal subclínica, na qual fatores como sexo masculino, alta atividade da doença e idade mais jovem demonstraram estar independentemente associados (VAN PRAET et al., 2013). Entre os instrumentos utilizados para a avaliação da evolução clínica dos pacientes com EpA axial, pode-se citar os índices BASDAI e ASDAS que avaliam atividade inflamatória da doença e o índice BASFI que avalia capacidade funcional, entre outros (DA COSTA et al., 2015; SAMPAIO-BARROS et al., 2007).

Embora se saiba que a doença possui uma forte associação com o alelo do MHC de classe I HLA-B27, desde 1972 até os dias de hoje, não está claro o papel desse alelo na patogênese da doença (REZAIEMANESH et al., 2018; SORRENTINO; BÖCKMANN; FIORILLO, 2014). Estudos de imagem têm mostrado que ser portador do gene HLA-B27 é um fator de risco para a extensão e cronicidade de lesões edematosas (osteíte) na articulação da sacroílica de pessoas susceptíveis. Existe uma forte associação do HLA-B27 com o aumento no risco de EpA. Entretanto, menos de 5% de pessoas que o possuem desenvolvem a doença, indicando assim que outros fatores e genes chave seriam necessários no desenvolvimento inicial da EpA (WATAD et al., 2018). Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS) identificaram mais de 40 genes relacionados a EpA. Entre estes, há tanto genes do complexo de histocompatibilidade (MHC) como o HLA-B27 e HLA-B40; quanto genes não localizados no complexo do MHC como os genes da ERAP1 e ERAP2 (Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 e 2) que são aminopeptidases relacionadas com a quebra do peptídeo imunogênico em 10 a 16 resíduos para se ligar posteriormente a moléculas MHC de classe I. Mas de todos esses genes, o HLA-B27 destaca-se como o gene que mais contribui para o aumento do risco para SpA (PEDERSEN; MAKSYMOWYCH, 2018; REZAIEMANESH et al., 2018; SORRENTINO; BÖCKMANN; FIORILLO, 2014). Algumas hipóteses têm sido levantadas para o possível papel do HLAB-27 na patogênese da EpA. Uma destas hipóteses é a do “peptídeo artritogênico” que propõe que peptídeos próprios ou peptídeos bacterianos similares aos próprios derivados das articulações e/ou fibrocartilagem das ênteses, ao serem apresentados por moléculas HLA-B27, poderiam ativar células T CD8+ auto-reativas e induzir uma resposta citotóxica. Neste contexto, polimorfismos do gene da ERAP1 poderiam aumentar ou reduzir a abundância de certos peptídeos apresentados pelo HLA-B27 às células T. É importante ressaltar que essas possíveis associações entre as variações da ERAP 1 e a EpA somente têm sido vistas quando os genes HLAB-27 e HLA-B40 estão presentes (PEDERSEN; MAKSYMOWYCH, 2018). Outro ponto relevante é que, até o momento, não foi elucidado nenhum antígeno próprio ou não-próprio que poderia estar relacionado à patogênese da EpA em estágio inicial (WATAD et al., 2018).

Um mecanismo alternativo proposto para explicar os estágios iniciais da EpA seria a capacidade de células T CD4⁺ de indivíduos HLA-B27⁺ em reconhecerem peptídeos derivados de HLA-B27 com dobragem defeituosa (BOYLE et al., 2001).

Entre os achados imunológicos de pacientes com EpA axial, estudos mostram que as concentrações séricas das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 estão reduzidas no soro enquanto os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF, IFN- γ , IL-17 e IL-23 estão aumentados (BABAIE et al., 2018; WEN et al., 2017).

As células T reguladoras (Treg) têm um papel importante no controle da reatividade aos autocomponentes e, portanto, são peças chave no desenvolvimento das doenças autoimunes. As Treg naturais (nTreg) são geradas no timo durante a seleção tímica, de onde saem ativadas e expressando os marcadores CD25 (receptor de alta afinidade para IL-2) e o fator de transcrição *forkhead box protein* P3 (FOXP3). Elas estão ligadas à tolerância central e seu mecanismo de supressão envolve o contato célula-célula e, em menor extensão, a ação de citocinas como IL-10 e TGF- β secretadas. Por outro lado, as Treg induzidas (iTreg) são células T naive CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ que são convertidas em tecidos linfoides periféricos em células T reguladoras funcionais expressando CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Essas células têm papel crucial na tolerância oral quando são induzidas por antígenos dietéticos ou da microbiota intestinal (MOWAT, 2018; REZENDE; WEINER, 2017). Entre as moléculas da Treg que contribuem para sua função reguladora, o peptídeo associado de latência (LAP), um propeptídeo associado não covalentemente ao domínio amino-terminal do TGF- β , expresso na membrana de certas populações de Treg, tem se mostrado importante. Estudos sugerem que células Treg CD4⁺ LAP⁺ (Th3) são estimuladas no intestino por antígenos orais, iniciando sua cascata reguladora. As células Th3 ativadas no intestino são capazes de suprimir respostas sistêmicas autoimunes e inflamatórias (WEINER et al., 2011). O local de exposição ao antígeno é crucial para determinar o subtipo de Treg que será expandida e o mecanismo de tolerância induzido (MOWAT, 2018; REZENDE; WEINER, 2017).

A redução no número e função de células Treg leva a defeitos na tolerância aos autocomponentes e a respostas imunes anormais a antígenos próprios, com isso levando a doenças autoimunes. Alguns estudos em animais têm mostrado que células Treg FOXP3⁺ transferidas de forma adotivas mostraram um papel positivo na prevenção e tratamento de doenças autoimunes (TAO et al., 2017). Em relação ao percentual de células Treg em pacientes com EpA axial, os dados têm sido

controversos nos estudos, alguns indicando uma redução em pacientes com EpA axial em relação a indivíduos controle saudáveis e outros sem alteração. Por sua vez, resultados de alguns estudos sugerem a presença em pacientes com EpA axial de defeitos funcionais em células Treg, como uma menor expressão de FOXP3, tornando-as menos eficientes em controlar a expansão de células T CD4+ efectoras (LIAO et al., 2015; MIAO; ZHU, 2018; WANG et al., 2018).

1.2 Tratamento da Espondiloartrite Axial

A EpA axial é considerada uma doença grave com diversas manifestações, sendo assim geralmente recomendado uma abordagem terapêutica multidisciplinar, coordenada por um reumatologista. Os principais objetivos do tratamento são melhorar a qualidade de vida dos pacientes, buscando controlar os sintomas e a inflamação, prevenir o acúmulo de dano estrutural e conseqüentemente o desenvolvimento de sequelas e promover a sua reinclusão social. Para alcançar tais objetivos, são recomendadas intervenções farmacológicas e não farmacológicas (VAN DER HEIJDE et al., 2017).

No tratamento farmacológico, uma gama de fármacos tem sido utilizada. Em casos de dor e rigidez, é recomendado o uso de anti-inflamatório não esteroidais (AINEs) até a dose máxima, considerando tolerância e riscos e benefícios individuais. Os glicocorticoides são utilizados para tratamento de artrites e entesites, mas sugere-se o uso por tempo curto e com altas doses e evitar o uso por longo tempo de glicocorticoides de ação sistêmica (VAN DER HEIJDE et al., 2017).

Aos pacientes com alto grau de atividade da doença persistente submetidos ao tratamento convencional é recomendada a terapia com inibidores de TNF (TNFi). Até o momento, existem 5 TNFi aprovados que diferem em sua composição molecular e funções efectoras imunológicas: os anticorpos monoclonais Infliximabe, Adalimumabe, Golimumabe, Certolizumabe pegol e a molécula recombinante Etanercept. Todos esses fármacos são altamente seletivos e podem se ligar ao TNF solúvel e/ou ligado à membrana. Nos casos de falha no tratamento com TNFi, é recomendado considerar a troca de terapia para o uso de inibidor de IL-17 (IL-17i). Entre os IL-17i existentes pode-se citar: Secukinumabe, Brodalumabe, Ixekizumabe, Bimekizumabe. Os IL-17i têm demonstrado uma eficácia similar a dos TNFi, entretanto ainda não se sabe o impacto destes na progressão de dano estrutural, não sendo recomendados para

pacientes com DIIs concomitantes (PEDERSEN; MAKSYMOWYCH, 2018; VAN DER HEIJDE et al., 2017).

O tratamento não farmacológico inclui o acompanhamento psicológico para auxiliar nos aspectos emocionais e integração social; fisioterapia de maneira sistemática em todos os estágios da doença, entre outros. Estratégias nutricionais para o tratamento de doenças reumáticas têm sido estudadas e, entre estas, o uso de dietas isentas de glúten foi recentemente sugerida como uma possível estratégia complementar para o tratamento da EA (ISASI; TEJERINA; MORÁN, 2016; SAMPAIO-BARROS et al., 2007).

Neste estudo, nosso objetivo foi explorar a existência do eixo intestino-articulações/ossos na espondiloartrite axial examinando a permeabilidade intestinal e a composição da microbiota intestinal de pacientes portadores dessa doença.

1.3 Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal humano é composto por uma enorme quantidade e diversidade de microorganismos, cerca de 100 trilhões, convivendo com o hospedeiro em uma relação constante e mutualística. Essa microbiota (o microorganismo ele mesmo) ou microbioma (todo material genético de todos os microorganismos de determinado local) é composto por archaeas, bactérias, protozoários, fungos e vírus que codificam mais de 3 milhões de genes e produzem milhares de metabólitos. O hospedeiro humano oferece o habitat e nutrientes para os microorganismos simbióticos e, em troca, estes fornecem suporte para o metabolismo de nutrientes e compostos xenobióticos, proteção contra microorganismos patogênicos e regulação do desenvolvimento, homeostase e função do sistema imune inato e adaptativo (JANDHYALA et al., 2015; RINNINELLA et al., 2019; SPILJAR; MERKLER; TRAJKOVSKI, 2017; TEICHMAN et al., 2020).

Os filos das bactérias dominantes na microbiota intestinal são os Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucromicrobia, sendo que as duas primeiras são predominantes e representam cerca de 90 a 99% de toda microbiota intestinal conhecida até o momento (RINNINELLA et al., 2019; SO; TAM, 2020; TEICHMAN et al., 2020). Uma microbiota considerada saudável é caracterizada em termos de riqueza do ecossistema (diversidade), estabilidade, resistência e resiliência. Quando fatores ambientais e/ou relacionados ao hospedeiro,

como presença de uma inflamação crônica, levam a uma alteração na composição e função da microbiota, perturbando o sistema microbiano em uma extensão que ultrapassa a capacidade de resistência e resiliência, tem-se um quadro conhecido como disbiose. Os perfis de disbiose podem variar, possuindo uma ou mais das seguintes características: 1) aumento de microorganismos comensais com potencial de causar doença (patobiontes) em situações de quebra da homeostase intestinal; 2) redução ou perda completa de microorganismos comensais habituais da microbiota; 3) perda da diversidade (LEVY et al., 2017).

A microbiota nativa é formada no início da infância, do período do nascimento até 5 anos de idade, sendo os 3 primeiros anos os mais críticos. Esse processo ocorre juntamente com o amadurecimento da mucosa intestinal e é influenciado por fatores como fatores genéticos, idade gestacional de nascimento, tipo de parto, período de desmame, estilo de vida e hábitos dietéticos, entre outros (CHENG et al., 2016; NIU et al., 2020; RINNINELLA et al., 2019; YATSUNENKO et al., 2012). A microbiota nativa formada no início da infância, apresenta-se bem resiliente e estável durante o resto da infância, juventude e fase adulta, mas pode sofrer alterações na presença de mudança de fatores externos como uso de antibióticos e mudanças na alimentação. Já nos idosos acima de 70 anos, estudos recentes sugerem um aumento de disbiose com uma redução expressiva de bactérias potencialmente benéficas (bactérias produtoras de butirato como *Akkermansia Muciniphila*) e um aumento de bactérias oportunistas potencialmente inflamatórias. Entretanto, baseado nos dados na literatura até o momento, não se pode afirmar se a redução na diversidade e alteração do perfil da microbiota visto em idosos, especialmente os classificados como frágeis, seria uma causa ou consequência das alterações observadas no envelhecimento tais como a inflamação crônica de baixo grau designada como *inflamm-aging* (HARAN; MCCORMICK, 2021; RAGONNAUD; BIRAGYN, 2021; RINNINELLA et al., 2019).

Como mencionado anteriormente, a microbiota intestinal tem um importante papel na regulação da homeostase imunológica do corpo. Estudos realizados em camundongos *germ-free* mostraram que a ausência da microbiota no intestino de camundongos leva ao comprometimento no desenvolvimento e maturação do Tecido Linfóide Associado ao Intestino (GALT) resultando em uma redução de células T (entre elas, as Treg) e células B produtoras de IgA. Outros estudos também mostram a importância da microbiota intestinal na regulação das células TH17 e ILC2 (RAGONNAUD; BIRAGYN, 2021).

Entre todos os fatores externos que podem impactar na variação intra-indivíduos, como estilo de vida, uso de antibióticos e outros, a alimentação tem se mostrado como um dos fatores que mais influencia a curto e a longo prazo a composição da microbiota intestinal assim como sua atividade metabólica (BARBER et al., 2021; REDONDO-USEROS et al., 2020; STATOVCI et al., 2017). Os nutrientes podem influenciar na microbiota diretamente servindo de substrato para determinadas bactérias e, por sua vez, os metabólitos produzidos por estas podem servir de substrato para outras bactérias (relação simbiótica/sintrofia). Por sua vez, o aumento destes táxons pode inibir outros (relação de competição) e haveria assim uma influência indireta do nutriente na microbiota. Outra influência indireta muito bem documentada seria pela ação de macro e micronutrientes na modulação da resposta imune que, por sua vez, interfere na microbiota (*crosstalk* entre o sistema imune e microbiota). Entre os macronutrientes que parecem modular a microbiota, os mais conhecidos são os carboidratos (entre eles, as fibras), proteínas e gorduras saturadas (GUERREIRO et al., 2018; SCOTT et al., 2013; SPILJAR; MERKLER; TRAJKOVSKI, 2017; STATOVCI et al., 2017).

A fermentação no colón dos carboidratos utilizados pela microbiota, especialmente os amido-resistentes, oligossacarídeos, polissacarídeos não amiláceos (celulose, hemicelulose, pectina, etc) leva à formação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acetato, propionato e butirato que possuem um papel essencial na homeostase intestinal (SCOTT et al., 2013; SPILJAR; MERKLER; TRAJKOVSKI, 2017).

Aproximadamente 10% da proteína ingerida chega ao cólon, local importante no *turnover* proteico, fornecendo nitrogênio e aminoácidos que servem de substrato para bactérias. No colón transversal e distal, onde os resíduos de carboidratos são escassos, a proteína se torna uma fonte importante de energia para a microbiota local. Entre os metabólitos produzidos pelo uso dos aminoácidos como substratos, pode-se citar os compostos indólicos, fenólicos e ácido graxos de cadeia ramificada (AGCR) (ROWLAND et al., 2018; SCOTT et al., 2013).

Deve-se sempre ter em mente também, quando pensamos no impacto de fatores externos na microbiota, que pode haver situações em que esses fatores, como a dieta, tenham impacto somente no metabolismo microbiano, como visto no estudo de Barber e colaboradores. Nesse estudo recente realizado com pessoas saudáveis, ao comparar o impacto na microbiota de uma dieta rica em gordura e pobre em

resíduos (simulando uma típica dieta ocidental) versus uma dieta pobre em gordura e rica em resíduos, os autores sugerem que a alteração dos substratos que chegaram ao colón teve um impacto importante nas funções metabólicas microbianas dos voluntários sem que houvesse uma alteração significativa na sua composição (sem alterar a alfa diversidade) (BARBER et al., 2021).

1.4 Microbiota e doenças

Alterações na composição e função do microbioma têm sido associados a diversas doenças e são alvo de constantes pesquisas. Os estudos indicam que alterações tanto na composição quanto nos metabólitos produzidos por estes microorganismos podem ser sentidos pelo organismo do hospedeiro e podem levar à diferentes estados de ativação do sistema imune. Além disto, outro ponto relevante é a possibilidade das alterações na microbiota e no seu metabolismo resultarem em alterações epigenéticas em células intestinais assim como também em outras células mais distantes como hepatócitos e adipócitos. Embora cada vez mais apareçam mais evidências de uma importante associação entre doenças imuno-mediadas e disbiose, ainda não está claro se a disbiose seria causa ou a consequência do surgimento e/ou perpetuação de processos inflamatórios, ou se os dois processos ocorrem ao mesmo tempo (BELIZÁRIO; FAINTUCH; GARAY-MALPARTIDA, 2018; CHAKAROUN; MASSIER; KOVACS, 2020; LEVY et al., 2017).

Dentro deste panorama, também é importante reforçar o papel da inflamação em alterar a permeabilidade intestinal, aumentando o risco de translocação de bactérias e produtos bacterianos pela barreira intestinal, o que, por sua vez, pode perpetuar o processo inflamatório (DU et al., 2016; STURGEON; FASANO, 2016). Algumas bactérias, como a *E.coli*, e as *Enterobacteriaceae* e *Enterococci*, por terem mais habilidade em evadir os mecanismo de imunidade, translocam mais prontamente que outras bactérias comensais quando ocorre um comprometimento significativo da barreira intestinal como é visto no intestino permeável ou *leaky gut* (CHAKAROUN; MASSIER; KOVACS, 2020).

Embora seja crescente o número de estudos avaliando possíveis assinaturas ligando microbiota e doenças na busca de novos tratamentos, esses estudos devem ser interpretados com cautela. Eles ainda não mostram causalidade, não foram capazes de identificar gêneros ou espécies específicos que causem determinada

doença ou estado patológico. O que podemos inferir com os dados disponíveis é se ocorre diferença na microbiota de um grupo experimental específico em relação a um controle e avaliar possíveis correlações entre as alterações vistas e a doença ou condição patológica investigada (TEICHMAN et al., 2020).

1.5 Microbiota intestinal e espondiloartrite axial

. Na última década, com a evolução dos métodos de avaliar a microbiota intestinal, muitos estudos interessantes vêm sendo feitos, sugerindo uma intrigante associação entre o microbioma de indivíduos com EpA e a patogênese da doença (BREBAN et al., 2017; LI et al., 2019; TITO et al., 2017; WEN et al., 2017; YIN et al., 2020).

Estudos feitos em ratos transgênicos para HLA-B27, criados em um ambiente *germ-free*, mostram que estes não desenvolvem muitos dos sintomas característicos da EpA. Entretanto, ao serem colonizados por bactérias intestinais, como as *Bacteroides*, houve desenvolvimento da doença. Tal evidência sugere fortemente uma possível associação entre do gene HLA-B27 e as alterações encontradas no microbioma em pacientes com EpA (YANG et al., 2016). Em concordância com esses achados, alguns estudos têm sugerido uma possível associação entre pacientes com EpA portadores do gene HLA-B27 e uma associação com a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Dois estudos mais antigos, realizados na década de 80, mostraram que anticorpos monoclonais anti-HLA-B27 foram capazes de se ligar a *K. pneumoniae*, e sugeriram a possibilidade de haver uma reação de mimetização/reação cruzada entre sequências de aminoácidos do HLA-B27 e da *K. pneumoniae* que, por sua vez, estaria associado ao desenvolvimento e perpetuação da EA (OGASAWARA; KONO; YU, 1986; VAN BOHEMEN et al., 1984). Desde então, novos estudos têm buscado confirmar e aprofundar essa hipótese. Entre eles, alguns mostraram que a *K. pneumoniae* possui um complexo enzimático chamado Pullulanase com 17 componentes, alguns dos quais apresentam sequências de aminoácidos que mimetizam sequências de proteínas do corpo humano como a miosina e o colágeno I, III e IV. Essa hipótese propõe que o “mimetismo molecular” faria com que os anticorpos para os epítomos pertencentes a *K. pneumoniae* fariam uma reação cruzada com a miosina e o colágeno das articulações ativando assim uma cascata inflamatória nestes locais. O mesmo poderia ocorrer com outras proteínas relacionadas a tecidos

encontrados na coluna sacro-ilíaca e úvea, principais regiões afetadas na EpA, em indivíduos susceptíveis servindo de gatilho para o desenvolvimento e/ou ativação da EpA e a perpetuação de um processo inflamatório crônico (CHARALAMBOUS²; KEEN³; MCPHERSON, 1988; RASHID et al., 2009; RASHID; EBRINGER, 2007; ZHANG et al., 2018a). Estudos clínicos sugerindo a *Klebsiella* como possível marcador da EpA axial ainda apresentam resultados contraditórios.

Outro estudo recente que fortalece a hipótese do mimetismo molecular realizado por Yin e colaboradores em uma coorte de 127 pacientes com EpA, mostrou uma predição, pela metodologia de Blast, de homologia entre peptídeos bacterianos (encontrados nas fezes dos pacientes) e epítomos do HLA-B27 já descritos na literatura. Os autores relataram ainda outros 24 epítomos bacterianos homólogos a epítomos do HLA-B27. Ao incubar esses peptídeos com células T CD8 dos voluntários com EpA, observaram que somente as células T CD8 dos pacientes positivos para HLA-B27 responderam ao estímulo com a produção de interferon- γ (YIN et al., 2020).

Além dessa hipótese explicativa, os estudos de sequenciamento da microbiota intestinal de indivíduos com EpA têm mostrado a presença de disbiose nesses indivíduos e sugerido uma associação entre disbiose, inflamação, alteração da permeabilidade intestinal e atividade da doença. Entretanto, não existe até o momento uma assinatura microbiana estabelecida que se correlacione com a doença e as sugestões de gêneros e/ ou espécies mostradas nos ensaios clínicos divergem entre si. Provavelmente isto é devido a diversos fatores como tamanho amostral, métodos diferentes utilizados de sequenciamento, fase da doença (inicial, inativa, ativa em tratamento), diferenças entre as características dos indivíduos dos estudos (região, cultura, hábitos alimentares locais, genética, etc), entre outros (BREBAN; BEAUFRÈRE; GLATIGNY, 2019; CICCIA et al., 2017a; SO; TAM, 2020).

1.6 Eixo Intestino-Articulações/Ossos

Uma forte sobreposição genética tem sido mostrada entre EpA axial e as doenças inflamatórias intestinais (DII) sendo que cerca de 20 de 30 genes associados a EpA são compartilhados com as DIIs. Além disto, estudos mostram que cerca de 6 a 10% de pacientes com EA apresentam relato de DIIs e 60 a 70% apresentam sinais de inflamação intestinal subclínica, na qual fatores como alta atividade da doença, sexo masculino e idade mais jovem demonstraram estar independentemente

associados (PEDERSEN; MAKSYMOWYCH, 2018; VAN PRAET et al., 2013; WATAD et al., 2018).

Em pacientes com EA, foram observadas frequências aumentadas de células ILC3 NKp44+ no intestino, na medula óssea, no sangue e nos fluídos sinoviais, com produção de IL-17 e IL-22. Células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3) podem ser estimuladas pela IL-23 e secretar IL-17, IL-22 e outras citocinas associadas. Essas ILCs expressavam a integrina $\alpha 4\beta 7$ o que sugere que podem ter sido originadas no timo e posteriormente direcionadas para o intestino. Outra possibilidade seria delas serem formadas no intestino e posteriormente direcionadas a outras regiões do corpo como as articulações, onde eles poderiam ser responsáveis pelo desenvolvimento de uma resposta inflamatória mediada pela produção de IL-17 e IL-22 (CICCIA et al., 2015; MOHAMMADI et al., 2018). A análise da sinóvia de pacientes com artrite reumatoide por imunohistoquímica mostrou também, neste tecido, a expressão de $\alpha E\beta 7$ e E-caderina, moléculas responsáveis pela adesão de linfócitos T a células epiteliais como as do intestino (TROLLMO et al., 1996).

Recentemente, tem sido muito investigado o papel da microbiota em doenças imunologicamente mediadas. Ciccia e colaboradores analisaram biópsias intestinais da parte do íleo de pacientes com EA sem alterações histológicas, com inflamação aguda e crônica em relação a indivíduos saudáveis (grupo controle). Eles observaram um aumento de bactérias aderentes e invasivas nos indivíduos com EA e, entre estes, a inflamação intestinal esteve positivamente correlacionada com o número de bactérias patogênicas. Foi observado também uma associação entre o aumento dessas bactérias e uma menor expressão de proteínas de junção firme (*tight junctions*) no epitélio intestinal. Em concordância com esse achado, foi detectada uma maior expressão de pré-haptoglobina 2 (zonulina) nos indivíduos com EA em relação ao grupo controle sendo que essa expressão aumentada de zonulina estava associada a uma menor expressão de proteínas de junção firme no epitélio intestinal dos pacientes com EA (CICCIA et al., 2017b).

A zonulina, proteína codificada pelo alelo HP2 do gene da haptoglobina, é descrita como uma moduladora fisiológica das junções firmes e, portanto, da permeabilidade intestinal. Ela é um análogo da toxina secretada pelo *Vibrio cholerae* e tem sido implicada na patogênese da doença celíaca e da diabetes mellitus tipo 1. Sua liberação por enterócitos é estimulada pela presença de disbiose intestinal e/ou por ligação de peptídeos de gliadina do glúten ao receptor CXCR3 nos enterócitos

(FASANO, 2011; TRIPATHI et al., [s.d.]; VISSER et al., 2009). Ciccia e colaboradores concluem, no seu estudo, que pacientes portadores de EA com inflamação intestinal apresentam um aumento de bactérias aderentes e invasivas característico de um quadro de disbiose. Esses autores sugerem ainda que a disbiose estaria relacionada a um aumento da expressão de zonulina e de dano na mucosa intestinal levando ao aumento da permeabilidade intestinal e à translocação de proteínas derivadas do lúmen do intestino para a corrente sanguínea. Todas essas alterações poderiam resultar em mudanças imunológicas que seriam parte na patogênese da EA (CICCIA et al., 2017b).

Em concordância com o objetivo proposto por este estudo, evidências sugerem que a entrada antígenos microbianos e adjuvantes na circulação sanguínea poderiam ter um papel como gatilhos no desenvolvimento de entesite que, por sua vez, estaria relacionada à patogênese da EpA axial no estágio inicial. É sugerido que esses antígenos microbianos e adjuvantes poderiam levar à secreção local da citocina IL-23 por células estromais residentes nas enteses levando à ativação de ILC3 e, numa fase mais tardia, de células T com receptores para IL-23. A liberação de IL-17 e IL-22 resultaria em entesite, edema ósseo, osteíte e proliferação óssea podendo levar à fusão óssea (anquilose) e limitações dos movimentos (KEHL; CORR; WEISMAN, 2016; LORIES; MCINNES, 2012; WATAD et al., 2018).

Assim, há fortes indícios de que um envolvimento de um eixo intestino-articulações/ossos esteja associado à patogênese da EpA.

2 HIPÓTESE E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A hipótese investigada neste estudo é que existe uma correlação entre a assinatura da microbiota intestinal e aumento da permeabilidade intestinal com a atividade da doença em pacientes com EpA axial.

A EpA axial é uma doença cuja progressão pode levar a um quadro de incapacitação e até mesmo aumento da morbimortalidade (BABAIE et al., 2018). Seu tratamento farmacológico pode trazer efeitos colaterais significativos e ser oneroso dependendo dos fármacos utilizados (SAMPAIO-BARROS et al., 2007). Se nossa hipótese se mostrar correta, esses achados poderão abrir caminho para o desenvolvimento de tratamentos alternativos, como intervenções dietéticas específicas, que teriam como objetivo modular a microbiota e restabelecer a integridade da barreira intestinal nesses pacientes. Assim, esta poderia ser uma futura estratégia promissora na prática clínica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar a microbiota de indivíduos com EpA axial em relação a controles saudáveis e analisar possíveis associações entre a microbiota intestinal, a permeabilidade intestinal e parâmetros clínicos da doença.

3.2 Objetivos Específicos

Caracterizar a microbiota intestinal de indivíduos com EpA brasileiros por sequenciamento de nova geração (NGS).

Analisar as diferenças na ecologia microbiana entre indivíduos com EpA e saudáveis e as possíveis correlações com os seguintes parâmetros:

- Marcadores de permeabilidade intestinal no soro;
- Marcador de inflamação intestinal nas fezes;
- Dosagem da citocina IL-17 no soro;
- Dados antropométricos e dietéticos;
- Atividade clínica da EpA;
- Função física dos pacientes com EpA;
- Qualidade de vida dos pacientes com EpA

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal realizado no período entre outubro de 2018 e março de 2021. Foram selecionados 21 pacientes com espondiloartrite axial do ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; e 21 voluntários saudáveis da cidade de Belo Horizonte. Os critérios de inclusão no grupo com EpA foram indivíduos adultos com diagnóstico de EpA axial (classificados segundo os critérios ASAS de 2009) e com a doença ativa (definido por um ASDAS-PCR $\geq 2,1$ e ou um BASDAI ≥ 4). Foram excluídos indivíduos com diagnóstico prévio de doenças inflamatórias intestinais (DIIs), vegetarianos ou pessoas em dietas restritivas, mulheres grávidas ou lactantes e aqueles que reportaram uso nos últimos três meses de: probióticos, prebióticos ou antibióticos. O critério de inclusão no grupo saudável foram idade adulta e ausência de comorbidades conhecidas. Os critérios de exclusão do grupo saudável (controle) seguiram os mesmos do grupo EpA.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG sob o número 2.912.519 (ANEXO 1).

4.1 Delineamento do Estudo

A seleção de pacientes com EpA axial foi realizada pelo Dr. Gustavo Resende, médico especialista (reumatologista) do Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte. Os indivíduos a serem convidados a participar do estudo foram selecionados através da aplicação dos questionários BASDAI e ASDAS, e por avaliação clínica tendo como critério aqueles em que a doença estava ativa (BASDAI ≥ 4 ou ASDAS-PCR $\geq 2,1$). Os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 1 e 2) e foram instruídos a retornarem trazendo amostras de fezes e registro alimentar de três dias. No dia do retorno, os pacientes entregaram as fezes coletadas em domicílio. Em seguida, eles foram direcionados para uma consulta com uma nutricionista na qual foram coletados dados antropométricos, aplicado os questionários relacionados à doença e feito a revisão do registro alimentar de 72 horas.

Os voluntários saudáveis selecionados em Belo Horizonte receberam as mesmas orientações dos pacientes com EpA e foram realizados os mesmos procedimentos, exceto a aplicação dos questionários relacionados a EpA axial.

4.2 Tamanho Amostral

Amostra por conveniência.

4.3 Questionários

4.3.1 Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)

Utilizado para avaliar e acompanhar o índice da atividade da EpA, este questionário mede, por meio de uma escala visual analógica (EVA), 6 parâmetros relacionados a doença: fadiga, entesite, dor periférica, dor axial, duração e intensidade da rigidez matinal. O valor final é obtido pela soma dos valores dos 6 parâmetros individuais (DA COSTA et al., 2015; SAMPAIO-BARROS et al., 2007).

O questionário (ANEXO 2) foi aplicado pelo reumatologista da equipe.

4.3.2. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS)

É um instrumento que avalia o índice da atividade da EA. Ele associa a presença de um marcador de atividade inflamatória e a Hemossedimentação (VHS) ou a proteína C reativa (PCR) possuindo pontos de corte validados e recomendados pela *Assessment of SpondyloArthritis International Society- ASAS* e pelo *Outcomes Measures in Rheumatology – OMERACT*. Os pontos de corte são classificados como atividade de doença: moderada, alta ou muito alto (MACHADO; LANDEWÉ; HEIJDE, 2018; SAMPAIO-BARROS et al., 2007).

O questionário foi aplicado pelo médico reumatologista da equipe.

4.3.3 *Health Assessment Questionnaire* modificado para espondiloartropatias (HAQ-S)

O HAQ é um questionário autoaplicável que avalia incapacidade em realizar atividades do dia a dia. São avaliadas 20 atividades da rotina diária, divididas em 8 categorias, as quais os pacientes marcam em cada atividade o grau de dificuldade que teve em realizar tal atividade, na última semana. A pontuação varia de 0 (sem dificuldades) até 3 (incapaz de fazer). O HAQ-S é uma versão modificada do HAQ em que foram acrescentados 5 itens relacionados a dificuldades relatadas em pacientes com comprometimento axial (SHINJO; GONÇALVES; GONÇALVES, 2006). (ANEXO 3)

O questionário (ANEXO 5) foi preenchido pelo paciente na consulta com a nutricionista.

4.3.4 Bath As Functional Index (BASFI)

Índice que avalia a intensidade de comprometimento funcional, com um questionário autoaplicável com uma escala visual analógica (EVA) de zero a 10 cm. O resultado é dado pela média aritmética dos valores de todas as 10 questões. Apresenta confiabilidade e sensibilidade às mudanças clínicas da doença (SHINJO; GONÇALVES; GONÇALVES, 2006) (ANEXO 4).

O questionário foi preenchido pelo paciente durante a consulta com a nutricionista.

4.3.5 Ankylosing Spondylitis Quality of Life (ASQoL)

Instrumento autoaplicável que avalia a qualidade de vida de pacientes com EpA através da resposta com “sim” ou “não” de 18 itens específicos para EpA. A pontuação é dada pelo número de respostas “sim” marcadas e quanto maior for a pontuação, mais a doença interfere na qualidade de vida do indivíduo (DOWARD et al., [s.d.]; SHINJO; GONÇALVES; GONÇALVES, 2006) (ANEXO 3).

O questionário foi preenchido pelo paciente durante a pesquisa com a nutricionista.

4.3.6 Registro Alimentar

Método que coleta informações sobre a ingestão atual de um indivíduo ou grupo. O voluntário é orientado a anotar todos os alimentos e bebidas consumidos ao longo de três dias. O registro foi realizado em dias alternados e abrangendo um dia do final de semana (MARA FISBERG; MARIA LOBO MARCHIONI; CAROLINA ALMADA COLUCCI, 2009).

Os participantes, em seu primeiro contato com a nutricionista, receberam os registros (APÊNDICE 3) a serem preenchidos e instruções de como fazer este preenchimento de forma adequada: informações de como anotar medidas caseira, horários, datas, detalhes dos alimentos e modo de preparo.

Posteriormente, os registros foram analisados no *Software Avanutri* e quantificado a ingestão média de calorias, carboidratos, proteínas, lipídios, fibras e micronutrientes.

4.4 Avaliação Antropométrica

As medidas antropométricas foram coletadas por uma única nutricionista qualificada para tal procedimento. Foram aferidos peso, altura, índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal de acordo com o que é preconizado pela literatura (HEYMSFIELD SB; TIGHEA A; WANG ZM, 1994). Também foi realizado a aferição de porcentagem de gordura, massa magra e índice de gordura visceral, através de bioimpedância.

Para aferição do peso foi utilizado balança de plataforma Balmak®, com o paciente descalço, de costas para a balança, em posição ereta, com os pés unidos ao centro da plataforma e braços estendidos ao longo do corpo.

A estatura foi aferida com o auxílio de um estadiômetro vertical com precisão de 0,1 cm, acoplado à balança. O paciente foi orientado a ficar descalço e sem acessórios na cabeça, em posição ereta, com o olhar fixo no plano horizontal, calcanhares juntos, braços estendidos ao longo do corpo e peso distribuído igualmente entre os pés.

O Índice de Massa Corporal (IMC), após aferição do peso e da estatura, foi determinado pelo uso da seguinte fórmula: $IMC = p/a^2$; onde **p** equivale ao peso em

quilogramas (kg) e a equiva à estatura do indivíduo em metros. O IMC foi classificado de acordo com o preconizado pela OMS (2000).

A circunferência abdominal foi aferida com o paciente em posição ereta, com a fita num plano horizontal, posicionada passando por cima da cicatriz umbilical. Foi utilizada uma fita antropométrica milimetrada, não flexível.

A porcentagem de gordura, massa muscular e índice de gordura visceral foram aferidos pelo uso de balança de bioimpedância da marca Tanita BC 601, conforme orientações do manual.

4.5 Análises Imunológicas e Bioquímicas no Soro

4.5.1 Coleta de sangue

Foram coletados 16 ml de sangue periférico dos voluntários por um profissional da equipe de pesquisa treinado para tal procedimento, utilizando jaleco, luva e materiais descartáveis. A coleta de sangue dos pacientes com EpA axial foi realizada no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG e as dos indivíduos saudáveis em consultório reumatológico particular (sempre entre 8 à 12 horas). O sangue foi separado em tubos e acondicionados em gelox, em caixas térmicas, para serem transportados ao Instituto René Rachou – FIOCRUZ-MG, para processamento. O sangue coletado em tubo sem anticoagulante foi separado o soro para análise posterior de marcadores de permeabilidade intestinal e citocina IL17. Após o processamento, o soro foi armazenado a -20° C.

4.5.2 Medida dos níveis séricos da citocina IL-17

Dosagem da citocina IL-17 foram realizadas no soro, em duplicatas, pelo método ELISA sanduíche de acordo com as instruções do fabricante (ELIZA MAX™ Deluxe set Human IL17A, Biolegends, San Diego, CA, USA).

4.5.3 Avaliação da Permeabilidade intestinal

Para avaliação da permeabilidade intestinal, foram medidas as concentrações da Proteína Ligadora de Ácidos Graxos (FABP2) e da Proteína Ligadora de

Lipopolissacarídeos (LBP) no soro por kit de ELISA, em duplicatas, de acordo com as instruções dos fabricantes (BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY, Pleasanton, CA, USA).

4.6 Dosagem de calprotectina fecal

A dosagem da calprotectina foi feita pelo método ELISA sanduíche, utilizando o kit BÜHLMANN Quantum Blue®fCAL extended, de acordo com as instruções do fabricante (BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Suíça). Brevemente, uma pequena parte das fezes foi retirada, verticalmente no canto, e acondicionada em um tubo de propileno estéril. Posteriormente, foi inserido a parte com arranhadura do pino branco (dispositivo oferecido no kit) nas fezes e depois foi removido. Esta operação foi feita 3 vezes em locais diferentes da amostra. Em seguida o pino foi reintroduzido no corpo do dispositivo CALEX® Cap e fechado. Em seguida foi misturada as fezes na rachadura com o líquido de extração, utilizando o vórtex. O tubo foi então deixado 10 minutos em descanso para que o líquido dentro fizesse a extração. Por último, pipetou-se 60 microlitros do líquido com as fezes em um cassete, aguardou-se 12 minutos (período de incubação) e posteriormente iniciou a leitura no leitor Quantum Blue®. Este processo foi feito separadamente para cada das amostras dos voluntários.

4.7 Análise da microbiota intestinal

Os pacientes receberam vasilhames estéreis e foram instruídos sobre a coleta das amostras de fezes em casa. Os vasilhames foram identificados com o número de identificação pessoal do participante.

As amostras de fezes foram transportadas para Faculdade de Medicina da UFMG e armazenadas a – 80 graus para análise posterior da microbiota do intestino pelo método de sequenciamento de nova geração (NGS) do rRNA 16s.

4.7.1 Extração de DNA das fezes

A extração do DNA total microbiano das fezes foi feita utilizando o kit QIAamp DNA Stool Min Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany), de acordo com a especificação do fabricante. Foram utilizadas 220 gramas de fezes de cada voluntário.

O DNA extraído foi analisado qualitativamente e quantitativamente por eletroforese em gel de agarose a 1%, por electrofotometria (Nanodrop 1000ND, Thermo Scientific, USA) e utilizando um fluorômetro quântico (QuantiFluor dsDNA System, Promega, Madison, WI, USA).

4.7.2 Sequenciamento metagenômico de amplicon de 16s rRNA

A região V3-V4 das sequências do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada usando o par de primers contendo as sequências específicas do gene e as sequências nucleotídicas do adaptador Illumina. As sequências de primers de comprimento total foram: Primer 16S Amplicon PCR *Forward* (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG) e primer reverso de 16S Amplicon PCR (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC C).

O PCR do amplicon foi realizado para amplificar o modelo de amostras de de entrada do DNA. Resumidamente, cada 25 µL de reação em cadeia da polimerase (PCR) contém 12,5 ng de amostra de DNA como entrada, 12,5 µL 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) e 5 µL de 1 µM de cada primer. As reações de PCR foram realizadas usando o seguinte protocolo: uma etapa inicial de desnaturação realizada a 95°C por 3min seguido por 25 ciclos de desnaturação (95°C, 30 s), anelamento (55°C, 30 s) e extensão (72° C, 30 seg), e um alongamento final de 5 min a 72°C. O produto de PCR foi limpo da mistura de reação com esferas magnéticas Mag-Bind RxnPure Plus (Omega Bio-tek, Norcross, GA).

Um segundo índice de amplificação por PCR, usado para incorporar códigos de barras e adaptadores de sequenciamento no produto final de PCR, foi realizado em reações de 25 µL, usando as mesmas condições de master mix descritas acima. As condições de ciclagem foram as seguintes: 95°C por 3 minutos, seguido por 8

ciclos de 95°C por 30", 55°C por 30" e 72°C por 30". Uma etapa final de alongamento de 5 minutos foi realizada a 72°C.

As bibliotecas foram normalizadas com o Mag-Bind® EquiPure Library Normalization Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA) e então agrupadas. A biblioteca agrupada no tamanho de aproximadamente 600 bases foi verificada usando um Agilent 2200 TapeStation e sequenciado (2 x 300 bp emparelhado -end read setting) no MiSeq (Illumina, San Diego, CA).

4.8 Análises Estatísticas

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição dos resultados. As observações entre os grupos quanto aos questionários que avaliam a ingestão alimentar e os que avaliam a evolução clínica na doença, aos marcadores de permeabilidade intestinal e aos relacionados à ativação do sistema imune foram analisados por testes de variância. A comparação entre grupos com variáveis paramétricas foi utilizado o teste T para amostras independentes. Para amostras não paramétricas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney U. As análises estatísticas foram feitas pelo *software* SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os gráficos foram construídos através do programa R.

Os dados brutos de abundância de *reads* de cada OTU (e posteriormente agrupados em gêneros) foram inicialmente filtrados, retirando aqueles com ocorrência única (apenas 1 read) e normalizados utilizando-se a razão de log centrada, que é a mais indicada para dados composicionais (valores inteiros não-negativos que correspondem parte de um todo). As análises de diversidade alfa e beta, comunidade central (core community), correlações, agrupamento e ordenação foram realizados utilizando-se pacotes do R e o PAST v. 4.08. Para as análises de correlação, foi realizada uma análise bivariada usando o Coeficiente de Pearson, no qual foi considerado: valor menor que 0,3 correlação fraca, entre 0,3 e 0,6 média, e maior que 0,6 forte. Para diversidade alfa, utilizou-se o índice de diversidade de Shannon. Para a análise da diversidade beta, calculou-se a distância pelo índice de divergência de Jensen-Shannon e se realizou o teste estatístico de dispersão permutacional (PERMDISP) para avaliar a diferença entre os grupos controle e o grupo com espondiloartrite axial ao nível de valor $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

Participaram do estudo 42 voluntários, destes 21 pacientes com EpA axial e 21 controles saudáveis. Os voluntários foram pareados por sexo e sua caracterização pode ser vista na tabela 1. Os pacientes com EpA axial apresentaram maior idade e maior composição corporal em relação ao grupo controle saudável. Não houve diferença de números de indivíduos considerados sedentários (realizam menos de 150 minutos de exercício físico por semana), entre os grupos.

Características	Grupos						p-value
	EpA (n=21)			controle (21)			
	n	%	m	n	%	m	
Idade			52,14			38,76	0,000
Sedentários	11 (19)	58		14 (20)	67		0,554
HLAB27+	14 (21)	67		nd	nd		nd
Índice de massa corporal							0,003
Magreza	0	0		0	0		
Normal	1	5		9	43		
Sobrepeso	8	38		9	43		
Obesidade	12	57		3	14		
Uso de medicamentos							
Metotrexato	6	29		0	0		0,008
Biológico	12	57		0	0		0,000
Corticosteroide	3	14		0	0		0,072
Antidepressivo	10	48		2	10		0,006
Anti-inflamatório	14	67		0	0		0,000
Bisfosfonatos	3	14		0	0		0,072
Anti-hipertensivo	13	62		0	0		0,000
Vitamina D	5	24		1	5		0,078
Omeprazol	10	48		0	0		0,000
Diurético	6	29		0	0		0,008
Estatina	8	38		1	5		0,008
Amitriptilina	2	10		0	0		0,147
Benzodiazepínico	2	10		0	0		0,147
Hormônio	1	5		4	19		0,153
Sulfassalazina	1	5		0	0		0,311

Tabela 1. Características dos pacientes com espondiloartrite axial (EpA axial) e controles saudáveis da cidade de Belo Horizonte. Dados estão apresentados em média ou número (porcentagem). Valor considerado significativamente diferente com p-value <0,05.

5.1 Diferenças no aporte nutricional entre pacientes com EpA e controles saudáveis se resumiram ao consumo de folato e manganês

As análises feitas do registro alimentar de 72 horas dos voluntários, que avalia a aporte de calorias, macro e micronutrientes na ingestão atual, não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos do estudo quanto ao consumo de macronutrientes, a citar: carboidrato, proteínas, gordura total (ácido graxo saturado, ácido graxo poliinsaturado, ácido graxo monoinsaturado) e fibras. Com relação ao consumo de micronutrientes, vitaminas e minerais, houve somente diferença no consumo do folato e manganês sendo detectado um maior consumo destes no grupo controle saudável (p-value < 0,006, p-value < 0,045, respectivamente).

Nutrientes/calorias	Grupo EpA	Grupo Controle	p-value
	Média/Mediana	Média/Mediana	
Calorias	1408,2	1583,0	0,143
Carboidrato (g)	163,8	184,3	0,165
Proteína (g)	67,2	70,6	0,587
Lipídeos (g)	49,1	56,2	0,064
Gordura saturada (g)	14,9	19,6	0,174
Gordura poliinsaturada (g)	8,6	7,9	0,704
Gordura monoinsaturada (g)	13,9	14,9	0,575
Fibras (g)	14,7	13,5	0,485
Vitamina A	310,7	580,2	0,835
Vitamina D	1,0	1,5	0,557
Vitamina B1 (mg)	1,0	1,1	0,315
Vitamina B2 (mg)	0,85	1,10	0,171
Vitamina B5 (mg)	1,2	1,7	0,057
Vitamina B6 (mg)	0,8	1,4	0,900
Vitamina B12 (mcg)	1,3	2,6	0,268
Vitamina C (mg)	113,9	57,1	0,068
Vitamina E	8,0	6,0	0,917
Folato (mcg)	36,3	67,2	0,006
Cálcio (mg)	336,8	415,0	0,900
Fósforo (mg)	690,0	796,5	0,178
Magnésio (mg)	150,8	172,1	0,175
Ferro (mg)	13,1	9,8	0,197
Zinco (mg)	6,5	5,8	0,222
cobre (mg)	1,4	0,9	0,648
Iodo (mcg)	14,8	15,1	0,960
Selênio (mcg)	26,9	31,5	0,356
Manganês (mg)	1,3	1,6	0,045
Potássio (mg)	1408,9	1605,5	0,297
Sódio (mg)	2020,6	2149,0	0,434

Tabela 2. Ingestão de calorias, macronutrientes e micronutrientes entre os pacientes com espondiloartrite axial e os indivíduos saudáveis do estudo. A tabela mostra a ingestão atual de calorias, macronutrientes e micronutrientes em pacientes EpA axial e em indivíduos saudáveis, calculados pelo Software Avanutri. A comparação entre grupos com variáveis paramétricas foi utilizado o teste T para amostras independentes e, para amostras não paramétricas, o teste de Mann-Whitney U. Foram consideradas significativas diferenças com $p < 0,05$. Abreviações: EpA, espondiloartrite; g, grama; mg, miligrama; mcg, micrograma.

5.2 O perfil de gordura corporal estava aumentado nos pacientes com EpA axial em relação ao controle saudável

Ao avaliar se havia diferença na composição corporal entre os grupos, observamos um perfil de gordura corporal maior em pacientes com EpA axial em relação aos controles saudáveis. Entretanto, não houve diferenças no perfil de massa magra entre os grupos (Figura 1).

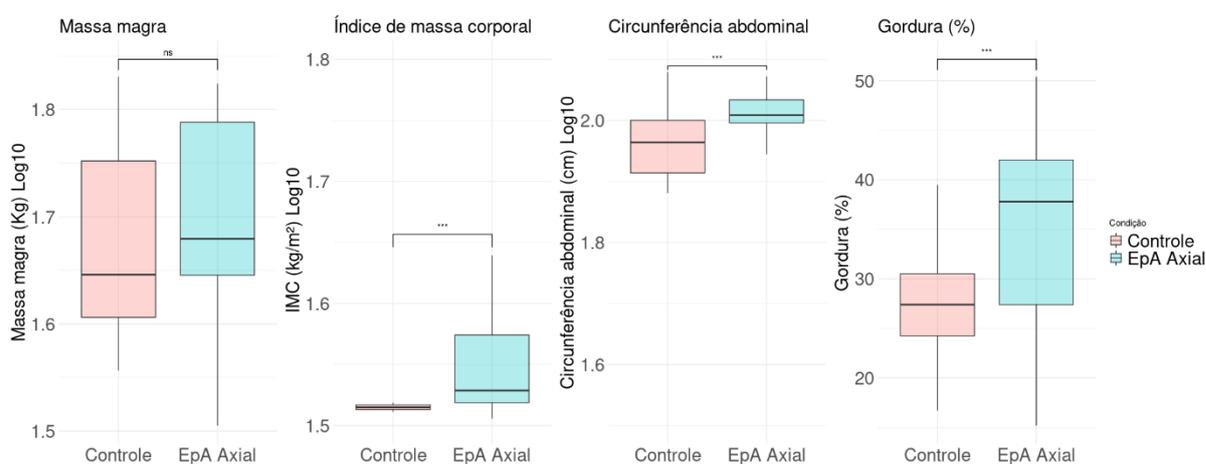


Figura 1- Perfil de gordura corporal aumentada em pacientes com espondiloartrite axial. Perfil de composição corporal avaliado pelos dados antropométricos massa magra, percentual de gordura, índice de massa corporal e circunferência abdominal. Os gráficos representam a comparação dos dados antropométricos coletados de indivíduos com EpA axial comparado aos indivíduos saudáveis. *** indica diferença estatisticamente significativa com p menor que 0,001 avaliado pelo teste Teste T para amostras independentes. Abreviações: EpA, espondiloartrite; Kg- quilograma; IMC, índice de massa corporal; Kg, quilograma, m², metros quadrados.

5.3 Os níveis do marcador de inflamação intestinal calprotectina e da citocina inflamatória IL-17 estavam aumentados em pacientes com EpA axial em relação ao controle saudável

Nosso próximo passo foi avaliar marcadores inflamatórios importantes relacionados com a EpA axial (Figura 2). Para tal comparação, dosamos um marcador de inflamação intestinal, a calprotectina fecal, e a citocina inflamatória IL-17. Os níveis de calprotectina fecal e IL17 sérica nos pacientes com EpA axial foram maiores que no grupo controle sugerindo a presença de inflamação intestinal e sistêmica em pacientes com EpA axial com a doença ativa, mesmo em tratamento.

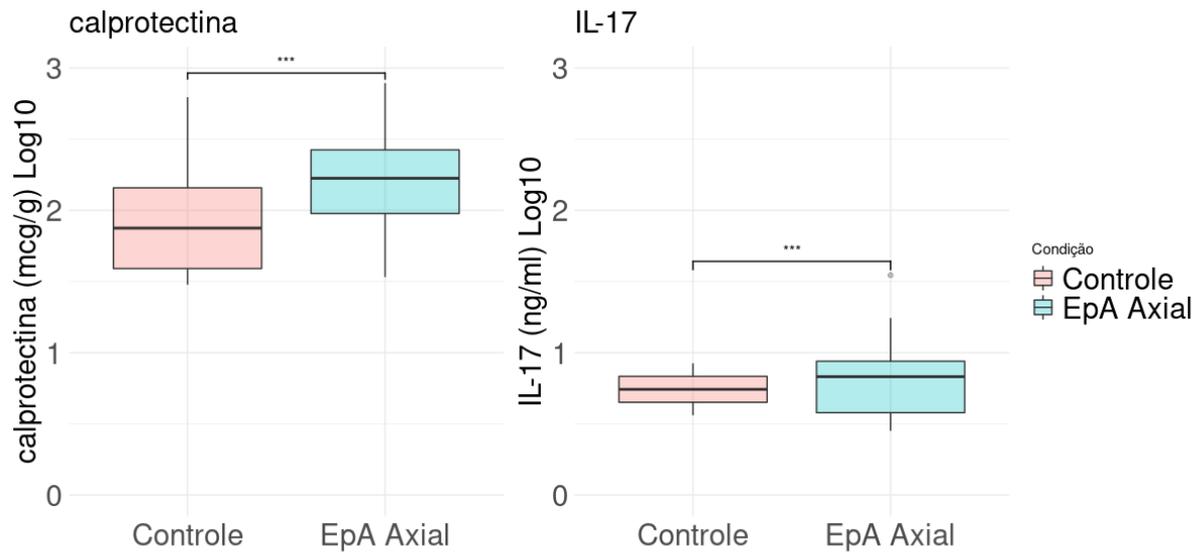


Figura 2- Indivíduos com espondiloartrite axial apresentaram níveis elevados de IL-17 circulantes e presença de inflamação intestinal. Níveis de IL17 medidos indiretamente por ELISA. Presença de inflamação no intestino avaliado pela dosagem nas fezes de calprotectina fecal por ELISA. Os gráficos representam a comparação da medida dos marcadores de inflamação intestinal e níveis de IL17 no soro de indivíduos com EpA axial comparado aos indivíduos saudáveis. *** indica diferença estatisticamente significativa com p menor que 0,001 avaliado pelo teste de Mann-Whitney U. Abreviações: FABP, Proteína Ligadora de Ácido Graxo; LBP, Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo; EpA, espondiloartrite; pg, picograma; ml; mililitro.

5.4 Aumento da permeabilidade intestinal em pacientes com EpA axial

Para avaliar a possibilidade de alteração da permeabilidade intestinal em pacientes com EpA axial, realizamos a dosagem de 2 marcadores de permeabilidade intestinal, a Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo (LBP) e a Proteína Ligadora de Ácido Graxo (FABP). Os resultados sugerem um aumento significativo da permeabilidade intestinal nos pacientes com EpA axial (Figura 3).

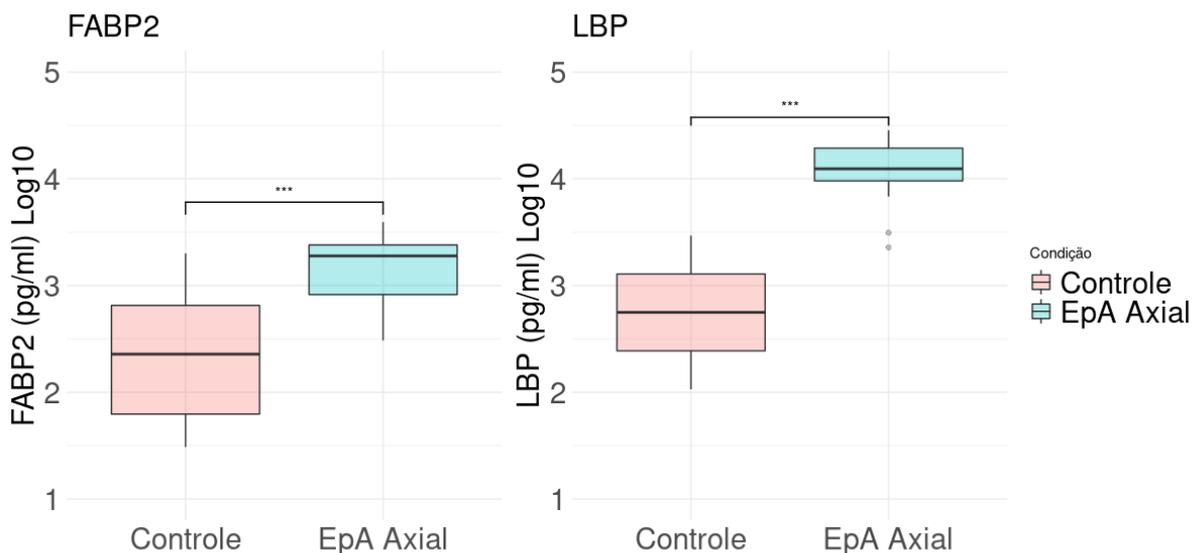


Figura 3- Indivíduos com espondiloartrite axial apresentaram permeabilidade intestinal aumentada. Permeabilidade intestinal medida indiretamente por ELISA. Os gráficos representam a comparação da medida dos marcadores de permeabilidade intestinal de indivíduos com EpA axial comparado aos indivíduos saudáveis. *** indica diferença estatisticamente significativa com p menor que 0,001 avaliado pelo teste de Mann-Whitney U. Abreviações: FABP2, proteína ligadora de ácido graxo; LBP; proteína ligadora de lipopolissacarídeo; EpA, espondiloartrite; ng, nanogramas; mcg, microgramas; g, grama; ml, mililitros

5.5 Perfil da microbiota intestinal alterado em pacientes com EpA axial

Após o sequenciamento das amostras de fezes coletadas, foi plotada uma tabela de abundância e composição de microorganismos com os dados brutos obtidos. Em seguida, foi realizada a análise entre as amostras e os microorganismos e a normalização dos dados para posterior análise.

Primeiramente, foi realizada uma análise descritiva e da ecologia das comunidades para avaliar riqueza, diversidade, características e relações entre os micro-organismos assim como possíveis biomarcadores da doença.

Foram encontrados 1.179 táxons diferentes em todas as amostras coletadas dos voluntários. Ao analisar esses táxons entre os grupos, ao nível de gênero, utilizando o Índice de diversidade de Shannon, não foi observada diferença significativa na diversidade alfa entre o grupo EpA axial e o controle saudável (Figura 4).

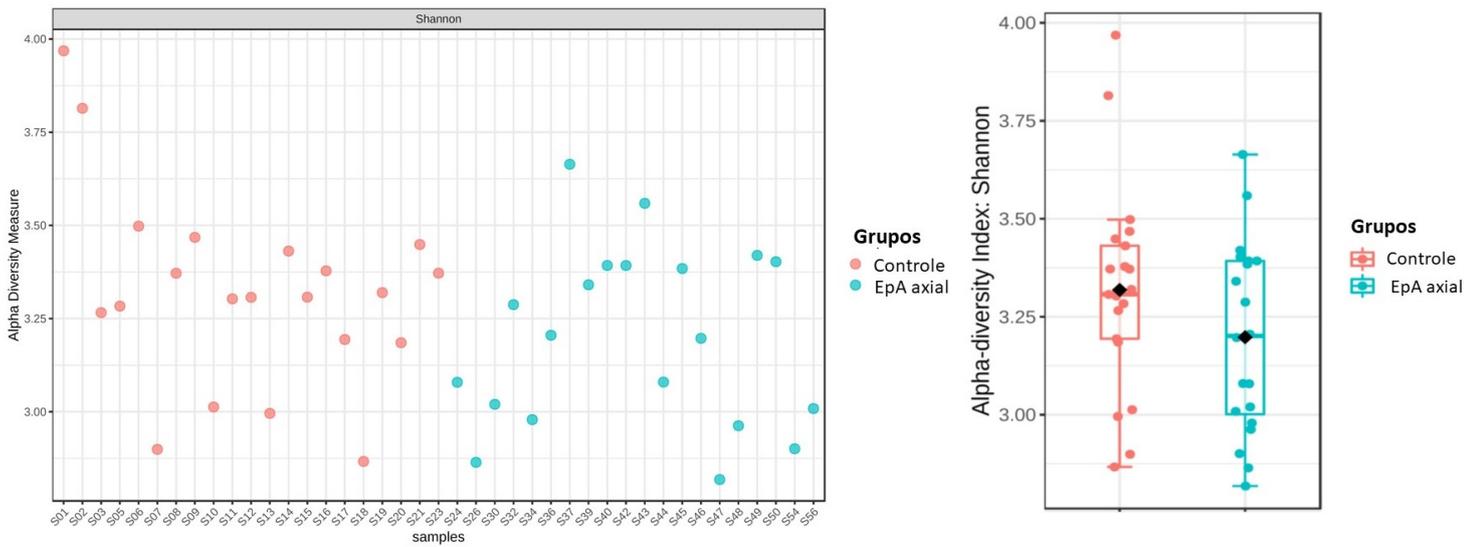


Figura 4- Pacientes com espondiloartrite axial não apresentaram alteração na diversidade alfa quando comparados aos indivíduos controle saudáveis. A diversidade alfa foi medida utilizando o Índice de diversidade de Shannon. Os gráficos representam a comparação da diversidade alfa intestinal de indivíduos com EpA axial comparado aos indivíduos saudáveis. Diferença estatística avaliada pelo teste estatístico PERMDISP. Abreviações: EpA: espondiloartrite.

Entretanto, os resultados da análise da diversidade beta, ao nível de gênero, realizada pelo índice de divergência Jensen-Shannon e pelo teste estatístico PERMDISP mostrou diferença significativa entre os grupos ($p\text{-value} < 0,05$) (figura 5).

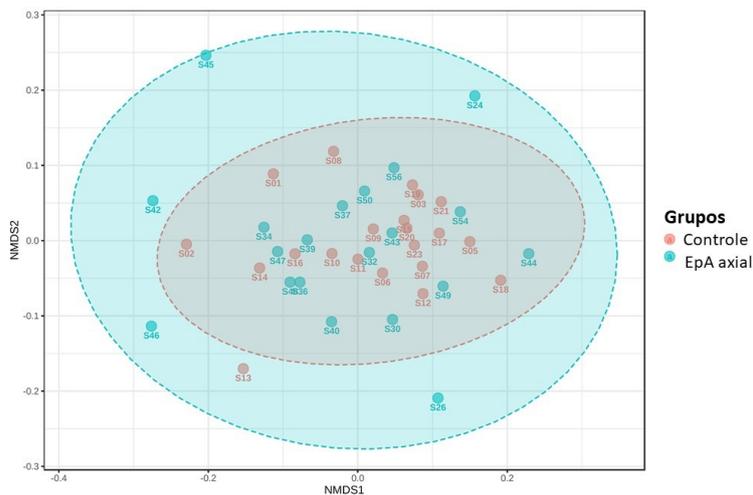


Figura 5- Pacientes com espondiloartrite axial apresentaram alteração na diversidade beta quando comparados aos indivíduos controle saudáveis. A diversidade beta foi medida utilizando o Índice de Jensen-Shannon. Os gráficos representam a comparação da beta-diversidade intestinal de pacientes com EpA axial comparado aos indivíduos saudáveis. Diferença estatística avaliada pelo teste estatístico PERMDISP. Valor considerado significativamente diferente com $p\text{-value} < 0,05$. Abreviações: EpA: espondiloartrite.

Posteriormente, foram realizadas análises para avaliar se existiam diferenças na abundância de táxons entre os grupos. Os resultados mostraram diferenças significativas em alguns táxons na composição da microbiota intestinal de pacientes com EpA axial em relação ao controle saudável (figura 6).

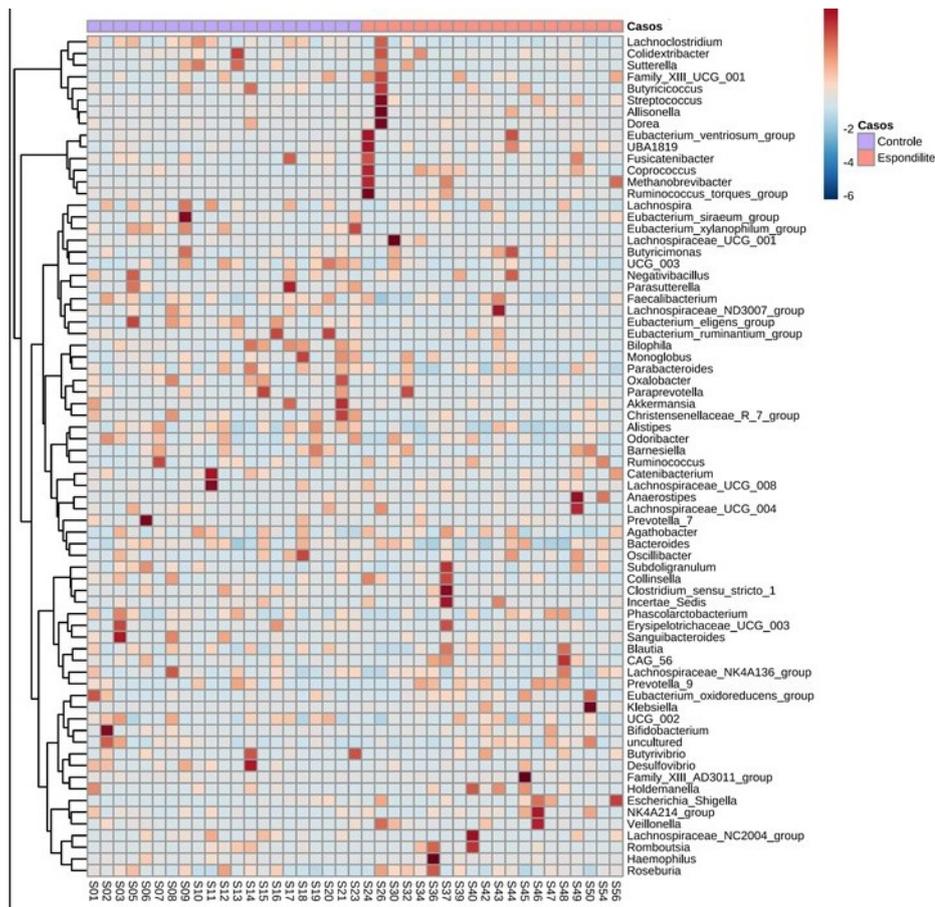


Figura 6- Pacientes com espondiloartrite axial têm táxons com diferentes abundâncias relativas. Heatmap mostrando as diferenças na abundância relativa entres os táxons de pacientes com EpA axial e indivíduos saudáveis.

Entres estes táxons, houve diferença significativa na abundância de alguns gêneros entre os grupos. Para obter resultados mais robustos e consistentes, utilizamos três métodos para esta análise (Metagenoma, Edge R e Random Forest) e consideramos alterados os gêneros que foram comuns entre os três métodos, conforme mostrado no diagrama de Venn, como possíveis biomarcadores da EpA axial (figura 7). Os gêneros *Acidaminococcus*, *Ruminococcus_gauvreauui_group*, *Howardella*, *Klebsiella*, *Methanobrevibacter*, *UBA1819* e *Veillonella* estão significativamente mais abundantes no grupo com EpA axial em relação ao grupo

controle saudável. Já os gêneros *Eubacterium_xylanophilum_group*, *Bilophila* e *Lachnoclostridium* estão significativamente reduzidos no grupo EpA axial em relação ao controle.

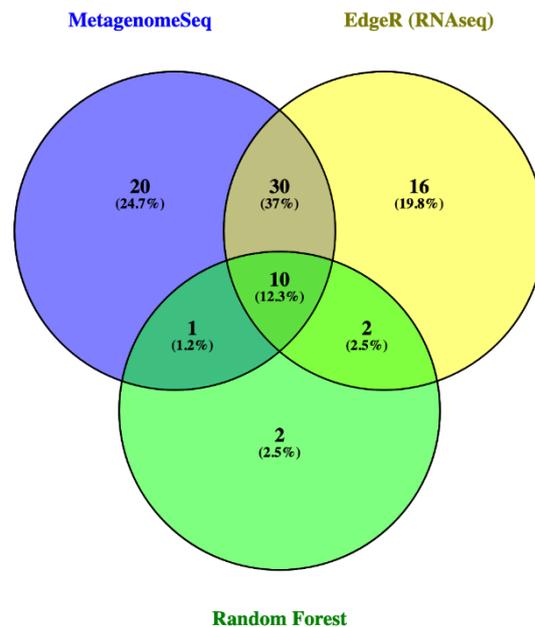


Figura 7- Pacientes com espondiloartrite axial mostrando 10 gêneros alterados. Diagrama de Venn mostrando gêneros com abundâncias relativas significativamente alteradas em pacientes com EpA axial em relação a indivíduos saudáveis.

5.6 Agrupamento e correlações entre os metadados coletados e microbiota

Para uma apreciação inicial das relações entre os metadados entre os grupos, foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico de amostras e metadados (Figura 8). Essa análise mostra que os dois grupos, com exceção de 2 indivíduos, foram claramente separados em dois clusters. É interessante notar que, ao observar a LBP que é um marcador de translocação bacteriana e um marcador indireto de aumento da permeabilidade intestinal, podemos observar que a EpA axial está correlacionada com valores elevados de LBP.

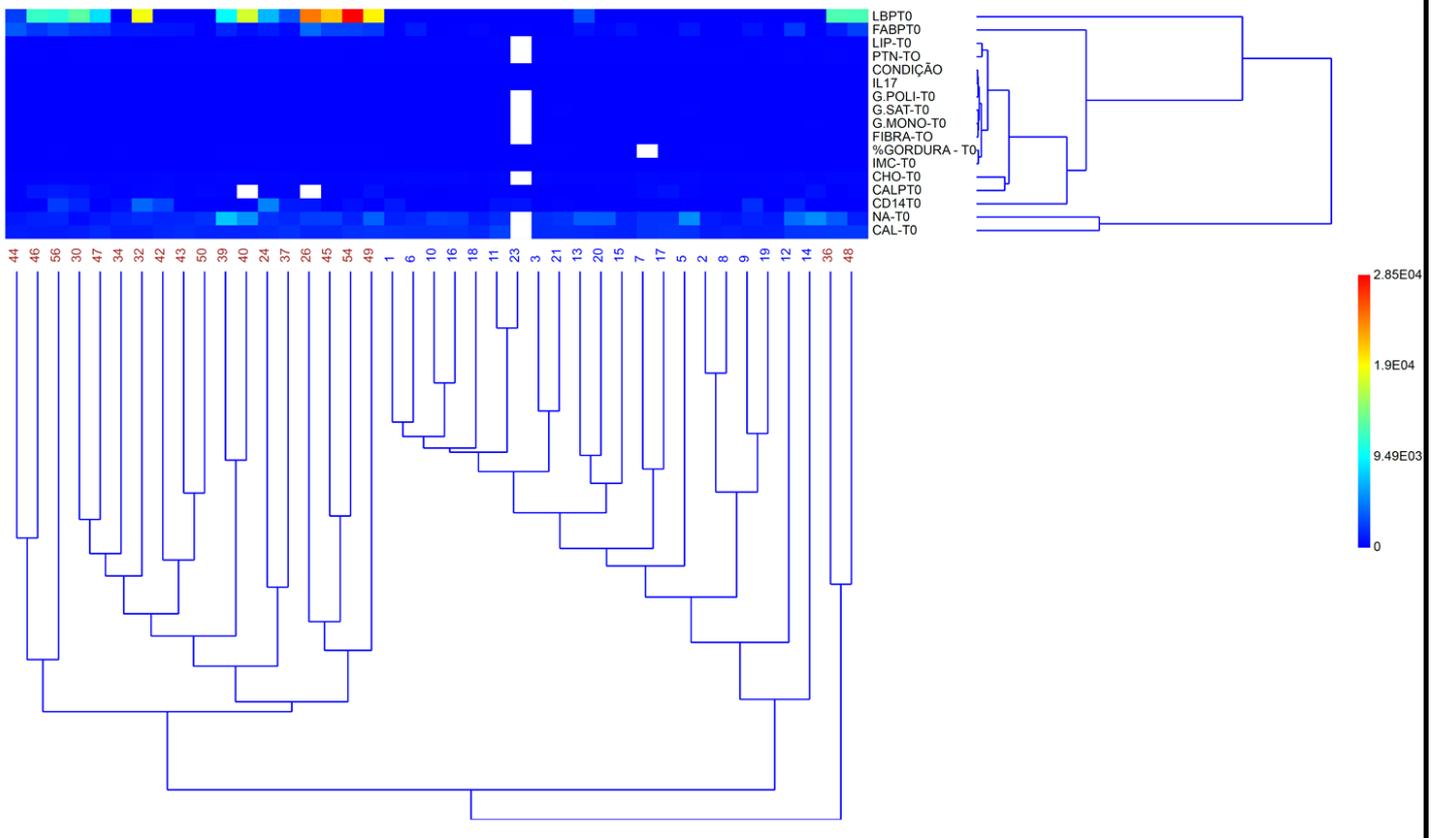


Figura 8- Separação entre os grupos espondiloartrite axial e controle saudável em dois clusters, com exceção de dois indivíduos, e correlação da doença com o marcador de translocação de bactérias e/ou produtos bacterianos (LBP). Agrupamento hierárquico das amostras versus os metadados de voluntários com EpA axial e controle saudáveis. Abreviações: LBP, proteína ligadora de lipopolissacarídeo; FABP2, proteína ligadora de ácido graxo; LIP, lipídeos, PTN, proteínas; IL, interleucina; G.POLI, gordura poliinsaturada; G.SAT, gordura saturada; G.MONO, gordura monoinsaturada; IMC, índice de massa corporal; CHO, carboidrato; CALP, calprotectina; NA, sódio; CAL, calorias.

Posteriormente, avaliamos se, entre os metadados coletados, há correlação entre eles dentro do grupo com EpA axial (Figura 9). Ao analisar os resultados, observamos uma forte correlação positiva entre IMC e percentual de gordura corporal e os dois questionários que avaliam a atividade da doença, ASDAS E BASDAI ($p < 0,05$ em ambos) e uma correlação positiva média e forte, respectivamente, com HAQS que avalia capacidade funcional ($p\text{-value} < 0,05$). Na análise das correlações entre os marcadores de permeabilidade e dados clínicos, observamos uma correlação positiva média entre FABP e a LBP ($p < 0,05$). Por sua vez, as correlações entre marcadores inflamatório e marcadores de permeabilidade mostraram somente uma tendência de

correlação positiva média entre IL-17 e FABP (p-value = 0,051). As correlações entre os marcadores de permeabilidade e os dados antropométricos indicaram uma correlação positiva média entre a LBP e a percentual de gordura corporal (p < 0,05). Não foram encontradas correlações significativas entre os marcadores inflamatórios avaliados (IL-17 e calprotectina fecal) e os dados antropométricos e nem dados clínicos coletados nos questionários. Avaliando as correlações entre a ingestão de macronutrientes, houve uma correlação negativa forte entre fibra e FABP (p < 0,05); e negativa média com o HAQS e porcentagem de gordura corporal. Houve uma tendência a uma correlação negativa média entre o consumo de fibra e níveis de IL-17 (p = 0,054). Nenhuma outra correlação significativa foi encontrada entre os macronutrientes e LBP, IL-17, calprotectina fecal e dados clínicos coletados. Não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre a calprotectina fecal e os demais metadados coletados.

O próximo passo foi avaliar as correlações ecológicas entre os prováveis biomarcadores identificados nos pacientes com EpA axial através de análises de correlação (Figura 9). Entre os gêneros que tiveram menor abundância com relação ao grupo controle, houve uma correlação: 1) negativa média entre *Eubacterium_xylanophilum_group* e *Howardella* 2) positiva média entre *Bilophila* e *Ruminococcus_gauvreauii_group* 3) positiva média entre *Lachnoclostridium* e *Acidaminococcus* e negativa média entre *Lachnoclostridium* e *Howardella*. Avaliando os gêneros que tiveram, por sua vez, maior abundância, houve correlação significativa: 1) negativa média entre *Ruminococcus_gauvreauii_group* e os gêneros *Methanobrevibacter* e *Klebsiella*; 2) positiva média entre *Howardella* e *UBA1819*; 3) *Klebsiella*, *Methanobrevibacter* e a *UBA1819* tiveram correlações fortes entre si.

Para finalizar, avaliamos se havia correlações entre os gêneros microbianos considerados possíveis biomarcadores e os metadados coletados nos pacientes com EpA axial. Os resultados das análises de correlação mostram: 1) uma correlação negativa média com entre o gênero *Eubacterium_xylanophilum_group* e o BASFI (avalia comprometimento funcional), circunferência abdominal e circunferência da cintura; e uma tendência a uma correlação negativa média deste gênero com o ASCoL que avalia qualidade de vida (p-value = 0,054) 2) correlação positiva média entre o gênero *Acidaminococcus* e percentual de gordura. Entre os micronutrientes, selecionando o folato e manganês que foram os dois cujo consumo foi menor no grupo EpA axial, observou-se uma correlação negativa média entre o gênero e *Veillonella* e

o consumo de manganês (figura de correlação com metadados completos no apêndice 5).

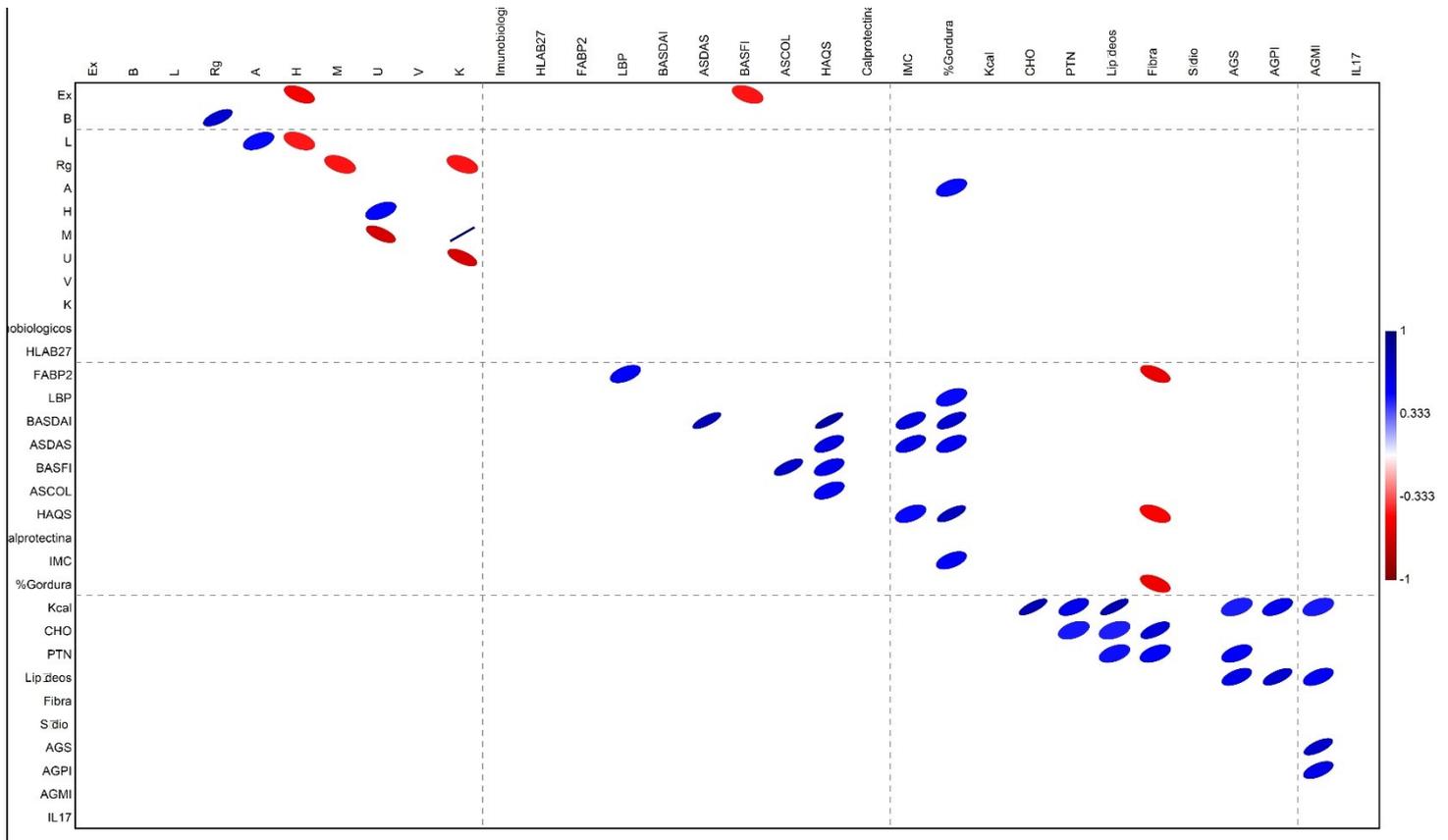


Figura 9- Existência de uma correlação entre os 10 gêneros alterados nos pacientes com espondiloartrite axial, marcadores de permeabilidade intestinal, perfil de gordura corporal, ingestão de fibras e metadados que avaliam o impacto da doença no paciente. O gráfico mostra análises de correlação feitas entre os 10 gêneros alterados, marcadores indiretos de permeabilidade intestinal, dados antropométricos que avaliam perfil de gordura corporal, uso de imunobiológicos, presença do alelo HLA-B27, ingestão de macronutrientes e valor dos questionários aplicados que avaliam o impacto da doença no paciente com EpA axial. Para as análises de correlação foi feita análise bivariada usando o Coeficiente de Pearson, e considerado estatisticamente significativo valor de $p < 0,05$. Abreviações: Ex; *Eubacterium_xylanophilum_group*; B, *Bilophila*; L, *Lachnospirillum*; Rg, *Ruminococcus_gauvreauii_group*; A, *Acidaminococcus*; H, *Howardella*; M, *Methanobrevibacter*; U, *UBA1819*; V, *Veillonella*; K, *Klebsiella*; HLA, Antígeno leucocitário humano; LBP, proteína ligadora de lipopolissacarídeo; FABP2, proteína ligadora de ácido graxo; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASFI, Bath As Functional Index; ASCOL, Ankylosing Spondylitis Quality of Life; HAQS, Health Assessment Questionnaire modificado para espondiloartropatias; PTN, proteínas; IMC, índice de massa corporal; Kcal, calorias; CHO, carboidrato; AGS, gordura saturada; AGPI, gordura poliinsaturada; AGMI, gordura monoinsaturada IL, interleucina.

6 DISCUSSÃO

Na última década, com a evolução dos métodos de avaliação da microbiota intestinal, muitos estudos interessantes têm sugerido uma intrigante associação entre o microbioma de indivíduos com EpA com alteração da permeabilidade intestinal e a patogênese da doença (BREBAN et al., 2017; BREBAN; BEAUFRÈRE; GLATIGNY, 2019; LI et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Neste estudo, mostramos uma alteração na microbiota e alteração da permeabilidade intestinal em pacientes com EpA axial com doença ativa em tratamento. Na assinatura da microbiota intestinal diferente do grupo controle saudável, foram encontrados 10 gêneros com abundância significativamente alterados e que são prováveis marcadores microbianos nesses pacientes. Os resultados também mostraram aumento nos marcadores de permeabilidade intestinal, de inflamação intestinal e níveis séricos de IL-17. Além disto, associações interessantes foram apontadas entre a microbiota e a permeabilidade intestinal com parâmetros da doença, ingestão dietética e dados antropométricos.

As análises descritivas e da ecologia das comunidades realizadas mostraram que, embora não tenhamos observado diferença na diversidade alfa, foi encontrada diferença significativa na diversidade beta entre os grupos e na abundância relativa entre os táxons encontrados. Foram considerados como prováveis biomarcadores microbianos, nesses pacientes com EpA axial, os gêneros que apresentaram abundância relativa alterada quando analisadas por 3 métodos diferentes, Metagenoma, Edge R e Random Forest, sendo estes: *Acidaminococcus*, *Ruminococcus_gauvreauii_group*, *Howardella*, *Klebsiella*, *Methanobrevibacter*, *UBA1819* e *Veillonella* aumentados e *Eubacterium_xylanophilum_group*, *Bilophila* e *Lachnospirillum* reduzidos no grupo EpA axial em relação ao controle.

A microbiota nativa é formada juntamente com o processo de maturação do intestino e da imunidade de mucosa no início da infância, no período do nascimento até 5 anos de idade, sendo os 3 primeiros anos os mais críticos. Embora essa microbiota nativa apresente uma resiliência e estabilidade grande ao longo da infância e da vida adulta, fatores externos como uso de antibióticos e mudanças na alimentação podem desencadear alterações na sua composição (CHENG et al., 2016;

NIU et al., 2020; RINNINELLA et al., 2019). Como a alimentação tem se mostrado como um dos fatores que mais influencia a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal assim como sua atividade metabólica (BARBER et al., 2021; REDONDO-USEROS et al., 2020; STATOVCI et al., 2017), avaliamos também, neste estudo, possíveis diferenças no aporte nutricional entre os grupos como as possíveis relações destas com a microbiota. Este é um aspecto que tem sido deixado de lado ou analisado de forma muito superficial em outros estudos que avaliam variações na microbiota intestinal em indivíduos com EpA (ZHANG et al., 2019). Em nosso estudo, os dados sobre a ingestão atual dos voluntários mostraram que não havia diferença entre o consumo de macro e micronutrientes entre os grupos, exceto por um maior consumo de folato e manganês pelo grupo controle saudável. Não existem ainda na literatura evidências que mostrem associação entre um menor consumo de folato e alterações na microbiota. Entretanto, há estudos sobre o impacto do folato no sistema imune. O folato tem um papel importante na síntese de DNA e no ciclo celular, além de atuar como importante fator epigenético por participar de reações de metilação do DNA e regulação da expressão gênica. Entre as ações do folato no sistema imune, sugere-se que ele tenha papel na manutenção de células Treg no intestino, na citotoxicidade de células NK e na produção de anticorpos (GOMBART; PIERRE; MAGGINI, 2020; TOURKOCHRISTOU; TRIANTOS; MOUZAKI, 2021). No nosso estudo, não encontramos correlação entre a ingestão de folato e manganês e nenhum dos marcadores inflamatórios e de permeabilidade intestinal avaliados. O mesmo se deu em relação aos macronutrientes, com exceção do consumo de fibras.

Estudos pré-clínicos sugerem que dietas baixas em fibras levam a uma redução importante na camada de muco no intestino, que tem um papel fundamental de proteção física das mucosas (DESAI et al., 2016; LELES et al., 2021; STATOVCI et al., 2017). Uma possível causa dessa redução seria um aumento de espécies bacterianas que degradam muco, como *A. muciniphila* e *B. caccae*, juntamente com uma redução de bactérias que degradam fibras e/ou uma mudança no seu metabolismo (por exemplo, pela troca de substrato utilizado). A redução no muco, por sua vez, aumentaria o risco de contato de patógenos invasivos com a mucosa e de aumento da permeabilidade intestinal, sendo que esses eventos poderiam se tornar gatilhos para uma resposta inflamatória. A dieta rica em fibras, ao contrário, estaria associada a uma redução na produção de algumas citocinas pró-inflamatórias e a uma

maior produção de AGCC. Os AGCC estão relacionados com uma maior produção de mucina, manutenção da barreira mucosa (fonte de energia para enterócitos), maior formação de células Treg, entre outros benefícios importantes com efeitos anti-inflamatórios e protetores da integridade do epitélio intestinal, além de outros benefícios no controle metabólico e na saúde (DESAI et al., 2016; LELES et al., 2021; STATOVCI et al., 2017). Neste estudo não observamos diferenças entre o consumo de fibras entre os grupos EpA axial e controle, mas, em ambos, a média da ingestão de fibras ($14,7g \pm 6,9$ e $13,52g \pm 3,8$; respectivamente) estava abaixo ou próximo ao limite inferior da ingestão diária recomendada de fibras que é em torno de 21 a 38g/dia, dependendo do sexo e faixa etária (PADOVANI et al., 2006). Ao avaliar a correlação entre as fibras e os demais metabólitos no grupo EpA axial, observamos uma forte correlação negativa entre consumo de fibras e o marcador de apoptose de enterócitos e indicador indireto de aumento da permeabilidade, FABP2. Outro achado interessante nesse mesmo sentido foi a correlação negativa entre o consumo de fibras e os valores do questionário HAQS. Esses resultados sugerem que um menor consumo de fibra está correlacionado à incapacidade dos pacientes em realizar atividades do dia a dia (medida pelo questionário HAQS). Observamos também uma tendência a correlação negativa entre consumo de fibras e os níveis séricos de IL-17, uma citocina chave na fisiopatologia da doença. Embora não tenha ocorrido correlação entre o consumo de fibras com o marcador de translocação de produtos bacterianos (LBP), esses resultados fortalecem os achados em estudos pré-clínicos de uma correlação entre o consumo de fibras e integridade da mucosa intestinal (DESAI et al., 2016; LELES et al., 2021; STATOVCI et al., 2017). Essa correlação entre translocação de produtos microbianos e consumo de fibras parece ser significativa na vigência de uma inflamação intestinal (clínica ou subclínica) e poderia atuar como gatilho e/ou perpetuação do quadro inflamatório (DESAI et al., 2016; LELES et al., 2021; STURGEON; FASANO, 2016).

Ciccia e colaboradores analisaram biópsias intestinais da parte do íleo de pacientes com EA sem alterações histológicas, com inflamação aguda e crônica em relação a indivíduos saudáveis (grupo controle). Eles observaram um aumento de bactérias aderentes e invasivas nos indivíduos com EA e, entre estes, a inflamação intestinal esteve positivamente correlacionada com o número de bactérias patogênicas. Foi observado também uma associação entre o aumento dessas

bactérias e uma menor expressão de proteínas de junção firme (*tight junctions*) no epitélio intestinal e aumento nas concentrações séricas dos marcadores indiretos de permeabilidade intestinal FABP, LBP, CD14 solúvel e zonulina. Esses autores sugerem, baseado em seus resultados, que a disbiose e o dano de mucosa intestinal encontrados estariam relacionados a um aumento da permeabilidade intestinal e a um consequente aumento de translocação de proteínas derivadas do lúmen do intestino para a corrente sanguínea. Segundo eles, tais alterações poderiam resultar em mudanças imunológicas que seriam parte na patogênese da EA (CICCIA et al., 2017a).

No nosso estudo, utilizamos dois dos marcadores indiretos de permeabilidade intestinal: 1) FABP2, proteína expressa somente em enterócitos no intestino delgado, e que seu aumento é indicativo de apoptose de enterócitos e danos na mucosa intestinal; 2) LBP, proteína que se liga ao LPS no sangue e que seu aumento é indicativo de translocação de bactérias e/ou produtos bacterianos. Não foi possível avaliar a biópsia do intestino dos pacientes por sua natureza mais invasiva, mas utilizamos os marcadores indiretos de permeabilidade, utilizados no estudo mencionado acima, e em outros (CICCIA et al., 2017a; UHDE et al., 2016). Nossos resultados mostram que, assim como no estudo do Ciccia e colaboradores, os pacientes com EpA axial apresentaram maiores níveis séricos dessas proteínas, sugerindo que esses pacientes apresentam dano intestinal, aumento da permeabilidade e uma maior translocação de bactérias e/ou produtos bacterianos; sugerindo uma maior permeabilidade intestinal nestes pacientes. Detectamos também uma correlação positiva entre IL-17 e FABP2 sugerindo que uma barreira intestinal mais permeável levaria a maior invasão / translocação bacteriana e isso levaria por sua vez a uma maior inflamação da mucosa e aparecimento de doença. E outra possibilidade é que a doença leve a inflamação intestinal e isso torna a barreira mais permeável. Outro fator que pode ter influenciado o aumento dos marcadores de permeabilidade seria a alteração na microbiota intestinal encontrada. Entretanto, não houve uma correlação entre os gêneros microbianos alterados e os marcadores indiretos de permeabilidade.

Outro fator que tem mostrado associação importante tanto na composição da microbiota intestinal como na inflamação é a composição de gordura corporal. Estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que a obesidade está associada a um processo

inflamatório de baixo grau, ao aumento da permeabilidade intestinal e a um quadro de disbiose embora ainda não esteja estabelecido se esta causa e/ou consequência da condição clínica dos obesos (BATTINENI et al., 2021; CHELAKKOT; GHIM; RYU, 2018; YE; MCGUINNESS, 2013). Ao compararmos a composição corporal entre os grupos, o grupo com EpA axial apresentou um perfil de gordura corporal maior em relação ao controle. Tal diferença pode se justificar tanto por um viés na seleção amostral (não foi feito pareamento por IMC) como também pelo fato de haver uma maior ocorrência de obesidade em indivíduos com doenças autoimunes, devido a fatores como menor mobilidade, efeito do uso de medicamentos e presença de um processo inflamatório crônico e sua influência no metabolismo (BRIOT et al., 2008). Um achado muito interessante deste estudo foi que, avaliando as correlações entre os metadados, o IMC, que está aumentando em indivíduos com maior composição de gordura corporal, teve uma forte correlação com a atividade inflamatória da doença (avaliado pelo ASDAS e BASDAI) e com a capacidade funcional de realizar atividades rotineiras. Esses resultados sugerem que, em indivíduos com EpA axial, a obesidade poderia agravar o quadro clínico da doença e interferir na qualidade de vida dos pacientes. Não houve correlação entre os marcadores antropométricos que avaliam perfil de gordura corporal e os marcadores inflamatórios avaliados. Porém, uma correlação da obesidade com outros marcadores inflamatórios tais como TNF, IL6, IL1-beta não avaliados neste estudo pode estar presente, como já relatado em outros estudos com pacientes obesos (BATTINENI et al., 2021; YE; MCGUINNESS, 2013). Encontramos uma correlação positiva média entre IMC, percentual de gordura corporal e translocação de produtos bacterianos, sugerindo que, nos pacientes com EpA axial, o índice de obesidade se relaciona diretamente com o grau de translocação de produtos bacterianos circulando e possível aumento da permeabilidade intestinal, com possível agravamento do processo inflamatório. Tendo em vista que neste estudo o grupo com EpA axial era composto por uma maioria de indivíduos com um maior perfil de gordura corporal, resta o questionamento se a possível alteração na permeabilidade intestinal e translocação de produtos bacterianos seria somente consequência da obesidade ou se estaria presente mesmo na sua ausência. Para tal, seria interessante, em novos estudos, incluir mais voluntários considerados eutróficos e com baixo percentual de gordura, e comparar com os indivíduos obesos.

Estudos recentes têm mostrado uma forte sobreposição genética entre EpA axial e as doenças inflamatórias intestinais (DII), sendo que cerca de 20 de 30 genes

associados a EpA são compartilhados com as DIIs. Além disto, esses estudos também mostram que cerca de 6 a 10% de pacientes com EA apresentam relato de DIIs e 60 a 70% sinais de inflamação intestinal subclínica, na qual fatores como alta atividade da doença, sexo masculino e idade mais jovem demonstraram estar independentemente associados (PEDERSEN; MAKSYMOWYCH, 2018; VAN PRAET et al., 2013; WATAD et al., 2018). Um método menos invasivo e com bons resultados utilizado em estudos de pacientes com DIIs para avaliar a inflamação intestinal é a dosagem da calprotectina fecal. A calprotectina fecal é uma proteína derivada predominantemente de neutrófilos constituindo entre 30 a 60% das proteínas totais dos neutrófilos. Sua detecção em amostras de fezes humanas está relacionada à migração de neutrófilos para o lúmen intestinal. Como o aumento desse infiltrado inflamatório tem sido correlacionado com achados endoscópicos de inflamação grave e inflamação sistêmica, a medida de calprotectina é considerada bom marcador de inflamação intestinal (FERREIRO-IGLESIAS et al., 2018; YE et al., 2021). Os resultados das análises da calprotectina fecal mostraram que os pacientes com EpA axial tiveram níveis mais altos de calprotectina fecal em relação ao grupo controle saudável sugerindo a presença de uma inflamação intestinal nesses pacientes, como já relatado em outros estudos (CICCIA et al., 2017b; VAN PRAET et al., 2013). Entretanto, contrariamente ao que esperávamos, não houve correlação desse marcador com nenhum metadado coletado e nem com os 10 gêneros microbianos alterados.

Por último, com uma visão mais ampla dos metadados e suas correlações, avaliamos as relações ecológicas entre os 10 gêneros alterados e suas possíveis correlações com os metadados. O gênero *Veillonella* é composto por bactérias anaeróbias obrigatórias, Gram-negativas. Essas bactérias fermentam lactato como única fonte de energia a propionato em condições anaeróbicas. A presença de ácidos biliares parece inibir seu crescimento. Há relatos de casos de infecção por essas bactérias causando bacteremia, endocardite e osteomielite. Sua abundância relativa aumentada no grupo EpA axial também foi observada no estudo realizado por Li e colaboradores em pacientes com EpA em uso de imunobiológicos (HIRAI et al., 2016; LOOMBA et al., 2020; VESTH et al., 2013). As bactérias do gênero *Lachnoclostridium* são produtoras de acetato e estudos sugerem uma correlação positiva forte entre esse gênero e gordura visceral com impacto negativo na obesidade e no diabetes tipo 2. Sua abundância relativa aumentou em um ensaio clínico de intervenção por 3 meses

utilizando dieta mediterrânea, dieta rica em fibras e polifenóis (NOGAL et al., 2021; PAGLIAI et al., 2020; TETTAMANZI et al., 2021). No estudo de Chen e colaboradores, a abundância relativa desse gênero estava reduzida, assim como no nosso. Entretanto no estudo desses pesquisadores, houve recuperação da abundância relativa em relação ao grupo controle após tratamento com Adalimumabe (CHEN et al., 2021). No nosso estudo, 57% dos pacientes com EpA axial faziam uso de imunobiológicos, e destes, cinco de Adalimumabe. Não observamos correlação entre o uso de imunobiológicos e os gêneros alterados. Assim, acreditamos que esses medicamentos não influenciaram nossos resultados, embora esta possibilidade não possa ser descartada também. O gênero *Bilophila* é composto por bactérias gram-negativas, obrigatoriamente anaeróbias, catalase-positivas, resistentes à bile e assacarolíticas. Em condições anaeróbicas, a espécie *Bilophila wadsworthi* é um dos poucos microorganismos conhecidos que degradam a taurina livre (metabólito contendo enxofre) produzindo H₂S (sulfeto de hidrogênio). Em pacientes com DIIs, ocorre um aumento na excreção de ácidos biliares devido à captação ineficiente de ácidos biliares no íleo (distorção da recirculação enterohepática), o que poderia ser um gatilho para o aumento de algumas bactérias bile-resistente e sulfidrogênicas como a *Bilophila wadsworthi* levando ao aumento da produção de sulfeto de hidrogênio. Existe na literatura uma associação entre DII e aumento na abundância de *Bilophila wadsworthi* e metabólitos como o sulfeto de hidrogênio (DAHL; RIVERO MENDOZA; LAMBERT, 2020; WALKER; SCHMITT-KOPPLIN, 2021). No nosso estudo, sua abundância relativa está reduzida, assim como no estudo de Yin e colaboradores em pacientes sem tratamento com imunobiológicos, sendo que os aqueles que faziam uso de imunobiológicos não tiveram diferença em relação ao grupo controle saudável. O mesmo se deu com o gênero *Klebsiella* nesse estudo (YIN et al., 2020). Entretanto, os resultados do nosso estudo estão em desacordo com os achados destes autores. Nossos dados mostram que o gênero *Klebsiella* está aumentado em pacientes com EpA quando comparados aos indivíduos controle. E como mencionado anteriormente, não houve correlação entre esses gêneros e o uso de imunobiológicos no nosso estudo. O gênero *Klebsiella* é composto por bactérias gram-negativas, não-móveis, capsuladas. Geralmente essas bactérias são patógenos oportunistas, resistentes a vários antibióticos, mas que geralmente não afetam indivíduos saudáveis. Esse gênero de bactérias expressa a enzima cisteína desulfurase que catalisa a reação de cisteína e água para produção de piruvato, NH₃

e H₂S (sulfeto de hidrogênio). A espécie *K. pneumoniae* é um dos principais agentes etiológicos de infecção hospitalar e tem sido apontada por alguns autores como correlacionada com a EpA. Entretanto, há divergência de opiniões na literatura sobre essa associação (PATRO; RATHINAVELAN, 2019; WYRES; LAM; HOLT, 2020). O aumento da abundância dos gêneros, *Acidaminococcus*, *Ruminococcus_gauvreauii_group*, *Howardella*, *Methanobrevibacter* e *UBA1819*, aumentados em pacientes com EpA em nosso estudo não foi relatado ainda por outros ensaios clínicos avaliando a microbiota de pacientes com EpA.

O gênero *Acidaminococcus* é composto por bactérias anaeróbicas, gram-negativas que utilizam D- e L Glutamato, trans-aconitato e citrato como fontes de energia; 40% das espécies desse gênero catabolizam glicose produzindo um pouco de ácido. Em um meio complexo, produzem ainda amônia, gás carbônico, acetato, butirato e hidrogênio são produzidos. Essas bactérias atuam em simbiose com microorganismos metanogênicos como a *Methanobrevibacter* (BOIANGIU et al., 2006; JUMAS-BILAK et al., 2007). Em nosso estudo, não houve correlação entre esses dois gêneros de bactérias. Notamos, no entanto, uma correlação positiva média entre esse gênero e o gênero *Lachnospirillum*. Ambos os gêneros estavam aumentados em pacientes obesos (NOGAL et al., 2021; PINART et al., 2022). Embora os pacientes com EpA apresentavam um maior perfil de gordura corporal, inclusive gordura visceral, aumentado, somente o gênero *Acidaminococcus* estava aumentado e apresentando uma correlação positiva média com o percentual de gordura corporal. A abundância relativa das bactérias do gênero *Lachnospirillum* estava reduzida e sem correlação significativa com os marcadores de perfil de gordura corporal. Tal resultado sugere que fatores inerentes da nossa coorte e/ou aspectos da doença podem resultar em associação distintas entre a gordura corporal e esses dois gêneros.

Entre os 10 gêneros alterados, houve uma tríade de gêneros que se destacou por apresentarem forte correlação positiva entre si: *Methanobrevibacter*, *Klebsiella* e *UBA1819*. O gênero *Methanobrevibacter*, aumentado no grupo EpA axial, é composto por arqueas, estritamente anaeróbicas, que convertem o gás hidrogênio em metano via a redução de gás carbônico, sendo a metanogênese sua única forma de energia para seu crescimento. A espécie *Methanobrevibacter smithii* é a mais dominante (94%), no gênero, no TGI humano. Geralmente arqueas metanogênicas, como as *Methanobrevibacter*, competem com bactérias sulforedutoras pelo gás hidrogênio.

Houve uma correlação positiva forte entre este e o gênero *Klebsiella* também aumentado. Ambos, entre os gêneros aumentados, foram os mais expressivos com abundância relativa aumentada em relação ao controle saudável. A eliminação do gás hidrogênio por arqueas do gênero *Methanobrevibacter* aumenta a eficiência da fermentação de carboidratos por microrganismos no intestino e, como este é um nutriente importante para espécie *Klebsiella pneumoniae*, poderia ser umas das possíveis justificativas para essa correlação (ROWLAND et al., 2018; SAENGERDSDUB; RICKE, 2014; TAKAKURA; PIMENTEL, 2020). Outro aspecto em comum entre esses dois gêneros é que ambos tiveram uma correlação negativa média com o gênero *Ruminococcus_gauvreauii_group*. Esse gênero é composto por bactérias gram-positivas, estritamente anaeróbicas que metabolizam D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-ribose, D-sorbitol, Dmannitol, inositol e sacarose produzindo ácidos. Por sua vez, foi mostrado que ácidos advindos da fermentação diminuem o PH no trato gastrointestinal e têm efeito adverso na metanogênese (DOMINGO et al., 2008). Observamos uma correlação positiva forte entre a abundância relativa do gênero *Ruminococcus_gauvreauii_group* e o gênero *Bilophila*.

Outro gênero pertencente à tríade mencionada, *UBA1819*, aumentando nos pacientes com SpA neste estudo, é um gênero pouco documentado na literatura, produtoras de succinato. O succinato pode ser produzido, como produto intermediário, pela fermentação de inulina e FOS por algumas bactérias. Dois estudos em camundongos mostraram que bactérias desse gênero aumentam em abundância com o consumo de linhaça (fonte de fibras) e prebióticos (OBERMÜLLER et al., 2020; XIA et al., 2022). Não houve correlação entre o consumo de fibras e a abundância desse gênero no nosso estudo. A quantidade de prebióticos naturalmente presente em alguns alimentos como a banana, cebola, alho, entre outros, não é quantificado pelo software utilizado no estudo. Esse gênero também apresentou uma correlação positiva média com o gênero *Howardella* que é composto por bactérias gram positivas, anaeróbicas estritas quem fermentam acetato para seu crescimento. Observamos também uma correlação média negativa do gênero *Howardella* com os gêneros *Eubacterium_xylanophilum_group* e *Lachnoclostridium*, sendo que esse último é composto por bactérias produtoras de acetato, substrato fermentado pela *Howardella*. O gênero *Eubacterium_xylanophilum_group* foi o que chamou mais a atenção pois foi o único dos 10 gêneros alterados que apresentou correlação com metadados que

avaliam o impacto da doença no paciente. Ele é composto por bactérias gram-positivas, anaeróbias e parece ter efeitos negativos na função cerebral em estudo pré-clínicos (DILING et al., 2020; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2014). Esse gênero, reduzido no grupo EpA axial, teve uma correlação negativa média com a intensidade de comprometimento funcional dos pacientes com EpA axial avaliado pelo questionário BASFI e uma tendência a ter correlação negativa média com a qualidade de vida avaliado pelo questionário ASQoL. Esses achados sugerem que quanto menor a abundância das bactérias desse gênero nos pacientes, maiores as limitações e pior a sua qualidade de vida. Entretanto, um ponto importante é que também houve correlação negativa média com as medidas antropométricas da circunferência abdominal e da cintura que estão ambas aumentadas em indivíduos obesos como aqueles do grupo de pacientes com EpA. Desconhecemos estudos que tenham encontrado esse gênero alterado em indivíduos obesos ou correlação similar com esses parâmetros antropométricos. Continuamos com a questão se estes achados sobre o gênero *Eubacterium_xylanophilum_group* vistos neste estudo seriam causa ou consequência da obesidade mais prevalentes nestes pacientes, e/ou influenciados por este fator e outras alterações característicos da doença.

Focalizamos a análise da associação da dieta com a microbiota intestinal nos 10 gêneros considerados prováveis biomarcadores da EpA e os nutrientes. Em relação aos macronutrientes, não encontramos nenhuma correlação significativa. Ao avaliar a correlação entre os micronutrientes e os 10 gêneros alterados, entre as correlações encontradas, destacamos os dois micronutrientes cujo consumo foi significativamente diferente entre os grupos. O mineral manganês, cuja ingestão foi menor no grupo com EpA axial, se correlacionou negativamente com o gênero *Veillonella*, que teve sua abundância relativa aumentada no grupo EpA axial em relação ao controle e foi o único gênero que não apresentou nenhuma correlação significativa com os demais 9 prováveis biomarcadores microbianos. Esses achados reforçam a influência direta dos nutrientes consumidos na microbiota intestinal.

Avaliando, de forma global, os resultados discutidos aqui, um ponto importante a ser destacado é que, embora os dados tenham mostrado um aumento no dano de mucosa e translocação de produtos bacterianos sugerindo um aumento na permeabilidade intestinal nos pacientes com EpA, não foi possível demonstrar uma correlação entre os marcadores de permeabilidade e atividade da doença e os

prováveis biomarcadores microbianos. Cabe ressaltar que talvez a influência da permeabilidade intestinal no quadro inflamatório seja mais significativa em estágios iniciais (antes do uso de medicamentos) ou anteriores ao desencadeamento da doença. Neste estudo, somente foram incluídos pacientes com doença ativa e já em tratamento. Talvez um tamanho amostral maior e a presença também de pacientes com EpA axial em outros estágios da doença (doença inativa, recém- diagnosticado), não incluídos e que são limitações do estudo, poderiam mostrar outras correlações não encontradas neste estudo. Outra hipótese seria que essa correlação poderia ser subclínica, não sendo detectada pelos questionários aplicados e estar ligada a outros marcadores inflamatórios (citocinas, células imunes) não avaliados neste estudo. Todas essas questões podem ter influenciado nos resultados nos quais não encontramos correlações entre os metadados e a microbiota neste estudo. Outro aspecto importante é que o método utilizado de metagenoma de amplicon não nos permitiu avaliar outros microorganismos, como os fungos. Em um estudo com pacientes com EpA no qual a microbiota foi analisada pelo método de shotgun (mais abrangente que o metagenoma de amplicon), foi demonstrado que as alterações na abundância de fungos (diversidade da microbiota) era mais relevante que aquelas encontradas entre as bactérias (LI et al., 2019). Esses microorganismos, seus metabólitos e suas respectivas relações ecológicas entre si e com o sistema imune podem ter papel importante na permeabilidade intestinal e no desenvolvimento da EpA.

Embora o número de estudos como o nosso avaliando o perfil da microbiota em pacientes com EpA axial tenha crescido, não foi descrita, até o momento, uma assinatura microbiana relacionada à doença. As sugestões de gêneros e/ ou espécies mostradas nos ensaios clínicos, inclusive no nosso, divergem entre eles e provavelmente isto ocorre devido a diversos fatores como tamanho amostral, métodos diferentes de sequenciamento, fase da doença (inicial, inativa, ativa em tratamento), diferenças entre as características dos indivíduos (região, cultura, hábitos alimentares locais, genética, etc), entre outros (BREBAN; BEAUFRÈRE; GLATIGNY, 2019; CICCIA et al., 2017a; SO; TAM, 2020).

Nosso estudo contém limitações como pequeno tamanho amostral, ausência de pareamento entre o grupo com EpA axial e controle quanto ao percentual de gordura corporal, ausência de grupos em estágios diferente da doença, o uso de

medicamentos que podem afetar tanto a microbiota como a permeabilidade intestinal. Além disto, o método utilizado no nosso estudo, Metagenoma de Amplicon, ao contrário do Shotgun, não nos permite apontar as espécies alterados (somente indica possíveis espécies), possibilitando a análise das alterações até o nível de gênero. Essa metodologia também não avalia outros microorganismos como os fungos, vírus e análises de funções do microbioma.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou uma alteração na microbiota intestinal em pacientes com EpA axial em relação a controles saudáveis, sendo que 10 gêneros (bactérias e arqueas) com abundância relativa alterados são apontados como prováveis biomarcadores microbianos na EpA axial nesses indivíduos avaliados no Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte. Destes, somente o gênero *Eubacterium_xylanophilum_group* mostrou correlação com o impacto da doença nos pacientes estudados. Houve também uma correlação entre alguns dos prováveis biomarcadores microbianos e metadados relacionados a perfil de gordura corporal e ingestão dietética.

Este estudo, dada a natureza de suas análises e limitações, não nos permite falar em causalidades entre os resultados encontrados, mas as análises feitas e a riqueza nos metadados avaliados nos permitem afirmar que existe um maior dano de mucosa intestinal, presença de inflamação intestinal e aumento de passagem de produtos bacterianos para a corrente sanguínea e um possível aumento da permeabilidade intestinal nos pacientes com EpA axial. Essas alterações não se correlacionaram com a atividade da doença e seu impacto no dia a dia dos pacientes e nem com os prováveis biomarcadores microbianos apontados nesse grupo de pacientes com EpA axial estudados.

Mesmo com as limitações apontadas, os resultados deste estudo são intrigantes e inovadores, uma vez que desvendam muitas correlações com metadados importantes não avaliados em estudos clínicos publicados até o momento. No entanto, eles devem ser interpretados com cautela e mais estudos com tamanho amostral maior, com os cuidados com as limitações apontadas no nosso, e preferencialmente como uma análise mais ampla do microbioma, são necessários e muito importantes no caminho para o desenvolvimento de tratamentos alternativos, como intervenções dietéticas específicas, que teriam como objetivo modular a microbiota e o aumento da permeabilidade intestinal. E assim se tornar uma futura estratégia promissora na prática clínica.

REFERÊNCIAS

- BABAIE, F. et al. **The role of gut microbiota and IL-23/IL-17 pathway in ankylosing spondylitis immunopathogenesis: New insights and updates***Immunology Letters* Elsevier B.V., 1 abr. 2018.
- BARBER, C. et al. Differential effects of western and mediterranean-type diets on gut microbiota: A metagenomics and metabolomics approach. *Nutrients*, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021.
- BATTINENI, G. et al. Impact of obesity-induced inflammation on cardiovascular diseases (Cvd). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 9, 1 maio 2021.
- BELIZÁRIO, J. E.; FAINTUCH, J.; GARAY-MALPARTIDA, M. **New frontiers for treatment of metabolic diseases***Mediators of Inflammation*Hindawi Limited, 2018.
- BOIANGIU, C. D. et al. **Sodium ion pumps and hydrogen production in glutamate fermenting anaerobic bacteria***Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, abr. 2006.
- BOYLE, L. H. et al. The Recognition of HLA-B27 by Human CD4 + T Lymphocytes . *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 5, p. 2619–2624, 1 set. 2001.
- BREBAN, M. et al. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 76, n. 9, p. 1614–1622, 1 set. 2017.
- BREBAN, M.; BEAUFRÈRE, M.; GLATIGNY, S. **The microbiome in spondyloarthritis***Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*Bailliere Tindall Ltd, 1 dez. 2019.
- BRIOT, K. et al. **Personal non-commercial use only***The Journal of Rheumatology*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.jrheum.org>.
- CHAKAROUN, R. M.; MASSIER, L.; KOVACS, P. **Gut microbiome, intestinal permeability, and tissue bacteria in metabolic disease: Perpetrators or bystanders?***Nutrients*MDPI AG, , 1 abr. 2020.
- CHARALAMBOUS², B. M.; KEEN¹, J. N.; MCPHERSON, M. J. **Collagen-like sequences stabilize homotrimers of a bacterial hydrolase***The EMBO Journal*. [s.l: s.n.].
- CHELAKKOT, C.; GHIM, J.; RYU, S. H. **Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications***Experimental and Molecular Medicine*Nature Publishing Group, , 1 ago. 2018.
- CHEN, Z. et al. Adalimumab Therapy Restores the Gut Microbiota in Patients With Ankylosing Spondylitis. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 1 set. 2021.
- CHENG, J. et al. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME Journal*, v. 10, n. 4, p. 1002–1014, 1 abr. 2016.
- CICCIA, F. et al. Type 3 innate lymphoid cells producing IL-17 and IL-22 are expanded in the gut, in the peripheral blood, synovial fluid and bone marrow of patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 74, n. 9, p. 1739–1747, 1 set. 2015.
- CICCIA, F. et al. Dysbiosis and zonulin upregulation alter gut epithelial and vascular barriers in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 76, n. 6, p. 1123–1132, 1 jun. 2017a.
- CICCIA, F. et al. Dysbiosis and zonulin upregulation alter gut epithelial and vascular barriers in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 76, n. 6, p. 1123–1132, 1 jun. 2017b.

DA COSTA, I. P. et al. Avaliação do desempenho do BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) numa coorte brasileira de 1.492 pacientes com espondiloartrites: Dados do Registro Brasileiro de Espondiloartrites (RBE). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 1, p. 48–54, 2015.

DAHL, W. J.; RIVERO MENDOZA, D.; LAMBERT, J. M. Diet, nutrients and the microbiome. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier B.V., 2020. v. 171p. 237–263.

DESAI, M. S. et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1339–1353.e21, 17 nov. 2016.

DILING, C. et al. CircNF1-419 improves the gut microbiome structure and function in AD-like mice. **Aging (Albany NY)**, v. 12, p. 260–287, 2020.

DOMINGO, M. C. et al. Ruminococcus gauvreauii sp. nov., a glycopeptide-resistant species isolated from a human faecal specimen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1393–1397, 2008.

DOWARD, L. C. et al. **Development of the ASQoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.annrheumdis.com>.

DU, L. et al. **Crosstalk between Inflammation and ROCK/MLCK Signaling Pathways in Gastrointestinal Disorders with Intestinal Hyperpermeability** **Gastroenterology Research and Practice** Hindawi Limited, 2016.

FASANO, A. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. 2011.

FERREIRO-IGLESIAS, R. et al. Accuracy of Consecutive Fecal Calprotectin Measurements to Predict Relapse in Inflammatory Bowel Disease Patients under Maintenance with Anti-TNF Therapy. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 52, n. 3, p. 229–234, 2018.

GOMBART, A. F.; PIERRE, A.; MAGGINI, S. A review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2020.

GUERREIRO, C. S. et al. Diet, microbiota, and gut permeability—the unknown triad in rheumatoid arthritis. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. DEC, 2018.

HARAN, J. P.; MCCORMICK, B. A. Aging, Frailty, and the Microbiome—How Dysbiosis Influences Human Aging and Disease. **Gastroenterology**, v. 160, n. 2, p. 507–523, 1 jan. 2021.

HEYMSFIELD SB; TIGHEA A; WANG ZM. **Nutritional assessment by anthropometric and biochemical methods. Modern Nutrition in health and disease**. 2nd. ed. Philadelphia: [s.n.].

HIRAI, J. et al. Osteomyelitis caused by Veillonella species: Case report and review of the literature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 6, p. 417–420, 1 jun. 2016.

ISASI, C.; TEJERINA, E.; MORÁN, L. M. Sensibilidad al gluten no celíaca y enfermedades reumatológicas. **Reumatología Clínica**, 2016.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 7 ago. 2015.

JUMAS-BILAK, E. et al. Acidaminococcus intestini sp. nov., isolated from human clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2314–2319, out. 2007.

KEHL, A. S.; CORR, M.; WEISMAN, M. H. **Review: Enthesitis: New Insights into Pathogenesis, Diagnostic Modalities, and Treatment** **Arthritis and Rheumatology** John Wiley and Sons Inc., 1 fev. 2016.

- LELES, G. et al. Effects of dietary fibre intake in chemotherapy-induced mucositis in murine model. **British Journal of Nutrition**, v. 126, n. 6, p. 853–864, 28 set. 2021.
- LEVY, M. et al. **Dysbiosis and the immune system** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 1 abr. 2017.
- LI, M. et al. Altered Bacterial-Fungal Interkingdom Networks in the Guts of Ankylosing Spondylitis Patients. **mSystems**, v. 4, n. 2, 30 abr. 2019.
- LIAO, H. T. et al. Regulatory T cells in ankylosing spondylitis and the response after adalimumab treatment. **Joint Bone Spine**, v. 82, n. 6, p. 423–427, 2015.
- LOOMBA, R. et al. The Commensal Microbe *Veillonella* as a Marker for Response to an FGF19 Analog in NASH. **Hepatology**, v. 73, n. 1, p. 2021, 2020.
- LORIES, R. J.; MCINNES, I. B. Primed for inflammation: Enthesis-resident T cells. **Nature Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1018–1019, jul. 2012.
- MACHADO, P. M.; LANDEWÉ, R.; HEIJDE, D. VAN DER. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): 2018 update of the nomenclature for disease activity states. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 16 fev. 2018.
- MARA FISBERG, R.; MARIA LOBO MARCHIONI, D.; CAROLINA ALMADA COLUCCI, A. **Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica Assessment of food consumption and nutrient intake in clinical practice** *Arq Bras Endocrinol Metab.* [s.l: s.n.].
- MIAO, J.; ZHU, P. **Functional Defects of Treg Cells: New Targets in Rheumatic Diseases, Including Ankylosing Spondylitis** *Current Rheumatology Reports* Current Medicine Group LLC 1, , 1 maio 2018.
- MOHAMMADI, H. et al. **The role of innate lymphoid cells in health and disease** *Journal of Cellular Physiology* Wiley-Liss Inc., , 1 jun. 2018.
- MOWAT, A. M. I. **To respond or not to respond - A personal perspective of intestinal tolerance** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 1 jun. 2018.
- NIU, J. et al. Evolution of the Gut Microbiome in Early Childhood: A Cross-Sectional Study of Chinese Children. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 3 abr. 2020.
- NOGAL, A. et al. Circulating Levels of the Short-Chain Fatty Acid Acetate Mediate the Effect of the Gut Microbiome on Visceral Fat. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 15 jul. 2021.
- OBERMÜLLER, B. et al. The effects of prebiotic supplementation with OMNi-LOGiC® FIBRE on fecal microbiome, fecal volatile organic compounds, and gut permeability in murine neuroblastoma-induced tumor-associated cachexia. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 1–18, 1 jul. 2020.
- OGASAWARA, M.; KONO, D. H.; YU, D. T. Y. **Mimicry of Human Histocompatibility HLA-B27 Antigens by *Klebsiella pneumoniae*** *INFECTION AND IMMUNITY*. [s.l: s.n.].
- PADOVANI, R. M. et al. **Dietary reference intakes: application of tables in nutritional studies** *Rev. Nutr.* [s.l: s.n.].
- PAGLIAI, G. et al. Influence of a 3-month low-calorie Mediterranean diet compared to the vegetarian diet on human gut microbiota and SCFA: the CARDIVEG Study. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 5, p. 2011–2024, 1 ago. 2020.
- PATRO, L. P. P.; RATHINAVELAN, T. **Targeting the Sugary Armor of *Klebsiella* Species** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Frontiers Media S.A., 8 nov. 2019.

PEDERSEN, S. J.; MAKSYMOWYCH, W. P. Beyond the TNF- α Inhibitors: New and Emerging Targeted Therapies for Patients with Axial Spondyloarthritis and their Relation to Pathophysiology. **Drugs**, v. 78, n. 14, p. 1397–1418, 1 set. 2018.

PINART, M. et al. **Gut microbiome composition in obese and non-obese persons: A systematic review and meta-analysis** *Nutrients* MDPI, , 1 jan. 2022.

RAGONNAUD, E.; BIRAGYN, A. **Gut microbiota as the key controllers of “healthy” aging of elderly people** *Immunity and Ageing* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; DE VOS, W. M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 996–1047, 1 set. 2014.
RASHID, T. et al. **Role of Klebsiella and collagens in Crohn’s disease: A new prospect in the use of low-starch diet** *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* Lippincott Williams and Wilkins, 2009.

RASHID, T.; EBRINGER, A. **Ankylosing spondylitis is linked to Klebsiella - The evidence** *Clinical Rheumatology*, jun. 2007.

REDONDO-USEROS, N. et al. **Microbiota and lifestyle: A special focus on diet** *Nutrients* MDPI AG, 2020.

REZAIEMANESH, A. et al. **Immune cells involved in the pathogenesis of ankylosing spondylitis** *Biomedicine and Pharmacotherapy* Elsevier Masson SAS, , 1 abr. 2018.
REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. **History and mechanisms of oral tolerance** *Seminars in Immunology* Academic Press, 1 abr. 2017.

RINNINELLA, E. et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2019.

ROWLAND, I. et al. **Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components** *European Journal of Nutrition* Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG, , 1 fev. 2018.

SAENGERDSUB, S.; RICKE, S. C. **Ecology and characteristics of methanogenic archaea in animals and humans** *Critical Reviews in Microbiology*, maio 2014.

SAMPAIO-BARROS, P. D. et al. **First Update on the Brazilian Consensus for the Diagnosis and Treatment of Spondyloarthropathies: Ankylosing Spondylitis and Psoriatic Arthritis.** [s.l: s.n.].
SCOTT, K. P. et al. **The influence of diet on the gut microbiota** *Pharmacological Research*, mar. 2013.

SHINJO, S. K.; GONÇALVES, R.; GONÇALVES, R. **Medidas de Avaliação Clínica em Pacientes com Espondilite Anquilosante: Revisão da Literatura** *Measures of Clinical Assessment in Patients with Ankylosing Spondylitis: Review of Literature* *Rev Bras Reumatol.* [s.l: s.n.].
SO, J.; TAM, L. S. **Gut microbiome and its interaction with immune system in spondyloarthritis** *Microorganisms* MDPI AG, , 1 nov. 2020.

SORRENTINO, R.; BÖCKMANN, R. A.; FIORILLO, M. T. **HLA-B27 and antigen presentation: At the crossroads between immune defense and autoimmunity** *Molecular Immunology*, jan. 2014.
SPILJAR, M.; MERKLER, D.; TRAJKOVSKI, M. **The immune system bridges the gut microbiota with systemic energy homeostasis: Focus on TLRs, mucosal barrier, and SCFAs** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 30 out. 2017.

STATOVCI, D. et al. **The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., 28 jul. 2017.

STURGEON, C.; FASANO, A. **Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases** *Tissue Barriers* Taylor and Francis Inc., 1 out. 2016.

TAKAKURA, W.; PIMENTEL, M. **Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Irritable Bowel Syndrome – An Update***Frontiers in Psychiatry*Frontiers Media S.A., , 10 jul. 2020.

TAO, J. H. et al. **Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases***Inflammation*Springer New York LLC, , 1 fev. 2017.

TEICHMAN, E. M. et al. **When Rhythms Meet the Blues: Circadian Interactions with the Microbiota-Gut-Brain Axis***Cell Metabolism*Cell Press, , 3 mar. 2020.

TETTAMANZI, F. et al. A high protein diet is more effective in improving insulin resistance and glycemic variability compared to a mediterranean diet—a cross-over controlled inpatient dietary study. **Nutrients**, v. 13, n. 12, 1 dez. 2021.

TITO, R. Y. et al. Brief Report: Dialister as a Microbial Marker of Disease Activity in Spondyloarthritis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 69, n. 1, p. 114–121, 1 jan. 2017.

TOURKOCHRISTOU, E.; TRIANTOS, C.; MOUZAKI, A. **The Influence of Nutritional Factors on Immunological Outcomes***Frontiers in Immunology*Frontiers Media S.A., , 31 maio 2021.

TRIPATHI, A. et al. **Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/content/full/>.

TROLLMO, C. et al. Expression of the mucosal lymphocyte integrin alpha E beta 7 and its ligand E-cadherin in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 44, n. 3, p. 293–8, set. 1996.

UHDE, M. et al. Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. **Gut**, 2016.

VAN BOHEMEN, C. G. et al. **Identification of HLA-B27M1 and-M2 cross-reactive antigens in Klebsiella, Shigella and Yersinia***Immunology*. [s.l: s.n.].

VAN DER HEIJDE, D. et al. 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 6, p. 978–991, 1 jun. 2017.

VAN PRAET, L. et al. Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a multiparametric predictive model. **Ann Rheum Dis**, v. 72, p. 414–417, 2013.

VESTH, T. et al. The Genomic Standards Consortium Veillonella, Firmicutes: Microbes disguised as Gram negatives. **Standards in Genomic Sciences**, v. 9, p. 431–448, 2013.

VISSER, J. et al. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: Celiac disease and type 1 diabetes paradigms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1165, p. 195–205, 2009.

WALKER, A.; SCHMITT-KOPPLIN, P. The role of fecal sulfur metabolome in inflammatory bowel diseases. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 311, n. 5, 1 jul. 2021.

WANG, M. et al. Dysfunction of regulatory T cells in patients with ankylosing spondylitis is associated with a loss of Tim-3. **International Immunopharmacology**, v. 59, p. 53–60, 1 jun. 2018.

WATAD, A. et al. **The early phases of ankylosing spondylitis: Emerging insights from clinical and basic science***Frontiers in Immunology*Frontiers Media S.A., 16 nov. 2018.

WEINER, H. L. et al. **Oral tolerance***Immunological Reviews*, maio 2011.

WEN, C. et al. Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, 27 jul. 2017.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. **Population genomics of *Klebsiella pneumoniae****Nature Reviews Microbiology*Nature Research, 1 jun. 2020.

XIA, H. et al. Milled flaxseed-added diets ameliorated hepatic inflammation by reducing gene expression of TLR4/NF- κ B pathway and altered gut microbiota in STZ-induced type 1 diabetic mice. **Food Science and Human Wellness**, v. 11, n. 1, p. 32–40, 1 jan. 2022.

YANG, L. et al. **A possible role of intestinal microbiota in the pathogenesis of ankylosing spondylitis***International Journal of Molecular Sciences*MDPI AG, , 17 dez. 2016.

YATSUNENKO, T. et al. **Human gut microbiome viewed across age and geography***Nature*, 14 jun. 2012.

YE, J.; MCGUINNESS, O. P. **Inflammation during obesity is not all bad: Evidence from animal and human studies***American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2013.

YE, X. et al. Can fecal calprotectin accurately identify histological activity of ulcerative colitis? A meta-analysis. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 14, 2021.

YIN, J. et al. Shotgun metagenomics reveals an enrichment of potentially cross-reactive bacterial epitopes in ankylosing spondylitis patients, as well as the effects of TNFi therapy upon microbiome composition. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 79, n. 1, p. 132–140, 1 jan. 2020.

ZHANG, L. et al. **The association of HLA-B27 and *Klebsiella pneumoniae* in ankylosing spondylitis: A systematic review***Microbial Pathogenesis*Academic Press, , 1 abr. 2018a.

ZHANG, L. et al. **The association of HLA-B27 and *Klebsiella pneumoniae* in ankylosing spondylitis: A systematic review***Microbial Pathogenesis*Academic Press, , 1 abr. 2018b.

ZHANG, L. et al. Fecal microbiota in patients with ankylosing spondylitis: Correlation with dietary factors and disease activity. **Clinica Chimica Acta**, v. 497, p. 189–196, 1 out. 2019.

APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - voluntário com espondiloartrite axial.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA

Prezado(a) Senhor(a):

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo título é: **EFEITOS DO CONSUMO DE GLÚTEN DE TRIGO NA RESPOSTA IMUNE E MICROBIOTA EM INDIVÍDUOS COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE**. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo para esclarecê-los. Se você concordar em participar do estudo, ao final da leitura deste documento você deverá assinar o Termo de Consentimento da última página, em duas vias, uma das quais ficará com os pesquisadores.

O objetivo do estudo é avaliar as possíveis alterações na resposta imune e clínica, microbiota e permeabilidade intestinal induzidas pela retirada do glúten de trigo na dieta de pacientes com espondilite anquilosante.

Os procedimentos que faremos estão descritos abaixo:

Após concordar em participar será realizada uma entrevista perguntando sobre algumas informações importantes para a pesquisa. Após, colheremos amostras de sangue, saliva e fezes. Você será orientado a enxaguar a boca com água. Em seguida, será coletado sua saliva utilizando uma escovinha descartável própria para tal. A nutricionista esfregará a escova para cima e para baixo nas suas bochechas, vinte vezes por dez segundos por lado. Será coletado também, por profissional habilitado, 16 mL de seu sangue na veia do seu braço, com agulha e tubo descartáveis, que será identificada por código de conhecimento exclusivo dos pesquisadores responsáveis. As fezes serão coletadas por você em domicílio e entregues ao pesquisador responsável em dias pré-determinados. Sua saliva, sangue e fezes coletados serão transportados para o laboratório de Imunobiologia na Universidade Federal de Minas Gerais, aonde serão armazenados por um período máximo de 10 anos para serem utilizados para análises nesta pesquisa. Eles poderão ser usados em outras pesquisas, mas você será consultado nesse caso. Seu material coletado será destruído após a pesquisa atual ou caso tenha seu consentimento, após seu uso em pesquisas futuras. Com os resultados do exame de sangue lhe informaremos se você é propenso ou não à doença celíaca ou alergia ao trigo. Caso você seja propenso, nós o orientaremos sobre os procedimentos necessários e não iremos integrá-lo na pesquisa. Caso você não tenha a propensão à doença celíaca e nem apresente alergia ao trigo, você será orientado quanto a dieta a ser seguida.

Você deverá fazer sua dieta habitual ou uma dieta isenta de glúten, a ser definido posteriormente, por 12 semanas.

Após as 12 semanas, será realizada a segunda bateria de exames, com coleta de sangue e fezes. Posteriormente, você deverá ingerir bolinhos, fornecidos por nós, contendo glúten ou proteína isolada de arroz, por 7 dias cada. Você não saberá quais bolinhos receberá para não interferir nos resultados.

Nova coleta de sangue será realizada antes e após da ingestão de cada série de bolinhos.

Os acompanhamentos com nutricionista e com reumatologista serão realizados no Hospital das Clínicas de Belo Horizonte, assim como a coletas dos materiais biológicos humanos.

Riscos ou desconfortos: a retirada de sangue será realizada por um profissional capacitado, no entanto, como todo procedimento de coleta sanguínea, poderá ocorrer um pequeno desconforto

passageiro e dor na hora em que a agulha perfura a pele. Raramente ocorrem manchas roxas no local da picada da agulha causada por uma pequena quantidade de sangue que extravasa da veia. A coleta de fezes pode ocasionar um certo constrangimento ao entregar as fezes e o risco de quebra de confidencialidade. Para evitar tais inconvenientes, todo o material será recebido em local reservado e codificado para que o indivíduo não seja identificado no material. Quanto aos riscos associados com a restrição de trigo e desafio alimentar: você poderá experimentar efeitos nervosismos ou sinais de frustração por não poder ingerir certos alimentos. A retirada do trigo da dieta não traz nenhum prejuízo a saúde.

Benefícios esperados: Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar com a busca de tratamentos que auxiliem no tratamento da espondilite anquilosante.

Confidencialidade: Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, garantido assim o **sigilo**, porém os resultados da pesquisa serão utilizados em trabalhos científicos publicados ou apresentados oralmente em congressos e palestras sem revelar sua identidade.

Participação Voluntária/Compensação: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. O(A) Sr(a) não receberá remuneração por sua participação.

Custos: Você não terá gastos extras para realizar esta pesquisa. Caso você tenha gasto com deslocamento para coleta de dados da pesquisa, que não esteja inserido no seu acompanhamento no ambulatório de reumatologia, você será ressarcido em suas despesas.

Desligamento: Você deve ter ciência que, a qualquer momento, poderá retirar o seu consentimento de participação, sem que isso implique em perda de direitos pré-existentes ou prejuízo no relacionamento profissional, pessoal e no tratamento de sua doença.

Contato em Caso de Dúvida: Os pesquisadores responderão a quaisquer perguntas ou esclarecimentos que você tenha ou possa ter quanto aos objetivos, procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com pesquisa. Para mais esclarecimentos, por favor, entre em contato com a Nutricionista Ana Carolina G.B Campolina pelo telefone (031) 3409-2630. E-mail para contato: anacarinaballonas@gmail.com. Caso tenha dúvidas sobre o aspecto ético ou o andamento da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em pesquisa da UFMG que aprovou no endereço: Avenida Antônio Carlos, nº6627, Unidade administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte/MG, telefone (31) 34094592.

Consentimento:

Confirmando que li e que fui devidamente esclarecido sobre os propósitos e os procedimentos desse estudo e voluntariamente aceito participar, até que eu decida o contrário.

Eu, _____, concordo em participar do estudo.

Consentimento Opcional:

Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - voluntário saudável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA

Prezado(a) Senhor(a):

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo título é: **EFEITOS DO CONSUMO DE GLÚTEN DE TRIGO NA RESPOSTA IMUNE E MICROBIOTA EM INDIVÍDUOS COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE**. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo para esclarecê-los. Se você concordar em participar do estudo, ao final da leitura deste documento você deverá assinar o Termo de Consentimento da última página, em duas vias, uma das quais ficará com os pesquisadores.

O objetivo do estudo é avaliar as possíveis alterações na resposta imune e clínica, microbiota e permeabilidade intestinal induzidas pela retirada do glúten de trigo na dieta de pacientes com espondilite anquilosante.

Os procedimentos que faremos estão descritos abaixo:

Após concordar em participar, colheremos amostras de sangue, saliva e fezes. Você será orientado a enxaguar a boca com água. Em seguida, será coletado sua saliva utilizando uma escovinha própria para tal, descartável. A nutricionista esfregará a escova para cima e para baixo nas suas bochechas, vinte vezes por dez segundos por lado. Será coletado também, por profissional habilitado, 16 mL de seu sangue na veia do seu braço, com agulha e tubo descartáveis, que será identificada por código de conhecimento exclusivo dos pesquisadores responsáveis. As fezes serão coletadas por você em domicílio e entregues ao pesquisador responsável em dias pré-determinados. Sua saliva, sangue e fezes coletados no laboratório de Imunobiologia na Universidade Federal de Minas Gerais, onde serão armazenados por um período máximo de 10 anos para serem utilizados para análises nesta pesquisa. Eles poderão ser usados em outras pesquisas, mas você será consultado nesse caso. Seu material coletado será destruído após a pesquisa atual ou caso tenha seu consentimento, após pesquisas futuras.

Riscos ou desconfortos: a retirada de sangue será realizada por um profissional capacitado, no entanto, como todo procedimento de coleta sanguínea, poderá ocorrer um pequeno desconforto passageiro e dor na hora em que a agulha perfura a pele. Raramente ocorrem manchas roxas no local da picada da agulha causada por uma pequena quantidade de sangue que extravasa da veia. A coleta de fezes pode ocasionar um certo constrangimento ao entregar as fezes e o risco de quebra de confidencialidade. Para evitar tais inconvenientes, todo o material será recebido em local reservado e codificado para que o indivíduo não seja identificado no material.

Benefícios esperados: Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar com a busca de tratamentos complementares para a espondilite anquilosante. Você terá acesso a alguns exames que não são de praxe na clínica médica e que te trarão informações sobre seu estado de saúde.

Confidencialidade: Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, garantido assim o **sigilo**, porém os resultados da pesquisa serão utilizados em trabalhos científicos publicados ou apresentados oralmente em congressos e palestras sem revelar sua identidade.

Participação Voluntária/Compensação: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. O(A) Sr(a) não receberá remuneração por sua participação.

Custos: Você não terá gastos extras para realizar esta pesquisa. Caso deslocamento seja necessário para coleta de dados da pesquisa, você será ressarcido em suas despesas.

Desligamento: Você deve ter ciência que, a qualquer momento, poderá retirar o seu consentimento de participação, sem que isso implique em perda de direitos pré-existentes ou prejuízo no relacionamento profissional, pessoal e no tratamento de sua doença.

Contato em Caso de Dúvida: Os pesquisadores responderão a quaisquer perguntas ou esclarecimentos que você tenha ou possa ter quanto aos objetivos, procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com pesquisa. Para mais esclarecimentos, por favor, entre em contato com a Nutricionista Ana Carolina G.B Campolina pelo telefone (031) 3409-2630. Email para contato: anacarolinaballonas@gmail.com. Caso tenha dúvidas sobre o aspecto ético ou o andamento da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em pesquisa da UFMG que a aprovou no endereço: Avenida Antônio Carlos, nº6627, Unidade administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte/MG, telefone (31) 34094592.

Consentimento:

Confirmando que li e que fui devidamente esclarecido sobre os propósitos e os procedimentos desse estudo e voluntariamente aceito participar, até que eu decida o contrário.

Fu, _____, concordo em participar do estudo.

Consentimento Opcional:

Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

APÊNDICE 3 - Registro alimentar de 72 horas

Registro Alimentar 24h - Durante a intervenção - Tempo: _____

NOME: _____ DATA: ____/____/____

	ALIMENTO	QUANTIDADE
DESJEJUM Horário: Típico [] Atípico []		
COLAÇÃO Horário: Típico [] Atípico []		
ALMOÇO Horário: Típico [] Atípico []		
LANCHE DA TARDE (Horário: Típico [] Atípico []		
JANTAR Horário: Típico [] Atípico []		
CEIA Horário: Típico [] Atípico []		

Observações: _____

APÊNDICE 4 – Termo de Constituição de Biorrepositório

Termo de Constituição de Biorrepositório

O presente acordo estabelece as normas para operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado em Biorrepositório, vinculado ao Projeto de Pesquisa “Efeitos do consumo de glúten de trigo na resposta imune e microbiota em indivíduos com espondilite anquilosante”, a ser gerenciado pelo(a) pesquisador(a) Ana Carolina G.B.Campolina, com participação da instituição Hospital das Clínicas da UFMG (administrado pela Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares Ebserh, inscrito no CNPJ sob o nº 17.217.985/0034-72, com endereço na Av. Alfredo Balena, nº 110, Santa Efigênia) e do(a) professor(a) Ana Maria Cactano de Faria do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, BH – CEP: 31270-901, autarquia federal, CNPJ nº 17.217.985/0001-04), conforme definido na legislação competente, atendendo, em especial, ao disposto nas Resoluções nº 441/11 e nº 466/12, ambas do CNS.

- 1- O Biorrepositório, constituído por amostras de sangue periférico, saliva e fezes atenderá às normas do Regimento Institucional de Biorrepositório da instituição depositária e será sediado e armazenado na Universidade federal de Minas Gerais, inscrita no CNPJ sob o nº 17.217.985/0001-04 e situada na Avenida Antônio Carlos, nº 6627, Bairro Pampulha, CEP: 31.270-901, Belo Horizonte, MG, no Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, especificamente no Laboratório de Imunobiologia (LIB), 4º andar, O4, sala 195;
- 2- O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido em freezer -80°C (plasma, fezes), geladeira (saliva) e nitrogênio líquido (células mononucleares do sangue periférico-*PBMC*), até sua utilização;
- 3- O prazo de armazenamento do Biorrepositório será o mesmo definido no cronograma do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG), sendo o prazo máximo de 10 anos;
- 4- As instituições acordantes, devidamente representadas, poderão ter acesso aos dados e materiais obtidos em decorrência da execução do projeto, durante sua vigência, mediante solicitação aos membros da equipe do projeto;
- 5- A solicitação de acesso a dados e materiais do Biorrepositório somente poderá ser feita por meio dos membros da equipe do projeto de pesquisa, devidamente cadastrados na Plataforma Brasil, dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Projeto de Pesquisa e mediante aprovação da análise ética;
- 6- O Biorrepositório estará sob a responsabilidade do pesquisador, competindo aos acordantes o cumprimento das disposições aqui constantes e observância das normas contidas no regulamento de Biorrepositório;
- 7- A requisição de amostras durante a vigência da pesquisa deverá ser feita por escrito e não poderá causar prejuízo ao regular desenvolvimento do Projeto de Pesquisa;
- 8- Havendo a retirada ou desistência por parte do participante da pesquisa, referente à amostra coletada e armazenada, deverá o pesquisador e a instituição que mantém a guarda disponibilizarem a amostra, nos termos da regulamentação vigente. Nesse caso, será facultado



- ao participante da pesquisa requerer a amostra ou solicitar que ela seja destruída pelo pesquisador;
- 9- Em caso de dissolução da parceria entre as instituições durante a vigência do projeto, a partilha e destinação dos dados e materiais que compõem o Biorrepositório serão objeto de novo acordo que deverá ser submetido à análise de ética dos Comitês de Ética Institucionais;
 - 10- Em caso de encerramento do projeto de pesquisa, havendo interesse de uso futuro das amostras do Biorrepositório e quando autorizado pelo participante da pesquisa em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o pesquisador responsável pelo projeto deverá manifestar seu interesse por escrito e assinado pelos pesquisadores e instituições parceiras. A partilha e destinação dos dados e materiais que compõem o Biorrepositório serão objeto de novo acordo entre as instituições, que deverá ser submetido à análise ética dos Comitês de Ética em Pesquisa envolvidos;
 - 11- Para uso futuro das amostras em nova pesquisa, em atendimento ao disposto na Resolução nº 441/2011 do CNS, deverá haver submissão de novo Projeto de Pesquisa ao Sistema CEP/CONEP;
 - 12- Todos os materiais armazenados no Biorrepositório serão destruídos ao final do projeto de pesquisa, caso não haja manifestação nos termos da Cláusula 10;
 - 13- Os casos não contemplados pelo presente Termo de Constituição de Biorrepositório serão submetidos à análise conjunta dos acordantes e resolvidos de comum acordo pelas partes envolvidas.

Assinaturas (com a inclusão de carimbos):

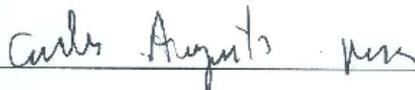

 Pesquisador Principal do Projeto

Ana Maria Castano de Faria
 LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA
 ICB - UFMG


 Chefa do Serviço de Pesquisa (chefe do departamento)

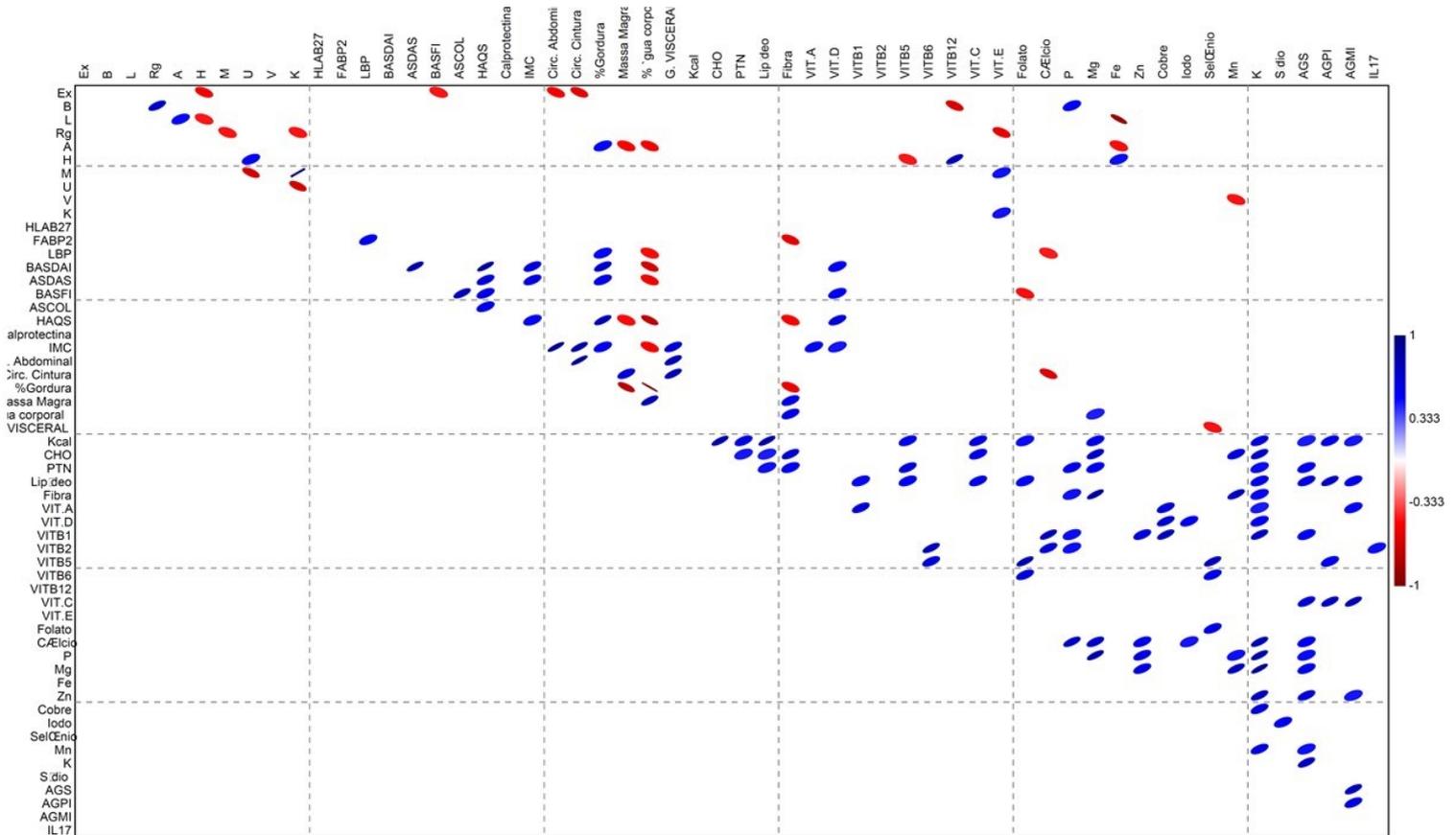
Prof.ª Fabiana Simão Machado
 Chefe Dep. de Bioquímica e Imunologia
 Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Chefia do Serviço de Pesquisa (chefe do departamento)


 Responsável Legal pela Instituição Acordante

Prof. Carlos Augusto Rosa
 Diretor ICB
 Portaria nº 3319 de 15/05/2018

APÊNDICE 5 – Correlação entre os 10 gêneros alterados, marcadores indiretos de permeabilidade intestinal, dados antropométricos, uso de imunobiológicos, presença do alelo HLA-B27, ingestão de macronutrientes, micronutrientes e valor dos questionários aplicados que avaliam o impacto da doença no paciente com EpA axial.



ANEXO 1 – Parecer 2.912.519 do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.912.519

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1183506.pdf	06/09/2018 15:22:10		Aceito
Outros	TERMO_CONSTITUICAO_BIORREPOSTORIO.pdf	06/09/2018 15:16:36	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_VOLUNTARIO_SAUDAVEL.pdf	06/09/2018 15:15:17	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ESPONDILITE_2.pdf	06/09/2018 15:14:18	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA_2.pdf	06/09/2018 15:13:55	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	06/09/2018 15:12:53	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	25/07/2018 11:51:36	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Outros	ParecerCoordenadoradoServicodeReumatologia.pdf	24/07/2018 23:08:25	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Outros	ParecerdaUnidadeFuncional.pdf	24/07/2018 23:05:09	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Outros	ParecerConsubstanciadoUFMG.pdf	24/07/2018 23:03:59	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Outros	DeclaracaoHospitaldasClinicas.pdf	24/07/2018 23:00:14	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 24 de Setembro de 2018

Assinado por:
Eliane Cristina de Freitas Rocha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO 2 - Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)

THE BATH ANKYLOSING SPONDYLITIS DISEASE ACTIVITY INDEX (BASDAI)

Coloque uma marca em cada linha abaixo, indicando sua resposta para cada questão, relacionada à SEMANA PASSADA:

1. Como você descreveria o grau de fadiga ou cansaço que você tem tido?
2. Como você descreveria o grau total de dor no pescoço, nas costas e no quadril relacionada à espondilite anquilosante que você tem tido?
3. Como você descreveria o grau total de dor e edema (inchaço) nas outras articulações sem contar com pescoço, costas e quadril?
4. Como você descreveria o grau total de desconforto que você teve em regiões do corpo dolorosas ao toque ou à compressão?
5. Como você descreveria a intensidade da rigidez matinal que você tem tido à partir da hora em que você acorda?

_____ Nenhum Intenso

6. Quanto tempo dura a sua rigidez matinal a partir do momento em que você acorda?

_____ 30 min 1h30 min

ANEXO 3 – Health Assessment Questionnaire for the Spondyloarthropathies

THE HEALTH ASSESSMENT QUESTIONNAIRE FOR THE SPONDYLOARTHROPATHIES (TIAQ-S)

Por favor, marque com uma cruz a resposta que melhor descreve sua capacidade habitual DURANTE A SEMANA PASSADA

	Sem QUALQUER dificuldade	Com ALGUMA dificuldade	Com MUITA dificuldade	Incapaz de fazer
VESTIR-SE E ARRUMAR-SE				
Você é capaz de:				
- Vestir-se, inclusive, amarrar os cordões dos sapatos e abotoar suas roupas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Lavar sua cabeça e seus cabelos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Você é capaz de:				
- Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Deitar-se e levantar-se da cama?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
COMER				
Você é capaz de:				
- Cortar um pedaço de carne?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Levar à boca um copo ou uma xícara cheios de café, leite ou água?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Abrir um saco de leite comum?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ANDAR				
Você é capaz de:				
- Caminhar em lugares planos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Subir cinco degraus?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HIGIENE PESSOAL				
Você é capaz de:				
- Lavar e secar seu corpo após o banho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ALCANÇAR COISAS				
Você é capaz de:				
- Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 kg que está posicionado pouco acima da cabeça?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
AGARRAR				
Você é capaz de:				
- Segurar-se em pé no ônibus ou metrô?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Abrir e fechar torneiras?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ATIVIDADES				
Você é capaz de:				
- Fazer compras nas redondezas onde mora?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Realizar tarefas, tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Carregar pacotes pesados tais como malas de mercearia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Sentar-se por longo período de tempo, tais como no trabalho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Dirigir um carro (Marque aqui <input type="checkbox"/> se você NÃO TIVER carta de motorista ou um carro)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Olhar para trás através de um espelho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Virar sua cabeça para dirigir para trás?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ANEXO 4 - Índice Funcional de *Bath* (BASFI)

ÍNDICE FUNCIONAL DE BATH PARA A ESPONDILITE ANQUILOSANTE (BASFI)

FAÇA UM TRAÇO EM CADA UMA DAS LINHAS PARA INDICAR O SEU NÍVEL DE CAPACIDADE PARA CADA UMA DAS SEGUINTE ACTIVIDADES, DURANTE A ÚLTIMA SEMANA

Nota: Uma ajuda técnica é um acessório que o ajuda a executar uma acção ou um movimento

EXEMPLO:

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 1 Calçar meias ou meias-calças (*collants*) sem ajuda de alguém nem ajuda técnica (por exemplo, um dispositivo auxiliar para calçar meias.

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 2 Dobrar-se para a frente pela cintura para apanhar uma caneta do chão sem ajuda técnica.

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 3 Esticar-se para chegar a uma prateleira alta sem a ajuda de alguém, nem ajuda técnica (por exemplo, alguém dar uma mão).

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 4 Levantar-se de uma cadeira sem braços sem usar as mãos ou qualquer outra ajuda.

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 5 Partindo da posição de deitado/a de costas no chão, pôr-se de pé sem ajuda.

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 6 Ficar de pé sem apoio durante 10 minutos, sem sentir desconforto.

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 7 Subir 12-15 degraus sem usar o corrimão ou ajuda técnica. **Um pé em cada degrau.**

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 8 Olhar por cima do ombro sem virar o corpo.

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 9 Fazer actividades fisicamente exigentes (por exemplo, exercícios de fisioterapia, jardinagem ou desporto).

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

- 10 Executar as actividades diárias, em casa ou no trabalho.

FÁCIL |-----| IMPOSSÍVEL

ANEXO 5 – Questionário de Qualidade de vida (ASQoL)**ASQoL - Qualidade de vida**

Abaixo estão algumas afirmativas feitas por pacientes com espondilite anquilosante. Leia com atenção e marque “sim” naquelas que se aplicam a você e “não”, nas que não se aplicam (neste momento).

- 1 - Minha doença limita os lugares que eu posso ir: () Sim () Não
2 - Às vezes tenho vontade de chorar: () Sim () Não
3 - Eu tenho dificuldade para me vestir: () Sim () Não
4 - Eu tenho dificuldade para fazer os serviços de casa: () Sim () Não
5 - É impossível dormir: () Sim () Não
6 - Eu sou incapaz de participar de atividades com a família ou amigos: () Sim () Não
7 - Estou cansando (a) o tempo todo: () Sim () Não
8 - Eu tenho que ficar parando o que estou fazendo para descansar: () Sim () Não
9 - Eu tenho dores insuportáveis: () Sim () Não
10 - Eu demoro muito tempo para começar minhas coisas pela manhã: () Sim () Não
11 - Eu sou incapaz de fazer os serviços de casa: () Sim () Não
12 - Eu me canso facilmente: () Sim () Não
13 - Eu me sinto frustrado frequentemente: () Sim () Não
14 - A dor está sempre presente: () Sim () Não
15 - Eu sinto que deixo de fazer muitas coisas: () Sim () Não
16 - Eu acho difícil lavar o meu cabelo: () Sim () Não
17 - Minha doença me deixa deprimido: () Sim () Não
18 - Eu me preocupo se deixo as pessoas desapontadas: () Sim () Não
- Número de respostas afirmativas: _____ Número de respostas em branco: _____