



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Luísa Sales Martins

**Caracterização da microbiota intestinal em pacientes com lúpus
eritematoso sistêmico e correlação com a dieta**

São José do Rio Preto

2022

Luísa Sales Martins

**Caracterização da microbiota intestinal em pacientes com lúpus
eritematoso sistêmico e correlação com a dieta**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88887.511276/2020-00

Orientador: Prof^a Dr^a Gislane Lelis Vilela de
Oliveira

Co-orientador: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto

2022

M386c Martins, Luisa Sales

Caracterização da microbiota intestinal em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e correlação com a dieta / Luisa Sales Martins. – São José do Rio Preto, 2022

90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Gislane Lelis Vilela de Oliveira

Coorientadora: Ana Lúcia Barretto Penna

1. Autoimunidade. 2. Lúpus eritematoso sistêmico. 3. Microbiota. 4. Dieta. I. Título.

Luísa Sales Martins

**Caracterização da microbiota intestinal em pacientes com lúpus
eritematoso sistêmico e correlação com a dieta**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88887.511276/2020-00

Comissão Examinadora

Prof.^a Dr.^a Gislane Lelis Vilela de Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof.^a Dr.^a Eleni Gomes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof.^a Dr.^a Fabíola Reis Oliveira
Universidade de São Paulo (USP)

São José do Rio Preto
13 de Maio de 2022

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em microbiologia por me aceitar como uma de suas discentes. A todos os docentes do PPG em especial a Profa Dra Fátima Pereira de Souza, Profa Dra Karina Alves de Toledo, Profa Dra Marília de Freitas Calmon Saiki que contribuíram de forma ativa para a minha formação. A Prof Dra Juliana Navarro Ueda Yaochite pela contribuição enorme e correção impecável.

A Coordenadora do PPG Microbiologia Prof Dra Eleni Gomes, por nos fazer mais atentos ao rigor científico. Foi uma honra participar das suas aulas.

À minha orientadora, Profa Dra Gislane Lelis Vilela de Oliveira que foi como uma mãe para mim desde o início, uma das únicas pesquisadoras no Brasil a trabalhar com a interação da microbiota intestinal e doenças autoimunes, sem ela eu não teria alcançado o meu sonho de trabalhar com esse tema. Agradeço especialmente ao convite de escrever o capítulo para editora Elsevier o que me trouxe muita honra e felicidade, espero continuar sendo sua orientanda, parceira e coautora.

A Profa Dra Ana Lucia Barretto Penna, que aceitou ser minha co-orientadora e abriu as portas de seu laboratório para que eu tivesse um local para processar/armazenar amostras. Eu nada seria sem Prof Ana!

À Dra Mariana Martins, Dra Thaisa Morete e Dr Cristiano Lupo reumatologistas do Ambulatório da FAMERP que aceitaram colaborar no projeto e auxiliar no recrutamento de pacientes.

Aos muitos internos em medicina FAMERP, que sempre tiveram curiosidade e atenção com o meu projeto me fazendo ótimas perguntas e demonstrando interesse. Aos residentes do Hospital de Base em reumatologia Dras Maria Julia, Patrícia, Renata e Dr. Gustavo e Carlos, além dos outros que eu possa ter esquecido de citar.

Aos funcionários do ambulatório do Hospital de Base: Senhor Claudio por participar da pesquisa, sempre me auxiliar e ser tão simpático todos os dias, já sinto saudade do seu “Bom dia, menina!”. Claudinha da recepção, respondia meus chamados com muita alegria. Helena, Vanessa e Diego que coletaram amostras, armazenavam e estavam dispostos ao propósito da pesquisa. Aos porteiros que por me pararem tantas vezes já me conheciam pelo nome. Renata e Bruna do laboratório central pela paciência e parceria. A toda equipe de limpeza, funcionários da administração, recepção e auxiliares de serviço gerais porque sem eles nenhum hospital por menor ou maior que seja estaria funcionando.

Ao Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro e seu aluno de doutorado Lucas que fizeram as análises de bioinformática (UNESP Botucatu).

Ao Dr. Luiz Felipe Valter de Oliveira e Dr. Giuliano Netto Flores Cruz (BiomeHub) que sequenciaram as amostras controles, permitindo assim as análises de bioinformática.

Aos pacientes com Lupus eritematoso sistêmico, os quais eu compartilho muitas das dores e tenho muita empatia. Àqueles que aceitaram participar do projeto, meu infinito agradecimento! Saibam que vocês não estão sozinhos.

Aos indivíduos sadios, do grupo controle, que foram mais do que cooperativos, torceram para que esse projeto fosse realidade, em especial à Sueli e Domingos pela ajuda e pelo carinho comigo e com o Rafael.

Aos seus colegas do grupo Larissa, Letícia, Guilherme e Alexandre, que não só estiveram presentes contribuindo com seus conhecimentos, como também foram verdadeiros guias e confidentes.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.511276/2020-00, a qual agradeço.

RESUMO

Alterações na diversidade e função da microbiota intestinal, a chamada disbiose, pode causar ou contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a microbiota intestinal de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e comparar com a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis. Amostras de fezes foram utilizadas para a caracterização da microbiota intestinal por sequenciamento das regiões V3/V4 do 16S bacteriano e PCR em tempo real. As comparações entre a composição da microbiota intestinal entre pacientes com LES e controles foram realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney. As correlações dos dados da microbiota com os dados demográficos, clínicos e hábitos alimentares foram realizadas pelo teste de *Spearman*. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O grupo de pacientes com LES foi constituído por 14 pacientes do sexo feminino, com idades entre 26 e 55 anos (média e desvio padrão = $45 \pm 9,84$). Em relação ao SLEDAI, 7,14% dos pacientes apresentam inatividade da doença; 7,14% atividade leve; 7,14% atividade moderada; 35,71% atividade alta; e 42,85% atividade muito alta. O grupo controle compreendeu vinte e oito pacientes do sexo feminino (93,33%) e dois pacientes do sexo masculino (6,67%), com idades entre 25 e 70 anos ($51,8 \pm 12,93$). Nos resultados de sequenciamento genômico, observamos que os pacientes com LES apresentaram disbiose intestinal, visto pelas diferenças significativas nas análises de beta diversidade. Os gêneros *Sphingomonas*, *Acidaminococcus*, *Enterobacter*, *Pelomonas*, *Veillonella*, *Parasutterella*, *Bifidobacterium*, *Lachnospira* e *Odoribacter* apresentaram abundância relativa significativamente aumentadas no LES. Os gêneros *Blautia*, *Hespellia*, *Eubacterium* e *Butyrivibrio* encontram-se reduzidos no grupo LES. Por PCR em tempo real observamos que as unidades relativas de expressão dos gêneros *Prevotella* e *Bacteroides* estavam significativamente maiores no LES em relação aos controles. Ao contrário a abundância relativa de *Bifidobacterium* estava significativamente menor em pacientes com LES. Encontramos correlação inversa entre a abundância relativa de espécies do gênero *Prevotella* nas fezes dos pacientes com o SLEDAI e o SLEDAI-2K. A modulação da microbiota pode ser uma estratégia potencial para enfrentar as consequências sistêmicas da disbiose e controle do LES.

Palavras-chave: Autoimunidade. Lúpus eritematoso sistêmico. Microbiota. Dieta.

ABSTRACT

Changes in the diversity and function of the gut microbiota, dysbiosis, can cause or contribute to the development of autoimmune diseases. The aim of this work was to characterize the intestinal microbiota of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and compare it with the intestinal microbiota of healthy individuals. Stool samples were used for the characterization of the intestinal microbiota by sequencing the V3/V4 regions of bacterial 16S and real-time PCR. Comparisons between the composition of the intestinal microbiota between SLE patients and controls were performed using the Mann-Whitney test. Correlations of microbiota data with demographic, clinical and dietary habits data were performed using the Spearman test. P values <0.05 were considered statistically significant. Patients with SLE consisted of 14 female patients, aged between 26 and 55 years (mean and SD = 45 ± 9.84). Clinical score SLEDAI, 7.14% of the subjects present inactivity of the disease; 7.14% light activity; 7.14% moderate activity; 35.71% high activity; and 42.85% very high activity. The control group comprised twenty-eight female patients (93.33%) and two male patients (6.67%), aged between 25 and 70 years (51.8 ± 12.93). In the genomic sequencing results, we observed that patients with SLE had intestinal dysbiosis, showed by beta diversity analyses. The genera *Sphingomonas*, *Acidaminococcus*, *Enteobacter*, *Pelomonas*, *Veillonella*, *Parasutterella*, *Bilophila*, *Lachnospira* and *Odoribacter* was significantly increased relative abundance in SLE. The genera *Blautia*, *Hespellia*, *Eubacterium* and *Butyrivibrio* are reduced in the SLE group. By real-time PCR we observed that the relative expression units of *Prevotella* and *Bacteroides* were significantly higher in SLE compared to controls. In contrast, the relative abundance of *Bifidobacterium* was significantly lower in patients with SLE. We found an inverse correlation between the relative abundance of species of the genus *Prevotella* in the feces of patients with SLEDAI and SLEDAI-2K. Microbiota modulation may be a potential strategy to address the systemic consequences of dysbiosis and SLE control.

Keywords: Autoimmunity. Systemic lupus erythematosus. Microbiota. Diet.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Análise de componentes principais da diversidade beta, mostrando a variabilidade na composição da comunidade entre as amostras de pacientes (N = 10) e controles (N = 9).	42
Figura 2: Gráficos de diversidade alfa, avaliando riqueza e uniformidade dentro de cada amostra.	42
Figura 3: Abundância relativa diferencial de Filos na microbiota intestinal de pacientes com LES.	43
Figura 4: Abundância relativa diferencial de Famílias na microbiota intestinal de pacientes com LES.	43
Figura 5: Abundância relativa diferencial de Gêneros na microbiota intestinal de pacientes com LES.	44
Figura 6: Abundância relativa diferencial de Espécies na microbiota intestinal de pacientes com LES.	44
Figura 7: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero <i>Prevotella</i> nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).	45
Figura 8: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero <i>Bacteroides</i> nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).	45
Figura 9: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero <i>Bifidobacterium</i> nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).	46
Figura 10: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero <i>Lactobacillus</i> nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).	46
Figura 11: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero <i>Roseburia</i> nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).	46
Figura 12: Correlação entre o escore clínico SLEDAI calculado para pacientes com LES e as unidades relativas de expressão de espécies do	47

gênero *Prevotella*/200 mg de fezes. Foi utilizado o teste de Spearman e considerado $P < 0,05$.

Figura 13: Correlação entre o escore clínico SLEDAI-2K calculado para pacientes com LES e as unidades relativas de expressão de espécies do gênero *Prevotella*/200 mg de fezes. Foi utilizado o teste de *Spearman* e considerado $P < 0,05$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de <i>primers</i> para o 16S bacteriano e tamanho dos produtos.	29
Tabela 2: Descrição dos dados demográficos dos pacientes com LES.	32
Tabela 3: Descrição dos dados clínicos dos pacientes com LES.	32
Tabela 4: Descrição dos dados clínicos dos pacientes diagnosticados com LES.	33
Tabela 5: Descrição das variáveis de estilo de vida e hábitos alimentares dos pacientes diagnosticados com LES.	35
Tabela 6: Descrição dos dados sobre funcionamento intestinal e histórico familiar e pessoal sobre comorbidades dos pacientes com LES.	37
Tabela 7: Descrição dos dados demográficos e clínicos do grupo controle.	34
Tabela 8: Descrição sobre estilo de vida e hábitos alimentares dos controles.	39
Tabela 9: Descrição dos dados sobre funcionamento intestinal e histórico familiar e pessoal sobre comorbidades.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AINEs	Anti-inflamatório não esteroide
AMP	Peptídeo antimicrobiano
APC	Células apresentadoras de antígenos
AZA	Azatioprina
BAFF	Fator de crescimento de células B
CF	Ciclofosfamida
DAMP	Padrão molecular associado à danos
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
F/B	Razão Firmicutes/Bacteroidetes
FAN	Anticorpo antinuclear
FasL	Ligante de Fas
FXR	Receptor farnesoide X
HCQ	Hidroxicloroquina
IBGE	Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IFN-I	Interferons do tipo I
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IMC	Índice de massa corporal
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
MMF	Micofenolato de mofetila
MTX	Metotrexato
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
MI	Microbiota intestinal
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POF	Pesquisa de orçamentos familiares
PPARγ	Proliferadores do peroxissoma tipo gama
PRED	Prednisona
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados

QFA	Questionário de frequência alimentar
qPCR	PCR em tempo real quantitativo
SLEDAI	Escore clínico para atividade de LES
TGI	Trato gastrointestinal
TGR5	Receptor 1 de ácido biliar acoplado à proteína G
TLR	Receptores do tipo <i>Toll-like</i>
Tregs	Células T reguladoras
UV	Ultravioleta
α	Alfa
β	Beta

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
mg	Miligramma
μL	Microlitro
μM	Micromol
ng	Nanograma
kg	Quilograma
S	Segundo
K	Mil
mM	Milimolar
°C	Graus Celsius
γ	Gama

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	14
I.1. Lúpus eritematoso sistêmico	14
I.2. Microbiota intestinal	20
I.3. Microbiota intestinal e lúpus eritematoso sistêmico	22
I.4. Microbiota intestinal e componentes alimentares	24
II. JUSTIFICATIVA	26
III. OBJETIVOS	27
III.1. Objetivo geral	27
III. 2. Objetivos específicos	27
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	28
IV. 1. Casuística e coleta das amostras	28
IV.2. Questionários social, epidemiológico e de frequência alimentar	29
IV.3. Extração de DNA e PCR em tempo real	29
IV.4. Sequenciamento das regiões V3/V4 do 16S bacteriano e análises	30
IV.5. Análise Estatística	31
V. RESULTADOS	32
V.1. Descrição do grupo de pacientes com LES	32
V.2. Descrição do grupo de indivíduos controles	34
V.3. Descrição do estilo de vida e hábitos alimentares dos pacientes com LES	36
V.4. Descrição do estilo de vida e hábitos alimentares do grupo controle	39
V.5. Caracterização da microbiota intestinal de pacientes com LES	43
V.6. Correlação da microbiota intestinal com os dados clínicos	49
V.7. Correlação da microbiota de pacientes e controles com os hábitos alimentares	50
VI. DISCUSSÃO	52
VII. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	76
ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	81
ANEXO C: QUESTIONÁRIO SOBRE ESTILO DE VIDA E HÁBITOS ALIMENTARES	85

I. INTRODUÇÃO

I.1. Lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada pela presença de autoanticorpos que podem formar imunocomplexos e gerar inflamação e danos teciduais em múltiplos órgãos (DURCAN; O'DWYER; PETRI, 2019; ZHAO *et al.*, 2021). A incidência e prevalência é maior entre negros, asiáticos e hispânicos, com início precoce e sintomas mais graves. Cerca de 90% dos pacientes são do sexo feminino, em idade reprodutiva (DÖRNER; FURIE, 2019). O início dos sintomas ocorre comumente entre a terceira e quarta décadas de vida (TANAKA, 2020).

A prevalência global do LES é estimada entre 20-150 casos por 100.000 habitantes, e parece estar aumentando com a possibilidade de melhores diagnósticos e aumento da sobrevida dos pacientes (TSOKOS, 2020). No Brasil, não dispomos de números exatos, mas as estimativas indicam que há cerca de 65.000 pessoas com LES, sendo a maioria mulheres. Acredita-se assim, que uma a cada 1.700 mulheres no Brasil tenha a doença (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2017).

A etiologia não está totalmente elucidada, mas há evidências sugerindo que a doença é influenciada por fatores genéticos, epigenéticos, hormonais e ambientais (LUO *et al.*, 2018; PEENE; ELEWAUT, 2019). Os processos de imunopatogênese do LES estão intimamente relacionados com mutações e expressão anômala de genes como *TNFSFS4*, *NCF1*, *CXorf21* (ZHAO *et al.*, 2021). Dentre os fatores genéticos, diversos alelos HLA, além de 26 regiões não-HLA (ZHERNAKOVA; WITHOFF; WIJMENGA, 2013). Atualmente, novos genes candidatos a biomarcadores diagnósticos estão sendo estudados (ZHAO *et al.*, 2021).

A epigenética parece estar envolvida no desenvolvimento de LES. Alguns achados indicam que tanto a hipometilação quanto a hipermetilação de genes específicos podem estar associadas com falhas da expressão gênica. Por exemplo, a hipometilação de *TNFSF5*, localizado no cromossomo X, aumenta a produção de CD40L em linfócitos T de mulheres. No entanto, a hipometilação de *IL10* aumenta a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (TSOKOS, 2020).

Evidências científicas apontam para o papel de hormônios femininos na patogênese do LES. O estrogênio pode influenciar diretamente a sobrevivência, desenvolvimento e a função de linfócitos B autorreativos e células dendríticas plasmascitoide, ambas produtoras de IFN-I. Mulheres em tratamento com estrogênio tem aumento de crises de LES, sendo contraindicado o seu uso. Homens com

síndrome de Klinefelter (47, XXY) tem susceptibilidade ao LES semelhante a encontrada em mulheres. Por isso, foi proposto que, no LES, o gene *TLR7* encontrado no cromossomo X pode estar super expresso. Além disso, a testosterona parece ter uma ação protetora em doenças autoimunes (KAUL *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2019).

Estudos epidemiológicos entre americanos descendentes de africanos e africanos da costa oeste mostram que a incidência de LES é maior entre americanos afrodescendentes, apesar de ambas as populações serem geneticamente similares (SYMMONS, 1995). A taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos para o LES é de 25%, e apenas 2% entre gêmeos dizigóticos, apontando que os fatores ambientais são decisivos para o desencadeamento da doença (KAUL *et al.*, 2016). Dentre os fatores ambientais, podemos destacar a exposição à radiação ultravioleta, infecções virais e bacterianas, toxinas, medicamentos e a disbiose intestinal (LUO *et al.*, 2018, KIM *et al.*, 2019).

A capacidade do sistema imune em diferenciar entre antígenos próprios e não próprios está prejudicada nas doenças autoimunes (ILLESCAS-MONTES *et al.*, 2019). A patogênese do LES se dá pela quebra da autotolerância, com produção de autoanticorpos (TSOKOS *et al.*, 2016). A perda da autotolerância pode ocorrer se os linfócitos autorreativos não forem deletados durante ou após se tornarem maduros ou até mesmo pela alta afinidade de células apresentadoras de antígenos (APC) por epítomos próprios (ILLESCAS-MONTES *et al.*, 2019).

A chamada tolerância central ocorre durante ou após a maturação dos linfócitos nos órgãos linfoides primários. Os linfócitos T, no timo, sofrem seleção negativa a fim de promover seu estado de autotolerância, ou seja, de tolerância a autoantígenos. Antígenos próprios ou internos presentes no timo são apresentados para os linfócitos T e, caso ocorra um reconhecimento ávido, os timócitos sofrerão morte celular ou se tornarão células T reguladoras (Tregs) (WANG; WANG; GERSHWIN, 2015). Apesar de estarem em quantidades normais, as Treg de pacientes LES encontram-se funcionalmente inativas. As células Tregs direcionadas aos principais autoantígenos do lúpus não são detectáveis em pacientes com doença ativa (DATTA *et al.*, 2022)

A resistência ao processo de apoptose dos linfócitos T assim como a exaustão pode permitir que essas células persistam em maior quantidade e de forma mais longa nos órgãos alvo. Exaustão é um processo gradual, induzido por antígenos que são cronicamente expressos, como é o caso dos autoantígenos. A IL-2 está presente no início da resposta imunológica e quando seus níveis diminuem ocorre reação em

cascata sinalizando para apoptose de linfócitos T. Entretanto, na autoimunidade é proposto que citocinas inflamatórias como TNF promovam inibição da metilação de PPP2R2B (região responsável pela inibição de IL-2, IL-7 e IL-15), evitando a expressão de B55 β diminuindo a sinalização para apoptose. Os linfócitos Treg consomem IL-2, dentre outras citocinas que podem exercer a mesma função como IL-7 e IL-15, além de terem atividades citotóxicas contra linfócitos T ativados via FASL (GONZALEZ *et al.*, 2021; ROSETTI *et al.*, 2022). Desta forma, a inflamação crônica é perpetuada com grande número de linfócitos T efetores e de memória, e juntamente com anormalidades na eferocitose, evidenciam o papel fundamental dos linfócitos T no LES.

Os linfócitos B medeiam funções deletérias como a apresentação de antígenos próprios para linfócitos T, expressão de moléculas coestimuladoras e produção de citocinas, além de produzirem autoanticorpos após a diferenciação em plasmócitos. O LES representa o protótipo de uma doença autoimune sistêmica (GERGES *et al.*, 2021) num contexto de hiperatividade de células B. Diante disso, tratamentos com alvo em depleção de linfócitos B (FILLATREAU; MANFROI; DÖRNER, 2021) ou visando diminuir sua atividade através da atenuação de moléculas secretadas por células dendríticas e macrófagos como inibidores de fator de crescimento de células B (BAFF) vem sendo empregadas (TANAKA, 2020). Sendo assim, a ativação do sistema imune leva a geração de células T efetoras e autoanticorpos que podem lesar órgãos (SHARABI; TSOKOS, 2020).

Pode haver presença de diferentes autoanticorpos como: anticorpo antinuclear (FAN), anticorpo anti Ro/SSa (proteína associada a RNA de função desconhecida, relacionado ao LES cutâneo e neonatal), anticorpo anti La/SSb (proteína associada a RNA polimerase), anticorpo anti fosfolípídeo, anticorpo anti dupla fita DNA, anticorpo anti Smith (associados a complicações diversas do LES), anticorpo antinuclear ribonucleoproteína. Ainda relacionados, porém menos comuns, anticorpo anticardiolipina, anticorpo anidrase carbônica II, colágeno, fibronectina, histona H2A-H2B-DNA, Ku-DNA quinase, RNA polimerase I-III (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2017; VON MÜHLEN; TAN, 1995; ZHERNAKOVA; WITHOFF; WIJMENGA, 2013).

A expressão aumentada de genes relacionados à produção de interferon é via chave para o princípio e desdobramento do LES (ZHAO *et al.*, 2021). As células dendríticas são as principais produtoras de IFN-I, mas outras células também podem amplificar a produção e manter altos níveis desta citocina. As células dendríticas

podem expressar genes que normalmente são expressos em neutrófilos e granulócitos, aumentando ainda mais a fonte de antígenos próprios para apresentação aos linfócitos T CD4+ (KAUL *et al.*, 2016).

A expressão de receptores do tipo *Toll-like* (TLR) está aumentada em células dendríticas e linfócitos B, ambas consideradas células apresentadoras de antígenos. Dessa forma, os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados à danos (DAMPs), associados à infecções, juntamente com a remoção ineficiente das células em apoptose (eferocitose anormal) interagem de forma exagerada com o sistema imunológico, aumentando a ativação de linfócitos, com subsequente produção de autoanticorpos. Citocinas envolvidas na comunicação entre o sistema imune inato e adaptativo, como os IFN-I, BAFF, IL-12 e IL-23 são críticas na produção de autoanticorpos e são investigadas como alvos de tratamento farmacológico (TANAKA, 2020).

Os numerosos e heterogêneos sintomas clínicos são resultado de diferentes patogêneses, com bases celulares e moleculares específicas (ZHAO *et al.*, 2021). A frequência média das complicações mais comuns são: artrite e complicações neuroesqueléticas (85%); sintomas sistêmicos e febre (70%); complicações cutâneas e de mucosas (70%); complicações neurológicas (50%); complicações gastrointestinais (50%); complicações hematológicas (50%); complicações pulmonares (40%); complicações renais (30%); pericardite (20%), fenômeno de Raynaud (20%) (KAUL *et al.*, 2016). O curso da doença é imprevisível, com períodos de surtos e remissão (TSOKOS, 2011).

A exposição à radiação ultravioleta, infecções e toxinas podem gerar um desequilíbrio entre células apoptóticas e a remoção ineficiente do material gerado por estas células, ou seja, eferocitose anormal (KAUL *et al.*, 2016; PEENE; ELEWAUT, 2019). Como consequência, há exposição de autoantígenos nucleares que, em condições fisiológicas não estariam disponíveis para o sistema imune (KIM *et al.*, 2019). A deficiência do sistema complemento relacionada aos pacientes com LES, pode estar relacionada com a diminuição do processo de opsonização de células sofrendo apoptose e, por consequência, falha na sinalização para a fagocitose (TSOKOS *et al.*, 2016).

Como fatores ambientais, infecções bacterianas e virais podem fazer parte da imunopatogênese do LES de quatro formas: liberação de epítomos crípticos, indução

de piroptose, armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETosis) e interações com constituintes de biofilmes de bactérias gram-negativas.

O mimetismo molecular é complexo no LES, mas o papel das células T auxiliar está bem estabelecido, a expansão de células B autorreativas requer células T helper patogênicas. É interessante notar que, o receptor de células T reconhece peptídeos no dependente do MHC, o mimetismo de peptídeos só poderia ocorrer se os conjuntos de peptídeos pudessem ser apresentados às células Th. Além desse mimetismo no nível de apresentação de peptídeos, as respostas imunes das células B contra patógenos podem iniciar respostas antiDNA, como demonstrado para vacinas contra pneumonia e anticorpos de ligação a polissacarídeos (AAS-HANSEN *et al.*, 2015). Patógenos podem ativar linfócitos T e B autorreativos de forma independente de antígeno durante uma infecção, criando meio inflamatório, mecanismo conhecido como ativação espectadora (SANDERSON *et al.*, 2017). Similarmente, o mesmo é provável para patobiontes presentes na MI, em outras palavras, tanto microrganismos patogênicos quanto oportunistas podem promover processos pró-inflamatórios, de forma a iniciar ou propagar a formação de autoantígenos (RUFF; GREILING; KRIEGL, 2020)

A liberação de epítomos expõe autoantígenos nucleares quando o patógeno direciona a célula do hospedeiro diretamente à morte celular ou em consequência da ação do sistema imune. Cromatina e DNA mitocondrial humanos, os quais antes ficavam compartimentalizados, são liberados no meio extracelular. A eferocitose pode não ser totalmente efetiva nos casos de infecção aguda, levando a maior tempo de exposição de material nuclear e subsequente ativação da imunidade inata. Os materiais nucleares e DNA mitocondrial são considerados DAMPs. Piroptose, uma forma inflamatória de apoptose, leva à ativação da Caspase-1 que estimula a formação de poros na membrana, resultando em lise osmótica e liberação do conteúdo citoplasmático. O lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da membrana de bactérias gram-negativas, pode levar a piroptose independente da caspase-1, quando se encontra no citoplasma e ativa as caspases 4 e 5. Ambos os mecanismos são importantes para a exposição de DAMPs e PAMPs, principalmente na presença de patógenos intracelulares como vírus e algumas bactérias. NETosis é um tipo de morte celular induzida pela presença de infecções bacterianas clínicas ou subclínicas. Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da infecção e a extrusão de redes extracelulares compostas de DNA mitocondrial oxidado, cromatina e fibras

servem de armadilhas para o aprisionamento de células bacterianas, impedindo a disseminação dos patógenos e facilitando a ação dos fagócitos e secreção de IFN-I (QIU; CARICCHIO; GALLUCCI, 2019; RUFF; GREILING; KRIEGEL, 2020).

Glicocorticoides e imunossupressores são medicamentos frequentemente utilizados para o tratamento do LES. No entanto, essa abordagem terapêutica é não-específica, além de causar efeitos adversos importantes como aumento do risco de infecções (oportunistas ou não) e alterações metabólicas que podem piorar a saúde óssea e desequilibrar os processos endócrinos, levando à hipertensão arterial e diabetes. Em 2014, A *European League Against Rheumatism* (EULAR) definiu objetivos no tratamento do LES: o principal deles é a remissão sem sintomas sistêmicos e desordens relacionadas a órgãos. As doses de glicocorticoides devem ser diminuídas progressivamente a medida que os sintomas diminuem e os marcadores imunológicos estejam dentro dos limites esperados (TANAKA, 2020).

No ano de 2019, a *European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology* (EULAR/ACR) publicou uma atualização quanto aos critérios diagnósticos para LES. Em resumo, há uma tabela com pesos diferentes para cada tipo de alteração clínica: sistêmica, hematológica, neuropsiquiátrica, cutaneomucosa, cardíaca ou pulmonar, musculoesquelética, renal. Seguida, também, de pesos específicos para alterações imunológicas: anticorpos antifosfolípides, alteração nas proteínas do complemento e anticorpos específicos para LES (anti dsDNA e Anti sm). Apesar de haver a possibilidade de pacientes com LES e FAN negativo, entre 96% a 99% dos pacientes com LES apresentam esse marcador positivo (ARINGER; JOHNSON, 2020).

Após a introdução dos glicocorticoides na década de 1950 no tratamento do LES, a sobrevivência dos pacientes aumentou (DÖRNER; FURIE, 2019). Mas desde a década de 1980, a taxa de mortalidade atingiu um platô, apesar das melhorias no diagnóstico e tratamento (KAUL *et al.*, 2016). LES é uma das doenças autoimunes mais prevalentes em todo o mundo. Por isso, é urgente elucidar não só os detalhes dos mecanismos de desenvolvimento, assim como desenvolver novas estratégias para o diagnóstico e tratamento desta doença e trazer luz para o entendimento de outras doenças autoimunes (ZHAO *et al.*, 2021).

A microbiota atualmente é reconhecida por seu papel no metabolismo, imunidade e desenvolvimento neurológico, manutenção da barreira intestinal. Dessa forma, estudos que relacionem a microbiota intestinal com o LES são necessários para

esclarecer o papel da microbiota no desenvolvimento e exacerbação dos LES (MA *et al.*, 2019; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019).

I.2. Microbiota intestinal

A microbiota intestinal (MI) é um ecossistema dinâmico complexo caracterizado por trilhões de microrganismos que habitam e mantêm a homeostase do trato gastrointestinal (TGI) (OLIPHANT; ALLEN-VERCOE, 2019). Estudos da última década indicam que o número de células bacterianas é da mesma ordem de grandeza que células humanas (SENDER; FUCHS; MILO, 2016). Em todo corpo, há cerca de 38 trilhões de bactérias em comunidades diversas (SENDER; FUCHS; MILO, 2016; SILVERMAN; AZZOUZ; ALEKSEYENKO, 2019). Há cerca de 1.000 espécies (ZHANG; FRENETTE, 2019), classificadas nos filos: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia, com abundância relativa de 98% de Firmicutes e Bacteroidetes (RINNINELLA *et al.*, 2019).

A MI tem distribuição heterogênea ao longo do TGI, sendo o cólon o local de maior densidade bacteriana devido às condições favoráveis para a proliferação dos microrganismos, caracterizadas por alta disponibilidade de nutrientes, menor concentração de enzimas digestivas e peristalse mais lenta (DA SILVA; DOS SANTOS; BRESSAN, 2013).

Há diversos fatores que podem influenciar a composição e função da microbiota intestinal:

hábitos alimentares, estilo de vida (alcoolismo/tabagismo/atividade física), região geográfica, gênero, idade, uso de medicamentos (principalmente uso de antibióticos).

O papel da MI é vasto e tem sido abordado recentemente por vários pesquisadores. No intestino delgado, a microbiota regula a absorção e metabolismo de nutrientes, impede a infecção por patógenos através da competição e modificação do pH local (OLIPHANT; ALLEN-VERCOE, 2019). No colón, bactérias podem sintetizar cofatores que influenciam o metabolismo energético do hospedeiro e regulam a expressão gênica, e a síntese de vitaminas dos complexos B e K (OLIPHANT; ALLEN-VERCOE, 2019; WU *et al.*, 2019).

Embora a microbiota esteja constantemente exposta a perturbações ambientais, sua composição e função em um indivíduo saudável são estáveis, visto que as comunidades microbianas são resilientes e, consideravelmente, resistentes à

mudança (SOMMER *et al.*, 2017). Apesar de se adequar às mudanças, a microbiota pode se desequilibrar e perder sua resiliência, ou seja, a sua capacidade de retornar ao seu estado de eubiose (homeostase), desenvolvendo um estado de desequilíbrio denominado disbiose (SILVERMAN; AZZOUZ; ALEKSEYENKO, 2019).

O desenvolvimento da microbiota até 2,5 anos é crítico, e processos disruptivos podem ser decisivos para o desenvolvimentos de doenças como obesidade, autoimunes e câncer (WU *et al.*, 2019). Logo após o nascimento começa um processo de colonização dos microrganismos devido ao contato com a vagina, fezes, pele, seios e a pele da mãe com o recém-nascido. Os microrganismos continuam aumentando em população à medida que o bebê entra em contato com o ambiente e através da alimentação. Fatores que influenciam na colonização inicial da microbiota são: idade gestacional, via de parto (vaginal ou cesárea), dieta (aleitamento materno ou fórmula infantil), higiene, uso de antibióticos. A microbiota do recém-nascido é menos diversa e com dominância dos filos Proteobacteria e Actinobacteria. Aos 2,5 anos de idade, em média, a microbiota intestinal fica estável e se assemelha a de um adulto, e essa característica mais estável da microbiota é denominada resiliência (SOMMER *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2019; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019).

O papel fundamental da microbiota intestinal e o sistema imunológico já foi descrito pela literatura científica. Até dois terços das células imunológicas residem na lâmina própria, tecido conjuntivo das membranas mucosas. Animais livres de microbiota ou *germ-free* tem o sistema imunológico disfuncional já que apresentam deficiências na maturação de células imunes, diminuição nas placas de Payer, linfonodos mesentéricos menos desenvolvidos e, por consequência, diminuição de secreção de IgA, muco e peptídeos antimicrobianos (AMP). Os animais *germ-free* apresentam alterações na morfologia e motilidade intestinal, com mudança na absorção de nutrientes, aumento do tempo de *turnover* do epitélio intestinal e microvilosidades irregulares (MANCA *et al.*, 2020). Além do mais, as bactérias que compõem a microbiota intestinal são capazes de interagir com as células imunológicas através de mecanismos diretos e indiretos. Inclusive, a produção de metabólitos proveniente da microbiota como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) tem características imunomoduladoras (ABDOLLAHI-ROODSAZ; ABRAMSON; SCHER, 2016), o tratamento com butirato, um tipo de AGCC, melhorou a disbiose associada ao LES e atenuou a lesão renal lúpica em camundongos (HE *et al.*, 2020).

Os AGCC fornecem energia adicional para os colonócitos e mantêm o pH ideal. Interessantemente, o butirato ativa os proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPAR γ) e aumentam a β oxidação e consumo de oxigênio no intestino, gerando um ambiente anaeróbico (RUFF; GREILING; KRIEGEL, 2020). A disbiose está associada a uma diminuição relativa da biodiversidade microbiana relacionada com um ambiente com maior concentração de oxigênio e menos ácido que, por consequência, propicia a expansão de patobiontes (BROWN; KENNY; XAVIER, 2019; FAN; PEDERSEN, 2020).

Ao defender seu nicho ecológico, a microbiota favorece a imunidade de barreira e, portanto, sua própria contenção, minimizando o contato entre os microrganismos e a lâmina própria. Essa separação física é realizada por ação conjunta de enterócitos e outras células epiteliais, muco, IgA, AMP, α -defensinas, lectina, lisossomos e células do sistema imune. No intestino delgado, a camada de muco produzida pelas células de Goblet ou caliciformes faz com que a maioria das células bacterianas estejam afastadas da camada epitelial. Já no cólon, há uma dupla camada de muco na qual a microbiota interage com a mais superficial, deixando a camada inferior praticamente livre de microrganismos. Ademais, o muco serve como fonte de energia e carbono para algumas bactérias. A propósito, essa interação é bidirecional, alterações no muco podem levar a desequilíbrios na microbiota e moléculas sinalizadoras advindas do metabolismo microbiano são necessárias para uma adequada produção de muco (BROWN; KENNY; XAVIER, 2019; RUFF; GREILING; KRIEGEL, 2020; ZHANG; FRENETTE, 2019).

É importante ressaltar que estudos que tem como objetivo entender a relação entre a microbiota intestinal, a disbiose e doenças autoimunes vem ganhando força na comunidade científica (KONIG, 2020), entretanto, no Brasil, ainda não há dados sobre pacientes com LES e o seu perfil de microbiota intestinal.

1.3. Microbiota intestinal e lúpus eritematoso sistêmico

A partir dos resultados recentes de estudos epidemiológicos, fisiológicos, complementados por estudos celulares e experimentos em animais, parece que uma parte considerável da influência ambiental sobre a saúde humana e o risco de doenças podem ser mediados ou modificados por interações entre microrganismos e o seu hospedeiro humano. Análises integradas dos microbiomas e metabolômica indicam

que metabólitos bioativos podem ser absorvidos pelos enterócitos e cair na circulação sanguínea, contribuindo com a imunopatogênese de doenças (FAN; PEDERSEN, 2020).

A disbiose está associada com a perda da integridade da barreira intestinal e a liberação de componentes bacterianos ou até mesmo a translocação bacteriana (SILVERMAN; AZZOUZ; ALEKSEYENKO, 2019). Os gatilhos relacionados a microbiota podem ter um papel importante no desenvolvimento e progressão do LES. A resposta imune inata a ácidos nucleicos e nucleoproteínas foi associada a algumas infecções bacterianas (ILLESCAS-MONTES *et al.*, 2019; PEENE; ELEWAUT, 2019). Em indivíduos geneticamente predispostos, epítomos bacterianos similares a proteína ligante de RNA (Ro) expressos por bactérias da microbiota foram associados ao *priming* e seleção de clones de células B autorreativas, além da ativação de linfócitos de memória (GREILING *et al.*, 2018).

Há, atualmente, alguns modelos animais que permitem análises de microbiota intestinal e LES. Em camundongos MRL/lpr foram encontrados aumento relativo de membros da família Lachnospiraceae e diminuição do gênero *Lactobacillus*, com associação de sintomas precoces e mais graves (ZHANG *et al.*, 2014). Tanto em camundongos MRL/lpr quanto em NZB/W F1, que também desenvolvem doença correspondente ao LES, porém de forma mais lenta, houve alteração da diversidade da microbiota intestinal à medida em que a doença progredia (LUO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2014).

Em estudos de coorte de LES, houve forte evidência de disbiose intestinal demonstrada pelo aumento relativo significativo de *Ruminococcus gnavus* em relação ao grupo controle. O crescimento excessivo de *Ruminococcus gnavus* foi acompanhado pela diminuição da espécie *Bacteroides uniformis*. O mesmo estudo relatou dano à barreira intestinal nesses pacientes e relacionou essas alterações com a perda de tolerância (PEENE; ELEWAUT, 2019).

Os dois filos predominantes na microbiota intestinal de adultos são: Firmicutes e Bacteroidetes, com predominância do primeiro (WU *et al.*, 2019). Em diversos estudos, foi reportado diminuição na razão dos filos Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) em pacientes com LES comparado aos controles saudáveis (CS) (GERGES *et al.*, 2021; GREILING *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2016; HEVIA *et al.*, 2014). Essa alteração é relatada em estudos em diferentes países. No Egito, um trabalho com pacientes recentemente diagnosticados com LES não só reafirmou essa alteração, como também encontrou

uma correlação inversa entre o SLEDAI 2K (escore clínico para atividade da doença) e a razão F/B. Outro resultado relevante encontrado foi uma diminuição significativa no gênero *Lactobacillus* (GERGES *et al.*, 2021).

Consoante, outro trabalho multicêntrico encontrou diminuição da razão F/B tanto em pacientes chineses e quanto espanhóis, sugerindo que mesmo em etnias diferentes, pacientes com LES tem alterações similares no perfil da microbiota intestinal. Os gêneros *Rhodococcus*, *Eggerthella*, *Klebsiella*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Flavonifractor* e *Incertae sedis* estavam significativamente aumentados, enquanto *Dialister* e *Pseudobutyrvibrio* estavam reduzidos nos pacientes chineses comparados aos controles (HE *et al.*, 2016).

Dentre os diversos fatores que contribuem para o estabelecimento de uma comunidade microbiana intestinal, a dieta é considerada o principal e o mais fácil de ser modificado (MAFRA *et al.*, 2019; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019).

I.4. Microbiota intestinal e componentes alimentares

Os carboidratos são a principal fonte de energia da dieta (KRAUSS *et al.*, 2000). No entanto, nem todos os carboidratos consumidos através da dieta podem ser acessíveis ao metabolismo humano já que a capacidade enzimática dos seres humanos é limitada. Nesse contexto, o arsenal enzimático das bactérias presentes na microbiota intestinal é vasto e excede a capacidade humana de hidrolisar diversos carboidratos presentes na alimentação (KOLODZIEJCZYK; ZHENG; ELINAV, 2019). O termo mais genérico para aqueles carboidratos cujo corpo humano não é capaz de digerir e absorver através das suas próprias enzimas é fibra alimentar. A fermentação sacarolítica acontece principalmente no cólon proximal, onde a concentração de fibras alimentares é maior. Bactérias gram-positivas como espécies de *Bifidobacterium*, *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* são os principais grupos responsáveis pela fermentação das fibras (KORPELA, 2018). O tratamento com amido resistente, um tipo de carboidrato rico em fibras, foi capaz de diminuir a sinalização de IFN-I, reduzindo ativação de células dendríticas plasmocitóides e aliviar os sintomas de LES em camundongos com disfunção no TRL-7. Visto esse contexto, são necessários mais estudos que relacionem a dieta, a microbiota intestinal e LES (CHIARO; ROUND, 2019).

Apesar de todo o conhecimento científico gerado nos últimos anos e de estudos publicados que apoiam a teoria da disbiose intestinal como uma chave para o desenvolvimento de doenças autoimunes e especificamente o LES (BROWN; KENNY; XAVIER, 2019; KONIG, 2020; VAN DE WIELE *et al.*, 2016; XIANG *et al.*, 2022), ainda não há estudos no Brasil associando a microbiota intestinal e hábitos alimentares em pacientes com LES, sendo o trabalho atual inédito no Brasil e América do Sul (XIANG *et al.*, 2022).

II. JUSTIFICATIVA

Os medicamentos utilizados para o tratamento do LES podem causar efeitos adversos como aumento da chance de infecção e disfunções metabólicas, seja comprometendo a saúde óssea ou favorecendo hipertensão. Novas terapias como o tratamento com imunobiológicos, apesar de promissoras, são onerosas para o sistema único de saúde (SUS), além de aumentarem as chances de infecções oportunistas. As infecções e complicações cardiovasculares são as principais causas de morte em pacientes com LES, segundo dados nacionais e internacionais (COSTI *et al.*, 2017; REPPE MOE *et al.*, 2021). Apesar das melhorias no diagnóstico e tratamento, desde a década de 1980, a taxa de mortalidade de pacientes com LES atingiu um platô (KAUL *et al.*, 2016). O LES progrediu para doença renal crônica em 5-11% de todos os pacientes com LES, segundo um estudo de acompanhamento de pacientes por 15 anos na europa (REPPE MOE *et al.*, 2021). Desta forma, podemos classificar o LES como uma doença crônica de grande sobrecarga funcional (GERGIANAKI *et al.*, 2017; REPPE MOE *et al.*, 2021; YEH *et al.*, 2013)

Mesmo em um sistema de saúde que ofereça acesso aos cuidados médicos, a baixa situação socioeconômica está associado a piores desfechos do LES (SAGY *et al.*, 2022). No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística (IBGE), há uma correlação entre raça e situação socioeconômica. Dados de 2018 apontam que há 15,4% de pessoas brancas vivendo abaixo da linha da pobreza (menos de 5,50 dolares americanos por dia *per capita*), contra 32,9% de pessoas negras e pardas. Sendo o LES mais frequente em pessoas negras e pardas, há indícios que essa doença tenha um impacto ainda maior do que o relatado até agora no nosso país em relação a qualidade de vida das pessoas.

Portanto, trabalhos científicos como o presente estudo são importantes tentar entender o papel da microbiota na fisiopatologia do LES, a influência da dieta na modulação da MI e saúde geral, bem como tentar identificar possíveis assinaturas da microbiota e propor tratamentos adjuvantes com moduladores da MI, visando reduzir custos relacionados a saúde publica e melhor qualidade de vida para os pacientes.

III. Objetivos

III.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a microbiota intestinal de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, comparar com a microbiota de indivíduos saudáveis e correlacionar com a dieta.

III. 2. Objetivos específicos

1. Descrever os dados demográficos e clínicos dos pacientes com LES;
2. Caracterizar a microbiota intestinal de pacientes com LES;
3. Comparar a composição da microbiota intestinal de pacientes com LES à dos indivíduos controles;
4. Descrever os hábitos alimentares de pacientes com LES;
5. Comparar os hábitos alimentares de pacientes com LES à dos indivíduos controles;
6. Correlacionar os resultados da composição da microbiota intestinal de pacientes com LES aos dados demográficos, clínicos e aos hábitos alimentares.

IV. Materiais e Métodos

IV. 1. Casuística e coleta das amostras

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos (Processo: 1.268/2016) (Anexo 1). Pacientes com LES e indivíduos sadios assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 2), e responderam ao questionário sobre estilo de vida e hábitos alimentares (Anexo 3).

Pacientes maiores de 18 anos, diagnosticados com LES, segundo os critérios revisados no *American College of Rheumatology* (1982, revisados em 1997), foram recrutados para avaliação da microbiota intestinal e hábitos alimentares. Indivíduos sadios, sem histórico familiar de LES e outras doenças autoimunes, foram incluídos no estudo como grupo controle.

Crítérios de exclusão como cirurgia bariátrica, doenças inflamatórias intestinais, presença de diarreias crônicas infecciosas ou não e uso de medicamentos como antibióticos e laxantes nos últimos 30 dias foram considerados para ambos os grupos.

Os dados clínicos dos pacientes, tais como lesões cutâneas ativas, avaliação de autoanticorpos (FAN, anti-DNA nativo, anti-Sm, anticardiolipina IgG e IgM, anticoagulante lúpico, anti-La/SSB, anti-Ro/SSA e anti-RNP), escore clínico SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) (ANEXO 4) e tratamento medicamentoso foram registrados.

O SLEDAI avalia os sintomas clínicos e resultados laboratoriais dos pacientes com LES, cada critério possui uma pontuação. Ao final, os pontos são somados para determinar o grau de atividade da doença. SLEDAI 0 é considerado como LES inativo; de 1 a 5 pontos, atividade leve; de 6 a 10 pontos, atividade moderada; de 11 a 19 pontos, atividade alta; e 20 pontos ou mais, atividade muito alta.

O SLEDAI-2K surgiu como atualização do SLEDAI, no ano 2000. A modificação proposta incluía a atividade persistente de alguns parâmetros, e não a pontuação desses parâmetros apenas nos casos de início ou recorrência. Portanto, para o SLEDAI-2K, os critérios são os mesmos, porém a pontuação de alguns itens difere do SLEDAI.

As amostras de fezes foram coletadas pelos próprios indivíduos ou familiares em frasco coletor universal para posterior extração de DNA. O DNA foi extraído utilizando kit comercial e a caracterização da microbiota intestinal de pacientes e controles foi realizada por PCR em tempo real e sequenciamento de nova geração.

IV.2. Questionários social, epidemiológico e de frequência alimentar

O questionário foi desenvolvido com propósito de agrupar dados sociais, epidemiológicos e de frequência alimentar dos pacientes com LES e indivíduos controles. O questionário envolveu somente perguntas fechadas de modo a coletar dados de estilo de vida como prática de exercícios físicos, tabagismo, uso de medicamento, consumo de bebidas alcoólicas, doenças pregressas.

Utilizamos o inquérito alimentar do tipo questionário de frequência alimentar (QFA) do tipo entrevista realizada por nutricionista treinada. O QFA é muito utilizado para estudos que tem como objetivo caracterizar os hábitos alimentares de uma maneira eficiente. Para tanto, um questionário com aproximadamente 20-25 minutos de duração, já que o tempo necessário para aplicação de um QFA é um dos principais fatores limitantes para a adesão dos sujeitos da pesquisa (SAM *et al.*, 2020). O questionário avaliou a frequência de consumo de grupos alimentares com efeitos na MI já descritos na literatura (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019).

IV.3. Extração de DNA e PCR em tempo real

O DNA bacteriano foi extraído a partir de 200 mg de fezes das amostras de pacientes e controles utilizando o kit *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. Alguns grupos bacterianos presentes nas amostras fecais foram caracterizados por PCR em tempo real utilizando *primers* descritos em literatura prévia (LARSEN *et al.*, 2010) (**Tabela 1**). Os *primers* são específicos para bactérias *Roseburia faecis*, *Roseburia hominis*, *Roseburia intestinalis* e *Roseburia cecicola*, grupo *Bacteroides-Prevotella*, subgrupos *Prevotella falsenii*, *Prevotella copri*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella pallens*, *Prevotella maculosa* e *Prevotella oris*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. As reações foram realizadas utilizando 7,5 μ L de Power SYBR Green PCR Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS), 4,0 μ L de água ultrapura, 1,0 μ L dos *primers forward* e *reverse* a 2 μ M, e 1,5 μ L de DNA, diluído para 5 η g, totalizando 15 μ L de volume final. Para a quantificação relativa, o número de cópias de DNA bacteriano amplificados para *Prev*, *Bif*, *Bac*, *Lac* e *Ros* foram normalizados pelo número de cópias do *primer* universal *Univ*. A

abundância relativa foi calculada a partir dos valores de Ct e expressos em unidades relativas de expressão (URE) (ALBESIANO *et al.*, 2003) por 200 mg de fezes.

Tabela 1: Sequência de *primers* para o 16S bacteriano e tamanho dos produtos.

Grupo/subgrupo	Sequência dos <i>primers</i> (5'- 3')	Produto da PCR (pb)
<i>Prevotella</i> (Prev)	F: CACCAAGGCGACGATCA R: GGATAACGCCYGGACCT	283
<i>Bifidobacterium</i> (Bif)	F: GCGTGCTTAACACATGCAAGTC R: CACCCGTTTCCAGGAGCTATT	126
<i>Bacteroides</i> (Bac)	F: GAAGGTCCCCACATTG R: CAATCGGAGTTCTTCGTG	410
<i>Roseburia</i> (Ros)	F: TACTGCATTGGAACTGTCTG R: CGGCACCGAAGAGCAAT	230
<i>Lactobacillus</i> (Lac)	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG	341
Universal (Univ)	F: TCCTACGGGAGGCAGCAGT R: GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	466

PCR: Reação em cadeia da polimerase; F: primer *forward*; R: primer *reverse*; C: Citosina; A: Adenina; G: Guanina; T: Timina; pb: pares de bases.

IV.4. Sequenciamento das regiões V3/V4 do 16S bacteriano e análises

A quantidade de DNA foi determinada em Nanodrop e no Quantus e ajustada para 5 ng/mL com tampão Tris (10mM, pH=8,5). As regiões V3 e V4 do 16S bacteriano foram amplificadas por PCR utilizando 2,5 mL do DNA bacteriano, 5 mL de cada um dos *primers* e 12,5 mL de mix contendo a enzima *2x KAPA HiFi Hot Start Ready Mix*. O produto da PCR (2 µL) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% em solução tampão contendo 40 mM de Tris-acetato (pH=8,0; 1mM de EDTA – solução tampão TAE), por 30 minutos, a 100 volts constantes. Para a visualização das bandas foi utilizado o intercalante de DNA *GelRed*. O produto da PCR foi purificado utilizando o kit *AMPure XP beads* (BD Biosciences, CA, EUA). As bibliotecas de DNA foram construídas conforme os protocolos da Illumina, incluindo etapas de ligação dos adaptadores (*Nextera XT Index Kit*), várias etapas de purificação (*AMPure XP beads*), quantificação e desnaturação pré-sequenciamento (*MiSeq v3 reagent kits*). O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando a plataforma Illumina MiSeq

System, através da colaboração com pesquisador da DNAconsult (São Carlos) e bioinformatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP Jaboticabal). As análises foram realizadas utilizando o *MiSeqReporter Software*. As *reads* geradas pelo sequenciamento foram classificadas utilizando a base de dados *RDP*.

IV.5. Análise Estatística

As comparações entre as variáveis de estilo de vida e hábitos alimentares foram realizadas pelo teste Qui-quadrado de Pearson. Para a comparação das unidades relativas de expressão dos grupos bacterianos entre pacientes e controles foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (One-tailed). As correlações das unidades relativas de expressão com as variáveis de estilo de vida e hábitos alimentares foram realizadas pelo teste de *Pearson* ou *Spearman*. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

V. RESULTADOS

V.1. Descrição do grupo de pacientes com LES

O grupo de pacientes com LES está constituído por 14 pacientes do sexo feminino, diagnosticados através de manifestações clínicas e exames laboratoriais, com idades entre 26 e 55 anos (média e desvio padrão = $45 \pm 9,84$ anos).

A massa corporal dos pacientes variou entre 55 Kg e 95 Kg (média e desvio padrão = $69,85 \text{ Kg} \pm 11,83 \text{ Kg}$). A estatura das pacientes variou entre 151 cm e 164 cm (média e desvio padrão = $159,2 \text{ cm} \pm 4,22 \text{ cm}$). Já o Índice de massa corporal (IMC) variou entre $21,5 \text{ Kg/m}^2$ e $35,8 \text{ Kg/m}^2$ (média e desvio padrão = $27,48 \pm 3,91$). Sendo que 35,71% apresentaram peso adequado para altura, 42,85% são classificados com sobrepesos e 21,42% são classificados como obesos. Os dados demográficos e clínicos estão representados na **Tabela 2**.

Os dados clínicos, tais como tempo de doença, escore clínico SLEDAI e SLEDAI-2K estão presentes na **Tabela 3**. SLEDAI-2K é a versão atualizada em 2000 do SLEDAI, que não inclui resultados de exames laboratoriais, porém o SLEDAI convencional ainda é o mais utilizado para classificar a atividade do LES. Em relação ao SLEDAI, 7,14% dos pacientes apresentam inatividade da doença; 7,14% atividade leve; 7,14% atividade moderada; 35,71% atividade alta; e 42,85% atividade muito alta.

Na **Tabela 4** estão afixados resultados dos exames laboratoriais de pesquisa de autoanticorpos, obtidos através dos prontuários do AME das pacientes e o tratamento atual utilizado para a doença. Outros anticorpos, como anti-Sm e anticardiolipina foram solicitados para algumas pacientes. LES01, 09, 10, 11 e 14 realizaram a pesquisa de anti-Sm, sendo que o único resultado reagente foi para LES11. LES09, 10 e 11 realizaram pesquisa para anticardiolipina, sendo todos não reagentes.

Tabela 2: Descrição dos dados demográficos dos pacientes com LES.

Pacientes	Sexo/idade	Etnia	Peso(kg)	Altura(cm)	IMC
LES01	F/ 52	Branca	63	155	26,2
LES02	F/46	Parda	72	160	28,1
LES03	F/ 48	Branca	63	160	24,6
LES04	F/54	Negra	60	155	25
LES05	F/26	Negra	56	151	24,6
LES06	F/55	Branca	67	160	26,2
LES07	F/51	Parda	95	163	35,8
LES08	F/39	Branca	69	163	26
LES09	F/37	Parda	73	159	28,9
LES10	F/47	Branca	74	153	31,6
LES11	F/26	Parda	55	160	21,5
LES12	F/54	Negra	91	165	33,4
LES13	F/42	Negra	77	164	28,6
LES14	F/54	Parda	63	161	24,3

Tabela 3: Dados clínicos dos pacientes com LES.

Pacientes	Tempo de doença	SLEDAI	SLEDAI-2K
LES01	20 anos	26	19
LES02	2 anos	14	14
LES03	2 anos	22	23
LES04	13 anos	12	14
LES05	11 anos	22	19
LES06	17 anos	4	4
LES07	6 anos	16	9
LES08	8 anos	24	24
LES09	6 anos	35	35
LES10	12 anos	8	8
LES11	1,8 anos	16	16
LES12	15 anos	24	24
LES13	2 anos	12	12
LES14	4 anos	0	0

Tabela 4: Descrição dos dados clínicos dos pacientes diagnosticados com LES.

Pacientes	FAN	Anti-DNA	anti-SSA (Ro)/SSB (La)	Tratamento atual
LES01	Negativo	Negativo	Negativos	Meloxicam
LES02	Fino denso 1/640	ND	ND	Azatioprina
LES03	Nuclear homogêneo 1/320	Negativo	Negativos	Hidroxicloroquina
LES04	Negativo	ND	ND	ND
LES05	Nuclear homogêneo 1/320	1/1280	ND	Hidroxicloroquina, micofenolato e prednisona
LES06	Negativo	ND	ND	ND
LES07	Negativo			Azatioprina e prednisona
LES08	Pontilhado fino 1/320	ND	ND	Azatioprina
LES09	Negativo	Negativo	Negativos	Hidroxicloroquina e metotrexato
LES10	Nuclear homogêneo periférico 1/80	Negativo	Ro positivo La negativo	Azatioprina e hidroxicloroquina
LES11	Nuclear pontilhado fino 1/160	Negativo	Ro positivo La negativo	Hidroxicloroquina e micofenolato
LES12	Centrométrico, núcleo reagente, placa metafásica presente 1/320	ND	ND	Hidroxicloroquina
LES13	Nuclear pontilhado 1/640	ND	ND	Metotrexato, prednisona, hidroxicloroquina
LES14	Nuclear homogêneo 1/8160	Negativo	Ro positivo La negativo	Nimesulida

ND: Não determinado

V.2. Descrição do grupo de indivíduos controles

O grupo controle contém vinte e oito pacientes do sexo feminino (93,33%) e dois pacientes do sexo masculino (6,67%), com idades entre 25 e 70 anos ($51,8 \pm 12,93$), massa corporal entre 41 e 95 Kg ($69,73 \pm 12,09$ Kg), altura entre 149 e 179 cm ($162,06 \pm 7,57$ cm) e IMC entre 16,4 e 33,8 Kg/m² ($26,59 \pm 4,38$), dessa forma 3,34% dos controles apresenta baixo peso, 36,67% são classificados com peso adequado para altura, 23,32% apresentam obesidade e 36,67% sobrepeso. Os dados demográficos foram registrados e estão representados na **Tabela 5**. Do total, 80% consideram-se

branco, 3,3% negro, 13,3% consideram-se pardos e 3,3% asiático. Os entrevistados referem que já moraram tanto em zona rural quanto em zona urbana, 63,3% apenas em zona urbana. Nenhum controle fez uso de anti-inflamatórios, antibióticos, corticoides ou imunossupressores e vacina nos intervalos de 07-30 dias prévios ao questionário e coleta de material biológico. 16 controles (53,3%) relataram cirurgias prévias: colecistectomia, histerectomia, cesárea e laqueadura.

Tabela 5: Descrição dos dados demográficos e clínicos do grupo controle.

Controles	Sexo	Idade	Peso (kg)	Altura (cm)	IMC	Etnia
CTL60	F	36	70	150	31,1	Branco
CTL61	F	61	65	149	29,3	Branco
CTL62	F	46	69	175	22,5	Branco
CTL63	F	55	72	156	29,6	Branco
CTL64	F	49	58	168	20,5	Branco
CTL65	F	59	80	170	27,7	Branco
CTL66	F	31	83	167	29,8	Branco
CTL67	F	28	59	151	25,9	Branco
CTL68	F	25	73	153	31,2	Amarelo/Asiático
CTL69	F	41	83	163	31,2	Pardo/Mulato
CTL70	F	43	48	159	19,4	Branco
CTL71	F	58	60	170	20,8	Branco
CTL72	F	49	53	157	21,5	Branco
CTL73	F	55	88	164	32,7	Branco
CTL75	F	51	68	155	28,3	Branco
CTL76	F	68	60	158	24,0	Branco
CTL77	F	70	69	160	27,0	Branco
CTL78	F	68	78	152	33,8	Branco
CTL79	F	66	74	165	27,2	Pardo/Mulato
CTL80	M	55	73	168	25,9	Branco
CTL81	F	29	70	170	24,2	Branco
CTL46	M	55	95	179	29,6	Branco
CTL16	F	39	64	165	23,5	Branco
CTL22	F	50	65	160	25,4	Branco
CTL82	F	67	65	165	23,9	Pardo/Mulato
CTL84	F	66	78	158	31,2	Branco
CTL86	F	64	92	167	33,0	Branco
CTL85	F	61	72	170	24,9	Branco
CTL83	F	55	41	158	16,4	Negro
CTL87	F	54	67	160	26,2	Pardo/Mulato

V.3. Descrição do estilo de vida e hábitos alimentares dos pacientes com LES

Em relação às variáveis relacionadas ao estilo de vida, observou-se que 28,6% dos pacientes com LES faz uso de álcool e 21,4% é tabagista. No que diz respeito à prática de atividade física, apenas uma paciente relatou realizar alguma atividade. Em relação aos hábitos alimentares, 71,4% dos pacientes mencionaram fazer ingestão de legumes, verduras e vegetais todos os dias. As frutas frescas são consumidas por 50% das pacientes entrevistadas todos os dias. A carne vermelha é consumida todos os dias por 50% das pacientes. O leite e derivados são consumidos por 35,7% das pacientes todos os dias. A gordura trans é consumida na maioria dos dias, mas não em todos, por 21,4% dos pacientes, mesma porcentagem das que consomem todos os dias. Massas e comidas enlatadas são consumidas por 50% das entrevistadas 1-2 vezes por semana. Cerca de 42,8% das pacientes relataram consumir comida condimentada 1-2 vezes por semana. Os dados relacionados ao estilo e vida e hábitos alimentares das pacientes com LES encontram-se expressos na **Tabela 6**.

Na **Tabela 7**, estão descritos os dados sobre funcionamento intestinal e histórico familiar e pessoal sobre comorbidades dos pacientes com LES. 50% dos pacientes apresentam artrite reumatoide. LES05 apresenta além de LES, artrite reumatoide, hipertensão arterial sistêmica, esclerodermia e espondilite anquilosante. LES06 apresenta também AR e dermatomiosite.

Tabela 6: Descrição das variáveis de estilo de vida e hábitos alimentares dos pacientes diagnosticados com LES

Variáveis do questionário sócio-epidemiológico	N (%)
Ingestão de álcool	
Sim	4 (28,6%)
Não	10 (71,4%)
Uso de tabaco	
Sim	3 (21,4%)
Não	11 (78,6%)
Prática de atividade física	
Sim	1 (7,1%)
Não	13 (92,9%)
Consumo de legumes, verduras e vegetais	
Nunca	-
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	-
1-2 vezes por semana	1 (7,1%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	3 (21,4%)
Todos os dias	10 (71,4%)

Consumo de frutas frescas	
Nunca	-
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	-
1-2 vezes por semana	5 (35,7%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	2 (14,3%)
Todos os dias	7 (50%)
Consumo de carne vermelha	
Nunca	-
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	-
1-2 vezes por semana	2 (14,3%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	5 (35,7%)
Todos os dias	7 (50%)
Consumo de leite e laticínios	
Nunca	1 (7,1%)
Menos que uma vez por mês	1 (7,1%)
1-3 vezes por mês	1 (7,1%)
1-2 vezes por semana	2 (14,3%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	4 (28,6%)
Todos os dias	5 (35,7%)
Consumo de gordura e gordura trans	
Nunca	-
Menos que uma vez por mês	1 (7,1%)
1-3 vezes por mês	3 (21,4%)
1-2 vezes por semana	4 (28,6%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	3 (21,4%)
Todos os dias	3 (21,4%)
Consumo de massas	
Nunca	-
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	-
1-2 vezes por semana	7 (50%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	3 (21,4%)
Todos os dias	4 (28,6%)
Consumo de comida enlatada	
Nunca	3 (21,4%)
Menos que uma vez por mês	3 (21,4%)
1-3 vezes por mês	7 (50%)
1-2 vezes por semana	1 (7,1%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	-
Todos os dias	-
Consumo de comida condimentada	
Nunca	1 (7,1%)
Menos que uma vez por mês	2 (14,3%)
1-3 vezes por mês	5 (35,7%)

1-2 vezes por semana	6 (42,8%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	-
Todos os dias	-
Consumo de pimenta ou comida apimentada	
Nunca	6 (42,8%)
Menos que uma vez por mês	1 (7,1%)
1-3 vezes por mês	1 (7,1%)
1-2 vezes por semana	4 (28,6%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	2 (14,3%)
Todos os dias	-
Consumo de bebidas quentes	
Nunca	-
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	1 (7,1%)
1-2 vezes por semana	-
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	-
Todos os dias	13 (92,9%)
Consumo de probióticos	
Nunca	7 (50%)
Menos que uma vez por mês	2 (14,3%)
1-3 vezes por mês	1 (7,1%)
1-2 vezes por semana	2 (14,3%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	-
Todos os dias	2 (14,3%)

Tabela 7: Descrição dos dados sobre funcionamento intestinal e histórico familiar e pessoal sobre comorbidades dos pacientes com LES.

Variáveis do questionário	N (%)
<u>Funcionamento intestinal</u>	
Todos os dias	11 (90,1%)
Três vezes na semana	1 (3,3%)
Duas vezes na semana	1 (3,3%)
Uma vez na semana	1 (3,3%)
<u>Uso de laxantes nos 7 dias anteriores a coleta de fezes</u>	
Sim	0
Não	14 (100%)
<u>Presença de diarreia crônica 15 dias antes</u>	
Sim	0
Não	14 (100%)
<u>Histórico familiar de LES</u>	
Sim	5 (35,7%)
Não	8 (57,1%)
Não Sabe	1 (3,3%)
<u>Histórico familiar de outras doenças autoimunes</u>	
Sim	10 (71,4%)
Não	4 (28,6%)
<u>Histórico familiar de doença inflamatória intestinal</u>	

Não	0 (100%)
História de infecções virais na infância	
Sim	10 (71,4%)
Não	3 (21,4%)
Não soube informar	1 (3,3%)
Comorbidades	
Hipertensão Arterial Sistêmica	4 (28,6%)
Diabetes Mellitus tipo 2	1 (3,3%)
Artrite Reumatóide	7 (50%)
Hipotireoidismo	1 (3,3%)
IVAS nas últimas 2 semanas	5 (35,7%)
Alergia	3 (21,4%)
Asma	0 (100%)

V.4. Descrição do estilo de vida e hábitos alimentares do grupo controle

Em relação às variáveis relacionadas ao estilo de vida, observou-se que 46,7% fizeram uso ou ainda faz de álcool, 20% são tabagistas (fumando cerca de 1-2 maços de cigarro por dia). Com relação as práticas de atividade física, 26,7% dos controles realizam exercícios, sendo a maioria de 3-5 dias por semana por pelo menos 60 minutos.

Considerando os hábitos alimentares, 53,3% dos controles mencionaram fazer ingestão de legumes, verduras e vegetais todos os dias. As frutas frescas são consumidas por 43,3% dos entrevistados todos os dias. A carne vermelha é consumida uma ou duas vezes por semana por 36,7%. O leite e derivados são consumidos por 60% todos os dias. A gordura trans é consumida uma ou duas vezes na semana por 23,3% dos controles. Alimentos fonte de carboidrato são consumidos por 43,3% dos entrevistados todos os dias. 16,7% dos controles relataram consumir comida enlatada uma ou duas vezes por semana. Quanto à comida condimentada, 46,7% referem fazer uso de 1-3 vezes por mês. Alimentos apimentados ou pimenta são consumidos por 3,3% dos controles todos os dias e café ou bebidas quentes como chá apresentam frequência de 73,3%, sendo consumidos todos os dias. Em relação aos probióticos, 30% relataram que usam 1-3 vezes por mês. Os dados relacionados ao estilo e vida e hábitos alimentares dos controles encontram-se expressos na **Tabela 8**.

Parâmetros também avaliados foram o funcionamento intestinal, em que 70% controles relataram evacuar todos os dias, o uso de laxantes, sendo utilizado por

3,3% dos controles, e presença de diarreia crônica nos últimos 15 dias, sendo que 96,7% negaram.

O último ponto questionado foi histórico familiar de doenças inflamatórias crônicas. 96,7% do total nega outros familiares com LES, 26,6% referem a presença de outras doenças autoimunes na família (sendo a maioria diabetes tipo 1 e outras como vitiligo e artrite reumatoide). 83,3% afirmaram que já foram acometidos por infecções virais mais prevalentes na infância (sendo considerado uma ou mais entre as opções: sarampo, caxumba, varicela ou rubéola). Dentre controles, 23,3% apresentam hipertensão arterial sistêmica. 90% negam infecções de vias aéreas nas últimas duas semanas e 50% relatam a presença de alergia. Em relação à asma, 96,7% dos controles negaram. Os últimos dados, funcionamento intestinal e histórico familiar e pessoal sobre comorbidades estão na **Tabela 9**.

Tabela 8: Descrição sobre estilo de vida e hábitos alimentares dos controles.

Variáveis do questionário sócio-epidemiológico	Controles N (%)
Ingestão de álcool	
Sim	16 (53,3%)
Não	14 (46,7%)
Uso de tabaco	
Sim	6 (20%)
Não	24 (80%)
Prática de atividade física	
Sim	8 (26,7%)
Não	22 (63,3%)
Consumo de legumes, verduras e vegetais	
Nunca	-
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	2 (6,7%)
1-2 vezes por semana	4 (13,3%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	8 (26,7%)
Todos os dias	16 (53,3%)
Consumo de frutas frescas	
Nunca	-
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	4 (13,3%)
1-2 vezes por semana	8 (26,7%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	5 (16,7%)
Todos os dias	13 (43,3%)
Consumo de carne vermelha	
Nunca	-

Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	1 (3,3%)
1-2 vezes por semana	11 (36,7%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	9 (30%)
Todos os dias	9 (30%)
Consumo de leite e laticínios	
Nunca	1 (3,3%)
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	3 (10%)
1-2 vezes por semana	6 (20%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	2 (6,7%)
Todos os dias	18 (60%)
Consumo de gordura e gordura trans	
Nunca	6 (20%)
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	11 (36,7%)
1-2 vezes por semana	7 (23,3%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	1 (3,3%)
Todos os dias	5 (16,7%)
Consumo de massas	
Nunca	1 (3,3%)
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	2 (6,7%)
1-2 vezes por semana	6 (20%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	8 (26,7%)
Todos os dias	13 (43,3%)
Consumo de comida enlatada	
Nunca	8 (26,7%)
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	14 (46,7%)
1-2 vezes por semana	5 (16,7%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	2 (6,7%)
Todos os dias	1 (3,3%)
Consumo de comida condimentada	
Nunca	12 (40%)
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	14 (46,7%)
1-2 vezes por semana	4 (13,3%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	-
Todos os dias	-
Consumo de pimenta ou comida apimentada	
Nunca	15 (50%)
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	8 (26,7%)
1-2 vezes por semana	3 (10%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	2 (6,7%)

Todos os dias	1 (3,3%)
Consumo de bebidas quentes	
Nunca	1 (3,3%)
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	3 (10%)
1-2 vezes por semana	3 (10%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	1 (3,3%)
Todos os dias	22 (73,3%)
Consumo de probióticos	
Nunca	14 (46,7%)
Menos que uma vez por mês	-
1-3 vezes por mês	9 (30%)
1-2 vezes por semana	5 (16,7%)
Na maioria dos dias, mas não todos os dias	1 (3,3%)
Todos os dias	1 (3,3%)

Tabela 9: Descrição dos dados sobre funcionamento intestinal e histórico familiar e pessoal sobre comorbidades.

Variáveis do questionário	N (%)
<u>Funcionamento intestinal</u>	
Todos os dias	21 (70%)
Três vezes na semana	4 (13,3%)
Duas vezes na semana	3 (10%)
Uma vez na semana	2 (6,7%)
<u>Uso de laxantes nos 7 dias anteriores a coleta de fezes</u>	
Sim	1 (3,3%)
Não	29 (96,7%)
<u>Presença de diarreia crônica 15 dias antes</u>	
Sim	1 (3,3%)
Não	29 (96,7%)
<u>Histórico familiar de LES</u>	
Sim	1 (3,3%)
Não	29 (96,7%)
<u>Histórico familiar de outras doenças autoimunes</u>	
Sim	8 (26,6%)
Não	22 (73,3%)
<u>Histórico familiar de doença inflamatória intestinal</u>	
Não	30 (100%)
<u>História de infecções virais na infância</u>	
Sim	25 (83,3%)
Não	3 (10%)
Não soube informar	2 (6,7%)
<u>Comorbidades</u>	
HAS	7 (23,3%)

IVAS nas últimas 2 semanas	3 (10%)
Alergia	15 (50%)
Asma	1 (3,3%)

V.5. Caracterização da microbiota intestinal de pacientes com LES

Com relação às análises metagenômicas da MI, observamos que os pacientes com LES apresentaram disbiose intestinal, visto pelas diferenças significativas nas análises de beta diversidade. A diversidade beta mede as diferenças entre as amostras, ou seja, a variabilidade na composição da comunidade entre as amostras de pacientes e controles, que foram significativamente diferentes e formaram dois agrupamentos ($P=0,00158$), como mostra a **Figura 1**. Por outro lado, não observamos diferenças nas análises de alfa diversidade. A diversidade alfa se resume a diversidade microbiana dentro de cada amostra, e as medidas de riqueza (número de táxons) ($P=0,872$) e uniformidade (abundância relativa desses táxons) ($P=0,097$) não foram diferentes entre pacientes e controles (**Figura 2**).

Figura 1: Análise de componentes principais da diversidade beta, mostrando a variabilidade na composição da comunidade entre as amostras de pacientes ($N = 10$) e controles ($N = 9$).

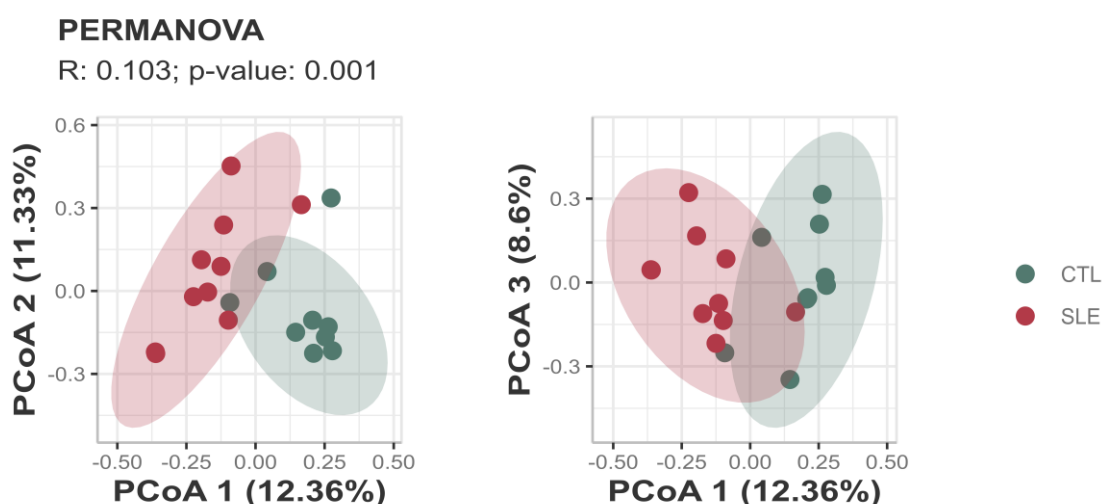
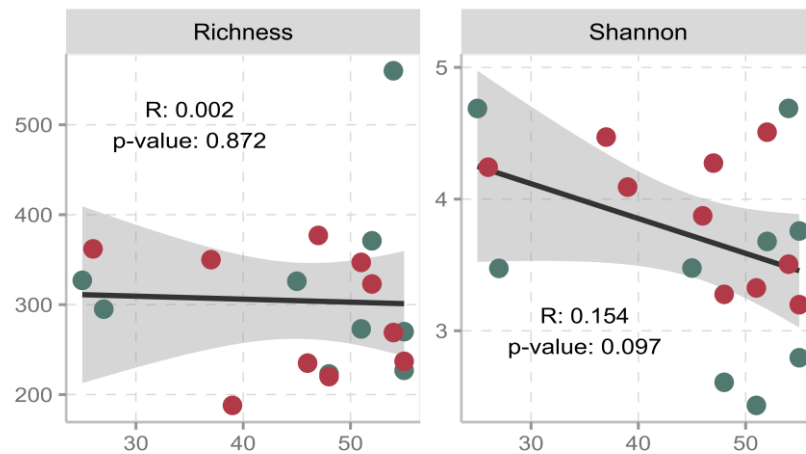


Figura 2: Gráficos de diversidade alfa, avaliando riqueza e uniformidade dentro de cada amostra.



A abundância relativa do filo *Desulfobacterota* está significativamente aumentada nas fezes dos pacientes com LES quando comparada aos controles. Por outro lado, os filios *Firmicutes* e *Actinobacteriota* estão reduzidos nas fezes do grupo LES (**Figura 3**). Com relação às famílias, *Sphingomonadaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Sutterellaceae*, *Marinifilaceae* e *Bacteroidaceae* estão aumentadas nas fezes dos pacientes, e *Ruminococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Bifidobacteriaceae* e *Erysipelatoclostridiaceae* estão diminuídas nas fezes do grupo LES, em relação aos controles (**Figura 4**). Os gêneros *Sphingomonas*, *Acidaminococcus*, *Enteobacter*, *Pelomonas*, *Veillonella*, *Parasutterella*, *Bilophila*, *Lachnospira* e *Odoribacter* estão com a abundância relativa significativamente aumentadas no LES em relação ao grupo controle. Os gêneros *Blautia*, *Hespellia*, *Eubacterium* e *Butyrvibrio* estão reduzidos nas fezes dos pacientes com LES (**Figura 5**). A **Figura 6** mostra a abundância relativa diferencial de espécies em pacientes com LES, em relação ao grupo controle.

Figura 3: Abundância relativa diferencial de Filos na microbiota intestinal de pacientes com LES.

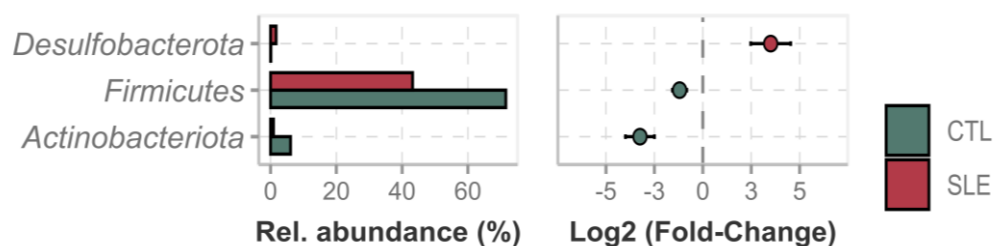


Figura 4: Abundância relativa diferencial de Famílias na microbiota intestinal de pacientes com LES.

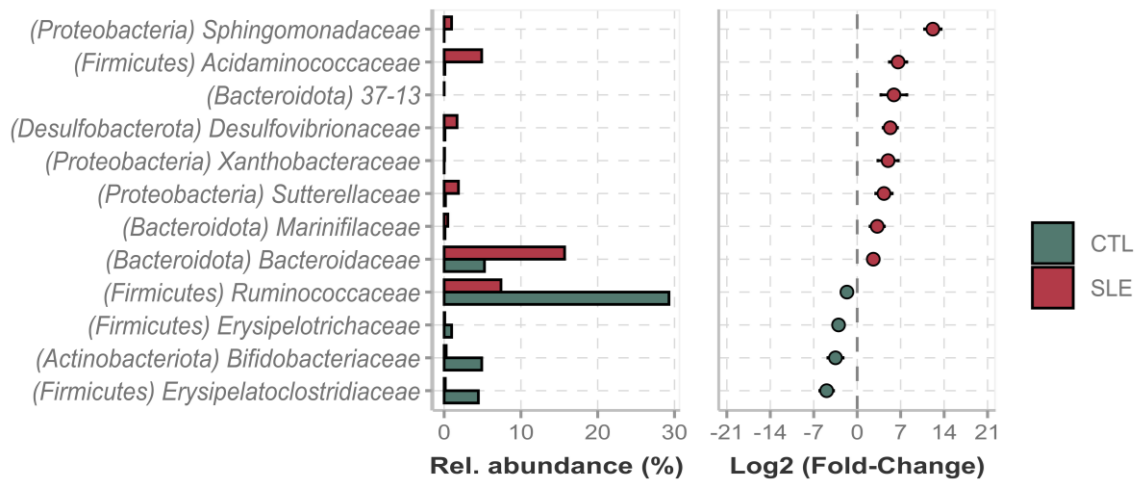


Figura 5: Abundância relativa diferencial de Gêneros na microbiota intestinal de pacientes com LES.

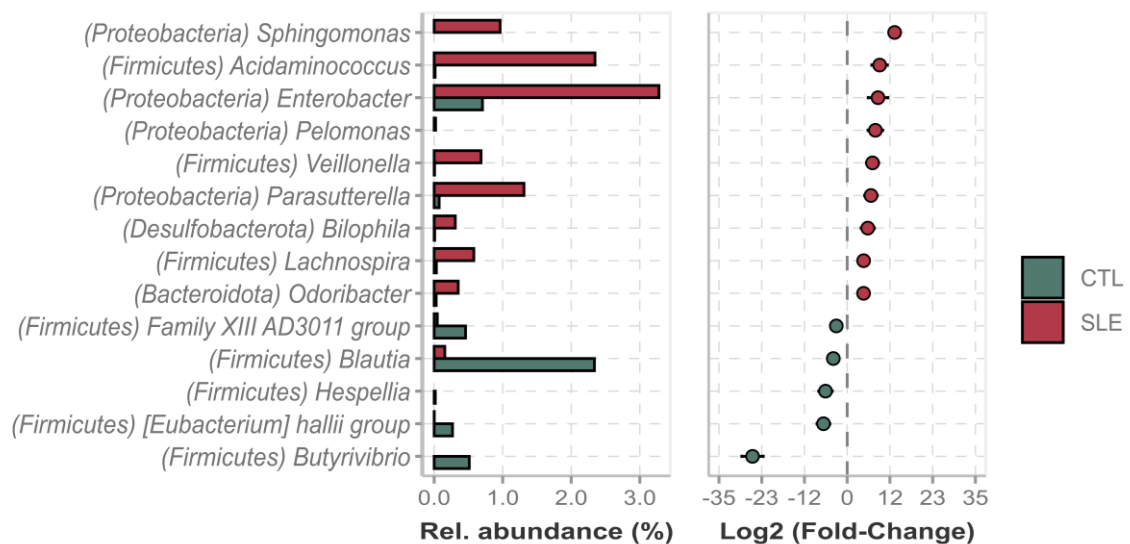
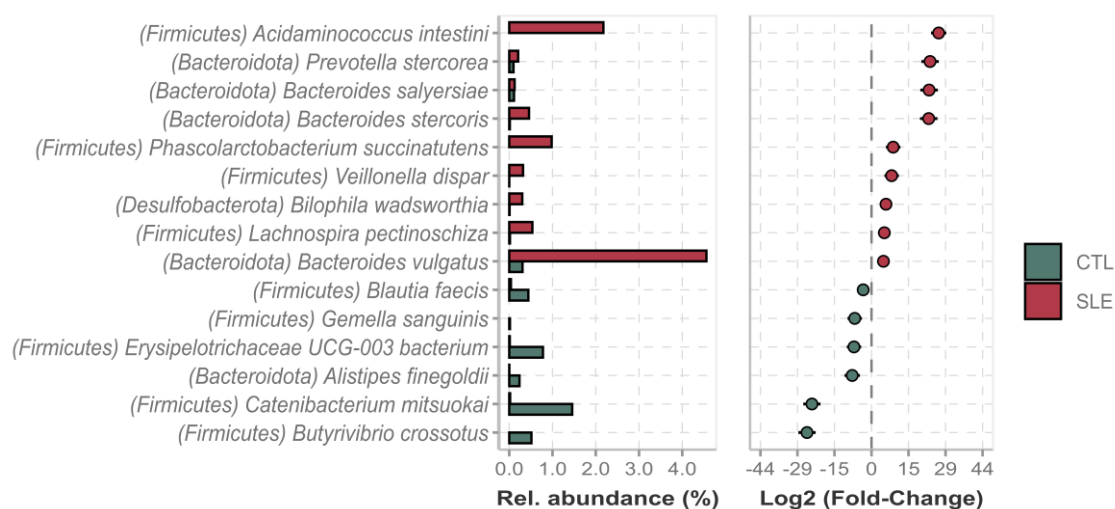


Figura 6: Abundância relativa diferencial de Espécies na microbiota intestinal de pacientes com LES.



Com relação à avaliação de alguns grupos bacterianos na MI por PCR em tempo real, observamos que as unidades relativas de expressão das espécies de *Prevotella* ($P=0,010$) e *Bacteroides* ($P=0,009$) estavam significativamente maiores em pacientes com LES (mediana Prev: 53,2; Bac: 1.473) em relação aos controles (mediana Prev: 0,335; Bac: 541) (**Figuras 7 e 8**).

Por outro lado, a abundância relativa das espécies de *Bifidobacterium* estava significativamente menor em pacientes com LES (mediana: 46,76; $P=0,012$) em comparação aos controles (mediana: 900,9) (**Figura 9**).

A abundância relativa das espécies de *Lactobacillus* e *Roseburia* estava similar em pacientes com LES (mediana Lac: 5.622; Ros: 787,5) e controles (mediana Lac: 9.182; Ros: 1.535). (**Figura 10 e 11**).

Figura 7: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero *Prevotella* nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).

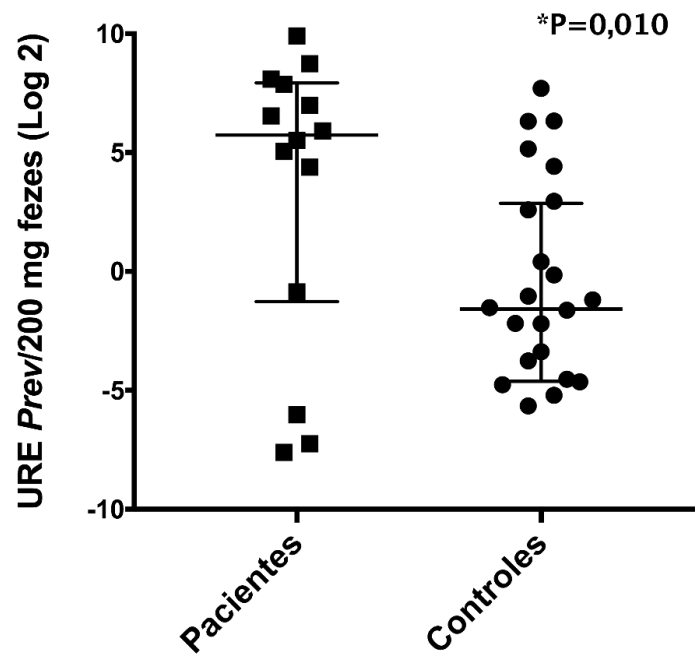


Figura 8: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero *Bacteroides* nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).

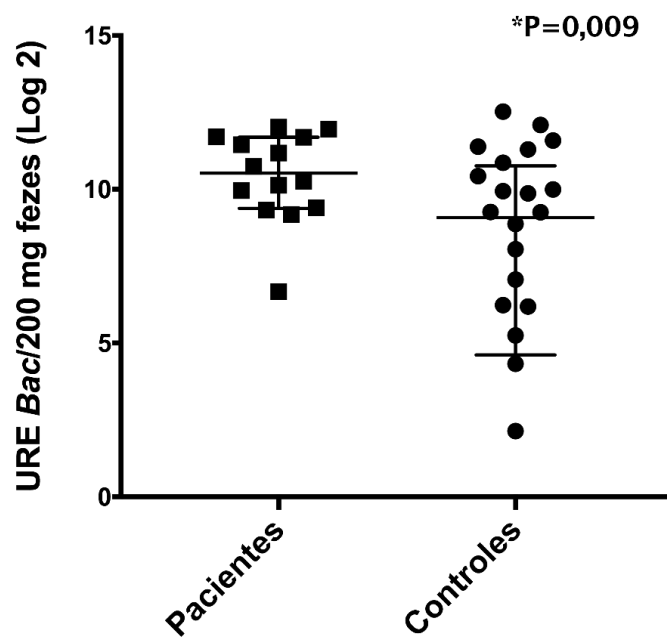


Figura 9: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero *Bifidobacterium* nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).

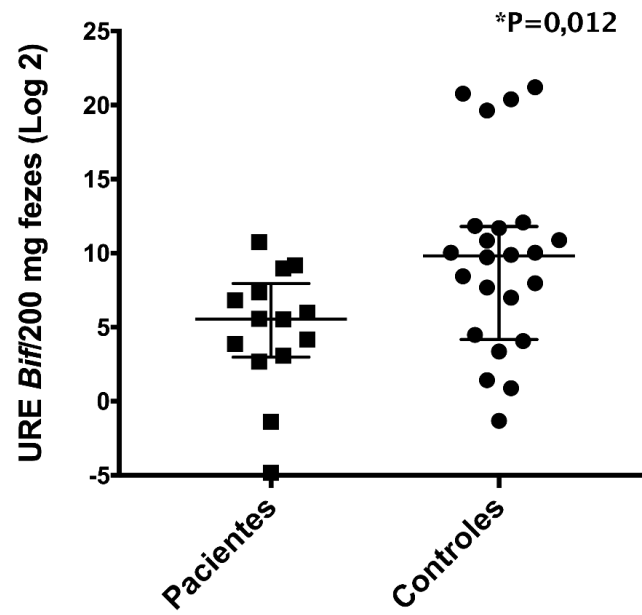


Figura 10: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero *Lactobacillus* nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).

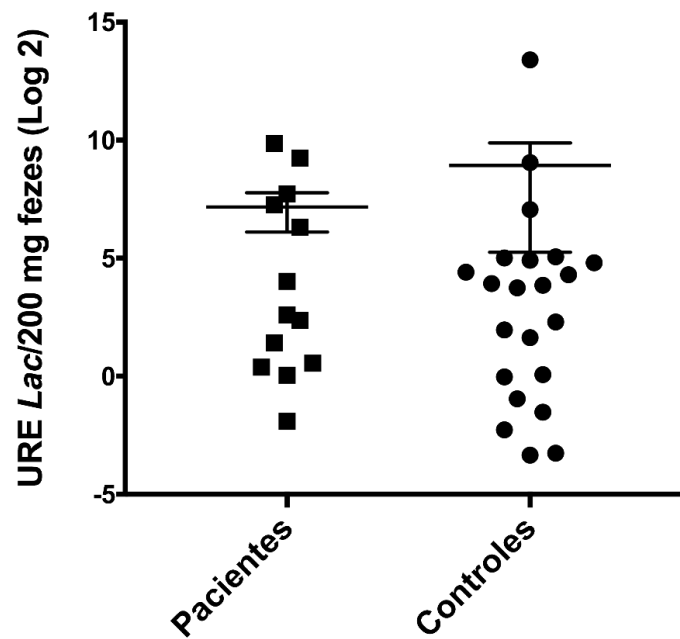
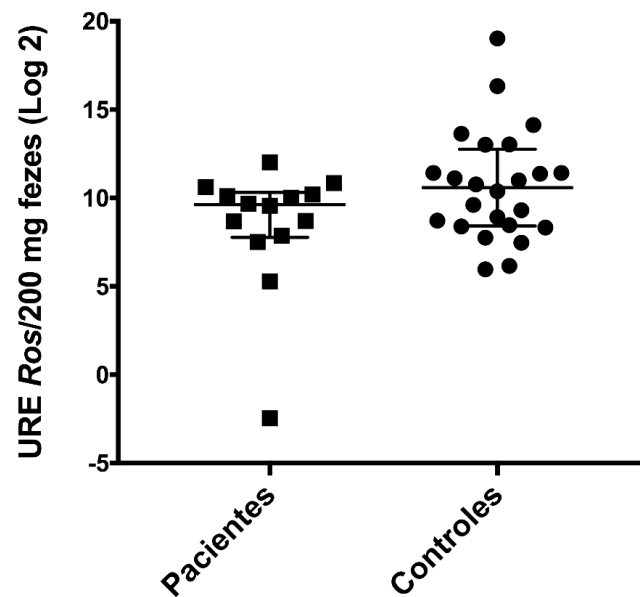


Figura 11: Unidades relativas de expressão (URE) por 200 mg de fezes do gênero *Roseburia* nas fezes de pacientes com LES (N=14) e controles (N=24).



V.6. Correlação da microbiota intestinal com os dados clínicos

Não foram observadas correlações entre a abundância relativa das espécies de *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Roseburia* com os valores do escore clínico SLEDAI e com o tempo de doença dos pacientes. Por outro lado, encontramos correlação inversa entre a abundância relativa de espécies do gênero *Prevotella* nas fezes dos pacientes com o SLEDAI ($r=-0,53$; $P=0,028$) e o SLEDAI-2K (Figuras 12 e

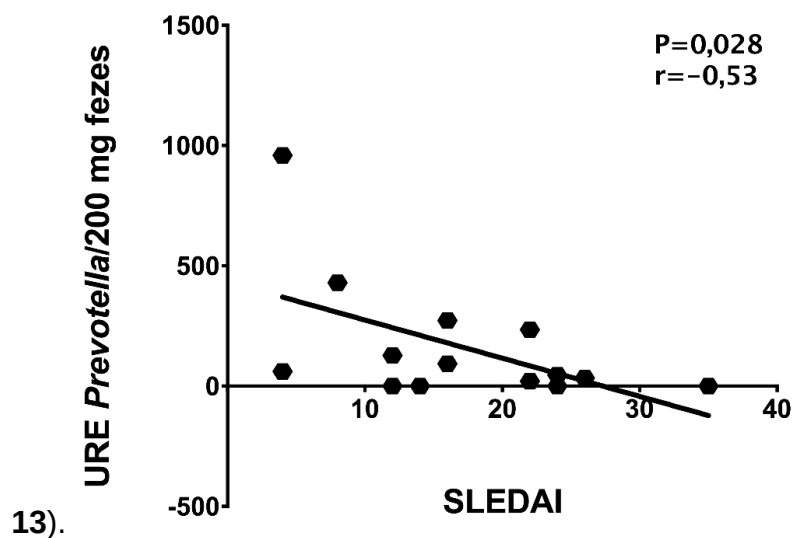


Figura 12: Correlação inversa entre o escore clínico SLEDAI calculado para pacientes com LES e as unidades relativas de expressão de espécies do gênero *Prevotella*/200 mg de fezes. Foi utilizado o teste de *Spearman* e considerado $P<0,05$.

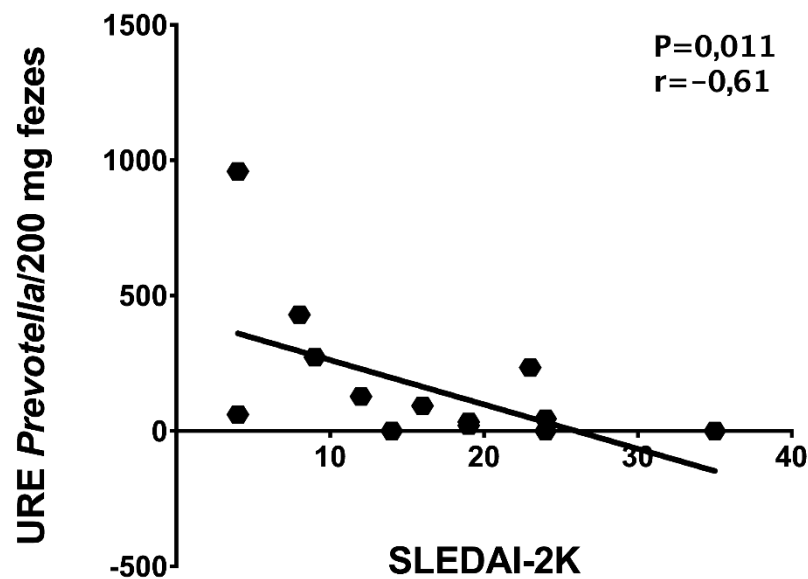


Figura 13: Correlação inversa entre o escore clínico SLEDAI-2K calculado para pacientes com LES e as unidades relativas de expressão de espécies do gênero *Prevotella*/200 mg de fezes. Foi utilizado o teste de *Spearman* e considerado $P < 0,05$.

V.7. Correlação da microbiota de pacientes e controles com os hábitos alimentares

Com relação às correlações dos hábitos alimentares com as comunidades microbianas presentes nas fezes dos pacientes com LES, observamos correlação positiva entre o consumo de carboidratos com a abundância relativa de espécies do gênero *Bifidobacterium* ($P=0,015$; $r=0,58$), e *Lactobacillus* ($P=0,028$; $r=0,52$) e correlação negativa *Bacteroides* ($P=0,013$; $r=-0,59$). Encontramos ainda, correlação inversa entre o consumo de enlatados e a abundância relativa de espécies do gênero *Prevotella* ($P=0,017$; $r=-0,57$). Além disso, foi observada correlação inversa entre o consumo de legumes/verduras e a abundância relativa de espécies do gênero *Bacteroides* ($P=0,023$; $r=-0,54$). Observamos também correlação inversa entre o consumo de probióticos com bactérias do gênero *Bacteroides* ($P=0,019$; $r=-0,56$).

Nos controles, observamos correlação positiva entre o consumo de gorduras saturadas/trans com a abundância relativa de espécies do gênero *Bifidobacterium* ($P=0,025$; $r=0,404$) e bactérias do gênero *Roseburia* ($P=0,044$; $r=0,355$). O leite e derivados correlacionou diretamente com a abundância relativa de espécies do gênero *Bacteroides* ($P=0,036$; $r=0,355$). Além disso, a abundância relativa de bactérias do gênero *Prevotella* correlacionou-se positivamente em relação a abundância de

bactérias do gênero *Bifidobacterium* ($P=0,002$; $r=0,558$), do gênero *Roseburia* ($P=0,0001$; $r=0,847$) e do subgênero *Clostridium leptum* ($P=0,0001$; $r=0,857$).

VI. DISCUSSÃO

A ideia de que a dieta pode alterar o processo saúde doença é antiga. Há mais de 2.000 anos, Hipócrates cunhou “Que o alimento seja seu remédio e que o remédio seja seu alimento”. A noção de que a dieta influencia a saúde humana de diferentes maneiras tem retornado ao centro dos debates científicos a partir de novas técnicas que permitiram identificar as possíveis vias pelas quais isso ocorre (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019). Evidências recentes indicam que o “elo perdido” entre a saúde e a dieta pode estar relacionado com modificações na microbiota intestinal. De fato, influências de nossas comunidades de microrganismos perpassam nossa própria essência (SILVERMAN; AZZOUZ; ALEKSEYENKO, 2019) e seu desequilíbrio, a disbiose, tem sido relacionada ao desenvolvimento de várias doenças autoimunes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; LIN; ZHANG, 2017; MARCHESI *et al.*, 2016).

A microbiota que vive na superfície gastrointestinal pode adotar um dos três estilos de vida diferentes. Podem ser organizadas como uma rede de células comunicantes levando a um comportamento comunitário, conhecido como o fenótipo do biofilme. Bem como, podem estar recentemente dispersas ao biofilme e migrar para o lúmen intestinal ou o até mesmo produzir invasões no hospedeiro, conhecido como biofilme disperso. Além disso, podem estar em um estilo de vida livre de fenótipo planctônico ou flutuante. Esses estilos de vida da microbiota estão associados a propriedades inerentes (motilidade, aderência e metabolismo) que podem influenciar uma resposta diferente do hospedeiro em relação a eles (MOTTA *et al.*, 2021).

Os biofilmes são um conjunto de células bacterianas agregadas e envoltas por uma matriz produzidas pelos próprios microrganismos e composta principalmente por polímeros. Em bactérias gram-negativas formadoras de biofilme, como *Escherichia coli* e espécies de *Salmonella*, a proteína amiloide Curli foi estudada em sua capacidade de apreender o material genético bacteriano, dificultar a ação de DNases, e, por consequência, estimular as respostas imunes a PAMPs. Achados recentes, sugerem que Curli pode complexar DNA de eucariotos e, de forma similar, dificultar o *clearance* dos DAMPs provenientes das células do hospedeiro (QIU; CARICCHIO; GALLUCCI, 2019).

Do ponto de vista ecológico, essa competição perpétua leva à estabilidade da comunidade geral, em parte devido à divisão dos nichos ecológicos disponíveis. Em um contexto mais amplo, as mais variadas espécies bacterianas interagem em configurações de biofilme e, dessa forma, têm um papel fundamental no sucesso da

comunidade, por exemplo alguns organismos dependem da atividade metabólica de outros organismos para crescerem e se manterem estáveis em determinados nichos (MOTTA *et al.*, 2021). As análises de composição da MI a partir de amostras fecais apesar de serem populares devido a baixa invasividade e simplicidade devem ser interpretadas com cautela já que esses métodos podem não incluir toda a complexidade ecológica manifestada ao longo do TGI. Possivelmente, outros métodos que possibilitem estabelecer com mais precisão onde, como e de que forma esses microrganismos estão interagindo com as células do hospedeiro e entre si deverão surgir nos próximos anos (MOTTA *et al.*, 2021). Apesar disso, a título de comparação entre grupos nos estudos de caso controle esse parece ser o material mais acessível e confiável disponível na atualidade.

Nesse trabalho, buscou-se preencher uma lacuna sobre o perfil da MI de pacientes com LES no Brasil, correlacionando com os hábitos alimentares. Nós detectamos disbiose intestinal e diferenças significativas na composição da MI de pacientes com LES, quando comparados aos controles saudáveis. No entanto, alguns estudos indicam que a MI de humanos e modelos animais apresentam alterações diferentes de acordo com o curso temporal da doença. Camundongos fêmeas livres de microbiota com genética para LES, MRL/Mp-Fas^{lpr}, desenvolvem a doença mesmo sem a presença de gatilhos da microbiota. Entretanto o tratamento com antibiótico vancomicina em camundongos convencionais com genética para LES antes do início da doença piorou a gravidade e prognóstico, sugerindo que a depleção da MI antes do início da doença pode agravar o LES. Ao contrário, o tratamento com antibiótico após o início da doença melhorou sintomas dos animais, incluindo a nefrite lúpica (MU *et al.*, 2020). Na verdade, o uso de antibióticos pode exacerbar crises de LES em humanos (LUO *et al.*, 2018). Esses achados sugerem que estudos de coortes com pacientes com LES são necessários para compreensão da dinâmica temporal da MI e seu real papel na melhora ou exacerbação dos sintomas (KOLODZIEJCZYK; ZHENG; ELINAV, 2019).

A nível de filo, nos pacientes LES encontramos aumentados Desulfobacterota que contém a família Desulfovibrionaceae, a espécie *Bilophila wadsworthia*. Aumentos na abundância e atividade de *Bilophila wadsworthia* na dieta rica em produtos de origem animal sustentam uma ligação entre gordura dietética, ácidos biliares e o crescimento de microrganismos capazes de desencadear doenças inflamatórias intestinais (DAVID *et al.*, 2014). Dietas muito ricas em gordura aumentam organismos resistentes à bile,

como *Bilophila* e *Bacteroides* (DAHL; RIVERO MENDOZA; LAMBERT, 2020). Como visto em nossos resultados, ambos os gêneros citados estavam aumentados nos pacientes, em análises de sequenciamento 16S e por PCR em tempo real, respectivamente.

Similarmente, encontramos nos controles os filos Firmicutes e Actinobacteriota aumentados. No primeiro filo, as espécies representantes *Acidaminococcus intesti*, gram negativa associada à dieta próinflamatória (ZHENG *et al.*, 2020), *Veillonella díspar*, gram negativa associada a infecções do trato urinário em mulheres com LES (ROTJANAPAN *et al.*, 2021), *Lachnospira pectinoschiza*, capaz de utilizar pectina como substrato, associado a dietas ricas em fibras e com capacidade antiinflamatória (SATOKARI *et al.*, 2014), *Blautia faecis*, gram positiva produtora de lactato e acetato a partir de carboidratos (PARK; KIM; BAE, 2013); *Erysipelotrichaceae bacterium*, produtora de butirato (LIU *et al.*, 2019); *Catenibacterium mitsuokai*, associada a dieta com alto teor de gordura e açúcar e disbiose (DUBÉ *et al.*, 2018); e *Butyrivibrio crossotus* capaz de degradar um dos principais componentes da parede celular de plantas, o xilano, através de suas xilanase/xilosidase (LI *et al.*, 2017). Já no segundo, estudos indicam que a abundância de Actinobacteriota na MI mostrou uma tendência decrescente com a idade, entretanto o gênero mais comentado é *Bifidobacterium* por apresentar espécies probióticas (LI *et al.*, 2021). De fato, esse gênero estava diminuído nos pacientes estudados.

Esses resultados são promissores, pois apontam quais são os táxons responsáveis pelas diferenças entre as MI. Entretanto, isoladamente, cada alteração encontrada nas abundâncias relativas entre controles de pacientes não se classifica, necessariamente, em diferenças benéficas ou deletérias para o metabolismo do hospedeiro. Essa dependência do contexto ajuda a explicar por que algumas bactérias podem ser benéficas em uma doença, mas deletérias em outra, o que é semelhante a exemplos bem conhecidos para fatores do hospedeiro, por exemplo, IFN-I atenuando esclerose múltipla mas promovendo o LES (RUFF; GREILING; KRIEGEL, 2020).

Ressaltamos que filo Bacteroidetes é o segundo mais populoso no intestino humano, atrás do filo Firmicute. Bacteroidetes tem como representantes os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*. Foi descrita uma associação entre o gênero *Bacteroides* e a regulação da homeostase do sistema imune, através da indução de células Tregs por citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (ROUND; MAZMANIAN, 2010), embora esse gênero também tenha sido associado ao maior risco de desenvolvimento de alergias

ao colonizar o TGI de neonatos (RUOHTULA *et al.*, 2019) e, frequentemente relacionado a abscessos intra-abdominais (COELHO; BARRETA; OKAWA, 2007). O leite e derivados correlacionou diretamente com a abundância relativa de espécies do gênero *Bacteroides*, nos controles.

Outro estudou com 83 pacientes com LES em uso ou não de medicamentos e 16 controles, utilizando sequenciamento de nova geração 16SrRNA, detectou uma diminuição da diversidade de espécies no grupo de LES, diminuição de Firmicutes, e foi notado um aumento significativo na espécie do gênero *Prevotella* no LES em concordância com nossos achados (SILVERMAN; AZZOUZ; ALEKSEYENKO, 2019).

Estudo realizado em modelos murinos suscetíveis ao LES– MRL/lpr e B6/lpr– mostraram uma grande diminuição nas espécies da família Lactobacillaceae e aumento de Lachnospiraceae na microbiota intestinal (ZHANG *et al.*, 2014). O LES acomete mais indivíduos do sexo feminino do que do sexo masculino (TSOKOS, 2011), devido a isso o mesmo estudo avaliou a relação da microbiota nos modelos MRP/lpr machos e fêmeas. Apesar de ambos desenvolverem lúpus espontaneamente, as fêmeas exibiram uma forma acelerada da doença. Foram comparadas as microbiotas de fêmeas de cinco e catorze semanas com os MRL controles, e as MRL/lpr das duas idades obtiveram resultados semelhantes, redução de espécies da família Lactobacillaceae e aumento de Lachnospiraceae. No entanto, as diferenças na MI entre MRL e MRL/lpr machos não foi significativa (ZHANG *et al.*, 2014).

A MI dos camundongos propensos ao LES demonstrou-se relacionado ao sexo, com uma diversidade maior nas fêmeas. A família Lachnospiraceae é bem mais abundante nas fêmeas, sugerindo correlação com sintomas mais severos. Em algumas situações, Lachnospiraceae é fortemente correlacionada com a linfadenopatia e glomerulonefrite lúpica. Enquanto que em outras espécies de Lachnospiraceae, há correlação negativa com esses parâmetros, pois possuem função anti-inflamatória, já que induzem os linfócitos Treg, sendo, portanto, uma espécie reduzida no LES, porém no presente estudo não foram notadas diferenças nos dois grupos investigados, trazendo a hipótese de que tal fato se deve ao uso dos anti-inflamatórios e/ou imunossupressores utilizados no tratamento do LES (GEUKING *et al.*, 2011).

Guo e colaboradores (2020) demonstram, através do sequenciamento metagenômico, que o uso de glicocorticoides em uma coorte de 17 mulheres com LES sem tratamento, 20 mulheres com LES em uso de glicocorticoides e 20 controles

saudáveis alterou o perfil da MI do grupo LES + glicocorticoides em relação ao LES sem tratamento. Ademais, o grupo controle apresentou perfil da MI mais parecido com grupo recebendo glicocorticoides (GUO *et al.*, 2020). A nossa amostra foi composta por pacientes do sexo feminino, em sua maioria recebendo tratamento medicamentoso, mas apenas duas pacientes estavam em tratamento com glicocorticoides (14%). Outro estudo de meta análise que continha 373 pacientes com LES concluiu que pacientes com LES podem ter sua MI alterada pelos medicamentos utilizados para o tratamento (XIANG *et al.*, 2022).

Diferenças na composição da MI de fêmeas e machos nos camundongos modelos de LES (BWF1) já foram descritas. Neste caso, fêmeas apresentam a doença já jovens, enquanto os machos ou são protegidos ou apresentam a patologia mais velhos. É notado que essa diferença é mediada por hormônios, já que camundongos castrados desenvolvem a doença mais cedo, similarmente as fêmeas. Fato importante se deu, quando as fêmeas foram receptoras do transplante de microbiota oral de doadores machos, resultando em um aumento significativo na sobrevida, diminuindo os sintomas renais e reduzindo a produção de anti-DNA (NEUMAN; KOREN, 2017). Os estudos supracitados, apesar de serem em modelos animais, demonstram que as alterações da MI em fêmeas é mais exacerbada do que em machos, e que essas diferenças são mediadas por hormônios. Nossa amostra foi apenas de mulheres, o que leva a discutir se essas diferenças encontradas em nossos resultados poderiam ser menores caso nossos participantes fossem de ambos os sexos.

Em revisão de Pezzole e Oselame (2014), demonstraram os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do LES, apesar de ainda ser uma doença sem causa conhecida. Os principais fatores de risco descritos foram: vacinas/medicamentos, gestação, falta de vitamina D, predisposição genética, desregulação de células T, autoanticorpos, alterações hormonais (principalmente prolactina e estrógeno), radiação UVB e tabagismo (PEZZOLE; OSELAME, 2014).

Os hábitos alimentares podem representar tanto risco de doença quanto fator de proteção, com base nas propriedades de alimentos específicos. Escolhas alimentares específicas podem, de fato, mostrar efeitos pró-inflamatórios como carne vermelha, sal, ingestão calórica excessiva ou, ao contrário, reduzir a inflamação como óleos vegetais, peixes gordos, frutas e outros (GIOIA *et al.*, 2020)

O microbioma intestinal humano pode alternar rapidamente entre perfis funcionais de vegetarianos e onívoros, podendo refletir pressões seletivas passadas durante a

evolução humana. O consumo de alimentos de origem animal por nossos ancestrais provavelmente era ocasional, dependendo da estação e do sucesso estocástico da caça. Diferentemente de alimentos vegetais prontamente disponíveis oferecendo uma fonte alternativa de calorias e nutrientes. Comunidades microbianas que pudessem rapidamente e apropriadamente mudar seu repertório funcional em resposta à mudança na dieta teriam, por consequência, aumentado a flexibilidade da dieta humana (DAVID *et al.*, 2014). Além disso, os fitoquímicos em alimentos à base de plantas têm efeitos específicos e possivelmente prebióticos no microbioma (DAHL; RIVERO MENDOZA; LAMBERT, 2020).

Um estudo chinês realizou o sequenciamento genômico da MI de 40 pacientes com LES e comparou os resultados com 22 controles saudáveis. Em concordância com o presente trabalho, foi encontrada uma diminuição do gênero *Bifidobacterium* no grupo de pacientes com LES com maior atividade. Foi encontrada uma diminuição do gênero *Roseburia*, entretanto o presente trabalho não encontrou tal associação (LI *et al.*, 2019).

Um estudo randomizado controlado por *crossover* com duração de 17 semanas demonstrou que a inclusão de alimentos integrais ricos em fibras, como a cevada e o arroz integral, resultou em modificações na MI. Os participantes, adultos saudáveis, que receberam 18,7g a mais de fibras dietéticas através do consumo de 60g de cevada integral apresentaram um aumento significativo dos gêneros *Roseburia* e *Bifidobacterium*. Em seguida, foi observado que o grupo que recebeu 11,5g de fibras alimentares através de uma mistura de cevada e arroz integral (30g de cada cereal) resultou em menores níveis de IL-6 plasmático e, quantitativamente, os indivíduos com sobrepeso ou obesidade obtiveram redução ainda mais acentuada (MARTÍNEZ *et al.*, 2013). A IL-6 e LPS séricos foram associados com translocação bacteriana e *leaky gut* em indivíduos com síndrome do intestino irritável e doença celíaca (HILLS *et al.*, 2019).

Apesar de não termos encontrado mudança significativa entre a abundância do gênero *Roseburia*, em nossos resultados foi observado um baixo consumo de massa seguido de menor abundância relativa de *Bifidobacterium* entre os pacientes portadores de LES. Um estudo experimental realizado em modelos de colite induzida por sulfato de sódio dextrano relatou que a espécie *Bifidobacterium breve* pode desencadear a polarização de T reg e redução de Th17, atuando como probiótico tolerogênico (ZHENG *et al.*, 2014). Especificamente, quanto maior a abundância de

Bifidobacterium menor o risco previsto associado ao LES, *odds ratio*: 0,565, intervalo de confiança de 95%: 0,426-0,748 (XU *et al.*, 2021). Todavia, *Bifidobacterium* é conhecido por estar aumentado na fase ativa da doença inflamatória intestinal (WANG *et al.*, 2014).

Estudos com análises metagenômicas fecais de 117 pacientes com LES não tratado e 52 pacientes com LES pós-tratamento foram alinhados com 115 controles saudáveis pareados e analisados pelo perfil do genoma completo. Para comparação, avaliamos o metagenoma fecal de camundongos MRL/lpr. A MI de indivíduos com LES apresentou diferenças significativas na composição e função em comparação com controles saudáveis. Certas espécies, incluindo a espécie *Clostridium* ATCC BAA-442, bem como *Atopobium rimae*, *Shuttleworthia satellites*, *Actinomyces massiliensis*, *Bacteroides fragilis* e *Clostridium leptum*, apresentaram-se enriquecidas na MI dos portadores de LES e reduzidas após o tratamento. Houve aumento das vias de biossíntese de LPS, simultaneamente com a redução nos níveis de biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), demonstrado por análises metabolômicas das amostras fecais (CHEN *et al.*, 2021).

Mulheres chinesas (n= 45) portadoras de LES por no mínimo um ano, sem receber tratamento por um mês e sem comorbidades e 48 mulheres saudáveis foram recrutadas para um estudo sobre a MI e correlação com LES. O gênero *Prevotella*, pertencente ao filo Bacteroidetes, estava significativamente aumentado no grupo LES comparado com controles saudáveis, similarmente ao observado em nossos resultados. A expansão da espécie *Prevotella copri* foi relacionada com artrite reumatoide no sequenciamento da MI de 114 pacientes com AR e controles, sugerindo um papel dessa bactéria na sua patogênese (BERNARD, 2013; MAEDA *et al.*, 2016; SCHER *et al.*, 2013).

Similarmente, há um trabalho sobre MI de 45 pacientes com LES, com diagnóstico há pelo menos um ano e que não estavam em uso de medicação por no mínimo um mês e não possuíam outras comorbidades. O sequenciamento 16SrRNA foi utilizado na pesquisa comparativa a 48 controles femininos equiparados em idade e estilo de vida. Esses apresentaram redução de Firmicutes e aumento de Bacteroidetes, em relação aos controles. Demonstrou-se também aumento de espécies do gênero *Prevotella* nos pacientes com LES, coincidindo com os resultados de Hevia *et al.* (2014) e com o presente estudo (HE *et al.*, 2016).

Uma revisão intercontinental com metanálise (>6.500 análises metagenômicas) identificou que a espécie *Prevotella copri* é composta, na verdade, por quatro clados distintos geneticamente. *P. copri* foi associada, inicialmente, com doenças inflamatórias, resistência à insulina e intolerância à glicose, porém, outros estudos a correlacionam com melhora na sensibilidade à insulina e tolerância à glicose em dietas ricas em fibras. De fato, essa espécie está presente principalmente em populações não ocidentalizadas, com dieta caracterizada por alta ingestão de alimentos de origem vegetal. Esses achados indicam que o efeito benéfico da *P. copri* pode ser dependente da dieta (TETT *et al.*, 2019). Nós encontramos correlação inversa entre a abundância relativa de espécies do gênero *Prevotella* nas fezes dos pacientes com o SLEDAI-2K, sugerindo que esse gênero pode ter um papel protetor na exacerbação dos sintomas do LES.

Nos controles, a abundância relativa de bactérias do gênero *Prevotella* correlacionou-se positivamente em relação a abundância de bactérias do gênero *Bifidobacterium*, do gênero *Roseburia* ambas produtoras de AGCC e do subgênero *Clostridium leptum* associado a capacidade tolerogênica em doenças alérgicas como a asma (HUANG *et al.*, 2022) Como se pode notar, certos metabólitos produzidos pela microbiota, especificamente o butirato produzido por espécies de *Clostridium*, promoveria diferenciação de linfócitos Treg, suprimindo a resposta inflamatória (MIYAKE *et al.*, 2015).

Em trabalhos com modelos animais para LES, foram encontrados aumento relativo de membros da família Lachnospiraceae e diminuição do gênero *Lactobacillus*, com associação de sintomas precoces e mais graves (ZHANG *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* com diversas espécies de *Lactobacillus* mostram que algumas espécies podem produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e outras são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-12 e IL-8 (GRIMOUD *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2014). Outro ensaio em que foram estudadas cepas de *Lactobacillus* (*L. Rhamnosus*, *L. Helveticus*, *L. Casei*) demonstrou que houve aumento significativo na concentração de IL-8, uma das principais citocinas envolvidas na resposta imune inata (ROCHA-RAMÍREZ *et al.*, 2017).

Amostras de fezes e plasma de pacientes italianos com LES (n = 27) e controles saudáveis geograficamente pareados (n = 27) resultou que os controles saudáveis apresentaram a tendência de se separar distantes dos grupos de pacientes em testes de PCoA e utilizando o sequenciamento por 16S (BELLOCCHI *et al.*, 2019). Num outro

trabalho com técnica similar a este verificou-se em pacientes com LES (n = 35), vivendo no norte da Holanda, e 965 controles saudáveis que composição da microbiota fecal de pacientes LES diferiu significativamente dos controles saudáveis. Pacientes LES foram caracterizados por menor riqueza bacteriana, menor razão Firmicutes/Bacteroidetes e maior abundância relativa de espécies de Bacteroides em amostras fecais em comparação com controles saudáveis (VAN DER MEULEN *et al.*, 2019).

Em trabalhos com modelos animais para LES, foram encontrados aumento relativo de membros da família Lachnospiraceae e diminuição do gênero *Lactobacillus*, com associação de sintomas precoces e mais graves (ZHANG *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* com diversas espécies de *Lactobacillus* mostram que algumas espécies podem produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e outras são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-12 e IL-8 (GRIMOUD *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2014). Outro ensaio em que foram estudadas cepas de *Lactobacillus* (*L. Rhamnosus*, *L. Helveticus*, *L. Casei*) demonstrou que houve aumento significativo na concentração de IL-8, uma das principais citocinas envolvidas na resposta imune inata (ROCHA-RAMÍREZ *et al.*, 2017).

O papel do *Lactobacillus spp.* é controverso no LES, já que uma expansão dessa espécie pode causar translocação para órgãos extra intestinais, observado principalmente no fígado. Apesar disso, algumas espécies desse grupo de bactérias são consideradas probióticas, sendo frequentemente vendidas como benéficas para a saúde (CHIARO; ROUND, 2019). Exemplificando, o tratamento com *Lactobacillus reuteri* agravou os sintomas de LES em estudos com animais, enquanto que a administração de *Lactobacillus johnsonii* não apresentou diferenças significativas quando comparada com grupo controle (ZEGARRA-RUIZ *et al.*, 2019). Em animais, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, encontrados alterados por causa do tratamento com antibióticos foram associados ao aumento da gravidade de LES (ZHANG *et al.*, 2020). Estudos apontam que, em humanos, o tratamento com antibiótico parece exacerbar crises de LES (LUO *et al.*, 2018). Em nossos resultados, não encontramos diferenças significativas entre a abundância de *Lactobacillus* entre o grupo LES e controle. Possivelmente, a integridade de barreira intestinal pode ser a chave para explicar essa aparente contradição (RUFF; GREILING; KRIEGEL, 2020).

Nesse estudo, não conseguimos correlacionar o uso de tabaco e álcool com os sintomas e desenvolvimento da doença, pois apenas 28,6% das mulheres com LES

faz uso de álcool (esporádico), contra uso também esporádico de 53,3% dos controles; e 21,4% é tabagista, taxa semelhante aos controles, com 20%. Taxas de alto IMC relativamente semelhantes foram encontradas nos dois grupos: 42,85% dos pacientes com LES são sobrepesos contra 36,67% dos controles, e 21,42% das pacientes são obesas contra 23,32% dos controles. Portanto, não é factível relacionar nesse estudo IMC, dieta e estilo de vida com o desenvolvimento da doença.

Entretanto, pessoas portadoras de LES têm maior risco de eventos cardiovasculares, sendo a hipertensão arterial um dos principais fatores que influenciam o maior risco de tais eventos nessa população. Os mecanismos exatos pelos quais o LES e a hipertensão se relacionam não estão totalmente descritos, mas, alguns estudos com fêmeas de camundongos NZB/WF1 demonstraram que a patogênese da hipertensão no LES é influenciada por citocinas inflamatórias como TNF- α e o estresse oxidativo. De fato, terapias com o uso de glicocorticoides e azatioprina foram associadas com aumento na frequência de eventos cardiovasculares em pacientes com LES. Portanto, é de extrema urgência que novas estratégias terapêuticas sejam estudadas, de forma a permitir um tratamento eficaz, porém sem comprometer outros sistemas e órgãos (DE LA VISITACIÓN *et al.*, 2019). Nos pacientes brasileiros com LES, propriamente dito foi citado como a principal causa subjacente de morte, seguida por doenças do sistema circulatório, infecciosas e parasitárias (COSTI *et al.*, 2017), enquanto que na europa, doenças cardiovasculares foram a causa de morte mais frequente em estudos com tempo de seguimento superior a 15 anos (REPPE MOE *et al.*, 2021).

Os alimentos de origem animal como carne bovina, aves, peixe e ovos são fonte de proteínas e gorduras, principalmente as gorduras saturadas e colesterol. Análises metabolômicas identificaram que os níveis séricos de colina, N-óxido de trimetilamina (TMAO) foram preditores do risco para doenças cardiovasculares. Esses metabólitos são provenientes do fosfatidilcolina dietético e são produzidos pela MI. Dietas ricas em proteína animal e gordura, ou seja, com alto consumo de carne bovina, ovos e linguiça foram capazes de aumentar o nível de TMAO e aumentar o risco cardiovascular (HILLS *et al.*, 2019). Nosso grupo de pacientes com LES apresentou o hábito de alta ingestão de produtos de origem animal, principalmente de carne bovina.

O gênero *Roseburia* é composto de bactérias gram positivas anaeróbias produtoras de butirato, um tipo de AGCC. Sob esse gênero, encontram-se cinco espécies: *Roseburia intestinalis*, *R. hominis*, *R. inulinivorans*, *R. faecis* and *R. cecicola*

(TAMANAI-SHACOORI *et al.*, 2017). O butirato é a principal fonte de energia para os colonócitos, com propriedade de inibir a expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias na mucosa através da inibição da via NF- κ B, além de ter efeito na motilidade colônica, estimulando-a em baixas concentrações (KUMARI; AHUJA; PAUL, 2013). Na literatura, foi descrita uma associação entre diminuição do gênero *Roseburia* e doença inflamatória intestinal, incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn, principalmente pela diminuição da produção de butirato (KUMARI; AHUJA; PAUL, 2013; MACHIELS *et al.*, 2015). Entretanto, não encontramos diferenças significativas entre a abundância deste gênero em pacientes LES quando comparados com controles.

Em uma revisão sistemática com meta análise publicada no corrente ano, pesquisadores investigaram a associação entre LES e perturbação da MI. Após remoção de duplicatas e artigos inconsistentes, foram incluídos 11 estudos do tipo caso-controle. Somados, 373 pacientes com LES e 1288 controles saudáveis localizados em nove cidades de cinco países (China, Espanha, Estados Unidos da América, Holanda e Itália) foram recrutados para análise metagenômica nas amostras fecais através do sequenciamento da porção 16S rRNA ou sequenciamento do tipo *Shotgun*. Segundo levantamento de dados, 265 pacientes não estavam sendo submetidos a tratamento medicamentoso, o restante, 108 utilizavam medicamentos diversos como prednisona, azatioprina e imunobiológico (XIANG *et al.*, 2022).

Constatou-se que pacientes com LES apresentaram menor diversidade de microbiota. Com efeito, o índice de diversidade alfa (uniformidade) foi ligeiramente menor em pacientes com LES ativo do que naqueles em remissão, ao passo que em nossos resultados não encontramos diferenças significativas na diversidade alfa. Em segundo lugar, a análise dos diferentes táxons indicou que pacientes com LES apresentaram uma abundância diminuída de Ruminococcaceae, aumento da abundância de Enterobacteriaceae e Enterococcaceae, e nenhuma alteração significativa em Lachnospiraceae e *Bacteroides*. Terceiro, as alterações em Ruminococcaceae e Enterococcaceae em pacientes com LES foram maiores em pacientes chineses com LES, esse achado pode indicar que a etnia tem impacto tanto no perfil da MI quanto nas alterações provocadas nela pelo LES. Em concordância aos nossos resultados, encontramos a família Ruminococcaceae em menor abundância comparado com controle, contudo encontramos *Bacteroides* aumentados no grupo LES (XIANG *et al.*, 2022).

Em um estudo realizado em pacientes com diabetes melittus tipo 2, Yamaguchi e colaboradores (2016) relataram uma correlação entre o consumo elevado de carboidratos, gordura e proteína com contagens aumentadas de clusters de *Clostridium IV e XI*, *Bifidobacterium spp.*, ordem *Lactobacillales*, *Bacteroides spp.* estavam inversamente correlacionados com o consumo de carboidratos, proteínas e glicemia de jejum, respectivamente (YAMAGUCHI *et al.*, 2016).

Já em nosso estudo, nos pacientes com LES houve correlação entre o consumo de carboidratos e a abundância relativa de espécies do gênero *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Lactobacillus*, indo de encontro aos resultados de Yamaguchi *et al.* (2016). Houve correlação inversa entre o consumo de legumes/verduras e a abundância relativa de espécies do gênero *Bacteroides*, sem enriquecimento de *Prevotella*, similar ao encontrado em outro estudo (WU *et al.*, 2011). O leite e derivados correlacionou diretamente com a abundância relativa de espécies do gênero *Bacteroides*, nos controles.

Parece haver uma relação causal entre o gênero *Bifidobacterium* e diabetes tipo 1 e doença celíaca, ao contrário do que relatado com o LES (XU *et al.*, 2021). Dessa forma, podemos afirmar que mesmo já fornecendo novos entendimentos sobre a relação entre a MI e doenças autoimunes, essas descobertas sejam específicas para cada doença.

Estudos relacionando SLEDAI e SLEDAI-2K e a MI são escassos na literatura científica (AZZOUZ *et al.*, 2019; GERGES *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2019; LUO *et al.*, 2018). Azzouz e colaboradores (2019) encontraram uma correlação inversa entre a diversidade alfa (Chao1) com o SLEDAI (Mann-Whitney, $p=0.08$), sendo que em pacientes com SLEDAI ≥ 8 foi encontrada uma correlação ainda mais forte ($p=0.003$) (AZZOUZ *et al.*, 2019). Pacientes com SLEDAI ≥ 8 apresetaram menos diversidade beta (Shannon index, $p=0,021$) e maior representação do filo Proteobacteria, que é composto principalmente por bactérias gram negativas ($p=0,019$) (LUO *et al.*, 2018). Outro estudo encontrou uma correlação positiva entre SLEDAI e a abundância de *Streptococcus*, um gênero de bactérias gram positivas do filo Firmicutes, e SLEDAI ($r = 0.492$) (LI *et al.*, 2019). No mais recente estudo, uma correlação inversa entre SLEDAI-2K e a razão F/B foi encontrada quando comparado com controles saudáveis ($r=-0.451$) (GERGES *et al.*, 2021).

A dieta tem se mostrado importante no surgimento dos sintomas no LES, com moléculas como vitaminas A, D e E, fitoesteróis e ácidos graxo poliinsaturados,

levando à redução da proteinúria e glomerulonefrite. Há evidências adicionais que ácidos graxos poliinsaturados podem reduzir as manifestações no LES, propondo que a microbiota possa estar envolvida na sustentação dos níveis de autoanticorpos (STRICKLAND *et al.*, 2013). Portanto, o controle da dieta seria de suma importância para alívio dos sintomas no LES (STRICKLAND *et al.*, 2013).

Uma revisão bibliográfica sobre hábitos alimentares e artrite reumatoide concluiu que dieta mediterrânea juntamente com um elevado consumo de peixes “gordurosos” (sardinha, salmão, robalo e truta) são umas das intervenções dietéticas mais benéficas para essa população. Os cientistas propõem, então, que esse padrão alimentar deveria ser incentivado, por certo pelas suas conhecidas propriedades anti-inflamatórias devido às altas concentrações de ômega 3 (GIOIA *et al.*, 2020).

Dessa forma, uma dieta rica em fontes naturais de ômega-3, assim como uma alimentação saudável para a homeostase do organismo e os processos enzimáticos pelos quais esses ácidos graxos passam uma vez dentro do corpo, tem grande potencial no tratamento adjuvante do LES. A patogênese da colite ulcerativa e da artrite reumatoide foi revisitada à luz da abordagem da disbiose da MI e como resultado esses ácidos graxos são capazes de prevenir e controlar essas duas condições patológicas que são responsáveis por grande carga crônica global, incapacidade funcional e comorbidades com risco de vida se não forem tratados adequadamente (ZORGETTO-PINHEIRO *et al.*, 2022). A título de reflexão, como estamos vivendo uma crise pandêmica devido à infecção por SARS-CoV-2, destacamos o potencial dos ômega-3 na prevenção de um mau prognóstico, uma vez que contribuem para equilibrar a modulação do sistema imunológico no processo inflamatório. A escassa literatura sobre dieta e risco de LES concentra-se em possíveis abordagens dietéticas para melhorar atividade da doença do LES, ou para prevenir ou tratar comorbidades, como doenças cardiovasculares; poucos estudos concentraram-se em fatores de risco dietéticos para incidentes LES (TEDESCHI *et al.*, 2020).

Recentemente, verificou-se que a administração por via oral de DNA bacteriano proveniente de cepa de *Escherichia coli* livre de LPS induziu um aumento de células B reguladoras no baço e linfonodos mesentéricos, as quais são produtoras de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (MU *et al.*, 2020). Na realidade, a administração por via oral parece ser uma boa forma de indução de tolerância imunológica, isso pode indicar que gatilhos bacterianos apresentados por via oral podem diminuir a autoimunidade (SRICHARUNRAT; PUMIRAT; LEAUNGWUTIWONG, 2018). Algumas cepas

probióticas parecem regular a resposta imunológica através da indução de mecanismos de tolerância (ESMAEILI *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que há evidências que o sucesso de estratégias com objetivo de modulação da MI, por exemplo intervenção dietética ou tratamento com probióticos, parece estar associado com o perfil da MI prévio (HILLS *et al.*, 2019; KOLODZIEJCZYK; ZHENG; ELINAV, 2019). Entretanto, medidas profiláticas para o controle da disbiose intestinal e diminuição dos efeitos adversos dos medicamentos, diminuição de comorbidades e melhora do estilo de vida podem ter um impacto positivo na sobrevida de pacientes com LES (MONTROYA *et al.*, 2021). Para tanto, é proposto que o controle da dieta seria de suma importância para alívio dos sintomas no LES (STRICKLAND *et al.*, 2013). Então, o tratamento dietoterápico com vistas ao equilíbrio da MI pode ser importante para cuidado pacientes com LES (CHEN *et al.*, 2021; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

VII. CONCLUSÕES

Podemos concluir que os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico avaliados neste estudo apresentam disbiose intestinal, com alterações importantes em filos, famílias, gêneros e espécies, mesmo fazendo uso de imunomoduladores. Além disso, sugerimos que os hábitos alimentares e estilo de vida exercem papel importante na modulação da MI em pacientes e controles.

Estudos adicionais, em outras regiões do Brasil e com coortes amplas são necessários. Além disso, são necessários estudos clínicos avaliando os benefícios de intervenções dietéticas personalizadas e probióticos para restauração da homeostase e saúde intestinal em pacientes com LES.

REFERÊNCIAS

- AAS-HANSSEN, K. et al. Systemic Lupus Erythematosus: Molecular Mimicry between Anti-dsDNA CDR3 Idiotype, Microbial and Self Peptides-As Antigens for Th Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 382, 2015.
- ABDOLLAHI-ROODSAZ, S.; ABRAMSON, S. B.; SCHER, J. U. The metabolic role of the gut microbiota in health and rheumatic disease: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 8, p. 446–455, ago. 2016.
- ARINGER, M.; JOHNSON, S. R. Classifying and diagnosing systemic lupus erythematosus in the 21st century. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 59, n. Suppl5, p. v4–v11, 5 dez. 2020.
- AZZOUZ, D. et al. Lupus nephritis is linked to disease-activity associated expansions and immunity to a gut commensal. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 78, n. 7, p. 947–956, 1 jul. 2019.
- BELLOCCHI, C. et al. Identification of a Shared Microbiomic and Metabolomic Profile in Systemic Autoimmune Diseases. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 9, p. E1291, 23 ago. 2019.
- BERNARD, N. J. Prevotella copri associated with new-onset untreated RA. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 1, p. 2, 2013.
- BROWN, E. M.; KENNY, D. J.; XAVIER, R. J. Gut Microbiota Regulation of T Cells During Inflammation and Autoimmunity. **Annual Review of Immunology**, v. 37, p. 599–624, 26 2019.
- CHEN, B. et al. An Autoimmunogenic and Proinflammatory Profile Defined by the Gut Microbiota of Patients With Untreated Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatology**, v. 73, n. 2, p. 232–243, fev. 2021.
- CHIARO, T. R.; ROUND, J. L. Fiber Puts Lactobacillus to SLEep. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 1, p. 3–5, 9 jan. 2019.
- COELHO, J. C. U.; BARRETA, G. A. P.; OKAWA, L. Seleção e uso de antibióticos em infecções intra-abdominais. **Arq Gastroenterol**, v. 44, n. 1, p. 85–91, 2007.
- COSTI, L. R. et al. Mortality from systemic erythematosus lupus in Brazil: evaluation of causes according to the government health database. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 57, n. 6, p. 574–582, nov. 2017.
- DA SILVA, S. T.; DOS SANTOS, C. A.; BRESSAN, J. Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics. **Nutricion Hospitalaria**, v. 28, n. 4, p. 1039–1048, ago. 2013.
- DAHL, W. J.; RIVERO MENDOZA, D.; LAMBERT, J. M. Diet, nutrients and the microbiome. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 171, p. 237–263, 2020.

- DATTA, S. K. et al. Editorial: Generating and Sustaining Stable Autoantigen-Specific CD4 and CD8 Regulatory T Cells in Lupus. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.
- DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, 23 jan. 2014.
- DE LA VISITACIÓN, N. et al. Protective Effects of Probiotic Consumption in Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 5 nov. 2019.
- DE OLIVEIRA, G. L. V. et al. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. **Immunology**, v. 152, n. 1, p. 1–12, 2017.
- DÖRNER, T.; FURIE, R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. **Lancet (London, England)**, v. 393, n. 10188, p. 2344–2358, 8 jun. 2019.
- DUBÉ, M. P. et al. Daily HIV pre-exposure prophylaxis (PrEP) with tenofovir disoproxil fumarate-emtricitabine reduced *Streptococcus* and increased *Erysipelotrichaceae* in rectal microbiota. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15212, 12 out. 2018.
- DURCAN, L.; O'DWYER, T.; PETRI, M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults. **Lancet (London, England)**, v. 393, n. 10188, p. 2332–2343, 8 jun. 2019.
- ESMAEILI, S.-A. et al. Tolerogenic probiotics: potential immunoregulators in Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 8, p. 1994–2007, ago. 2017.
- FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews. Microbiology**, 4 set. 2020.
- FILLATREAU, S.; MANFROI, B.; DÖRNER, T. Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, n. 2, p. 98–108, fev. 2021.
- GERGES, M. A. et al. Altered Profile of Fecal Microbiota in Newly Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus Egyptian Patients. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, p. 9934533, 2021.
- GERGIANAKI, I. et al. Epidemiology and burden of systemic lupus erythematosus in a Southern European population: data from the community-based lupus registry of Crete, Greece. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 12, p. 1992–2000, dez. 2017.
- GEUKING, M. B. et al. Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 794–806, maio 2011.
- GIOIA, C. et al. Dietary Habits and Nutrition in Rheumatoid Arthritis: Can Diet Influence Disease Development and Clinical Manifestations? **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. E1456, 18 maio 2020.

GONZALEZ, N. M. et al. Schrödinger's T Cells: Molecular Insights Into Stemness and Exhaustion. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

GREILING, T. M. et al. Commensal orthologs of the human autoantigen Ro60 as triggers of autoimmunity in lupus. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 434, 28 2018.

GRIMOUD, J. et al. In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 42–50, 2010.

GUO, M. et al. Alteration in gut microbiota is associated with dysregulation of cytokines and glucocorticoid therapy in systemic lupus erythematosus. **Gut Microbes**, v. 11, n. 6, p. 1758–1773, 1 nov. 2020.

HE, H. et al. Sodium Butyrate Ameliorates Gut Microbiota Dysbiosis in Lupus-Like Mice. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 604283, 11 nov. 2020.

HE, Z. et al. Alterations of the gut microbiome in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Gut Pathogens**, v. 8, 8 dez. 2016.

HEVIA, A. et al. Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. **mBio**, v. 5, n. 5, p. e01548- 01514, 30 set. 2014.

HILLS, R. D. et al. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 16 jul. 2019.

HUANG, F. et al. Clostridium leptum induces the generation of interleukin-10+ regulatory B cells to alleviate airway inflammation in asthma. **Molecular Immunology**, v. 145, p. 124–138, maio 2022.

ILLESCAS-MONTES, R. et al. Infectious processes and systemic lupus erythematosus. **Immunology**, v. 158, n. 3, p. 153–160, 2019.

JENSEN, H. et al. Immunomodulation of Monocytes by Probiotic and Selected Lactic Acid Bacteria. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 7, n. 1, p. 14–23, 2014.

KAUL, A. et al. Systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 2, p. 16039, 16 2016.

KIM, J.-W. et al. Recent Advances in Our Understanding of the Link between the Intestinal Microbiota and Systemic Lupus Erythematosus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, 30 set. 2019.

KOŁODZIEJCZYK, A. A.; ZHENG, D.; ELINAV, E. Diet-microbiota interactions and personalized nutrition. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 742–753, 2019.

KONIG, M. F. The microbiome in autoimmune rheumatic disease. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, p. 101473, 7 fev. 2020.

KORPELA, K. Diet, Microbiota, and Metabolic Health: Trade-Off Between Saccharolytic and Proteolytic Fermentation. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 65–84, 25 2018.

KRAUSS, R. M. et al. AHA Dietary Guidelines: Revision 2000: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee of the American Heart Association. **Circulation**, v. 102, n. 18, p. 2284–2299, 31 out. 2000.

KUMARI, R.; AHUJA, V.; PAUL, J. Fluctuations in butyrate-producing bacteria in ulcerative colitis patients of North India. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 22, p. 3404–3414, 2013.

LI, J. et al. Carbohydrate Staple Food Modulates Gut Microbiota of Mongolians in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 484, 2017.

LI, J. et al. Comparison of gut microbiota structure and Actinobacteria abundances in healthy young adults and elderly subjects: a pilot study. **BMC microbiology**, v. 21, n. 1, p. 13, 6 jan. 2021.

LI, Y. et al. Disordered intestinal microbes are associated with the activity of Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 133, n. 7, p. 821–838, 15 2019.

LIN, L.; ZHANG, J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. **BMC Immunology**, v. 18, n. 1, p. 1–25, 2017.

LIU, S. et al. Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 287, 22 jan. 2019.

LUO, X. M. et al. Gut Microbiota in Human Systemic Lupus Erythematosus and a Mouse Model of Lupus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, 15 2018.

MA, Y. et al. Gut microbiota promote the inflammatory response in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Molecular Medicine**, v. 25, n. 1, p. 35, 1 ago. 2019.

MACHIELS, K. et al. Specific members of the predominant gut microbiota predict pouchitis following colectomy and IPAA in UC. **Gut microbiota**, p. 1–10, 2015.

MAEDA, Y. et al. Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. **Arthritis and Rheumatology**, v. 68, n. 11, p. 2646–2661, 2016.

MAFRA, D. et al. Dietary Components That May Influence the Disturbed Gut Microbiota in Chronic Kidney Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 3, 27 fev. 2019.

MANCA, C. et al. Germ-free mice exhibit profound gut microbiota-dependent alterations of intestinal endocannabinoidome signaling. **Journal of Lipid Research**, v. 61, n. 1, p. 70–85, jan. 2020.

MARCHESI, J. R. et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 330–339, 2016.

MARTÍNEZ, I. et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. **The ISME journal**, v. 7, n. 2, p. 269–280, fev. 2013.

MONTOYA, T. et al. Epigenetic linkage of systemic lupus erythematosus and nutrition. **Nutrition Research Reviews**, p. 1–59, 16 ago. 2021.

MOTTA, J.-P. et al. Gastrointestinal biofilms in health and disease. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 5, p. 314–334, maio 2021.

MU, Q. et al. Gut Microbiota and Bacterial DNA Suppress Autoimmunity by Stimulating Regulatory B Cells in a Murine Model of Lupus. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 593353, 10 nov. 2020.

NEUMAN, H.; KOREN, O. The gut microbiota: a possible factor influencing systemic lupus erythematosus. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 374–377, jul. 2017.

OLIPHANT, K.; ALLEN-VERCOE, E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 91, 13 2019.

PARK, S.-K.; KIM, M.-S.; BAE, J.-W. *Blautia faecis* sp. nov., isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt 2, p. 599–603, fev. 2013.

PEENE, I.; ELEWAUT, D. Changing the wolf from outside: how microbiota trigger systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 78, n. 7, p. 867–869, 2019.

PEZZOLE, E. R.; OSELAME, G. B. Fatores de Risco para o Lupus Eritematoso Sistêmico: Revisão da Literatura. **Revista UNIANDRADE**, v. 15, n. 1, p. 65–77, 30 abr. 2014.

QIU, C. C.; CARICCHIO, R.; GALLUCCI, S. Triggers of Autoimmunity: The Role of Bacterial Infections in the Extracellular Exposure of Lupus Nuclear Autoantigens. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2608, 2019.

REPPE MOE, S. et al. Long-Term Outcome in Systemic Lupus Erythematosus; Knowledge from Population-Based Cohorts. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 19, p. 4306, 22 set. 2021.

RINNINELLA, E. et al. Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. **Nutrients**, v. 11, n. 10, 7 out. 2019.

ROCHA-RAMÍREZ, L. M. et al. Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017.

ROSETTI, F. et al. Regulation of activated T cell survival in rheumatic autoimmune diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, 24 jan. 2022.

ROTJANAPAN, P. et al. Vaginal microbiota affects urinary tract infection risk in women with systemic lupus erythematosus: a pilot cross-sectional study from Thailand. **Lupus Science & Medicine**, v. 8, n. 1, p. e000551, out. 2021.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 27, p. 12204–12209, 2010.

RUFF, W. E.; GREILING, T. M.; KRIEGEL, M. A. Host-microbiota interactions in immune-mediated diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 18, n. 9, p. 521–538, set. 2020.

RUIZ, L. et al. The role of gut microbiota in lupus: what we know in 2018? **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 14, n. 10, p. 787–792, 2018.

RUOHTULA, T. et al. Maturation of Gut Microbiota and Circulating Regulatory T Cells and Development of IgE Sensitization in Early Life. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. October, p. 1–12, 2019.

SAGY, I. et al. Lower socioeconomic status worsens outcome of patients with systemic lupus erythematosus independently of access to healthcare. **Lupus**, p. 9612033221084518, 27 mar. 2022.

SANDERSON, N. S. R. et al. Cocapture of cognate and bystander antigens can activate autoreactive B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 4, p. 734–739, 24 jan. 2017.

SATOKARI, R. et al. Fecal transplantation treatment of antibiotic-induced, noninfectious colitis and long-term microbiota follow-up. **Case Reports in Medicine**, v. 2014, p. 913867, 2014.

SCHER, J. U. et al. Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **eLife**, v. 2, p. e01202, 5 nov. 2013.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLOS Biology**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 19 ago. 2016.

SHARABI, A.; TSOKOS, G. C. T cell metabolism: new insights in systemic lupus erythematosus pathogenesis and therapy. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 2, p. 100–112, fev. 2020.

SILVERMAN, G. J.; AZZOUZ, D. F.; ALEKSEYENKO, A. V. Systemic Lupus Erythematosus and dysbiosis in the microbiome: cause or effect or both? **Current Opinion in Immunology**, v. 61, p. 80–85, dez. 2019.

SOMMER, F. et al. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 630–638, out. 2017.

SRICHARUNRAT, T.; PUMIRAT, P.; LEAUNGWUTIWONG, P. Oral tolerance: Recent advances on mechanisms and potential applications. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 36, n. 4, p. 207–216, dez. 2018.

STRICKLAND, F. M. et al. Diet influences expression of autoimmune-associated genes and disease severity by epigenetic mechanisms in a transgenic mouse model of lupus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 7, p. 1872–1881, jul. 2013.

SYMMONS, D. P. M. Occasional Series: Lupus Around the World Frequency of lupus in people of African origin. **Lupus**, v. 4, n. 3, p. 176–178, jun. 1995.

TAMANAI-SHACOORI, Z. et al. Roseburia spp.: a marker of health? **Future Microbiology**, v. 12, p. 157–170, fev. 2017.

TANAKA, Y. State-of-the-art treatment of systemic lupus erythematosus. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 23, n. 4, p. 465–471, abr. 2020.

TEDESCHI, S. K. et al. Dietary patterns and risk of systemic lupus erythematosus in women. **Lupus**, v. 29, n. 1, p. 67–73, jan. 2020.

TETT, A. et al. The Prevotella copri Complex Comprises Four Distinct Clades Underrepresented in Westernized Populations. **Cell Host & Microbe**, v. 26, n. 5, p. 666–679.e7, 13 nov. 2019.

TSOKOS, G. C. Systemic lupus erythematosus. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 22, p. 2110–2121, 1 dez. 2011.

TSOKOS, G. C. et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 12, n. 12, p. 716–730, 22 2016.

TSOKOS, G. C. Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus. **Nature Immunology**, v. 21, n. 6, p. 605–614, jun. 2020.

VAN DE WIELE, T. et al. How the microbiota shapes rheumatic diseases. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 12, n. 7, p. 398–411, 2016.

VAN DER MEULEN, T. A. et al. Shared gut, but distinct oral microbiota composition in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. **Journal of Autoimmunity**, v. 97, p. 77–87, fev. 2019.

WANG, L.; WANG, F.-S.; GERSHWIN, M. E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. **Journal of Internal Medicine**, v. 278, n. 4, p. 369–395, 2015.

WANG, W. et al. Increased proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 398–406, fev. 2014.

WU, G. D. et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105–108, 7 out. 2011.

WU, Y. et al. Interactions Between Food and Gut Microbiota: Impact on Human Health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, p. 389–408, 25 2019.

XIANG, S. et al. Association between systemic lupus erythematosus and disruption of gut microbiota: a meta-analysis. **Lupus Science & Medicine**, v. 9, n. 1, p. e000599, mar. 2022.

XU, Q. et al. Causal Relationship Between Gut Microbiota and Autoimmune Diseases: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 746998, 2021.

YAMAGUCHI, Y. et al. Association of Intestinal Microbiota with Metabolic Markers and Dietary Habits in Patients with Type 2 Diabetes. **Digestion**, v. 94, n. 2, p. 66–72, 2016.

YEH, K.-W. et al. Burden of systemic lupus erythematosus in Taiwan: a population-based survey. **Rheumatology International**, v. 33, n. 7, p. 1805–1811, jul. 2013.

ZEGARRA-RUIZ, D. F. et al. A diet-sensitive commensal *Lactobacillus* strain mediates TLR7-dependent systemic autoimmunity. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 1, p. 113–127.e6, 9 jan. 2019.

ZHANG, D.; FRENETTE, P. S. Cross talk between neutrophils and the microbiota. **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2168–2177, 16 maio 2019.

ZHANG, H. et al. Dynamics of gut microbiota in autoimmune lupus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7551–7560, dez. 2014.

ZHANG, Y. et al. Early and Short-Term Interventions in the Gut Microbiota Affects Lupus Severity, Progression, and Treatment in MRL/lpr Mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 628, 14 abr. 2020.

ZHAO, X. et al. Identification of key biomarkers and immune infiltration in systemic lupus erythematosus by integrated bioinformatics analysis. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 35, dez. 2021.

ZHENG, B. et al. *Bifidobacterium breve* Attenuates Murine Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis and Increases Regulatory T Cell Responses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e95441, 2 maio 2014.

ZHENG, J. et al. Dietary inflammatory potential in relation to the gut microbiome: results from a cross-sectional study. **The British Journal of Nutrition**, v. 124, n. 9, p. 931–942, 14 nov. 2020.

ZHERNAKOVA, A.; WITHOFF, S.; WIJMENGA, C. Clinical implications of shared genetics and pathogenesis in autoimmune diseases. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 9, n. 11, p. 646–659, nov. 2013.

ZMORA, N.; SUEZ, J.; ELINAV, E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 35–56, jan. 2019.

ZORGETTO-PINHEIRO, V. A. et al. Omega-3 Fatty Acids and Balanced Gut Microbiota on Chronic Inflammatory Diseases: A Close Look at Ulcerative Colitis and Rheumatoid Arthritis Pathogenesis. **Journal of Medicinal Food**, v. 25, n. 4, p. 341–354, abr. 2022.

ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 1.036-442

anti-Sm, anticardiolipina IgG e IgM, anticoagulante lúpico, anti-La/SSB, anti-Ro/SSA e anti RNP), escore clínico SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) e tratamento medicamentoso serão registrados. O DNA bacteriano será extraído utilizando kit comercial e a caracterização da microbiota será realizada por PCR em tempo real utilizando primers para grupos bacterianos específicos. A dosagem de citocinas inflamatórias será realizada por ensaios de ELISA. Os resultados da microbiota intestinal de pacientes e controles serão analisados utilizando o teste de Mann-Whitney e as correlações dos resultados da microbiota com os dados clínicos e sócio-epidemiológicos serão avaliadas pelo teste de Spearman. Esperamos encontrar diferenças na composição da microbiota intestinal de pacientes com LES em relação aos indivíduos saudáveis e possíveis correlações com os dados clínicos e citocinas inflamatórias plasmáticas. Estudos adicionais sobre a disbiose em doenças autoimunes são necessários, e possivelmente, no futuro, probióticos imunomoduladores possam auxiliar no tratamento da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a disbiose intestinal em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a possível correlação com citocinas inflamatórias plasmáticas.

Objetivos específicos

1. Realizar levantamento do número de pacientes com LES atendidos nos postos de saúde ligados à Secretaria de Saúde do município e no Ambulatório Médico de Especialidades de Barretos;
2. Selecionar/Recrutar pacientes com LES e indivíduos controles e aplicar o termo de consentimento livre e esclarecido e o questionário sócio-epidemiológico;
3. Caracterizar a microbiota intestinal isolada através do DNA bacteriano isolado das fezes de pacientes com LES e controles por PCR em tempo real;
4. Quantificar citocinas inflamatórias no plasma de pacientes com LES e controles;
5. Correlacionar os dados da microbiota intestinal de pacientes com LES às concentrações de citocinas, aos dados clínicos e sócio-epidemiológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos pelo pesquisador na Plataforma Brasil:

Riscos:

Não há riscos para os participantes envolvendo a coleta de fezes. Para o fornecimento de sangue que será utilizado neste projeto, há o risco de aparecimento de hematoma no braço onde a veia

Endereço: Rua Antenor Duarte Viêla, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
UF: SP Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: cap@hccbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 1.026.442

for puncionada para coleta do material, mas a execução do procedimento será padronizada pelos profissionais da saúde para minimizar as chances de risco. Além disso, há possível quebra de sigilo entre os membros relacionados com o estudo, mas isto será evitado ao máximo.

Benefícios:

Neste projeto será investigada a disbiose intestinal isolada em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Além disso, estes dados serão correlacionados aos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, que estão relacionadas à inflamação crônica. Os dados gerados por este trabalho serão inéditos para publicação e agregarão informações relevantes sobre o papel da disbiose na inflamação e desenvolvimento de doenças como o lúpus. É possível que este estudo não traga benefícios diretos a você, mas ao final deste estudo as informações obtidas poderão trazer benefícios a futuros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores submetem para apreciação as alterações solicitadas em parecer prévio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

1. Não está descrito como e onde serão selecionados os participantes de pesquisa sem lúpus eritematoso sistêmico (controles). Solicita-se que tal informação seja descrita no projeto de na plataforma Brasil, inclusive no TCLE (se e o que for pertinente).

RESPOSTA: Os indivíduos constituintes do grupo controle serão selecionados/recrutados nos postos de saúde ligados à Secretaria de Saúde e no Ambulatório Médico de Especialidades de Barretos, respeitando os critérios de exclusão descritos no projeto de pesquisa. Tal informação foi incluída no projeto de pesquisa e na plataforma Brasil. No TCLE foi incluída a informação sobre a colaboração da FACISB com os postos de saúde ligados à Secretaria de Saúde e Ambulatório Médico de Especialidades de Barretos para seleção/recrutamento de pacientes e controles.

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. No TCLE (Documento TCLE_Microbiota_LES_2016), no item O QUE ACONTECERÁ COMIGO DURANTE O ESTUDO? lê-se "Os dados clínicos, tais como lesões cutâneas ativas, avaliação de

Endereço: Rua Antenor Duarte Viçela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.764-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcanccerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 1.000.442

autoanticorpos (FAN, anti-DNA nativo, anti-Sm, anticardiolipina IgG e IgM, anticoagulante lúpico, anti-La/SSB, anti-Ro/SSA e anti-RNP), escore clínico SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) e tratamento medicamentoso..." Os termos usados são muito técnicos e podem dificultar o entendimento do TCLE por parte do participante. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: O TCLE foi completamente reformulado, utilizando linguagem acessível ao público leigo, facilitando a compreensão do estudo e das etapas envolvidas na inclusão dos pacientes com LES e dos controles. Todas as informações sobre os dados clínicos citadas .. "Os dados clínicos, tais como lesões cutâneas ativas, avaliação de autoanticorpos (FAN, anti-DNA nativo, anti-Sm, anticardiolipina IgG e IgM, anticoagulante lúpico, anti-La/SSB, anti-Ro/SSA e anti-RNP), escore clínico SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) e tratamento medicamentoso..." foram removidas do TCLE.

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Os pesquisadores apresentam um único TCLE (Documento TCLE_Microbiota_LES_2016), no qual consta informações direcionadas aos pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico. Não foi apresentado um TCLE para os indivíduos saudáveis (controles). Assim, não deve-se utilizar este TCLE para os indivíduos saudáveis, uma vez que neste consta sentenças como "Nosso trabalho tem como objetivo geral a caracterização dos microrganismos presentes nas fezes de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e correlação com proteínas inflamatórias no sangue" e "...serão pesquisados em seu prontuário médico..." Essas frases podem gerar confusão, uma vez que os indivíduos controles não são portadores de LES. Desta forma, solicita-se um TCLE específico para os controles.

RESPOSTA: Tendo em vista a reformulação do TCLE, acreditamos que agora ele está compatível para aplicação no grupo de pacientes com LES e no grupo controle. O termo foi reformulado para que possa atender às duas populações de estudo, evitando confusões ou dúvidas por parte dos indivíduos controles.

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Solicita-se que seja descrito no TCLE o tempo estimado para responder as 90 questões propostas nos questionários.

RESPOSTA: A informação pertinente ao tempo estimado para responder as 90 questões do questionário foi incluída no TCLE.

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: Rua Antenor Duarte Viçela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6800

E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 1.006.442

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, e após a análise das respostas as pendências emitidas, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa proposto.

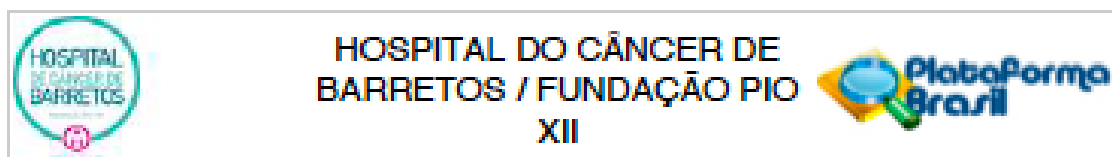
Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 24/11/2016.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1268/2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_736719.pdf	12/11/2016 13:18:33		Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencias_LES_2016.docx	12/11/2016 13:16:56	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LES_2016_reformulado.pdf	12/11/2016 13:16:00	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Microbiota_LES_2016_reformulado.pdf	12/11/2016 13:15:37	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_Microbiota_LES_2016.pdf	12/11/2016 13:14:56	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.764-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.806.442

Ausência	TCLE_Microbiota_LES_2016.pdf	12/11/2016 13:14:56	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Microbiota_LES_2016.pdf	12/11/2016 13:14:17	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencias_LES_2016.pdf	11/11/2016 16:31:57	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CIENCIA_FACISB_LES_2016.pdf	14/10/2016 22:44:26	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Outros	Financiamento_LES_2016.jpg	06/10/2016 20:40:18	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Responsabilidade_LES_2016.jpg	06/10/2016 20:39:22	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Ciencia_estudo_Secretaria_LES_2016.pdf	11/09/2016 20:06:01	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_LES_2016.pdf	11/09/2016 20:04:53	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Outros	Questionario_socioepidemiologico_LES_2016.pdf	10/09/2016 20:50:46	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 25 de Novembro de 2016

Assinado por:
Daniel Onofre Vidal
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
UF: SP Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br

ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Título do Projeto de Pesquisa: Avaliação da disbiose intestinal em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e correlação com citocinas inflamatórias plasmáticas.

INVESTIGADORES DO ESTUDO

Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata, Brasil
 Profa. Gislane Lelis Vilela de Oliveira, Fernanda Paolini Gonçalves, Guilherme Siqueira Pardo Rodrigues, Dra. Vânia Sammartino Mariano

Identificação do participante

Número do prontuário médico

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo que será realizado na Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata (FACISB), sendo coordenado pela Professora Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira.

Este Termo de Consentimento explica porque este estudo está sendo realizado e qual será a sua participação, caso você aceite o convite. Este documento também descreve os possíveis riscos e benefícios se você quiser participar. Após analisar as informações com a pessoa que explica este Termo de Consentimento, e esclarecer suas dúvidas, você deverá ter o conhecimento necessário para tomar uma decisão esclarecida sobre sua participação ou não neste estudo.

JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO

Nos últimos anos, pesquisadores têm demonstrado a importância das bactérias (um tipo de microrganismo) que naturalmente são encontradas no intestino humano e trato gastrointestinal chamadas de microbiota. Quando a relação benéfica entre o ser humano e estas bactérias é interrompida, a microbiota pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico. Um dos principais efeitos da quebra da boa relação existente entre os micróbios que habitam nosso intestino e organismo como um todo é a ativação desregulada de células do sistema de defesa do organismo humano. A desregulação deste sistema de defesa induz a produção de substâncias, chamadas citocinas pró-inflamatórias, que favorecem o desenvolvimento de doenças autoimunes órgão-específicas como a esclerose múltipla, mas também podem ter efeitos em locais distantes (sistêmicos), favorecendo a ocorrência de doenças como a artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico. No entanto, permanece questionável se a quebra da relação harmoniosa entre micróbios e corpo humano pode ser visto como agente causador de doença ou como consequência dela.



OBJETIVO DO ESTUDO

Nosso trabalho tem como objetivo geral a caracterização da microbiota intestinal isolada das fezes de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e correlação com citocinas inflamatórias plasmáticas.

PROCEDIMENTOS

O(A) senhor(a) responderá a um questionário sócio-epidemiológico relacionado ao histórico de doenças, medicações, hábitos de vida e alimentação, uso do tabaco e consumo de álcool e tem o direito de recusar-se a responder as perguntas que causem qualquer tipo de constrangimento. Após o questionário, amostras de sangue periférico (10 mL) serão colhidas em tubos EDTA (anticoagulante) para separação do plasma que será utilizado para dosagem de um tipo de proteína chamada de citocina inflamatória. Amostras de fezes (250 mg) serão solicitadas e armazenadas em freezer -20°C para posterior extração de DNA bacteriano (material genético). A composição da microbiota será realizada após extração de DNA e PCR em tempo real (reação que permite a identificação dos tipos diferentes de micróbios presentes no intestino). Os dados clínicos, tais como lesões cutâneas ativas, avaliação de autoanticorpos (FAN, anti-DNA nativo, anti-Sm, anticardiolipina IgG e IgM, anticoagulante lúpico, anti-La/SSB, anti-Ro/SSA e anti-RNP), escore clínico SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) e tratamento medicamentoso, serão pesquisados em seu prontuário médico, com toda descrição e sigilo e serão registrados.

RISCOS E DESCONFORTOS PARA OS PARTICIPANTES

Não há riscos para os participantes envolvendo a coleta de fezes. Para o fornecimento de sangue que será utilizado neste projeto, há o risco de aparecimento de hematoma no braço onde a veia for puncionada para coleta do material, mas a execução do procedimento será padronizada pelos profissionais da saúde para minimizar as chances de risco. Além disso, há possível quebra de sigilo entre os membros relacionados com o estudo, mas isto será evitado ao máximo.

BENEFÍCIOS ESPERADOS

Neste projeto será investigada a composição da microbiota intestinal isolada das fezes de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Além disso, estes dados serão correlacionados aos níveis plasmáticos de citocinas que estão relacionados à inflamação crônica. Os dados gerados por este trabalho serão inéditos para publicação e agregarão informações relevantes sobre o papel da disbiose na inflamação e desenvolvimento de doenças como o lúpus eritematoso sistêmico. É possível que este estudo não traga benefícios diretos a você, mas ao final deste estudo as informações obtidas poderão trazer benefícios a futuros pacientes.

PROCEDIMENTOS OU TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Não há procedimentos alternativos.

INTERRUPÇÃO DO ESTUDO

Este estudo poderá ser encerrado antes do prazo se houver dúvidas relativas à sua segurança ou por razões administrativas. Qualquer que seja o motivo, o estudo somente será interrompido depois da avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa que o aprovou, a não ser que existam razões de segurança que exijam a interrupção imediata do estudo.



LIBERDADE DE RECUSA

A sua participação neste estudo é voluntária e não é obrigatória. Você pode aceitar participar do estudo e depois desistir a qualquer momento. Você também poderá pedir a qualquer momento que as suas informações sejam excluídas completamente deste estudo e que elas não sejam usadas para mais nada.

GARANTIA DE SIGILO

O pesquisador tomará todas as medidas para manter suas informações pessoais (como nome, endereço, telefone e outras) em sigilo. Durante todo o estudo e mesmo depois que terminar, quando os resultados deste estudo forem publicados em revistas científicas ou apresentados em congressos ou reuniões, a sua identidade será guardada em segredo, não sendo revelada qualquer informação a seu respeito que possa identificar você publicamente. Contudo, durante o estudo, algumas pessoas da Faculdade de Ciências da Saúde Barretos Dr. Paulo Prata, envolvidas diretamente na pesquisa, poderão ter acesso aos seus dados. Mesmo assim, os seus dados serão preservados e não serão divulgados publicamente.

CUSTOS, REMUNERAÇÃO E INDENIZAÇÃO

A participação neste estudo não terá custos a mais para você. Os custos relacionados diretamente com o estudo serão pagos pela instituição que está participando deste estudo. Também não haverá qualquer tipo de pagamento devido à sua participação (mesmo que haja patentes ou descobertas). Se você sofrer algum dano a sua saúde como resultado da sua participação neste estudo, a Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata será responsável por lhe dar todo o tratamento necessário e de forma gratuita. Ao assinar este Termo de Consentimento, você não perderá nenhum direito, inclusive o de obter indenização por dano a sua saúde se isto acontecer.

DESTINO DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS

Todos os materiais biológicos coletados durante este estudo (sangue e fezes) e os dados obtidos durante o estudo não serão utilizados para outros fins além daqueles explicados neste Termo de Consentimento. Esses materiais não terão os seus dados pessoais, apenas códigos de identificação, para manter o seu sigilo. Depois de todas as análises terem sido realizadas, o material biológico que restar será adequadamente armazenado na Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata. Se houver necessidade de fazer novas análises com seu material e/ou outras pesquisas, o Comitê de Ética em Pesquisa avaliará esse novo uso. Sem a autorização deste Comitê, novas pesquisas com o seu material não poderão ser realizadas. Apesar deste material biológico ficar guardado, ele pertence a você. A qualquer momento, durante ou após este estudo, você poderá pedir que o material seja destruído. Ao final deste termo você poderá decidir se autoriza o uso de seu material em pesquisas futuras ou se prefere ser avisado em cada situação em que seu material seja utilizado em novos estudos para que você autorize ou não este uso.

ESCLARECIMENTOS ADICIONAIS, CRÍTICAS, SUGESTÕES E RECLAMAÇÕES

Você poderá tirar qualquer dúvida sobre o estudo, fazer críticas, sugestões e reclamações diretamente com o pesquisador na Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata, com a Profa. Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira, no telefone (17) 3321-3060 ramal: 232 ou pelo e-mail: glelislivilela@facisb.edu.br



DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Entendi o estudo. Tive a oportunidade de ler o termo de consentimento ou alguém o leu para mim. Tive a oportunidade de pensar, fazer perguntas e falar a respeito do documento com outras pessoas quando precisei. Autorizo a minha inclusão neste estudo. Ao assinar este termo de consentimento, não renuncio a nenhum dos meus direitos legais. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador responsável.

MANIFESTAÇÃO DE USO FUTURO DE MATERIAL BIOLÓGICO APÓS O TÉRMINO DA PESQUISA.

Após o término deste estudo, todo o material biológico retirado de você (sangue e fezes) será armazenado na Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata. No futuro, este material também poderá servir para outros estudos. Se isso ocorrer você poderá ou não autorizar o uso deste material novamente. Esta decisão é sua. Por favor, assinale uma das alternativas abaixo sobre o seu desejo em relação ao uso material biológico em outras pesquisas no futuro:

| ☐ **SIM**, autorizo o uso de meu material biológico em novas pesquisas, que possam ser realizadas futuramente na Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata, desde que sejam aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

| ☐ **NÃO** autorizo o uso de meu material biológico em novas pesquisas que possam ser realizadas futuramente. Desejo ser informado em cada situação em que meu material será utilizado em novos estudos para que eu possa autorizar ou não este uso.

Nome por extenso do participante de pesquisa ou do representante legal

Data

Assinatura

Nome por extenso do responsável que explicou e obteve o Termo de Consentimento

Data

Assinatura

Nome por extenso da testemunha imparcial (para casos de analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Data

Assinatura

ANEXO C: QUESTIONÁRIO SOBRE ESTILO DE VIDA E HÁBITOS ALIMENTARES

Data: ____/____/____

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

(Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira)

1	Identificação	
2	Nome	
3	Registro hospitalar	
4	Grupo 1- Lúpus eritematoso sistêmico; 2- Grupo controle	
5	Tempo de diagnóstico ANOS	
INFORMAÇÕES GERAIS		
6	Data de nascimento DD/MM/AAAA	
7	Como foi o nascimento? 1- Parto normal; 2- Cessárea; 3- Não sabe informar	
8	Sexo 1- Feminino; 2- Masculino	
9	Qual a sua raça (cor da pele)? 1- Branco; 2- Negro; 3- Pardo ou Mulato; 4- Amarelo (Asiático); 5- Indígena	
10	Estado civil 1- Solteiro; 2- Casado/Amasiado; 3- Separado/Divorciado; 4- Viúvo	
11	Escolaridade 0- Analfabeto; 1- Sabe ler e escrever; 2- Ensino fundamental incompleto; 3- Ensino fundamental completo; 4- Ensino médio incompleto; 5- Ensino médio completo; 6- Ensino superior incompleto; 7- Ensino superior completo	
14	Morou/Mora em zona rural 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
15	Se sim, por quanto tempo? ANOS	
16	Morou/Mora em zona urbana 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
17	Se sim, por quanto tempo? ANOS	
20	Usou algum antibiótico nos últimos 15 dias? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
21	Antibiótico ESPECIFICAR	
24	Faz uso frequente de alguma medicação? 0- Não; 1- Sim (se fez nos últimos 12 meses); 2- Só no passado; 99- Ignorado	
25	Medicação de uso frequente ESPECIFICAR	
26	Foi submetido a algum tipo de vacinação nos últimos 30 dias? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
27	Vacinação ESPECIFICAR	
28	Foi submetido a cirurgias do trato gastrointestinal? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	

29	Cirurgia	ESPECIFICAR
ESTILO DE VIDA		
30	Ingestão de álcool 0- Nunca; 1- Sim, ainda bebe (se parou nos últimos 12 meses); 3- Só no passado	
31	Cerveja 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
32	Idade de início ANOS	
33	Idade que parou ANOS	
34	Quantas unidades consome? 1- Copo pequeno – 50 ml; 2- Copo médio – 100 ml; 3- Copo grande – 250 ml%; ou garrafa pequena – 330 ml; 4- Garrafa – 700-750 ml; 5- Garrafa – 1 L	
35	Qual a frequência do consumo? 0- Menos que uma vez por mês; 1- 1-3 vezes por mês; 2- Uma ou duas vezes por semana; 3- Todos os dias	
36	Vinho 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
37	Idade de início ANOS	
38	Idade que parou ANOS	
39	Quantas unidades consome? 1- Copo pequeno – 50 ml; 2- Copo médio – 100 ml; 3- Copo grande – 250 ml%; ou garrafa pequena – 330 ml; 4- Garrafa – 700-750 ml; 5- Garrafa – 1 L	
40	Qual a frequência do consumo? 0- Menos que uma vez por mês; 1- 1-3 vezes por mês; 2- Uma ou duas vezes por semana; 3- Todos os dias	
41	Cachaça 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
42	Idade de início ANOS	
43	Idade que parou ANOS	
44	Quantas unidades consome? 1- Copo pequeno – 50 ml; 2- Copo médio – 100 ml; 3- Copo grande – 250 ml%; ou garrafa pequena – 330 ml; 4- Garrafa – 700-750 ml; 5- Garrafa – 1 L	
45	Qual a frequência do consumo? 0- Menos que uma vez por mês; 1- 1-3 vezes por mês; 2- Uma ou duas vezes por semana; 3- Todos os dias	
46	Tabaco 0- Não; 1- Sim, atualmente, 2- Sim, passado	
47	Cigarro de filtro 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
48	Número de maços por dia NÚMERO	
49	Idade de início ANOS	
55	Você esteve casado (ou vivendo junto) com um fumante? 0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99- Ignorado	
56	Quando criança, seu pai ou sua mãe fumavam? 0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99- Ignorado	

57	Por quanto tempo foi exposto?	ANOS
58	Pratica atividade física?	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
59	Se sim, qual a frequência por semana	1 - 7 dias
60	Quanto tempo por dia?	0- Menos de 30'; 1- pelo menos 30'; 2- pelo menos 60'; 3- não lembra; 99- Ignorado
HÁBITOS ALIMENTARES E MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS De maneira geral, com qual frequência você ingere...		
61	Legumes, verduras e vegetais?	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
62	Frutas frescas?	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
63	Carne vermelha?	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
64	Leite e laticínios (Ex: queijos e iogurte)?	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
65	Gordura, gordura trans? (Ex: da carne, bolachas recheadas, salgadinhos)	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
66	Massa? (pão, macarrão, nhoque)	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
67	Comida enlatada? (ervilha, milho, salsita de legumes)	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
68	Comida condimentada (Ex: catchup, mostarda, maionese)?	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
69	Pimenta ou comida apimentada?	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
70	Bebidas quentes (Ex: Café e Chá)	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana; 4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias
71	Probióticos (Ex: Yakult, Activia)	0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 2- 1-3 vezes por mês; 3- Uma ou duas vezes por semana;

	4- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 5- Todos os dias	
72	Peso QUILOS	
73	Altura METROS	
74	Funcionamento intestinal? 0- uma vez a cada 15 dias; 1- uma vez por semana; 2- duas vezes por semana; 3- três vezes por semana; 4- Todos os dias	
75	Fez uso de laxantes (naturais ou artificiais) ou medicamentos para prisão de ventre nos últimos 7 dias? 0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99- Ignorado	
76	Presença de diarreias crônicas (infecciosas ou não infecciosas) nos últimos 15 dias? 0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99- Ignorado	
HISTÓRICO FAMILIAR DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS		
77	Histórico familiar de lúpus eritematoso sistêmico 0- Não; 1- Sim; 2- não sabe; 99- Ignorado	
78	Avós, pais, irmãos, tios, primos, filhos ESPECIFICAR	
79	Histórico familiar de outras doenças autoimunes (diabetes tipo 1, esclerodermia, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, pénfigo foliáceo ou vulgar, vitiligo, psoríase) 0- Não; 1- Sim; 2- não sabe; 99- Ignorado	
80	Histórico familiar de doenças autoimunes (avós, pais, tios, irmãos, primos, filhos) ESPECIFICAR	
81	História familiar de doença inflamatória intestinal (doença de Crohn, colite ulcerativa e doença celíaca) (avós, pais, tios, irmãos, primos, filhos) 0- Não; 1- Sim; 2- não sabe; 99- Ignorado	
82	História de infecções virais na infância (Sarampo, Caxumba, Catapora e Rubéola) 0- Não; 1- Sim; 2- não sabe; 99- Ignorado	
83	História de infecções virais na infância ESPECIFICAR	
COMORBIDADES		
84	Tem hipertensão arterial ou diabetes? 0- Não; 1- Sim; 2- não sabe; 99- Ignorado	
85	Hipertensão ou diabetes ESPECIFICAR	
86	Teve alguma infecção das vias aéreas superiores nas últimas 2 semanas? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
87	Infecção vias aéreas superiores ESPECIFICAR	
88	Tem alergia? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
89	Alergia ESPECIFICAR	
90	Tem asma? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	