



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

Larissa Vedovato Vilela de Salis

**Análise metagenômica da microbiota intestinal de pacientes com
Tireoidite de Hashimoto e correlação com citocinas inflamatórias
séricas**

São José do Rio Preto
2021

Larissa Vedovato Vilela de Salis

**Análise metagenômica da microbiota intestinal de pacientes com
Tireoidite de Hashimoto e correlação com citocinas inflamatórias
séricas**

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 8882.434309/2019-01

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gislane Lelis Vilela de Oliveira

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes

São José do Rio Preto
2021

S166a	Salis, Larissa Vedovato Vilela de Análise metagenômica da microbiota intestinal de pacientes com Tireoidite de Hashimoto e correlação com citocinas inflamatórias séricas / Larissa Vedovato Vilela de Salis. -- São José do Rio Preto, 2021 91 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Gislane Lelis Vilela de Oliveira Coorientador: Eleni Gomes I. Microbiologia. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Larissa Vedovato Vilela de Salis

**Análise metagenômica da microbiota intestinal de pacientes com
Tireoidite de Hashimoto e correlação com citocinas inflamatórias
séricas**

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 8882.434309/2019-01

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos
UFG – Universidade Federal de Goiás

São José do Rio Preto
02 de julho de 2021

Dedico esta pesquisa aos meus Anjos da Guarda e a Deus. Aos meus Anjos, pelo zelo e proteção a mim voltados. A Deus, pelo tão sublime amor. Dedico ainda à minha orientadora Gislane, meu exemplo de dedicação e carinho. Quanta sorte por ter cruzado meu caminho com o seu.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me mostraram, sem precisar dizer, que eu deveria fazer de tudo e mais um pouco para dar conta da minha responsabilidade que sempre foi 'estudar' e, assim, me guiaram dentro desse universo do conhecimento, me ensinando, desde pequena, a buscar respostas para as perguntas e cativando meu gosto por aprender. Aprendi com eles a me colocar no lugar do próximo antes de falar, analisar ou julgar e, também, a ser alegre e ter um sorriso sempre. A eles meu eterno amor!

À minha orientadora Dra. Gislane, que se fez brilhante o tempo todo. Confesso que me inspirei muito nela para continuar sempre firme e cheia de ideias que pudessem acrescentar cada vez mais informações na minha vida. A sua colaboração para minha vida acadêmica e pessoal foi inestimável. Obrigada por sempre transmitir no olhar seu amor pelo que faz e por estar sempre presente, A ela meu imenso carinho e gratidão!

Ao Ibilce, que abriu suas portas para receber a mim e a minha orientadora, seja cedendo seu nome para a divulgação nesta pesquisa, suas salas, seus aparelhos multimídia, sua organização, como também o carinho dos mestres.

À minha prima Jéssica, que curtiu sua infância e boa parte de sua juventude junto a mim. Parecia, até, que sabia que não tinha muito tempo. Obrigada por me olhar lá de cima!

Aos meus irmãos, Guilherme e Leonardo, pelo exemplo de disciplina, dedicação e infinitas horas de estudos. Prometo a vocês ser sempre curiosa nas pesquisas, na busca de mais e mais conhecimentos, me espelharei e terei sempre vontade de copiar o modelo de vocês. Eu amo muito esses dois!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 – Processo: 8882.434309/2019-01.

RESUMO

A disbiose, associada ao aumentada permeabilidade intestinal e desregulação do sistema imune, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a disbiose intestinal em pacientes com tireoidite de Hashimoto (TH) e correlacionar aos dados clínicos, dieta, e concentrações séricas de citocinas e zonulina. A frequência de consumo alimentar foi avaliada por questionário estruturado desenvolvido por nutricionistas. Amostras de fezes foram utilizadas para avaliar a microbiota por PCR em tempo real e sequenciamento 16S, e o soro para a dosagem de citocinas e zonulina, por citometria de fluxo e ELISA, respectivamente. Os resultados foram analisados utilizando teste Qui-quadrado de Pearson, Mann-Whitney e correlação de Spearman. Foram incluídos 40 pacientes com TH ($48,9 \pm 13,2$ anos) e 53 indivíduos controles ($45,6 \pm 16,7$ anos). Observamos diferenças significativas entre pacientes e controles quanto ao consumo de carboidratos, proteínas, gorduras saturadas, verduras/legumes e laticínios. Foi detectada disbiose intestinal nos pacientes, com diferenças na riqueza e diversidade microbianas ($P < 0,05$). A abundância dos gêneros *Sutterella*, *Intestinimonas*, *Acidaminococcus* e *Bacteroides* estava aumentada nas fezes do grupo TH, enquanto *Ruthenibacterium*, *Escherichia*, *Erysipelatoclostridium*, *Blautia*, *Anaerostipes* e *Bifidobacterium* estavam reduzidos. O gênero *Lactobacillus* estava aumentado em pacientes que não tomavam levotiroxina. *Bacteroides*, *Anaerostipes*, *Eubacterium hallii* e *Dorea longicatena* correlacionaram de maneira inversa ao consumo de proteínas de origem animal. A ingestão de carboidratos correlacionou positivamente com *Faecalibacterium prausnitzii*, e o consumo de gorduras saturadas com *Bacteroides cellulosilyticus*, e negativamente com *Eubacterium* e *Sutterella wadsworthensis*. *Catenibacterium*, *Bacteroides plebeius* e *Holdemanella bififormis* correlacionaram inversamente aos níveis de IL-6. *Ruminococcus gnavus* correlacionou diretamente às concentrações de TNF, *Eubacterium rectale* aos de IFN- γ , e *Bacteroides stercoris* e *Blautia obeum* aos de IL-17A. Além disso, observamos aumento significativo dos níveis séricos de zonulina nos pacientes, sugerindo maior permeabilidade da barreira intestinal. Concluímos que pacientes com TH apresentam disbiose e aumento da permeabilidade intestinal e que os hábitos alimentares desempenham papel importante na determinação da composição da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Microbiota. Disbiose. Autoimunidade. Tireoidite de Hashimoto.

ABSTRACT

Dysbiosis, associated with increased intestinal permeability and dysregulation of the immune system, can contribute to the development of autoimmune diseases. The aim of this study was to evaluate intestinal dysbiosis in patients with Hashimoto's thyroiditis (HT) and correlate with clinical data, diet, and serum concentrations of cytokines and zonulin. The frequency of food consumption was assessed using a structured questionnaire developed by nutritionists. Stool samples were used to evaluate dysbiosis by Real-time PCR and 16S sequencing, and the serum was used for cytokine and zonulin quantification, by flow cytometry and ELISA, respectively. Results were analyzed by using Pearson's chi-square test, Mann-Whitney and Spearman's correlation. Forty HT patients (48.9 ± 13.2 years) and 53 controls (45.6 ± 16.7 years) were included. We observed significant differences between patients and controls regarding the consumption of carbohydrates, proteins, saturated fats, vegetables and dairy products. Intestinal dysbiosis was detected in HT patients, with differences in microbial richness and diversity ($P < 0.05$). The abundance of *Sutterella*, *Intestinimonas*, *Acidaminococcus* and *Bacteroides* genera were increased in HT patients, while *Ruthenibacterium*, *Escherichia*, *Erysipelatoclostridium*, *Blautia*, *Anaerostipes* and *Bifidobacterium* were decreased. *Lactobacillus* genus was increased in non-treated patients, when compared with levotyroxin-treated one. *Bacteroides*, *Anaerostipes*, *Eubacterium hallii* and *Dorea longicatena* inversely correlated with animal derived proteins. Carbohydrate intake correlated positively with *Faecalibacterium prausnitzii* and the saturated fats consumption with *Bacteroides cellulosilyticus*, and negatively with *Eubacterium* and *Sutterella wadsworthensis*. *Catenibacterium*, *Bacteroides plebeius* and *Holdemanella bififormis* inversely correlated with serum IL-6 levels. *Ruminococcus gnavus* positively correlated with TNF, *Eubacterium rectal* with IFN- γ , and *Bacteroides stercoris* and *Blautia obeum* with IL-17A concentrations. Besides that, we observed a significant increase in serum zonulin in HT patients, suggesting altered permeability of the intestinal barrier. We concluded that HT patients have dysbiosis and increased intestinal permeability. In addition, dietary habits play an important role in determining the composition of the microbial community in the human gut.

Keywords: Microbiota. Dysbiosis. Autoimmunity. Hashimoto's thyroiditis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação das condições de eubiose e disbiose intestinal	20
Figura 2 – Gráficos de diversidade alfa avaliando riqueza e uniformidade	40
Figura 3 – Análise de componentes principais da diversidade beta	40
Figura 4 – Análise de abundância diferencial de gêneros entre pacientes com TH e controles	41
Figura 5 – Unidades relativas de expressão de grupos bacterianos detectados em fezes de pacientes com TH e controles	42
Figura 6 – Correlação da microbiota intestinal e os dados clínicos	43
Figura 7 – Proporções bacterianas e frequência de consumo alimentar	45
Figura 8 – Perfil de citocinas em pacientes com TH e controles	46
Figura 9 – Correlação entre proporções bacterianas e concentração sérica de citocinas	47
Figura 10 – Concentrações séricas de zonulina em pacientes com TH e controles	48
Figura 11 – Correlação entre as concentrações séricas de zonulina e citocinas	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> para grupos bacterianos e tamanho dos produtos.	31
Tabela 2 – Dados demográficos e clínicos dos pacientes com TH.	37
Tabela 3 – Frequência de consumo alimentar em pacientes com TH e controles	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AME	Ambulatório Médico de Especialidades
Anti-Tg	Anti-Tireoglobulina
Anti-TPO	Anti-tireoperoxidase
AR	Artrite Reumatoide
ARE	Ambulatório Regional de Especialidades
CBP	Cirrose biliar primária
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTL	Controles
DAÍ	Doença sautoimunes
DAT	Doença autoimune da tireóide
DG	Doença de Graves
DM1	Diabetes tipo 1
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EM	Esclerose múltipla
GALT	Tecidos linfoides associados ao trato gastrointestinal
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IMC	Índice de massa corporal
IVAS	Infecções de vias aéreas superiores
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
PCR	Reação em cadeia da Polimerase

qPCR	PCR em tempo real quantitativo
SFB	Bactérias filamentosas segmentadas
Tg	Tireoglobulina
TGI	Trato Gastrointestinal
TH	Tireoidite de Hashimoto
TPO	Tireoperoxidase
TRAb	Anti-receptor de TSH
Tregs	Células T reguladoras
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
URE	Unidades relativas de expressão
ZO-1	Zonulina

LISTA DE UNIDADES

µg	Micrograma
Mg	Miligrama
µL	Microlitro
µM	Micromol
Ng	Nanograma
Kg	Quilograma
S	Segundo
K	Mil
mM	Milimolar
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Tireoidite de Hashimoto	16
1.2 Microbiota intestinal e sistema imune	118
1.3 Microbiota e permeabilidade intestinal	22
1.4 Relação microbiota intestinal e tireoidite de Hashimoto	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivos específicos	27
3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Delineamento, considerações éticas e instituições envolvidas	29
3.2 Casuística, critérios de exclusão e coleta das amostras	29
3.3 Extração de DNA e avaliação da qualidade do DNA extraído	28
3.4 Caracterização da microbiota por PCR em tempo real	30
3.5 Sequenciamento das regiões V3/V4 do 16S bacteriano	31
3.6 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo	32
3.7 Dosagem sérica de zonulina por ELISA	33
3.8 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	35
4.1 Descrição do grupo de pacientes com TH e grupo controle	36
4.2 Descrição dos hábitos alimentares e estilo de vida	36
4.3 Avaliação da disbiose intestinal em pacientes com TH	38
4.4 Correlação da microbiota intestinal com os dados clínicos	42
4.5 Correlação dos hábitos alimentares e microbiota intestinal	44
4.6 Perfil de citocinas e correlação com a microbiota intestinal	44
4.7 Avaliação da permeabilidade intestinal em pacientes com TH	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	61
Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	71
Anexo B – Termo de Consentimento Livre Esclarecido	76
Anexo C – Questionário sobre frequência de consumo alimentar	79
Anexo D - Publicação resultante dos dados iniciais do projeto	84

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças autoimunes (DAIs) representam uma família de pelo menos 80 enfermidades que compartilham uma patogênese comum, a resposta imune adaptativa autorreativa (ROSE, 2016), variando em incidência e prevalência de acordo com a doença estudada, região demográfica, idade, sexo e etnia (THURSBY; JUGE, 2017). Notadamente comum nos países ocidentais, com prevalência variando entre 7,6 e 9,4%(CRISCITIELLO et al., 2016; LI et al., 2015), a taxa de prevalência das DAIs vem aumentando nas últimas décadas, em todo o mundo, especialmente em países industrializados como os Estados Unidos. Estima-se que as DAIs impactem cerca de 7% da população mundial (SOMERS, 2020) e de 5 a 8% dos americanos, a depender de quais doenças são incluídas nos estudos (ROBERTS; ERDEI, 2020), gerando grande impacto na qualidade de vida, além de gastos com saúde pública. Esse aumento parece ser resultado da globalização que difundiu mudanças de hábitos alimentares e estilo de vida, não permitindo mais que se associe as DAIs apenas ao mundo ocidental mais desenvolvido (SHAPIRA; AGMON-LEVIN; SHOENFELD, 2010).

Há, aproximadamente, 100 diferentes tipos de DAIs, algumas são órgão-específicas, como cirrose biliar primária e doença autoimune da tireoide, como a doença de Graves e tireoidite de Hashimoto, enquanto outras refletem uma variedade de disfunções imunológicas envolvendo múltiplos órgãos, como o lúpus eritematoso sistêmico (WANG; WANG; GERSHWIN, 2015). As teorias atuais sugerem que o desenvolvimento da autoimunidade ocorra devido a predisposição genética, somada à fatores ambientais que, juntos, desencadeiam perda da tolerância imunológica e autorreatividade (WANG; WANG; GERSHWIN, 2015). Em relação à predisposição genética, algumas doenças são monogênicas, enquanto a maioria são poligênicas, e, estudos mostram que proteínas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) desempenham importante papel no desenvolvimento da autoimunidade (LU, 2013). Já em relação aos fatores ambientais, ainda é incerta a existência de fatores comuns a todas as DAIs, mas há alguns fatores já estabelecidos por influenciarem em uma ou várias doenças autoimunes, como solventes, mercúrio, pesticidas, tabagismo, fatores nutricionais, processos infecciosos e alterações da microbiota (KHAN; WANG, 2016, 2020).

1.1 Tireoidite de Hashimoto

O hipotireoidismo afeta aproximadamente 5% da população mundial, com estimativa da existência de outros 5% não diagnosticados, sendo que destes pacientes diagnosticados, 99% apresentam hipotireoidismo primário (CHIOVATO; MAGRI; CARLÉ, 2019). Mundialmente, a deficiência de iodo é a principal causa de disfunções tireoidianas, incluindo o hipotireoidismo. Entretanto, em regiões com suficiência de iodo, como no Brasil, a tireoidite de Hashimoto (TH) é a principal causa de distúrbios dessa glândula, acometendo em especial mulheres adultas e idosos (TAYLOR et al., 2018). A TH foi descrita em 1912, por Hashimoto, a partir da percepção de alterações crônicas na tireoide de quatro pacientes, caracterizadas por infiltração linfocítica difusa, fibrose e atrofia parenquimatosa, além de alterações eosinofílicas em células acinares (DAYAN; DANIELS, 2013). Atualmente, a TH é considerada a doença autoimune e endócrina mais comum, com grande prevalência ao redor do mundo (MCLEOD; COOPER, 2012; RALLI et al., 2020; TAYLOR et al., 2018), sendo que a China, um dos maiores centros de urbanização do mundo, apresentou aumento expressivo das DAIs da tireoide nos últimos anos, especialmente da tireoidite de Hashimoto (CHEN et al., 2021).

Clinicamente, a TH inicia-se com um alargamento gradual da glândula tireoide (bócio difuso) podendo ser acompanhado por sintomas leves de tireotoxicose pela elevação inicial transitória (semanas a meses) dos hormônios tireoidianos. A segunda fase da doença é o hipotireoidismo subclínico, caracterizado pela elevação do hormônio estimulante da tireoide (TSH) com tiroxina (T4) e tri-iodotironina (T3), ainda dentro da faixa de normalidade (RAGUSA et al., 2019). Habitualmente, com o decorrer da doença, ocorre progressão para a terceira fase, o hipotireoidismo clinicamente manifesto, uma síndrome clínica ocasionada por síntese/secreção insuficiente ou ação inadequada dos hormônios tireoidianos nos tecidos, resultando em lentificação generalizada do metabolismo, com sinais e sintomas inespecíficos em diferentes sistemas, como cardiovascular, pulmonar, hematopoiético, gastrointestinal, urinário, reprodutivo, neuropsiquiátrico, esquelético, pele e anexos.

Dentre os sintomas mais comuns estão cansaço, intolerância ao frio, dispneia aos esforços, ganho de peso, alteração da memória, constipação, depressão, ressecamento da pele e queda de cabelo, podendo ocorrer, em casos mais graves, deposição de mucopolissacarídeos na derme, gerando o mixedema, um tipo de edema sem presença de cacos (RAGUSA et al., 2019). Laboratorialmente, a TH é

definida pela presença dos anticorpos anti-tireoperoxidase (anti-TPO) e/ou anti-tireoglobulina (anti-Tg) e, com a evolução para o hipotireoidismo, passa a apresentar altos níveis de TSH e baixos de T4 livre. A dosagem sérica de TSH é o exame mais sensível para detecção de disfunções da glândula tireoide, exceto em casos de doença hipofisária ou hipotalâmica, podendo diagnosticar casos ainda na forma subclínica da doença (RAGUSA et al., 2019; RALLI et al., 2020).

Estudos recentes mostraram associação de fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento da TH, ou seja, é necessária a existência de um defeito imunológico em indivíduos suscetíveis associado a fatores externos (BOSSOWSKI et al., 2013; RAGUSA et al., 2019; RALLI et al., 2020), fato corroborado por evidências epidemiológicas como prevalência de 20-30% entre irmãos e taxa de concordância de 29% a 55% em gêmeos monozigóticos, comparado aos 0-7% em gêmeos dizigóticos (RAGUSA et al., 2019). Em relação à susceptibilidade genética, foram detectados genes que codificam proteínas envolvidas em fases específicas da resposta imune, como tolerância periférica (Foxp3), apresentação antigênica (genes HLA), ativação/inibição de células T (CTLA-4, PTPN22) e ativação de células B (FCRL3), enfatizando a importância genética na imunopatogênese da TH (RAGUSA et al., 2019). A epigenética também tem sido relatada como possível fator de contribuição na doença autoimune da tireoide, mais precisamente a hipometilação do promotor do gene ICAM-1 (SHALABY et al., 2019).

Fatores ambientais predisponentes para a TH incluem consumo excessivo de iodo (DUNTAS, 2015), gravidez, hormônios sexuais e exposição à radiação (RAGUSA et al., 2019), deficiência de selênio e vitamina D (DUNTAS, 2015; PIROLA et al., 2020), infecção por *Helicobacter pylori* (SHMUELY; SHIMON; GITTER, 2016), infecções virais, como hepatite C (RAGUSA et al., 2019), tabagismo (SAWICKA-GUTAJ et al., 2014), poluentes e agentes químicos, além de fatores como estresse, idade e clima (BRIX; KYVIK; HEGEDU, 2000; KHAN; WANG, 2016; QI et al., 2017; RAGUSA et al., 2019). Alterações na microbiota intestinal têm sido, também, investigadas como importante fator ambiental capaz de alterar o *status* saudável do hospedeiro, colaborando para o desenvolvimento de doenças. A interação entre fatores genéticos e ambientais permite a apresentação de antígenos tanto por células apresentadoras de antígenos do sistema imune (monócitos, células dendríticas e células B), quanto pelos próprios tireócitos, gerando ativação de vias de resposta imune Th1 e/ou Th17 (RAGUSA et al., 2019). Na ausência de uma

resposta imune reguladora eficiente, principalmente de células T reguladoras, ocorre um desequilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias, culminando em um processo autoimune na tireoide(VIRILI; STRAMAZZO; CENTANNI, 2021).

Alterações na diversidade e função da microbiota intestinal, a chamada disbiose, têm sido associadas ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares (XU et al., 2020a), neurológicas (MAIUOLO et al., 2021),alérgicas (MURDACA et al., 2021), obesidade (HERNÁNDEZ-CEBALLOS; CORDOVA-GALLARDO, 2021), doença inflamatória intestinal (AXELRAD et al., 2021), diabetes tipo 1 (SNETHLAGE et al., 2021),esclerose múltipla (NOTO; MIYAKE, 2020),artrite reumatoide (XU et al., 2020b), assim como nas doenças associadas à tireoide, incluindo a doença de Graves e TH(CAYRES et al., 2021; FRÖHLICH; WAHL, 2019; VIRILI et al., 2018).

1.2 Microbiota intestinal e sistema imune

O corpo humano abriga mais de 10^{13} microrganismos, com uma proporção de número de bactérias no corpo humano ($3,8 \times 10^{13}$) para o número de células humanas nucleadas ($0,3 \times 10^{13}$) de 10:1 (SENDER; FUCHS; MILO, 2016), sendo que, aproximadamente 70% destes podem ser encontrados como parte da comunidade microbiana comensal que habita principalmente o trato gastrointestinal (TGI) (VIRILI et al., 2018). A microbiota intestinal adulta, em condições de eubiose/equilíbrio é composta principalmente por bactériaspertencentes aos filos Firmicutes e Bacteroidetes, sendo mais prevalentesos microrganismos pertencentes ao primeiro filo, englobando principalmente espécies como *Faecalibacteriumprausmtzii*, *Eubacteriumrectale* e espécies de *Roseburia*. O filo Bacteroidetes é o segundo mais populoso no intestino humano, com predomínio dos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*. Outros gêneros também podem ser encontrados, como, por exemplo, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcuse* *Escherichia*(ARGENIO; SALVATORE, 2015; MARIAT et al., 2009).Além das bactérias, também são encontrados alguns fungos, vírus e bacteriófagos, porém, em menor quantidade quando comparados às bactérias simbióticas (ARGENIO; SALVATORE, 2015).

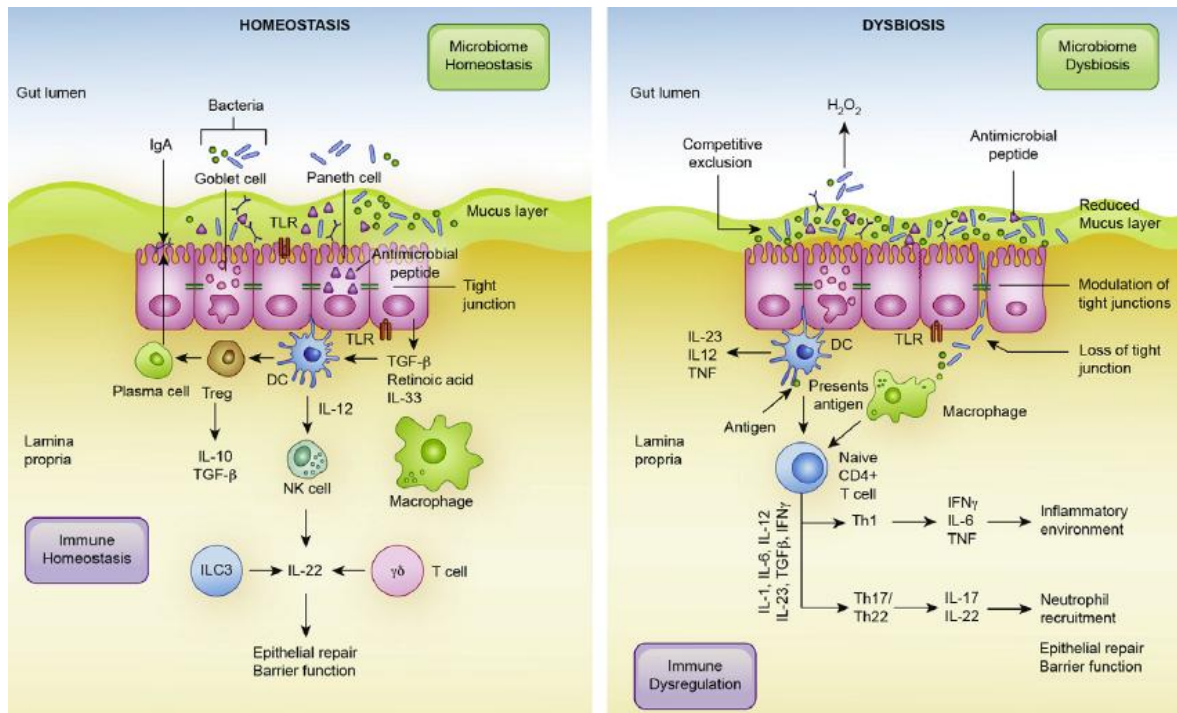
Há relatos na literatura da existência de microrganismos na vida intrauterina, entretanto, a real expansão da microbiota ocorre a partir do nascimento, sendo que o perfil da microbiota desenvolvida varia de acordo com o tipo de parto, microbiota materna, aleitamento ou fórmula nos primeiros anos de vida e o ambiente ao qual a

criança é exposta (TAMBURINI et al., 2016). Por volta dos três anos de idade, a composição de microrganismos se torna relativamente estável, com uma composição muito semelhante a que essa criança apresentará na vida adulta, embora ainda possa ser fortemente influenciada por diversos fatores, como dieta, exposição ambiental, uso de antibióticos e outros medicamentos, além de fatores genéticos (TAMBURINI et al., 2016).

A comunidade microbiana do TGI é constantemente exposta a fatores externos, podendo apresentar oscilações transitórias em sua composição e função mas que, na ausência de perturbações graves, retorna ao seu estado inicial devido à capacidade de resiliência e resistência, apresentando o chamado equilíbrio dinâmico. O termo resistência se refere a capacidade da microbiota intestinal permanecer inalterada durante uma perturbação enquanto resiliência se refere ao tempo em que a comunidade microbiana leva para recuperar sua composição funcional ou taxômica após um agravo (SOMMER et al., 2017). Perturbações externas constantes podem levar a perda desse estado de equilíbrio dinâmico, gerando um estado mal definido da comunidade microbiana intestinal, conhecido por disbiose intestinal, tipicamente relacionado a perda de diversidade e inflamação espontânea na barreira mucosa, já relacionado a inúmeras doenças humanas (LIN; ZHANG, 2017; SOMMER et al., 2017).

A disbiose intestinal interfere na homeostase da comunidade bacteriana no TGI, podendo ocasionar redução de microrganismos comensais benéficos e expansão e estabelecimento de microrganismos patogênicos (CARDING et al., 2015). Evidências sugerem uma relação causal entre a disbiose intestinal e várias DAs como lúpus eritematoso sistêmico (CHOI et al., 2020), esclerose múltipla (NOTO; MIYAKE, 2020), artrite reumatoide (SORINI et al., 2018; ZHANG et al., 2015), doença inflamatória intestinal (MATSUOKA; KANAI, 2015, HIDALGO-CANTABRANA; G, 2019, OLSHAN et al., 2020). Alguns poucos estudos evidenciaram a relação da microbiota intestinal no desenvolvimento da TH (RALLI et al., 2020; VIRILI; STRAMAZZO; CENTANNI, 2021), mas seu papel ainda não está bem estabelecido. Na **Figura 1** podemos observar as interações da microbiota intestinal e sistema imune e as condições de homeostase intestinal, conhecida por eubiose, e a desregulação deste equilíbrio, a disbiose intestinal.

Figura 1: Representação das condições de eubiose e disbiose intestinal.



Fonte: COSTELLO et al. The intestinal microbiome in human disease and how it relates to arthritis and spondyloarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2015, 29(2), 202-12.

A comunidade microbiana intestinal é dinâmica e se adaptou a colonizar o TGI, possibilitado por algumas características fundamentais como a existência de um arsenal enzimático capaz de utilizar os nutrientes disponíveis, capacidade de escapar de bacteriófagos e do sistema imunológico e resistência às tensões físicas e químicas do intestino (ADAK; KHAN, 2019). Devido ao seu grande conteúdo genômico e complemento metabólico, a microbiota intestinal fornece uma gama de propriedades benéficas ao hospedeiro. Algumas das funções mais importantes desses microrganismos estão pautadas em auxiliar a manutenção da integridade de barreira da mucosa, fornecer nutrientes e proteger contra patógenos. Além disso, a interação entre a microbiota comensal e o sistema imune de mucosa é crucial para a função imunológica adequada (THURSBY; JUGE, 2017). A microbiota está ainda, envolvida na modulação de mudanças epigenéticas pela produção de substâncias dependentes da metabolização de componentes da dieta, como vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), ou independentes, através dos lipopolissacarídeos e peptideoglicanos e, também, pela capacidade de inibir ou ativar enzimas que influenciam no *status* epigenético do hospedeiro (VIRILI et al., 2018).

O ser humano e a microbiota intestinal têm coevoluído mecanismos de benefício mútuo, incluindo formas de se defenderem contra a invasão de microrganismos patogênicos, aliado a mecanismos para manter o equilíbrio, minimizando respostas

pró-inflamatórias desnecessárias aos organismos comensais, fato que torna o sistema imune fortemente influenciado pela microbiota (FUNG; OLSON; HSIAO, 2017). Para proteger seu nicho ecológico, a microbiota reforça a imunidade de barreira e, portanto, sua própria contenção, minimizando o contato entre os microrganismos e a lâmina própria. Essa segregação é realizada por ação conjunta de células epiteliais, muco, IgA, peptídeos antimicrobianos e células do sistema imune (MACPHERSON et al., 2009). A camada epitelial intestinal e o muco ali presentes constituem a primeira barreira física de proteção contra uma eventual invasão tecidual por agentes patogênicos do lúmen intestinal, e as células dessa barreira produzem moléculas antimicrobianas, como as defensinas, que promovem lise bacteriana. Os anticorpos IgA se ligam e agregam bactérias, evitando aderência à mucosa e posterior estabelecimento das infecções (NAVARRO et al., 2016). Existem ainda os linfócitos T intraepiteliais que, por estarem em contato direto com antígenos do lúmen intestinal, participam da resposta imune efetora contra microrganismos patogênicos e também em processos imunorreguladores na mucosa gastrointestinal. Além disso, existem outras subpopulações de linfócitos T, localizados no interior dos tecidos linfoides associados ao TGI (GALT), como as placas de Peyer e folículos linfoides difusos ao longo da lâmina própria do intestino (NAVARRO et al., 2016). Na resposta imune adaptativa contra os antígenos entéricos, o linfócito T virgem é ativado pela célula apresentadora de antígeno e se diferencia em célula efetora do tipo Th1 ou Th17 capaz de entrar na circulação sistêmica e retornar para o intestino auxiliando no controle/eliminação de patógenos (MESQUITA et al., 2010).

As células T efectoras do subgrupo Th1 são os principais agentes na defesa contra microrganismos que são ingeridos por fagócitos e o Th17 está principalmente envolvido no recrutamento de neutrófilos e na indução da inflamação, reações críticas para destruir bactérias extracelulares e fungos, além de contribuir significativamente para as doenças inflamatórias (RIBEIRO; WANDERLEY, 2010). As bactérias comensais podem induzir respostas de células TCD4⁺ pró e anti-inflamatórias por diferentes mecanismos. Por exemplo, bactérias filamentosas segmentadas induzem a expansão de células Th17, produtoras de IL-17, enquanto a produção de AGCCs pelas bactérias residentes no cólon pode induzir a diferenciação de Tregs (SORINI et al., 2018), inibir desacetilação de histonas e reduzir produção de IFN- γ (VIRILI et al., 2018). Acredita-se, portanto, que o estreito

equilíbrio entre células T pró-inflamatórias e células Tregs desempenha um papel crucial na manutenção da relação entre hospedeiro e a microbiota intestinal.

1.3 Microbiota e permeabilidade intestinal

A superfície das mucosas é revestida por células epiteliais. O epitélio intestinal é composto por uma camada única de células, predominantemente de enterócitos. Os enterócitos são células colunares, seletivamente permeáveis, permitindo a absorção de nutrientes e a secreção de resíduos (BUCKLEY; TURNER, 2018). Em condições fisiológicas, mais de 90% dos antígenos absorvidos, passam pela via transcelular e são degradados, pelos lisossomos, em pequenos peptídeos não imunogênicos. O restante cruza o epitélio através da via paracelular na forma de proteínas intactas ou peptídeos parcialmente digeridos, rigidamente regulado por meio da modulação das *tight junctions* que leva à tolerância antigênica (STURGEON; FASANO, 2016). O epitélio intestinal, portanto, desempenha um papel central na regulação de interações entre o sistema imunológico de mucosa e o conteúdo luminal, que incluem antígenos da dieta, a microbiota intestinal e inúmeros patógenos (KINASHI; HASE; JORDAN, 2021).

Os enterócitos são conectados fortemente uns aos outros por moléculas de adesão conhecidas por *tight junctions*, mantidas por uma complexa rede de interação proteica, que auxilia na manutenção da integridade de barreira (BUCKLEY; TURNER, 2018), reduzindo a permeabilidade paracelular. A perda da função de barreira, secundária à regulação positiva da zonulina, o único modulador fisiológico conhecido das *tight junctions* (STURGEON; FASANO, 2016), pode culminar no aumento da permeabilidade intestinal consequente influxo descontrolado de antígenos dietéticos e microrganismos, gerando uma condição denominada síndrome do intestino permeável ou *leaky gut*. Evidências recentes sugerem que mudanças na composição da microbiota intestinal e do metabolismo coincidem com o aumento da permeabilidade intestinal (KARL et al., 2017). É fácil notar essa relação, visto que produtos metabólicos da microbiota intestinal podem mediar a interlocução entre células epiteliais e imunológicas, enquanto as células epiteliais reforçam a barreira, reduzindo a permeabilidade e separando as células imunes do hospedeiro da microbiota (VIRILI; STRAMAZZO; CENTANNI, 2021).

Na síndrome do intestino permeável pode ocorrer a passagem de toxinas, antígenos e bactérias do lúmen para a lâmina própria e, consequentemente,

sua disseminação para todo o corpo ao atingir a corrente sanguínea, iniciando respostas inflamatórias intestinais e extra-intestinais (MU et al., 2017). A ativação da zonulina e o aumento de sua concentração sérica têm sido relacionados a várias doenças como diabetes tipo 2 (SIRIN et al., 2021; ZHANG et al., 2014), doenças do espectro autista (ESNAFOGLU et al., 2017; ROSE; YANG; SERENA, 2018), ansiedade e depressão (STEVENS et al., 2018), sepse (KLAUS et al., 2013; OAMI; COOPERSMITH, 2021) e DAIs, incluindo a TH (AYDIN; YILDIZ; TOPAL, 2020; LERNER; MATTHIAS, 2015). Alguns estudos em pacientes com TH demonstraram alterações morfológicas ultraestruturais nos enterócitos do duodeno distal e aumento nos espaços entre as microvilosidades dos enterócitos, mostrando possível efeito do aumento da permeabilidade intestinal na patogênese da TH (REMBACKEN, 2004).

1.4 Relação microbiota intestinal e tireoidite de Hashimoto

Vários estudos têm sido conduzidos a fim de esclarecer a relação entre disbiose intestinal e DAIs e, com isso, múltiplos mecanismos que explicam a forma como infecções podem desencadear a autoimunidade já foram descritos, dentre eles: mimetismo molecular, ativação espectadora, espalhamento de epítomos devido à lise direta de tecido por persistência do patógeno (ERCOLINI; MILLER, 2009). A principal hipótese baseia-se em mecanismos de mimetismo molecular que correspondem ao surgimento de clones autorreativos de linfócitos B e T resultantes de uma resposta cruzada a autoantígenos homólogos a estruturas bacterianas ou virais (ROJAS et al., 2018). Estudos mostraram homologia entre sequências de aminoácidos da tireoperoxidase e tireoglobulina, importantes proteínas da tireoide e proteínas de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus plantarum* (KISELEVA et al., 2011), reforçando o possível envolvimento de bactérias no surgimento da TH. Outro conceito relatado como desencadeante de autoimunidade é a disseminação de epítomos, que corresponde ao desenvolvimento de resposta imune a antígenos endógenos, secundária à liberação de autoantígenos durante uma resposta inflamatória a um patógeno persistente, que causou danos ao tecido hospedeiro (CORNABY et al., 2014). A disseminação pode envolver o aumento do número de epítomos reconhecidos no mesmo autoantígeno (intramolecular) e posterior reconhecimento de autoantígenos adicionais (intermoleculares) (CORNABY et al., 2014). A ativação espectadora descreve a ativação indireta ou inespecífica de células autoimunes devido ao ambiente inflamatório existente durante a infecção.

Pode ocorrer um efeito dominó em que a ativação inespecífica de um dos braços do sistema imunológico leva à ativação de outros. Por fim, outro mecanismo descrito é o processamento e apresentação de antígenos crípticos que, em contraste com os determinantes antigênicos dominantes, os antígenos crípticos subdominantes são normalmente invisíveis ao sistema imunológico mas podem se tornar visíveis a partir do aumento da produção de proteases e do processamento diferencial de autoepítomos liberados pelas células apresentadoras de antígenos devido ao ambiente inflamatório pós-infeccioso (ERCOLINI; MILLER, 2009). Além disso, outro fator envolvido tem relação com produtos microbianos, como os AGCCs, que servem como fonte energética aos enterócitos e, junto aos hormônios tireoidianos, aumentam a diferenciação e fortalecem as junções intercelulares dos enterócitos (FRÖHLICH; WAHL, 2019), tornando o aumento da permeabilidade intestinal um forte componente no desencadeamento da TH, pois, alterações da microbiota levariam a alterações na produção de AGCCs, que resultariam em perda de integridade das junções intercelulares dos enterócitos (MU et al., 2017), expondo ao meio interno microrganismos que deveriam estar restritos ao TGI.

Os mecanismos que ligam a disbiose intestinal a DAIs têm sido estudados de forma mais intensa em doenças como diabetes, esclerose múltipla, artrite reumatoide e lupus eritematoso sistêmico, mas nos últimos anos, alterações na microbiota tem sido relatadas em pacientes com TH (VIRILI et al., 2018).

Há diferentes ciclos envolvendo microbiota e TH. Região geográfica, dieta (como o consumo de iodo), obesidade, idade, hormônios sexuais e a presença de outra doença autoimune influenciam a composição da microbiota intestinal. Ao mesmo tempo, a microbiota esta relacionada à presença de doenças autoimunes, influencia os níveis de estrógeno e iodo e tem um papel na obesidade, além de influenciar no ciclo enterohepático de hormônios tireoidianos e na bioviabilidade da levotiroxina (FRÖHLICH; WAHL, 2019).

Até o momento, poucos estudos foram realizados com o intuito de entender a relação entre microbiota intestinal e TH. Alguns estudos realizados na China, demonstraram a existência de disbiose intestinal em pacientes com TH (ISHAQ et al., 2017), e evidenciaram aumento de *Eubacterium*, *Fusicatenibacter*, *Blautia* e *Romboutsia* e diminuição de *Prevotella*, *Bacteroides* e *Fecalibacterium* em pacientes com TH (ZHAO et al., 2018). Mais recentemente, outro estudo detectou menor riqueza e diversidade bacteriana nos pacientes com TH em comparação aos

controles (LIU et al., 2020). Entretanto, sabe-se que a composição da microbiota é fortemente influenciada por fatores externos como hábitos alimentares, estilo de vida e localização geográfica (THURSBY; JUGE, 2017) e, portanto estudos avaliando a microbiota de pacientes com TH no Brasil são necessários.

Além disso, levando em consideração que a microbiota intestinal desempenha papel importante na saúde e na doença e que a disbiose intestinal foi identificada em várias doenças autoimunes, nossa hipótese é que pacientes com TH apresentam disbiose intestinal, e que estas alterações da microbiota possam ter correlação com a concentração sérica de citocinas inflamatórias, com os hábitos alimentares e marcadores de permeabilidade intestinal.



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a disbiose intestinal em pacientes com tireoidite de Hashimoto e correlacionar os resultados aos dados clínicos, hábitos alimentares e concentrações séricas de citocinas inflamatórias e zonulina.

2.1 Objetivos específicos

1. Reunir os dados clínico-demográficos de pacientes com tireoidite de Hashimoto.
2. Avaliar a frequência de consumo alimentar em pacientes com tireoidite de Hashimoto e indivíduos controles;
3. Identificar a presença de disbiose em pacientes com tireoidite de Hashimoto;
4. Realizar a dosagem sérica de citocinas em pacientes com TH e controles;
5. Realizar a dosagem sérica de zonulina em pacientes com TH e controles;
6. Correlacionar os resultados da microbiota intestinal aos dados clínicos, hábitos alimentares e concentrações séricas de citocinas e zonulina.



Metodologia

3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento, considerações éticas e instituições envolvidas

Este estudo observacional do tipo transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, processo número 1.359/2017 (Anexo A). Os pacientes com tireoidite de Hashimoto (TH) e indivíduos controles assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B) e responderam ao questionário estruturado sobre frequência de consumo alimentar, elaborado por nutricionistas do Hospital de Câncer de Barretos (Anexo C).

O trabalho foi uma colaboração do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas com a Faculdade de Ciências da Saúde Dr. Paulo Prata, Ambulatório Médico de Especialidades de Barretos (AME), Ambulatório Regional de Especialidades (ARE-I) de Barretos, Hospital de Câncer de Barretos e BiomeHub Pesquisa e Desenvolvimento de Florianópolis.

3.2 Casuística, critérios de exclusão e coleta das amostras

No ambulatório médico de especialidades, pacientes com idade igual ou superior a 18 anos foram diagnosticados com TH, segundo dosagens de hormônio estimulante da tireoide (TSH), tiroxina livre (T4), anticorpos antitireoperoxidase (anti-TPO) e antitireoglobulina (anti-Tg), e selecionados com o auxílio da endocrinologista Larissa Donadel Barreto Sargentini para participação no estudo. Os dados clínicos dos pacientes, tais como níveis de TSH, T4 livre, anticorpos anti-TPO, anti-Tg, tempo de doença e tratamento medicamentoso foram registrados. Indivíduos saudáveis, com idade igual ou superior a 18 anos, sem histórico familiar de TH e outras doenças autoimunes, foram incluídos no estudo como grupo controle.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos incluíram cirurgias do trato gastrointestinal, doenças inflamatórias intestinais, presença de diarreias crônicas infecciosas ou não-infecciosas nos últimos 15 dias, uso de medicamentos, como antibióticos, laxantes, anti-inflamatórios, imunossupressores e vacinação nos últimos 30 dias.

Após assinarem o TCLE, os indivíduos responderam o questionário sobre hábitos de vida e alimentar. O questionário foi aplicado pelo pesquisador responsável de forma clara e eventuais dúvidas foram sanadas durante a aplicação.

As amostras de fezes foram coletadas pelos próprios indivíduos em frasco coletor universal, devidamente identificado, e foram congeladas a -20°C para posterior

extração de DNA. O DNA bacteriano foi extraído utilizando kit comercial e a caracterização da microbiota foi realizada por PCR em tempo real e sequenciamento da região 16S do RNA ribossômico. Amostras de sangue periférico foram coletadas por profissionais de saúde treinados e as amostras de soro foram congeladas para posterior dosagem de citocinas e zonulina por citometria de fluxo e ensaio imunoenzimático (ELISA), respectivamente.

3.3 Extração de DNA e avaliação da qualidade do DNA extraído

O DNA foi extraído a partir de 200 mg de fezes das amostras de pacientes e controles utilizando o *QIAampFast DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN Inc., Hilden, Germany), de acordo com o protocolo do fabricante. O rendimento esperado, de acordo com o fabricante é de aproximadamente 15-60 µg e a concentração de DNA esperada de 75-300 ng/µL. Para verificação da qualidade do DNA bacteriano foi realizada amplificação das regiões V3/V4 por PCR convencional. Para esta reação utilizamos um *mix* contendo a enzima *KappaHifi Hot Start* (12,5 µL), *primers forward* e *reverse* que incluem as regiões V3 e V4 do 16S (2,5 µL de cada um/concentração de 2,0 µM), água *DNase-free* (6,5 µL) e DNA de interesse (1 µL), totalizando um volume final de 25 µL por reação. A ciclagem consistiu em 35 ciclos de 95°C por 3 minutos, 98°C por 20 segundos e 40°C por 30 segundos e, para finalizar, um ciclo de 72°C por 5 minutos. O tamanho do produto amplificado desejado era de aproximadamente 500 pares de bases (pb). Os produtos de amplificação (1 µL de cada produto de PCR) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em solução tampão contendo 40 mM de Tris-acetato pH 8,0; 1mM de EDTA (solução tampão TAE) por 30 min a 90 V constantes. Para visualização das bandas foi utilizado o intercalante de DNA *GelRed* (Biotium). As amostras que apresentaram boa qualidade e concentração foram utilizadas para as etapas subsequentes.

3.4 Caracterização da microbiota intestinal por PCR tempo real

Os grupos de bactérias nas amostras fecais foram caracterizados por PCR em tempo real (qPCR) utilizando *primers* específicos para *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale*, *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Roseburia* (**Tabela 1**). As reações foram realizadas utilizando 7,5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 4,0 µL de água ultrapura, 1,0 µL dos *primers forward* e *reverse* a 2 µM e 1,5 µL de DNA,

diluído para 5 ng, totalizando 15 µL de volume final. Para a quantificação relativa, o número de cópias de DNA bacteriano amplificados para *Bac*, *Bif*, *Ccoc*, *CIEub*, *Clept*, *Lac*, *Prev*, e *Ros* foram normalizados pelo número de cópias de DNA do *primer* Universal (*Univ*), e a proporção de bactérias calculada a partir dos valores de *Cyclethreshold* (Ct) e expressos em unidades relativas de expressão (URE), utilizando como baseline o grupo controle.

Tabela 1: Sequência de *primers* para grupos bacterianos e tamanho dos produtos.

Grupo/subgrupo	Sequência dos primers (5' - 3')	Produto da PCR (pb)
<i>Bacteroides</i> (<i>Bac</i>)	F: GAAGGTCCCCCACATTG R: CAATCGGAGTTCTTCGTG	410
<i>Bifidobacterium</i> (<i>Bif</i>)	F: GCGTGCTTAACACATGCAAGTC R: CACCCGTTTCCAGGAGCTATT	126
<i>Clostridium coccooides</i> (<i>Ccoc</i>)	F: AAATGACGGTACCTGACTAA R: CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	440
<i>Clostridium coccooides-Eubacterium rectale</i> (<i>CIEub</i>)	F: CGGTACCTGACTAAGAAGC R: AGTTTYATTCTTGCGAACG	429
<i>Clostridium leptum</i> (<i>Clept</i>)	F: GCACAAGCAGTGGAGT R: CTTCTCCGTTTTGTCAA	239
<i>Lactobacillus</i> (<i>Lac</i>)	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG	341
<i>Prevotella</i> (<i>Prev</i>)	F: CACCAAGGCGACGATCA R: GGATAACGCCYGGACCT	283
<i>Roseburia</i> (<i>Ros</i>)	F: TACTGCATTGGAAACTGTCTG R: CGGCACCGAAGAGCAAT	230
Universal (<i>Univ</i>)	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.

3.5 Sequenciamento das regiões V3/V4 do 16S bacteriano e análises

A quantidade de DNA foi determinada no 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 µL do DNA bacteriano, 5 µL de cada um dos *primers* e 12,5 µL de mix contendo a enzima 2x KAPA HiFi HotStart 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 IlluminaMiSeq System, através da colaboração com pesquisadores e bioinformatas da BiomeHub Pesquisa e Desenvolvimento de Florianópolis.

Os arquivos fastq oriundos do sequenciamento foram filtrados em relação à qualidade e os *primers* e adaptadores trimados. Apenas sequências com o tamanho esperado de 283pb foram utilizadas para análise. Após esse filtro, *reads* com sequências idênticas são agrupadas em *oligotypes* e analisadas com o software Deblur (AMIR et al., 2017) para remoção de possíveis erros de amplificação/sequenciamento. Após, o VSEARCH (ROGNES et al., 2016) foi utilizado para a remoção de *amplicons* quiméricos. O agrupamento das sequências com 100% de identidade em *oligotypes* proporciona maior resolução para os resultados, permitindo uma análise de ASVs (*amplicon sequencing variants*), também denominados de sOTUS (KNIGHT, 2018). Um filtro adicional foi implementado para remoção de *oligotypes* com frequência abaixo de 0.2% em relação ao total de *reads* da amostra. Os *oligotypes* que passarem por este sistema de filtragem são então direcionados para classificação taxonômica dos microrganismos utilizando a ferramenta BLAST em um banco de dados de genomas de referência bacterianos do NCBI. Assim, as taxonomias são atribuídas aos *oligotypes* utilizando o BLAST e um algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*). Se mais de uma referência taxonômica distinta puder ser atribuída ao *oligotype* com similaridade equivalente, o pipeline atribui ao *oligotype* a taxonomia de menor resolução não-ambígua possível (gênero, família, ordem, classe, filo ou mesmo reino), de acordo com alguns limites de similaridade previamente estabelecidos (YARZA et al., 2014).

3.6 Dosagem sérica de citocinas por citometria de fluxo

Amostras de sangue periférico (8,5 mL) de pacientes com TH e controles foram colhidas em tubo gel com ativador de coágulo para a separação do soro. Após a coleta, a amostra foi incubada a temperatura ambiente por uma hora para retração do coágulo e depois centrifugada a 3.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado em freezer -20°C até o momento da

quantificação de citocinas. O kit CBA Flex utilizado, *Human Th1/Th2/Th17 Kit* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), possibilita a detecção e quantificação dos níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF. Ao final do experimento, as amostras foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos, o *pellet* foi ressuspenso em 300 mL de tampão de lavagem para leitura do resultado em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, CA, EUA) e a análise foi realizada com o auxílio do software *BDFCAP array*™. Os resultados foram expressos através da conversão da intensidade média de fluorescência em pg/mL.

3.7 Dosagem sérica de zonulina por ELISA

As amostras de soro foram utilizadas para a quantificação da zonulina por meio do kit comercial *Human Zonulin ELISA Kit* (Elabscience, Bethesda, MD, USA). Padrões e amostras foram adicionados a placas pré-revestidas com anticorpos específicos para zonulina humana e incubadas por 1 h a 37°C. Em seguida, foram adicionados anticorpos de detecção biotinilados, específicos para a zonulina humana, e conjugados avidina-peroxidase (HRP), incubados por 30 minutos. Moléculas não ligadas e livres foram removidas após lavagens. A solução de substrato foi adicionada a cada poço e incubada por 15 minutos, quando então, a reação foi bloqueada pela solução de parada. A densidade óptica foi medida em espectrofotômetro a 450 nm. A curva padrão foi construída e as concentrações de zonulina foram calculadas convertendo-se a densidade óptica em ng/mL.

3.8 Análise estatística

As comparações entre os hábitos alimentares e estilo de vida foram realizadas pelo teste Qui-quadrado de Pearson. A comparação entre as unidades relativas de expressão de *Bac*, *Bif*, *Ccoc*, *CIEub*, *Clept*, *Lac*, *Preve* e *Rosent* entre pacientes e controles foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Para a comparação das concentrações de citocinas e zonulina entre pacientes e controles foi utilizado teste paramétrico com correção de *Welch*, uma vez que estes dados apresentaram distribuição Gaussiana. As correlações dos dados da microbiota com os dados clínicos, dieta, citocinas e zonulina foram realizadas pela correlação de *Spearman*. As análises foram realizadas utilizando-se os softwares IBM SPSS Statistics (versão 20) e Prism (versão 9.1.2). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Todas as análises estatísticas do sequenciamento foram realizadas no R (v. 4.0.3) e os pacotes phyloseq (v. 1.34.0) e tidyverse (v. 1.3.0). A análise de beta diversidade empregou o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, calculado a partir das proporções observadas para cada *oligotype*, e o teste PERMANOVA (vegan, v. 2.5.7) para inferir sobre associação multivariada com agrupamentos amostrais. A alfa diversidade foi medida por riqueza e índice de Shannon, ambos computados a partir das *reads* brutas dos *oligotypes*, e testada via teste de Wilcoxon. A análise de abundância diferencial foi realizada por meio do pacote DESeq2 (v. 1.30.1). Correlações entre proporções bacterianas observadas e níveis de citocinas e indicadores de hábitos alimentares foram analisadas por meio do coeficiente Rho de Spearman. O ajuste dos valores de *P* para controle de taxa de falsas descobertas em 5% foi realizado por meio do procedimento de Benjamini-Hochberg.



RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Descrição do grupo de pacientes com TH e grupo controle

O grupo de pacientes com TH está composto por 40 indivíduos, sendo 36 do sexo feminino (%) e 4 do sexo masculino (%), com idades entre 23 e 82 anos (média e desvio padrão: $48,9 \pm 13,2$ anos). Em relação à etnia dos pacientes, 31 (77,5%) consideram-se brancos, de origem caucasiana, 6 (15%) consideram-se pardos ou mulatos e 3 (7,5%) declararam-se negros, sendo os dois últimos considerados afrodescendentes (22,5%). Trinta e dois pacientes (80%) fazem uso de levotiroxina e oito relataram não fazer a reposição hormonal (20%). Os dados demográficos e clínicos foram registrados e estão representados na **Tabela 2**.

O grupo controle está composto por 53 indivíduos, com idades entre 18 e 79 anos (média e desvio padrão: $45,6 \pm 16,7$ anos), sendo 44 indivíduos do sexo feminino (83%) e nove do sexo masculino (17%). Em relação à etnia dos controles, 43 (81,1%) são de origem caucasiana, 7 (13,2%) afrodescendentes, 2 (3,8%) asiáticos e 1 (1,9%) de origem indígena.

4.2 Descrição dos hábitos alimentares e estilo de vida

Tendo em consideração a frequência de consumo alimentar diário, 40% dos pacientes com TH relataram consumir carboidratos, 50% proteínas de origem animal e 17,5% gorduras saturadas. Além disso, verduras e legumes fazem parte da dieta de 57,5% dos pacientes e frutas de 37,5% deles. Laticínios são ingeridos por 50% dos pacientes e enlatados por 2,5% dos pacientes.

Em relação às variáveis relacionadas ao estilo de vida, observou-se que 35% dos pacientes com TH fazem ou fizeram uso abusivo de álcool e 20% são tabagistas (fumando cerca de 0,5 a 2 maços de cigarro por dia). No que diz respeito à atividade física, 16 pacientes (40%) relataram praticar alguma atividade.

Outros questionamentos foram sobre histórico familiar de doenças e presença de comorbidades, sendo que 52,5% dos pacientes relataram que outros familiares possuem TH, e 30% relatam a presença de outras doenças autoimunes na família. Sobre as infecções virais mais prevalentes na infância, 92,5% relataram já ter apresentado sarampo, caxumba, varicela ou rubéola. Dentre os pacientes, 30% apresentam histórico de hipertensão arterial sistêmica ou diabetes, sendo que, destes, 22,5% apresentam HAS, 2,5% diabetes, e 5% as duas condições.

Tabela 2: Dados demográficos e clínicos dos pacientes com tireoidite de Hashimoto.

Paciente	Sexo/idade	Etnia	TSH	T4	TPO	Tg	Tempo doença	Tratamento
TH1	F/28	C	ND	ND	ND	ND	08	Levotiroxina
TH2	F/57	C	1,61	0,84	51,27	ND	01	Nenhum
TH3	F/35	C	ND	ND	ND	ND	01	Nenhum
TH4	F/28	A	ND	ND	ND	ND	05	Nenhum
TH5	F/55	C	ND	ND	ND	ND	03	Levotiroxina
TH6	F/29	C	0,01	2,6	356	ND	13	Nenhum
TH7	F/56	C	5,17	1,23	ND	ND	25	Levotiroxina
TH8	F/26	C	6,55	1,2	>600	241,3	04	Levotiroxina
TH9	F/42	C	9,86	ND	71	ND	12	Levotiroxina
TH10	F/67	C	12,21	1,1	463	ND	05	Levotiroxina
TH11	F/40	C	17	0,92	325	ND	03	Levotiroxina
TH12	M/58	C	7,58	1,2	ND	ND	05	Levotiroxina
TH13	F/50	A	51	0,3	109	111	02	Levotiroxina
TH14	F/53	A	14	0,87	1.683	6.652	42	Levotiroxina
TH15	F/54	C	3,41	1,21	ND	ND	25	Nenhum
TH16	F/64	C	1,53	1,84	>2.000	ND	25	Levotiroxina
TH17	F/52	C	9,85	0,57	250	11,58	05	Levotiroxina
TH18	F/45	C	5,51	0,62	160	137,8	02	Levotiroxina
TH19	F/63	A	ND	ND	ND	ND	17	Levotiroxina
TH20	F/53	C	ND	ND	ND	ND	10	Levotiroxina
TH21	F/82	A	ND	ND	ND	ND	10	Nenhum
TH22	F/54	C	ND	ND	211,8	56,53	20	Levotiroxina
TH23	F/38	A	ND	ND	ND	ND	14	Levotiroxina
TH24	F/65	C	4,52	ND	ND	ND	10	Levotiroxina
TH25	F/52	A	10,1	ND	ND	ND	06	Levotiroxina
TH26	F/65	A	4,72	ND	ND	ND	05	Levotiroxina
TH27	M/62	C	16,8	2,05	10,82	42,81	03	Levotiroxina
TH28	F/47	C	1,26	1,1	ND	ND	21	Levotiroxina
TH29	F/35	C	9,48	ND	ND	ND	07	Levotiroxina
TH30	F/51	A	3,2	0,89	270	143,2	18	Nenhum
TH31	F/45	C	4,33	1,06	159	214	04	Levotiroxina
TH32	M/66	C	ND	ND	ND	ND	03	Nenhum
TH33	M/56	C	0,52	1,73	970	26	0,9	Levotiroxina
TH34	F/23	C	2,03	0,96	1.840	8,58	05	Levotiroxina
TH35	F/44	C	0,97	ND	ND	ND	07	Levotiroxina
TH36	F/45	C	ND	ND	ND	ND	ND	Levotiroxina
TH37	F/49	C	4,91	0,95	0,52	57	07	Levotiroxina
TH38	F/43	C	0,48	1,1	366	5,06	02	Levotiroxina
TH39	F/52	C	4,89	1,24	282	>1.000	10	Levotiroxina
TH40	F/27	C	7,97	1,44	ND	ND	13	Levotiroxina

TH: Tireoidite de Hashimoto; F: Feminino; M: Masculino; C: Caucasiana; A: Afrodescendente; TSH:Hormônio tireoestimulante (Referência: 0,38 a 5,33 µUI/mL); T4: Tiroxina livre (Referência:0,54 a1,24 ng/dL); TPO: Anticorpo anti-peroxidase tireoideana (Referência:<9 UI/mL); Tg: anticorpo antireoglobulina (Referência:< 4 UI/mL); ND: não determinado.

No grupo controle, referente a frequência de consumo alimentar diário, 47,2% dos controles relataram consumir carboidratos, 32,1% proteínas de origem animal e 22,6% gorduras saturadas. Além disso, verduras e legumes fazem parte da dieta de 53,3% dos indivíduos controles e frutas de 62,3% deles. Laticínios são ingeridos por 66% dos indivíduos e enlatados por 3,8%.

Quanto ao estilo de vida, observou-se que 46,7% fez uso ou ainda faz uso de álcool, 20% é tabagista (fumando cerca de 1-2 maços de cigarro por dia). À respeito da prática de atividade física, 26,7% dos controles realizam atividades físicas, com frequência de 3-5 dias por semana, por pelo menos 60 minutos.

Sobre o histórico familiar de doenças e presença de comorbidades, 90% do total referem não apresentar outros familiares com TH, 23,3% referem a presença de outras doenças autoimunes na família (sendo a maioria diabetes tipo 1 e outras como vitiligo e lúpus eritematoso sistêmico). 83,3% afirmaram infecções virais na infância, como sarampo, caxumba, varicela ou rubéola.

Quando comparamos a frequência de consumo alimentar entre pacientes com TH e controles observamos diferenças significativas ($P < 0,05$) no consumo de carboidratos, proteínas, gorduras saturadas, vegetais/legumes, frutas e laticínios. Na **Tabela 3** podemos observar os resultados quanto aos hábitos alimentares em pacientes e controles.

4.3 Avaliação da disbiose intestinal em pacientes com TH

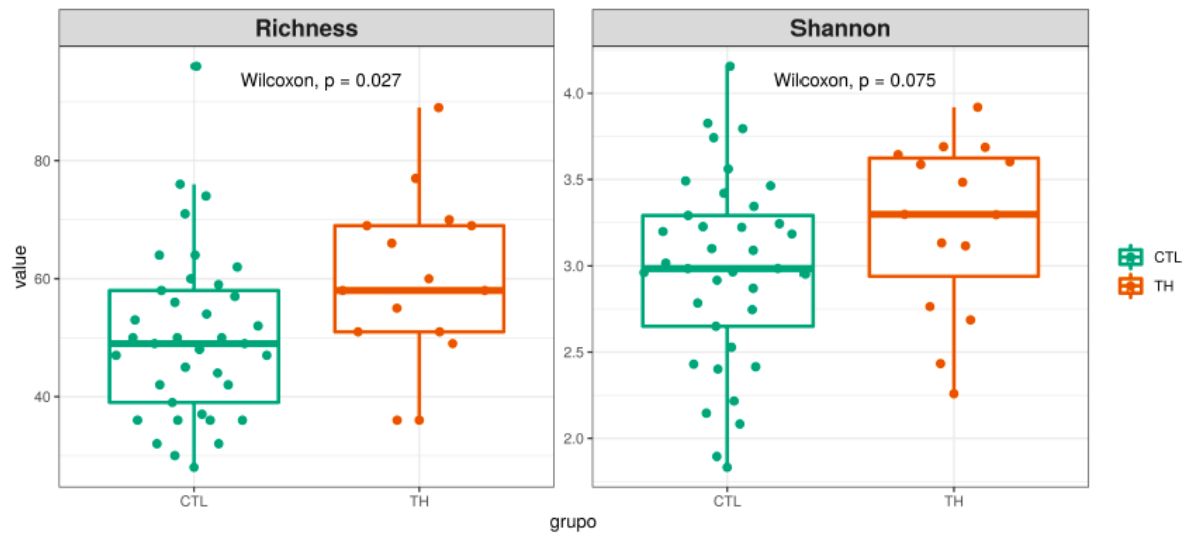
Com relação às análises metagenômicas da microbiota intestinal, observamos que os pacientes com TH apresentam disbiose intestinal, visto pelas diferenças significativas nas análises de alfa e beta diversidade. A diversidade alfa resume a diversidade microbiana dentro de cada amostra, e as medidas de riqueza (número de táxons) ($P = 0,027$) foram significativamente diferentes entre pacientes e controles (**Figura 2**), enquanto que a uniformidade (abundância relativa desses táxons) ($P = 0,075$) foi semelhante. 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 3**.

Tabela 3: Frequência de consumo alimentar em pacientes com TH e controles.

Frequência de consumo	Pacientes TH N (%)	Controles N (%)	Valor de P
Carboidratos			
Não consome	1 (2,5%)	0	P<0,001
Menos de uma vez por mês	2 (5%)	0	
1-3 vezes por mês	6 (15%)	2 (3,8%)	
1-2 vezes por semana	13 (32,5%)	17 (32,1%)	
Na maioria dos dias	2 (5%)	9 (16,9%)	
Todos os dias	16 (40%)	25 (47,2%)	
Proteínas			
Não consome	1 (2,5%)	0	P<0,001
1-3 vezes por mês	1 (2,5%)	1 (2%)	
1-2 vezes por semana	6 (15%)	19 (35,8%)	
Na maioria dos dias	12 (30%)	16 (30,1%)	
Todos os dias	20 (50%)	17 (32,1%)	
Gorduras saturadas			
Não consome	7 (17,5%)	8 (15,1%)	P=0,005
Menos de uma vez por mês	2 (5%)	7 (13,2%)	
1-3 vezes por mês	8 (20%)	12 (22,6%)	
1-2 vezes por semana	12 (30%)	13 (24,5%)	
Na maioria dos dias	4 (10%)	1 (2%)	
Todos os dias	7 (17,5%)	12 (22,6%)	
Verduras e Legumes			
Menos de uma vez por mês	1 (2,5%)	0	P<0,001
1-3 vezes por mês	2 (5%)	2 (6,7%)	
1-2 vezes por semana	2 (5%)	4 (13,3%)	
Na maioria dos dias	12 (30%)	8 (26,7%)	
Todos os dias	23 (57,5%)	16 (53,3%)	
Frutas			
Menos de uma vez por mês	3 (7,5%)	0	P<0,001
1-3 vezes por mês	4 (10%)	4 (7,5%)	
1-2 vezes por semana	7 (17,5%)	5 (9,4%)	
Na maioria dos dias	11 (27,5%)	11 (20,8%)	
Todos os dias	15 (37,5%)	33 (62,3%)	
Laticínios			
Não consome	5 (12,5%)	2 (3,8%)	P<0,001
Menos de uma vez por mês	3 (7,5%)	0	
1-3 vezes por mês	4 (10%)	3 (5,7%)	
1-2 vezes por semana	3 (7,5%)	6 (11,3%)	
Na maioria dos dias	5 (12,5%)	7 (13,2%)	
Todos os dias	20 (50%)	35 (66%)	
Enlatados			
Não consome	11 (27,5%)	11 (20,8%)	P<0,001
Menos de uma vez por mês	12 (30%)	4 (7,5%)	
1-3 vezes por mês	12 (30%)	18 (33,9%)	
1-2 vezes por semana	4 (10%)	16 (30,2%)	
Na maioria dos dias	0	2 (3,8%)	
Todos os dias	1 (2,5%)	2 (3,8%)	

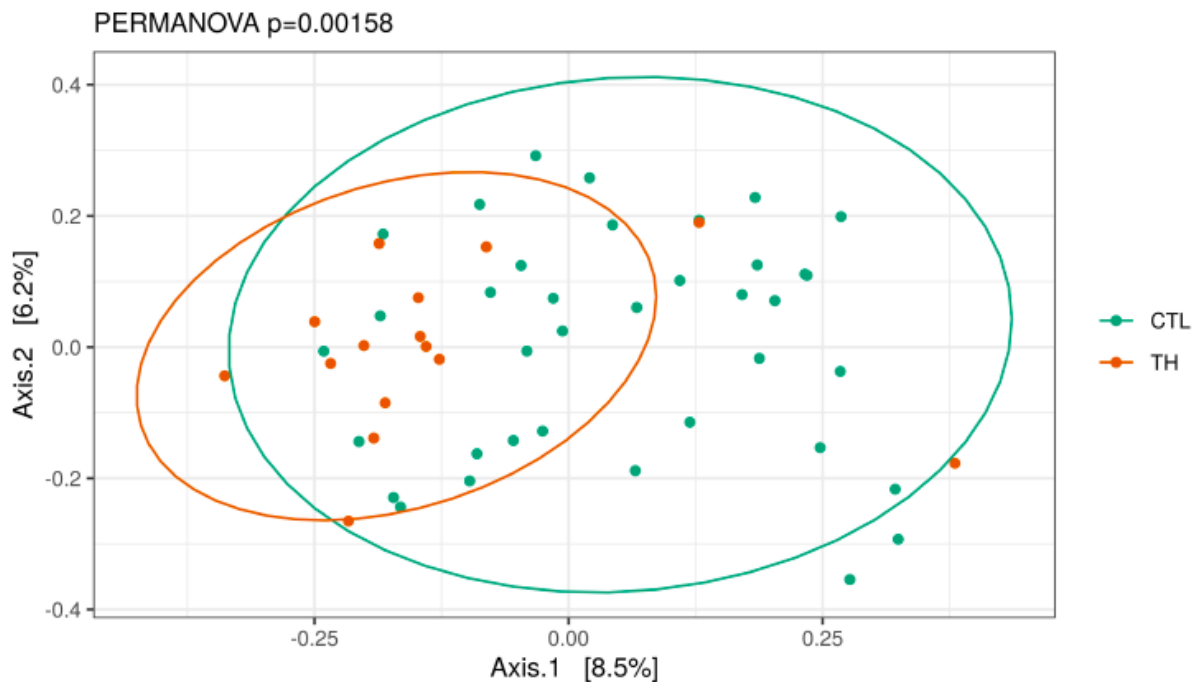
As análises foram realizadas no software IBM SPSS Statistics, versão 20.

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



Fonte: BiomeHub Pesquisa e Desenvolvimento.

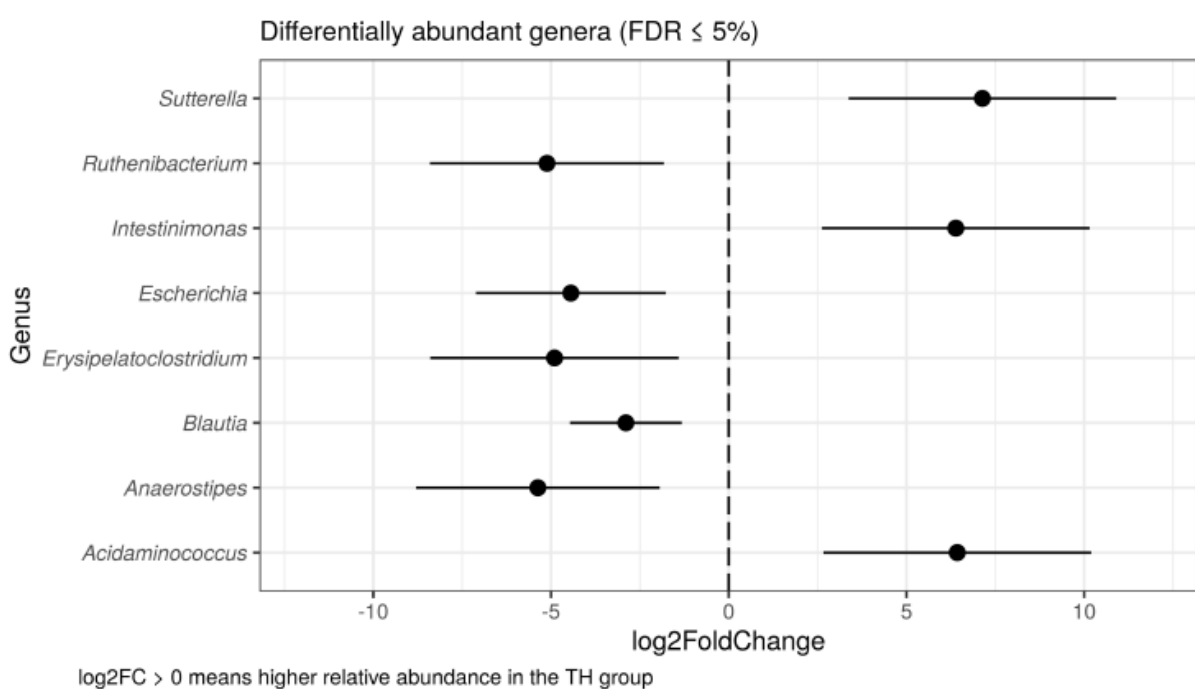
Figura 3: Análise de componentes principais da diversidade beta, mostrando a variabilidade na composição da comunidade entre as amostras de pacientes (TH) e controles (CTL).



Fonte: BiomeHub Pesquisa e Desenvolvimento.

A abundância relativa dos gêneros *Sutterella*, *Intestinimonas* e *Acidaminococcus* estava significativamente aumentada nas fezes dos pacientes com TH quando comparada aos controles. Por outro lado, os gêneros *Ruthenibacterium*, *Escherichia*, *Erysipelatoclostridium*, *Blautia* e *Anaerostipes* estavam significativamente reduzidos nas fezes do grupo TH, em relação ao grupo controle (**Figura 4**).

Figura 4: Análise de abundância diferencial de gêneros entre pacientes com TH e controles.

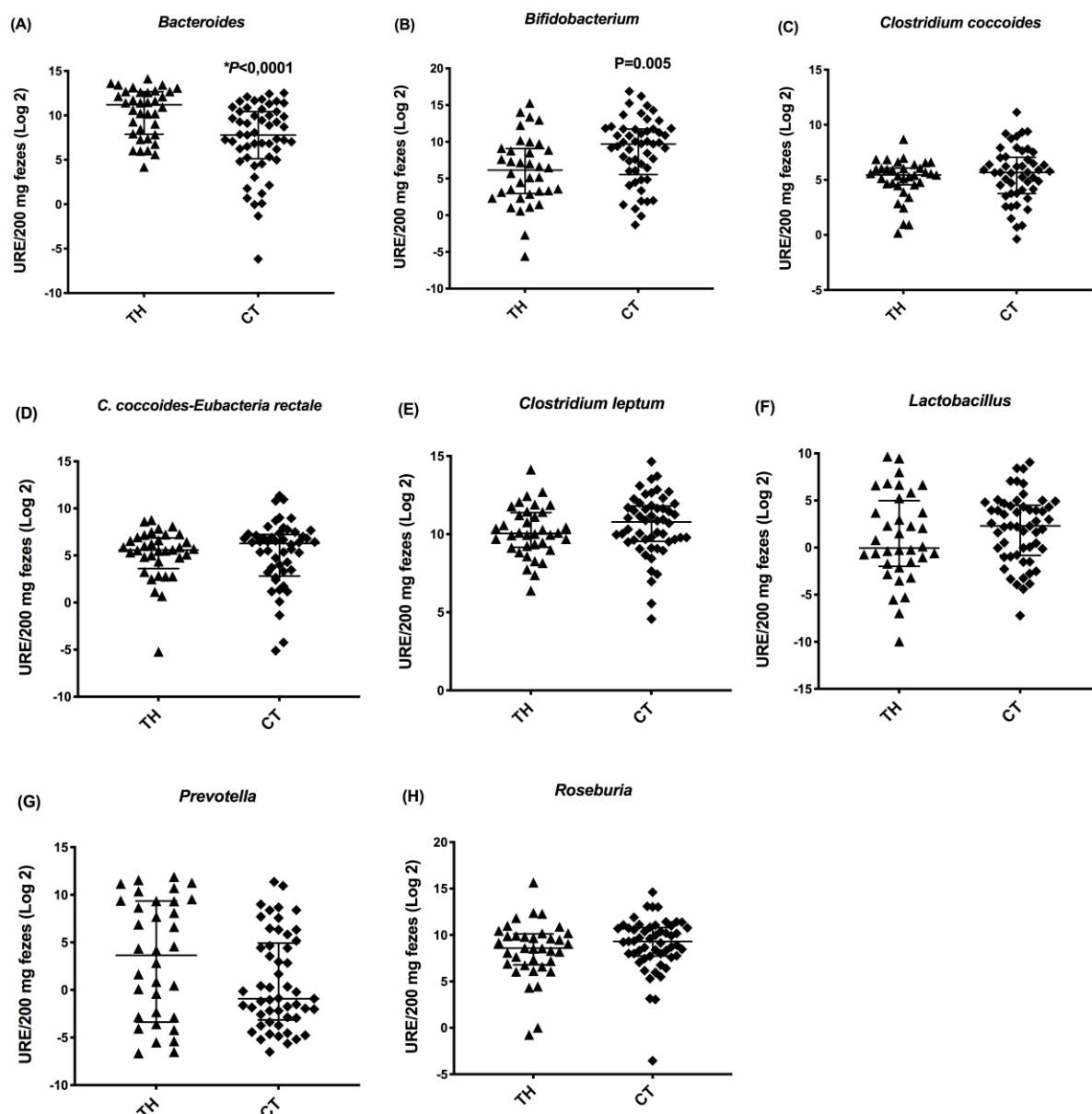


Fonte: BiomeHub Pesquisa e Desenvolvimento.

Com relação à avaliação de alguns grupos bacterianos na microbiota intestinal por PCR em tempo real, observamos que as unidades relativas de expressão das espécies de *Bacteroides* estavam significativamente aumentadas ($P < 0,0001$) em pacientes com TH (mediana *Bac*: 2.344) em relação aos controles (mediana *Bac*: 221,3) (**Figura 5A**). Por outro lado, as unidades relativas de expressão de espécies de *Bifidobacterium* estavam reduzidas ($P = 0,005$) em pacientes com TH (mediana *Bif*: 70,86) em relação aos controles (mediana *Bif*: 830,6) (**Figura 5B**).

As unidades relativas de expressão de *Clostridium coccoides*, *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum*, *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Roseburia* estavam similares em pacientes com TH (mediana *Ccoc*: 43,51; *CIEub*: 48,03; *Clept*: 1.060; *Lac*: 0,974; *Prev*: 12,53; *Ros*: 385,8) e controles (mediana *Ccoc*: 51,21; *CIEub*: 78,04; *Clept*: 1.762; *Lac*: 4,933; *Prev*: 0,530; *Ros*: 635,9) (**Figura 5**).

Figura 5: Unidades relativas de expressão (URE)/200 mg de fezes de grupos bacterianos detectados em pacientes com tireoidite de Hashimoto (TH) e controles (CT). Foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. As barras horizontais representam a mediana e o intervalo interquartil.



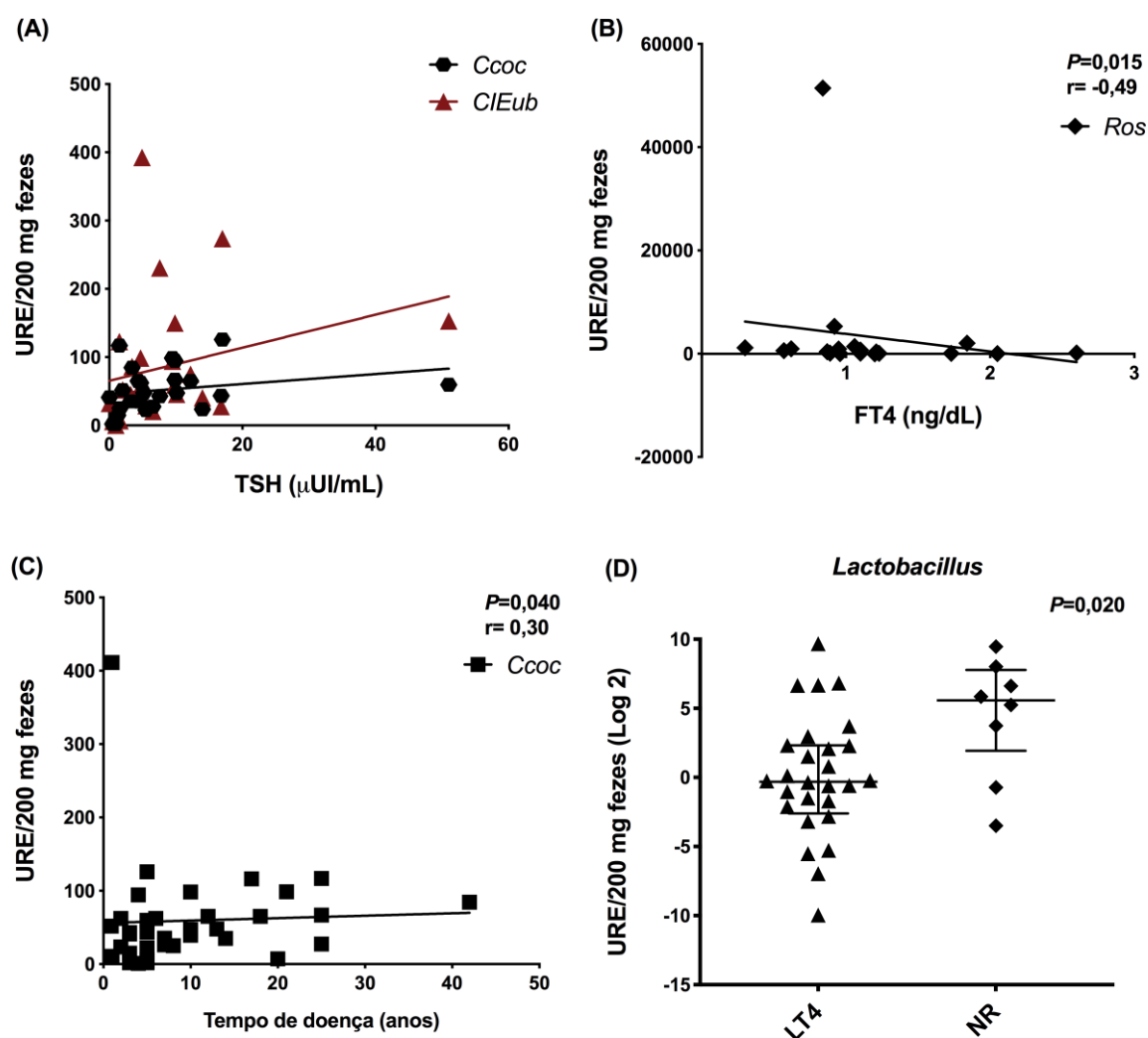
Fonte:Elaborado pela autora no software Prism, versão 9.1.2

4.4 Correlação da microbiota intestinal com os dados clínicos dos pacientes

Para avaliar a conexão entre a composição da microbiota intestinal e os parâmetros clínicos, correlacionamos as unidades relativas de expressão de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum*, *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Roseburia* com as concentrações de TSH, T4 livre, autoanticorpos TPO e Tg, com o tempo de

doença e tratamento medicamentoso. Detectamos correlações positivas entre as URE de *Clostridium coccoides* ($P=0,023$; $r=0,40$) e *Clostridium coccoides*-*Eubacterium rectale* ($P=0,010$; $r=0,45$) como níveis de TSH (**Figura 6A**). As URE das espécies de *Roseburia* correlacionaram inversamente ($P=0,015$; $r=-0,49$) aos níveis de T4 livre (**Figura 6B**). Também encontramos correlação positiva entre *Clostridium coccoides* ($P=0,040$; $r=0,30$) e a duração da doença (**Figura 6C**). Além disso, observamos diferenças significativas nas URE de *Lactobacillus* entre os pacientes que fizeram reposição do hormônio tireoidiano (mediana Lac: 0,8065 URE/200 mg de fezes) e aqueles que não fizeram (mediana Lac: 47,73; $P=0,020$; **Figura 6D**). Não observamos correlações significativas entre a microbiota intestinal e os níveis de autoanticorpos TPO e Tg.

Figura 6: Correlação da microbiota intestinal e os dados clínicos dos pacientes com TH. Foi utilizado o teste de *Spearman* e considerado $P<0,05$.



4.5 Correlação dos hábitos alimentares e microbiota intestinal em pacientes

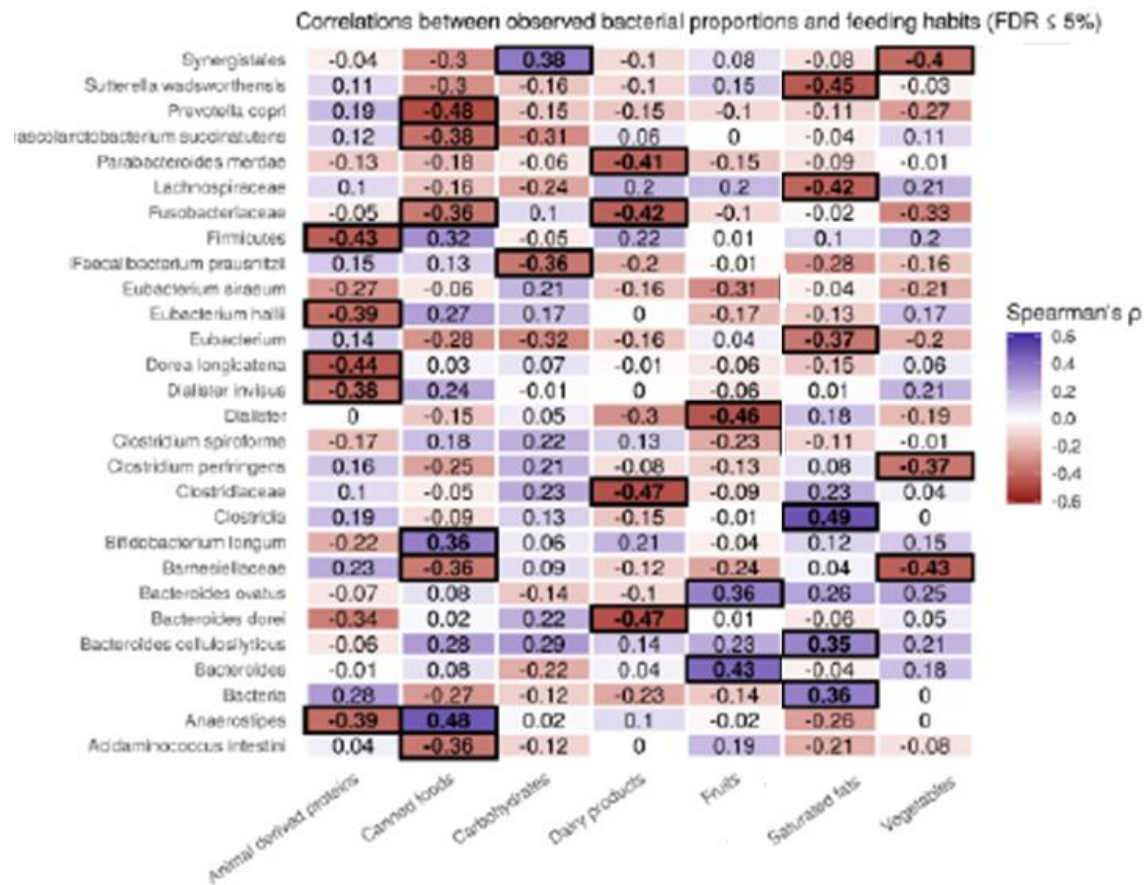
Para detectar correlações entre a dieta e composição da microbiota intestinal em pacientes com TH, foram utilizadas as frequências de consumo alimentar e a abundância relativa obtida pelo sequenciamento, e as URE dos grupos bacterianos, obtidas por PCR em tempo real. Sobre o consumo de proteínas de origem animal, observamos correlação inversa com a abundância relativa do filo Firmicutes, gênero *Anaerostipes*, *Eubacterium hallii*, *Dorea longicatena*, *Dialister invisus*, e com as URE de *Bacteroides* ($P=0,002$; $r=-0,61$). A ingestão de carboidratos correlacionou de forma positiva com a ordem Synergistales e *Faecalibacterium prausnitzii*. Já o consumo de gorduras saturadas apresentou correlação direta com a abundância da classe Clostridia *Bacteroides cellulosilyticus*, e correlação inversa com a família Lachnospiraceae, gênero *Eubacterium* e *Sutterella wadsworthensis* (**Figura 7**).

A ingestão de verduras e legumes apresentou correlação negativa com a abundância relativa de membros da ordem Synergistales, família Barnesillaceae, e com *Clostridium perfringens*. Já o consumo de frutas, correlação positiva com *Bacteroides*, *Bacteroides ovatus*, e negativa com o gênero *Dialister*. O consumo de leites e derivados correlacionou inversamente à abundância de membros das famílias Fusobacteriaceae e Clostridiaceae, e com as espécies *Parabacteroides merdae* e *Bacteroides dorei*. E correlações negativas entre o consumo de enlatados e abundância relativa de Fusobacteriaceae, Barnesiellaceae, *Acidaminococcus intestini*, *Prevotella copri* e *Phascolarctobacterium succinatutens*, e positivas com *Anaerostipes* e *Bifidobacterium longum* (**Figura 7**).

4.6 Perfil de citocinas e correlação com a microbiota intestinal

Com relação ao perfil de citocinas séricas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$) nas concentrações de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF entre pacientes com TH (média $\pm$ erro padrão IL-2: $0,3369 \pm 0,0638$ pg/ml; IL-4: $0,4081 \pm 0,0542$ pg/ml; IL-6: $1,121 \pm 0,1599$ pg/ml; IL-10: $0,3192 \pm 0,0333$ pg/ml; IL-17A: $0,5835 \pm 0,2388$ pg/ml; IFN- γ : $0,4473 \pm 0,1023$ pg/ml; TNF: $1,154 \pm 0,1090$ pg/ml) e controles (média $\pm$ erro padrão IL-2: $0,3800 \pm 0,0527$ pg/ml; IL-4: $0,3791 \pm 0,0541$ pg/ml; IL-6: $1,375 \pm 0,2492$ pg/ml; IL-10: $0,2884 \pm 0,0414$ pg/ml; IL-17A: $0,3981 \pm 0,1985$ pg/ml; IFN- γ : $0,3438 \pm 0,0951$ pg/ml; TNF: $1,317 \pm 0,1711$ pg/ml) (**Figura 8**).

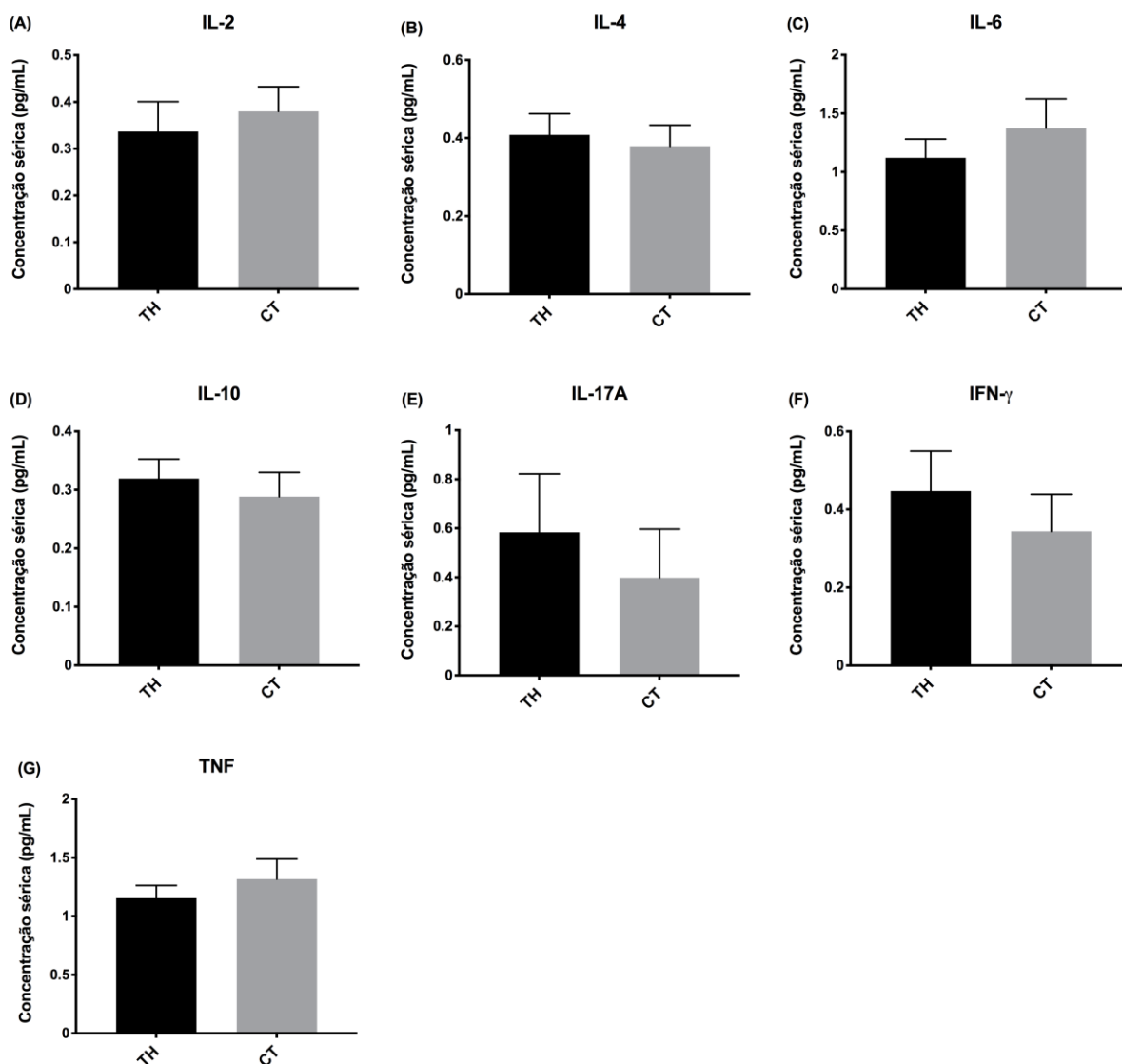
Figura 7: Mapa de calor mostrando as correlações entre proporções bacterianas e frequência de consumo alimentar. Correlações estatisticamente significativas estão indicadas com contorno sólido preto, e foram analisadas por meio do coeficiente Rho de Spearman.



Fonte: BiomeHub Pesquisa e Desenvolvimento.

Quando avaliamos as possíveis correlações entre a microbiota intestinal e as concentrações séricas de citocinas inflamatórias, observamos correlações inversas entre a ordem Synergistales, família Sutterellaceae, gênero *Catenibacterium*, *Bacteroides plebeius*, *Holdemanella bififormis* e os níveis de IL-6 no soro dos pacientes. Foi detectada correlação direta entre o filo Firmicutes, gênero *Roseburia* e *Ruminococcus gnavus* e as concentrações de TNF. Os níveis de IFN- γ correlacionou de forma direta com a espécie *Eubacterium rectale*, e as concentrações de IL-17A correlacionou positivamente com o gênero *Bifidobacterium*, *Bacteroides stercoris* e *Blautia obeum* (Figura 9).

Figura 8: Perfil de citocinas em pacientes com TH e indivíduos controles. Foi utilizado teste paramétrico com correção de *Welch* e os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão.

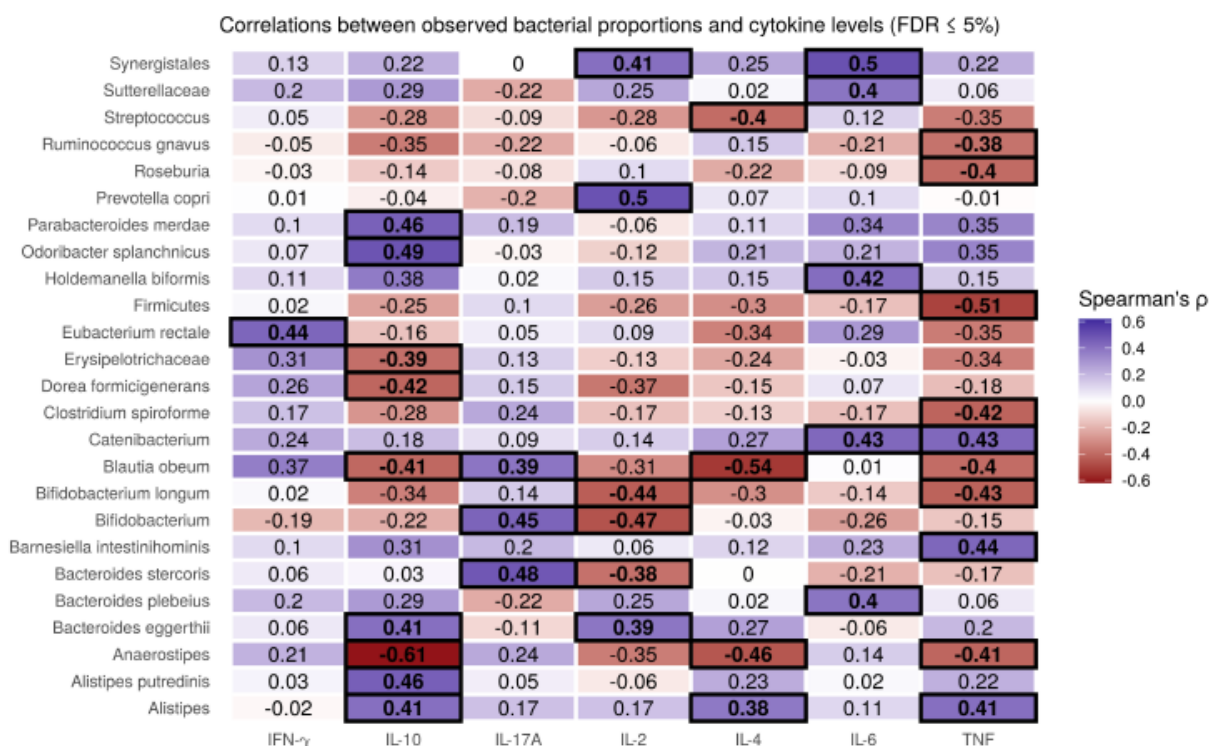


Fonte: Elaborado pela autora no software Prism, versão 9.1.2

As concentrações séricas de IL-10 correlacionou positivamente com *Alistipes*, *Parabacteroides merdae*, *Odoribacter splanchnicus*, *Bacteroides eggerthii*, *Alistipes putredinis*, e negativamente com *Erysipelotrichaceae*, *Anaerostipes* e *Blautia obeum*. Os níveis de IL-4 apresentou correlação direta com *Alistipes*, e inversa com *Anaerostipes*, *Streptococcus* e *Bacteroides obeum*. Por último, foram observadas correlações positivas entre a IL-2 e *Synergistales*, *Prevotella copri*, *Bacteroides*

eggerthiie negativas com *Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, e *Bacteroides stercoris* (Figura 9).

Figura 9: Mapa de calor mostrando as correlações entre proporções bacterianas e concentrações séricas de citocinas. Correlações estatisticamente significativas estão indicadas com contorno sólido preto, e foram analisadas por meio do coeficiente Rho de Spearman.

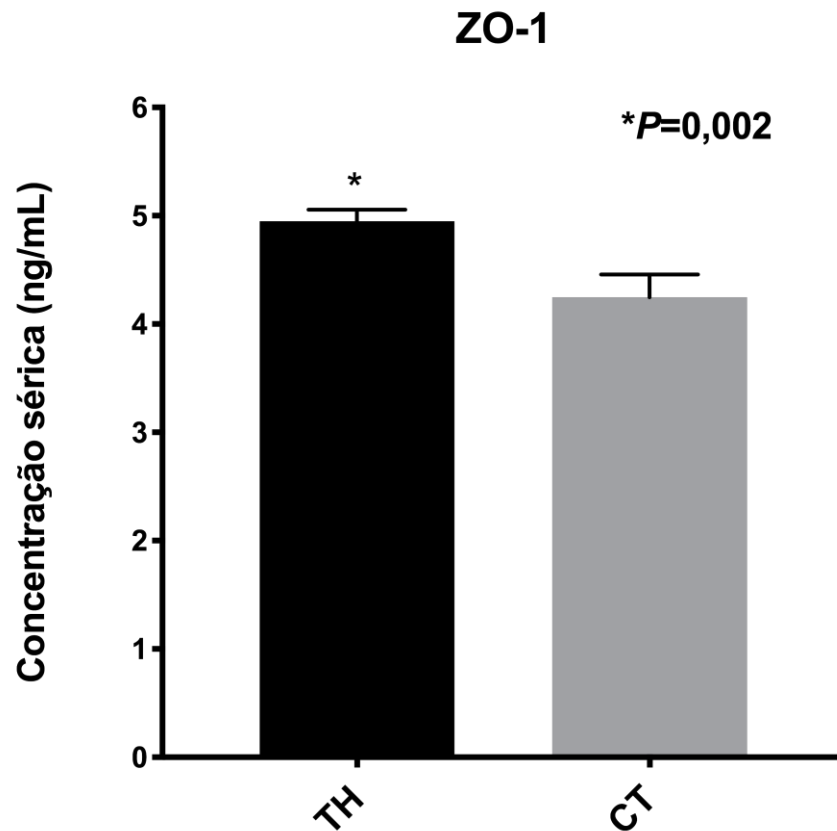


Fonte: BiomeHub Pesquisa e Desenvolvimento.

4.7 Avaliação da permeabilidade intestinal em pacientes com TH

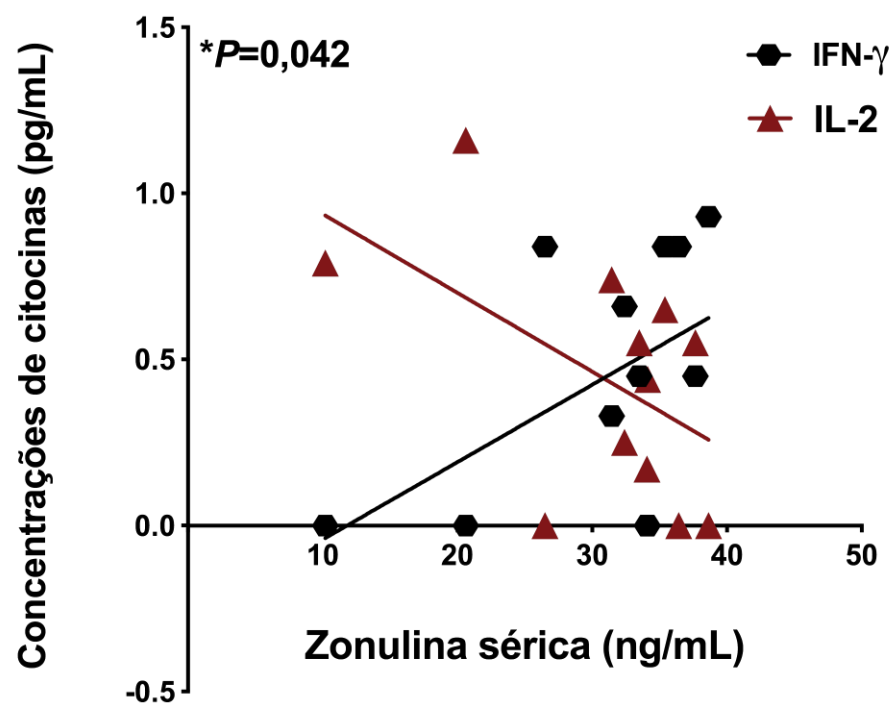
Com o intuito de avaliar se os pacientes com TH apresentavam alterações na barreira intestinal, visto que foram detectadas alterações na microbiota intestinal, avaliamos as concentrações de zonulina sérica em pacientes e controles. Foi observado aumento significativo da permeabilidade intestinal ($P=0,002$), ou seja, nos níveis de zonulina no soro de pacientes com TH (média $\pm$ erro padrão: $30,92 \pm 2,36$ ng/ml), quando comparados aos controles (média $\pm$ erro padrão: $19,01 \pm 2,98$ ng/ml) (Figura 10). Além disso, as concentrações de zonulina correlacionaram diretamente com os níveis sistêmicos de IFN- γ ($P=0,042$; $r=0,52$) e inversamente às concentrações de IL-2 ($P=0,042$; $r=-0,51$) em pacientes com TH (Figura 11).

Figura 10: Concentrações séricas de zonulina (ZO-1) em pacientes com TH e controles.



Fonte: Elaborado pela autora no software Prism, versão 9.1.2

Figura 11: Correlações entre as concentrações séricas de ZO-1 e citocinas em pacientes com TH.



Fonte: Elaborado pela autora no software Prism, versão 9.1.2



DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O TGI é a maior interface entre o meio externo e o meio interno e, por isso, a microbiota ali presente precisa estar preparada para interagir com várias substâncias, incluindo alimentos, medicamentos e possíveis toxinas. Quando ocorre alteração na composição ou função dessa microbiota, a chamada disbiose intestinal, a homeostase intestinal pode ser afetada, ocasionando aumento da permeabilidade intestinal e desequilíbrio na resposta imune de mucosa (CAMILLERI, 2019; KINASHI; HASE; JORDAN, 2021). Nos últimos anos, a disbiose intestinal vem sendo associada ao desenvolvimento de várias doenças autoimunes (KINASHI; HASE; JORDAN, 2021; LIN; ZHANG, 2017; MARCHESI et al., 2016). Sendo assim, em nosso trabalho propusemos avaliar a presença/ausência de disbiose intestinal em pacientes com TH, que é a doença autoimune órgão-específica mais prevalente no mundo, e correlacionar os dados da microbiota aos achados clínicos, dieta e concentrações de citocinas e zonulina.

Embora os estudos mostrem a existência de fatores genéticos associados ao desenvolvimento de TH, ao se notar o grande aumento na incidência dessa patologia, torna-se clara a necessidade de fatores externos envolvidos em sua patogênese. Dentre os fatores envolvidos, a disbiose intestinal vem recebendo destaque devido a influência da microbiota no sistema imune local e sistêmico e do papel do desequilíbrio microbiota-sistema imune no desenvolvimento de DAIs (DE OLIVEIRA et al., 2017; FRÖHLICH; WAHL, 2019; KNEZEVIC et al., 2020). Há poucos estudos na literatura caracterizando a microbiota intestinal de pacientes com TH, além de terem sido realizados em outras regiões geográficas em que diferentes culturas e alimentações podem influenciar no resultado, uma vez que a microbiota é fortemente influenciada por fatores nutricionais (ILLIANO; BRAMBILLA; PAROLINI, 2020).

Em nosso estudo, a análise da microbiota fecal por PCR em tempo real evidenciou aumento do gênero *Bacteroides* e diminuição de *Bifidobacterium* nos pacientes com TH. Utilizando a mesma técnica de análise, Ishaq e colaboradores (2017), na China, encontraram também diminuição de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* nos pacientes com TH (ISHAQ et al., 2018). O gênero *Bifidobacterium* engloba microrganismos comensais que tem mostrado efeitos benéficos por modular

a resposta imune, em especial *B. infantis* que demonstrou efeito em regularnegativamente linfócitos Th2 e Th17 e promover diferenciação de Tregs(SHI et al., 2018), tendo sido mostrado possíveis efeitos benéficos no tratamento da doença inflamatória intestinal (MI et al., 2017). Por promover a diferenciação imunológica em um padrão anti-inflamatório, o fato deste microrganismo ter sido encontrado em menor abundância nos pacientes com TH sugere que os pacientes apresentatiam um perfil mais inflamatório em comparação ao grupo controle, embora não tenhamos encontrado diferenças significativas no perfil de citocinas entre os grupos.

As análises por PCR em tempo real são capazes de nos informar sobre a presença de alguns grupos bacterianosna microbiota intestinal,mas muitos gêneros não são identificados e, portanto, técnicas de sequenciamento tornam-se importantes formas para se obter um conhecimento real acerca da microbiota existente em cada grupo de indivíduos. As análises metagenômicas realizadas em nosso estudo evidenciaram maior abundância relativa dos gêneros *Suterella*, *Intestinimonas* e *Acidaminococcus* e menor abundância dos gêneros *Ruthenibacterium*, *Escherichia*, *Erysipelatoclostridium*, *Blautia* e *Anaerostipes* no grupo TH.

O trabalho realizado por Zhao et al. (2018), na China, analisou a microbiota intestinal de 28 pacientes com TH e 16 controles, e evidenciou aumento nos gêneros *Blautia*, *Roseburia*, *Ruminococcus_torques*, *Romboutsia*, *Dorea*, *Fusicatenibacter* e *Eubacterium_hallii*, e diminuição dos gêneros *Lachnoclostridium*,*Bacteroides*, *Prevotella_9* e *Fecalibacterium* no grupo TH(ZHAO et al., 2018). O estudo realizado por Ishaq et al. (2017), também na China, detectou predomínio dos gêneros *Bacteroides*, *Escherichia_Shigella* e *Parasutterella* e redução dos gêneros *Prevotella* e *Dialister* nos pacientes com TH (ISHAQ et al., 2017). Já o estudo de Cornejo-Pareja et al. (2020), realizado na Espanha, evidenciou aumento de *Victivallaceae* e diminuição de *Faecalibacterium* no grupo TH, com microbioma central representado por *Streptococcus*, *Alistipes*, *Anaerostipes*, *Dorea* e *Haemophilus*(CORNEJO-PAREJA; RUIZ-LIM; ANA, 2020).

Embora o gênero *Suterella* tenha mostrado um perfil imunológico protetivo *in vitro* (BERER et al., 2017), algumas espécies tem a capacidade de degradar a IgA eparecem estar envolvidas na falha terapêutica de indivíduos com retocolite ulcerativa (KAAKOUSH, 2020), assim como também já foram descritas em maior

abundância em pacientes com depressão (AMIRKHAZADEH BARANDOUZI et al., 2020). O gênero *Intestinimonas* inclui espécies produtoras de butirato que serve como fonte energética para as células epiteliais intestinais (BUI et al., 2016), auxiliando em sua integridade, embora também já tenha sido relacionado com aumento dos níveis de IL-4 (DU et al., 2021), citocina indutora do padrão Th2, da proliferação e diferenciação de linfócitos B, e relacionada com doenças como asma, dermatite atópica e reações anafiláticas (KARO-ATAR et al., 2018). *Acidaminococcus* foi encontrado aumentado nas fezes de pacientes com espondilite anquilosante, doença inflamatória crônica (ZHOU et al., 2020), e *Acidaminococcus* *intestini* foi encontrado aumentado em indivíduos que consumiram dietas mais pró-inflamatórias (ZHENG et al., 2020), podendo, então, estar relacionado a um perfil mais inflamatório, característico das doenças autoimunes.

Dentre as bactérias encontradas em menor abundância nos pacientes com TH, está o gênero *Ruthenibacterium*, que embora não tenha dados associando este gênero à TH, a espécie *R. lactatiformans* foi encontrado em menor abundância em pacientes com AR (LEE et al., 2019). O gênero *Escherichia*, também reduzido no grupo TH, tem mostrado possível efeito benéfico como probiótico na prevenção da EM (LIBBEY et al., 2020), além de ter mostrado efeitos anti-inflamatórios nas placas de Peyer, aumentar a expressão de peptídeos antimicrobianos e diminuir a produção de óxido nítrico sintase induzível em macrófagos, diminuindo a gravidade de uveíte autoimune (DUSEK et al., 2020). *Erysipelatoclostridium*, positivamente correlacionada à ingestão de laticínios, está associada à síndrome metabólica em humanos e, em estudos realizados com animais, foi associada à regulação da glicose e dos transportadores de gordura do intestino delgado, resultando em aumento da obesidade induzida por dieta (SHEN et al., 2019). O gênero *Blautia* inclui microrganismos produtores de AGCCs e foram encontrados em menor abundância em atletas quando comparado a indivíduos sedentários (JANG et al., 2019). Assim como o gênero anterior, *Anaerostipes* também compreende espécies produtoras de butirato, benéficas para a manutenção do equilíbrio intestinal (BUI et al., 2019). Os AGCCs são benéficos para a saúde intestinal por auxiliarem na manutenção da integridade epitelial e, estudos demonstram a capacidade de uma espécie beneficiar outra através da interação direta, aumentando a produção de substratos e, conseqüentemente, de metabólitos (BUI et al., 2019). O fato de termos detectado a disbiose intestinal, com redução da diversidade beta e riqueza de microrganismos,

corroborar a hipótese da existência de alterações na saúde intestinal de pacientes com TH.

Em relação à correlação da microbiota intestinal com os dados clínicos dos pacientes com TH, observamos correlação direta entre a abundância de *Clostridium coccooides* com os níveis de TSH. Estudos mostram que a microbiota influencia em neurotransmissores no cérebro, como a dopamina, regulando o eixo hipotálamo-hipófise (FARZI; FRÖHLICH; HOLZER, 2018). Uma vez que a dopamina é capaz de diminuir a secreção de TSH, através de sua ação na hipófise anterior (MOURA; MOURA, 2004), a função da tireoide também pode ser afetada (NEUMAN et al., 2015). Níveis reduzidos de dopamina luminal podem levar à diminuição da captação e à falta de inibição da secreção de TSH pela glândula hipófise, aumentando sua concentração em animais *germ-free* (FRÖHLICH; WAHL, 2019).

Outra maneira da microbiota afetar a síntese de TSH é pela produção de metabólitos como ácidos biliares secundários produzidos pela microbiota a partir de sais biliares do hospedeiro (SONG et al., 2016). Há relatos da produção desses metabólitos pelos gêneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Rumicoccus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus* e *Methanobrevibacter* (ZENG et al., 2019). Os sais biliares são absorvidos pelo cólon e exercem efeito sistêmico, como regulação do metabolismo energético através da alteração nos níveis de TSH (BONDE et al., 2014). Sabe-se, portanto, que há correlação entre os níveis hormonais da tireoide e a microbiota intestinal, entretanto, não está claro ainda o real mecanismo exercido por cada gênero bacteriano. Além de ser influenciado pelo nível de TSH, a produção de T4 livre parece também sofrer efeito da microbiota intestinal, sendo que nosso estudo evidenciou correlação inversa entre níveis de T4 livre e concentração de *Roseburia*. A maior parte dos hormônios é produzido na forma de T4 e, por ação das deiodinases é convertido em T3, que exercerá sua função a nível metabólico. Estudos mostram que microrganismos podem influenciar na ação das deiodinases através da ação de citocinas (SPAGGIARI et al., 2017). Sendo assim, probióticos poderiam ser utilizados para modular a produção de T3/T4 por interferir na deiodação hormonal.

Outro dado relevante foi o aumento de espécies de *Lactobacillus* em pacientes que não faziam o tratamento com levotiroxina. Estudos *in vitro* com espécies de *Lactobacillus* mostraram que algumas espécies são capazes de induzir citocinas pró-

inflamatórias como TNF, IL-12 e IL-8, enquanto outras citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (GRIMOUD et al., 2010; JENSEN et al., 2014). Outro estudo em que foram estudadas cepas de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. casei*) mostrou que todas produziram aumento significativo na concentração de IL-8, uma das principais citocinas envolvidas na resposta imune inata (ROCHA-RAMÍREZ et al., 2017).

A microbiota intestinal é caracterizada por uma variabilidade interindividual devido a fatores genéticos e ambientais. Entre os ambientais, os hábitos alimentares desempenham papel fundamental em modular a composição da microbiota, e muitos estudos têm considerado mudanças específicas na composição microbiana relacionada a padrões de dieta, podendo ocorrer de maneira rápida e reproduzível (WILLIS; JOANNE L. SLAVIN, 2019). Sendo assim, uma dieta específica pode promover o crescimento de cepas bacterianas específicas, levando a consequências alterações metabólicas, com efeito direto no pH intestinal, o que pode culminar no surgimento de uma microbiota patogênica (BIBBÒ et al., 2016).

Os nutrientes podem interagir diretamente com os microrganismos promovendo ou inibindo seu crescimento, e a capacidade de extrair energia de constituintes específicos da dieta confere vantagem competitiva direta para membros selecionados da comunidade microbiana intestinal, tornando-os capazes de proliferar às custas de membros menos adeptos (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019). O consumo de uma dieta com produtos inteiramente de origem animal foi relacionado ao enriquecimento de bactérias biletolerantes como *Alistipes*, *Bilophila* e *Bacteroides*, e depleção de bactérias do filo Firmicutes, como *Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromi*, que metabolizam polissacarídeos de plantas (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019). Nosso estudo encontrou resultado semelhante pela correlação inversa com o filo Firmicutes, apesar de ter encontrado correlação direta com *Bacteroides*.

Estudo realizado por Wu e colaboradores (2011) demonstrou associação de *Prevotella* com dietas ricas em carboidratos e componentes agrários (WU et al., 2011). Em nosso estudo, *Prevotella* apresentou correlação negativa apenas com enlatados, ao contrário do achado de Wu e colaboradores. Em camundongos, dietas ricas em gordura tem sido associada a uma diminuição de *Bacteroidetes* e aumento de *Firmicutes* e *Proteobacteria* de forma dose-dependente (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019). Em nosso estudo essa dieta apresentou correlação direta com a classe

Clostridia e *Bacteroides cellulosilyticus* e inversa com a família Lachnospiraceae. O consumo de frutas, vegetais e peixes por humanos com sobrepeso ou obesidade têm mostrado correlação positiva com riqueza do microbioma e, um estudo realizado com diferentes grupos ingerindo frutas e vegetais em quantidades diferentes revelou um aumento da concentração de *Bifidobacterium*, no grupo com baixa ingestão de frutas e legumes, sem encontrar correlação com *Lactobacillus* (KLINDER et al., 2016).

Em nosso estudo, encontramos correlação positiva entre o consumo de frutas e *Bacteroides*, *Bacteroides ovatus* e negativa com o gênero *Dialister*. Fatores dietéticos podem, portanto, modificar a microbiota intestinal. Esse achado deve ser levado em consideração para que se deixe de lado a ideia de que apenas fatores genéticos individuais determinam a composição da microbiota intestinal. Alguns padrões de dieta podem favorecer um “perfil inflamatório”. Dietas ricas em gorduras e pobres em fibras, típica dos países ocidentais, se espalhou rapidamente pelo mundo todo, ao mesmo tempo em que a prevalência de doenças inflamatórias e autoimunes aumentou (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019). Sendo assim, podemos sugerir que a dieta tem um impacto importante sobre a composição e diversidade da microbiota, e como encontramos diferenças significativas em relação aos hábitos alimentares, podemos sugerir que as diferenças na microbiota podem refletir, em parte, os hábitos alimentares dos pacientes.

A secreção de citocinas pró-inflamatórias desempenha papel significativo na patogênese da TH e estudos mostram que os principais linfócitos T envolvidos são os do tipo Th1 e Th17 (GERENOVA; MANOLOVA; STANILOVA, 2019; LI et al., 2019). Inicialmente, acreditava-se que a resposta Th1 era o principal elemento envolvido na patogênese da TH e inúmeras evidências corroboravam essa teoria (AJJAN et al., 1996; DEL PRETE et al., 1987; GUO; RAPOPORT; MCLACHLAN, 1999; SHI et al., 2010), entretanto, estudos recentes, mostram um papel importante dos linfócitos Th17 no desenvolvimento de TH, mostrando que os pacientes apresentam aumento de células Th17 secretando IL-17 tanto na periferia quanto na glândula tireoide (ZAKE et al., 2019). Um estudo foi realizado objetivando a dosagem de níveis séricos de IL-23 e IL-17 em pacientes com TH em diferentes estágios da atividade da doença, sendo evidenciado maior nível sérico de IL-23 e IL-17 em todos os pacientes com TH em comparação aos controles, destacando o envolvimento do eixo IL-23/IL-17 no desenvolvimento da TH (GERENOVA; MANOLOVA; STANILOVA, 2019). Em nosso estudo, não avaliamos as

concentrações de IL-23 e não encontramos diferenças significativas nos níveis das citocinas inflamatórias avaliadas em pacientes e controles. Como a grande maioria dos pacientes já estavam em tratamento com a levotiroxina, podemos sugerir que a reposição hormonal tenha algum efeito sobre a resposta imune, embora não tenha apresentado efeitos sobre a disbiose intestinal.

Ao avaliar correlações entre a microbiota intestinal e a concentração sistêmica de citocinas foram encontrados alguns resultados interessantes. A abundância relativa do gênero *Catenibacterium*, que inclui bactérias que degradam polissacarídeos, e as espécies *Bacteroides plebeius* e *Holdemanella biformis* correlacionaram inversamente aos níveis séricos de IL-6. O enriquecimento de *Catenibacterium* está associado a adesão à dietas mediterrâneas (GARCIA-MANTRANA et al., 2018). Por outro lado, o gênero foi detectado em indivíduos que apresentam dietas ricas em gorduras, mesmo não apresentando alterações no índice de massa corporal (SHIN et al., 2016). *Bacteroides plebeius* são bactérias comumente encontradas nas fezes humanas e apresentam abundância aumentada em pacientes hipertensos não tratados (CALDERÓN-PÉREZ et al., 2020). Já a espécie *Holdemanella biformis* produz ácidos graxos de cadeia longa associados a efeitos anti-inflamatórios na colite ulcerativa (PUJO et al., 2021). Além disso, a abundância de *Ruminococcus gnavus*, espécies comuns do intestino humano, correlacionou diretamente às concentrações de TNF, e estão aumentadas em algumas condições, como doença inflamatória intestinal e doenças alérgicas em crianças (BELL et al., 2019; BUI et al., 2019; CHUA et al., 2018; HALL et al., 2017).

A espécie *Eubacterium rectale*, que metaboliza polissacarídeos de plantas, correlacionou de forma direta aos níveis de IFN- γ , e seu aumento está associado à obesidade (GOMES; HOFFMANN; MOTA, 2018). Os gêneros *Bacteroides stercoris* e *Blautia obeum* correlacionaram positivamente às concentrações de IL-17A. *Eubacterium rectale* pertence ao filo Firmicutes, e metaboliza polissacarídeos de plantas, e epitopos de *Bacteroides stercoris* foram reconhecidos de forma cruzada por linfócitos T CD8 autorreativos às ilhotas pancreáticas e reatividade de IgG à esta espécie também foi observada em pacientes com doença inflamatória intestinal (CULINA et al., 2018; KAPPLER et al., 2020). *Blautia obeum*, que possui atividade azorreductase, encontra-se aumentada em indivíduos pré-diabéticos e que foram submetidos à colecistectomia (YOON et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Além disso, detectamos correlação inversa desta

espécie com as concentrações séricas de IL-10, sugerindo que esta bactéria possa apresentar impacto inflamatório no microambiente intestinal. Em suma, nossos achados suportam a ideia de que a composição da microbiota intestinal influencia a resposta imune além de desempenharem um papel na manutenção da homeostase intestinal. Concluimos, ainda, que a resposta celular às citocinas varia de acordo com fatores do hospedeiro e da população microbiana.

A função da barreira intestinal envolve a regulação da translocação do conteúdo luminal, como antígenos e bactérias, que passam através da camada de células epiteliais entre as células epiteliais (via paracelular) ou através das células (via transcelular) para a mucosa subjacente. Um aumento da permeabilidade intestinal e sinais de uma barreira disfuncional foram observados em várias condições diferentes, como doença de Parkinson, obesidade e diabetes tipo 2 (SCHOULTZ; KEITA, 2020). Evidências recentes sugerem que alterações na composição da microbiota intestinal coincidem com o aumento da permeabilidade intestinal (CAMILLERI, 2019). A homeostase da barreira intestinal depende da relação entre a microbiota e o epitélio intestinal. Em condições de eubiose, a simbiose entre a microbiota intestinal e o hospedeiro é bem equilibrada. No entanto, em certas situações, como na disbiose, esse equilíbrio é rompido e contribui para a inflamação. Essa condição tem sido particularmente associada a um número reduzido de microrganismos benéficos, como *Faecalibacterium prauznitzii*, essencial para a fermentação de substratos não digeríveis das fibras (SCHOULTZ; KEITA, 2020). A zonulina humana regula a permeabilidade intestinal desfazendo as *tight junctions*, sendo encontrada em níveis aumentados nos tecidos intestinais e no soro de pacientes com DAI (AYDIN; YILDIZ; TOPAL, 2020). Em nosso estudo foi observado aumento significativo dos níveis de zonulina sérica em pacientes com TH, indicando aumento da permeabilidade intestinal nesses pacientes. Esse achado concorda com um estudo recente realizado em crianças com TH, em que também foi evidenciado aumento da permeabilidade intestinal (AYDIN; YILDIZ; TOPAL, 2020). Estudos mostram que o IFN- γ é capaz de induzir aumento da permeabilidade paracelular em células epiteliais intestinais por meio da redistribuição e expressão de proteínas *tight junctions* e rearranjo do citoesqueleto de actina (GRAZIANI et al., 2019), concordando com nosso estudo que evidenciou correlação direta entre os níveis de zonulina e as concentrações de IFN- γ .



CONCLUSÃO

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que os pacientes com tireoidite de Hashimoto avaliados neste estudo apresentam disbiose intestinal e alterações da permeabilidade da barreira epitelial no intestino, mesmo fazendo reposição de hormônio tiroideano. Além disso, concluímos que os hábitos alimentares foram determinantes na composição da microbiota intestinal 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 TH.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAK, A.; KHAN, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 3, p. 473–493, 2019.

AJJAN, R. A. et al. Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 105, n. 3, p. 523–528, 1996.

AMIRKHANZADEH BARANDOUZI, Z. et al. Altered composition of gut microbiota in depression: A systematic review. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, n. June, p. 1–10, 2020.

ARGENIO, V. D.; SALVATORE, F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. **Clinica Chimica Acta**, v. 451, p. 97–102, 2015.

AXELRAD, J. E. et al. The role of gastrointestinal pathogens in inflammatory bowel disease: a systematic review Jordan. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 14, p. 1–17, 2021.

AYDIN, B. K.; YILDIZ, M.; TOPAL, N. Children with Hashimoto ' s Thyroiditis Have Increased Intestinal Permeability : Results of a Pilot Study. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**, v. 12, n. 3, p. 303–307, 2020.

BANESH HOFFMANN. **Albert Einstein: criador e rebelde**. [s.l: s.n.].

BELL, A. et al. Elucidation of a sialic acid metabolism pathway in mucus-foraging *Ruminococcus gnavus* unravels mechanisms of bacterial adaptation to the gut. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2393–2404, 2019.

BERER, K. et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 40, p. 10719–10724, 2017.

BIBBÒ, S. et al. The role of diet on gut microbiota composition. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 22, p. 4742–4749, 2016.

BONDE, Y. et al. Thyroid hormone reduces PCSK9 and stimulates bile acid synthesis in humans. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 11, p. 2408–2415, 2014.

BOSSOWSKI, A. et al. Lower proportions of CD4+CD25high and CD4+FoxP3, but not CD4+CD25+CD127low FoxP3+T cell levels in children with autoimmune thyroid diseases. **Autoimmunity**, v. 46, n. 3, p. 222–230, 1 maio 2013.

BRIX, T. H.; KYVIK, K. O. H. M.; HEGEDU, L. A Population-Based Study of Chronic Autoimmune Hypothyroidism in Danish Twins. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 2, p. 536–539, 2000.

BUCKLEY, A.; TURNER, J. R. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2018.

BUI, T. P. N. et al. Comparative genomics and physiology of the butyrate producing bacterium *Intestinimonas butyriciproducens*. **Environ Microbiol Rep**, v. 8, n. 6, p. 1024–1037, 2016.

BUI, T. P. N. et al. Mutual Metabolic Interactions in Co-cultures of the Intestinal *Anaerostipes rhamnosivorans* With an Acetogen, Methanogen, or Pectin-Degrader Affecting Butyrate Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. November, p. 1–12, 2019.

CALDERÓN-PÉREZ, L. et al. Gut metagenomic and short chain fatty acids signature in hypertension: a cross-sectional study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2020.

CAMILLERI, M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. **Gut**, v. 68, p. 1516–1526, 2019.

CARDING, S. et al. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, p. 1–9, 2015.

CAYRES, L. C. F. et al. Detection of Alterations in the Gut Microbiota and Intestinal Permeability in Patients With Hashimoto Thyroiditis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–12, 2021.

CHEN, Y. et al. Influence of Rapid Urbanization on Thyroid Autoimmune Disease in China. **International journal of endocrinology**, v. 2021, p. 9967712, 2021.

CHIOVATO, L.; MAGRI, F.; CARLÉ, A. Hypothyroidism in Context: Where We've Been and Where We're Going. **Advances in Therapy**, v. 36, p. 47–58, 2019.

CHOI, S. et al. Gut microbiota dysbiosis and altered tryptophan catabolism contribute to autoimmunity in lupus-susceptible mice. **Sci Transl Med**, v. 12, n. 551, 2020.

CHUA, H. H. et al. Intestinal Dysbiosis Featuring Abundance of *Ruminococcus gnavus* Associates With Allergic Diseases in Infants. **Gastroenterology**, v. 154, n. 1, p. 154–167, 2018.

CORNABY, C. et al. B cell epitope spreading: Mechanisms and contribution to autoimmune diseases. **Immunology Letters**, p. 1–14, 2014.

CORNEJO-PAREJA, I.; RUIZ-LIM, P.; ANA, M. G. Differential Microbial Pattern Description in Subjects with Autoimmune-Based Thyroid Diseases : A Pilot Study. **Journal of Personalized Medicine**, v. 10, n. 192, 2020.

CRISCITIELLO, C. et al. Impact of autoimmune diseases on outcome of patients with early breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 51184–51192, 2016.

CULINA, S. et al. Islet-reactive CD8⁺ T-cell frequencies in the pancreas but not blood distinguish type 1 diabetes from healthy donors. **Sci Immunol**, v. 3, n. 20, 2018.

DAYAN, C. M.; DANIELS, G. H. CHRONIC AUTOIMMUNE THYROIDITIS. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 2, p. 99–107, 2013.

DE OLIVEIRA, G. L. V. et al. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. **Immunology**, v. 152, n. 1, p. 1–12, 2017.

DEL PRETE, G. F. et al. Enhanced production of γ -interferon by thyroid-derived T cell clones from patients with Hashimoto's thyroiditis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 69, n. 2, p. 323–331, 1987.

DU, G. et al. Altered Gut Microbiota Related to Inflammatory Responses in Patients With Huntington's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–12, 2021.

DUNTAS, L. H. The Role of Iodine and Selenium in Autoimmune Thyroiditis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 47, n. 10, p. 721–726, 2015.

DUSEK, O. et al. Severity of Experimental Autoimmune Uveitis Is Reduced by Pretreatment with Live Probiotic Escherichia coli Nissle 1917. **Cells**, v. 10, n. 1, 2020.
 ERCOLINI, A. M.; MILLER, S. D. The role of infections in autoimmune disease. **Clin Exp Immunol**, v. 155, n. 1, p. 1–15, 2009.

ESNAFOGLU, E. et al. Increased Serum Zonulin Levels as an Intestinal Permeability Marker in Autistic Subjects. **The Journal of Pediatrics**, 2017.

FARZI, A.; FRÖHLICH, E. E.; HOLZER, P. Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 1, p. 5–22, 2018.

FRÖHLICH, E.; WAHL, R. Microbiota and Thyroid Interaction in Health and Disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 8, p. 479–490, 2019.

FUNG, T. C.; OLSON, C. A.; HSIAO, E. Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 145–155, 2017.

GARCIA-MANTRANA, I. et al. Shifts on gut microbiota associated to mediterranean diet adherence and specific dietary intakes on general adult population. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–11, 2018.

GERENOVA, J.; MANOLOVA, I.; STANILOVA, S. Serum levels of interleukin - 23 and interleukin - 17 in hashimoto's thyroiditis. **Acta Endocrinologica**, v. 15, n. 1, p. 74–79, 2019.

GOMES, A. C.; HOFFMANN, C.; MOTA, J. F. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. **Gut Microbes**, v. 9, n. 4, p. 308–325, 2018.

GRAZIANI, C. et al. Intestinal permeability in physiological and pathological conditions: Major determinants and assessment modalities. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 795–810, 2019.

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, J.; RAPOPORT, B.; MCLACHLAN, S. M. Balance of Th1/Th2 cytokines in thyroid autoantibody synthesis in vitro. **Autoimmunity**, v. 30, n. 1, p. 1–9, 1999.
HALL, A. B. et al. A novel Ruminococcus gnavus clade enriched in inflammatory bowel disease patients. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2017.

HERNÁNDEZ-CEBALLOS, W.; CORDOVA-GALLARDO, J. Gut Microbiota in Metabolic-associated Fatty Liver Disease and in Other Chronic Metabolic Diseases. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 9, n. 2, p. 227–238, 2021.

HIDALGO-CANTABRANA, C. D.; G, J. Gut microbiota dysbiosis in a cohort of patients with psoriasis. **British Journal of Dermatology**, p. 1–9, 2019.

ILLIANO, P.; BRAMBILLA, R.; PAROLINI, C. The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. **FEBS Journal**, v. 287, n. 5, p. 833–855, 2020.

ISHAQ, H. M. et al. Molecular estimation of alteration in intestinal microbial composition in Hashimoto's thyroiditis patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. June, p. 865–874, 2017.

ISHAQ, H. M. et al. Molecular Alteration Analysis of Human Gut Microbial Composition in Graves' disease Patients. **International journal of biological sciences**, v. 14, n. 11, p. 1558–1570, 2018.

JANG, L. G. et al. The combination of sport and sport-specific diet is associated with characteristics of gut microbiota: An observational study. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 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.
KAAKOUSH, N. O. Sutterella Species, IgA-degrading Bacteria in Ulcerative Colitis. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 519–522, 2020.

KAPPLER, K. et al. Increased Antibody Response to Fucosylated Oligosaccharides and Fucose-Carrying Bacteroides Species in Crohn's Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. July, p. 1–15, 2020.

KARL, J. P. et al. Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 312, n. 34, p. 559–571, 2017.

- KARO-ATAR, D. et al. Therapeutic Targeting of the Interleukin-4/Interleukin-13 Signaling Pathway: In Allergy and Beyond. **BioDrugs**, v. 32, n. 3, p. 201–220, 2018.
- KHAN, M. F.; WANG, G. Environmental Agents, Oxidative Stress and Autoimmunity. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2016.
- KHAN, M. F.; WANG, H. Environmental Exposures and Autoimmune Diseases: Contribution of Gut Microbiome. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. January, p. 1–11, 2020.
- KINASHI, Y.; HASE, K.; JORDAN, S. Partners in Leaky Gut Syndrome : Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity. v. 12, n. April, p. 1–9, 2021.
- KISELEVA, E. P. et al. The role of components of Bifidobacterium and Lactobacillus in pathogenesis and serologic diagnosis of autoimmune thyroid diseases. **Beneficial Microbes**, v. 2, n. 2, p. 139–154, 2011.
- KLAUS, D. A. et al. Original paper Increased plasma zonulin in patients with sepsis. **Biochemia Medica**, v. 23, n. 1, p. 107–111, 2013.
- KLINDER, A. et al. Impact of increasing fruit and vegetables and flavonoid intake on the human gut microbiota. **Food and Function**, v. 7, n. 4, p. 1788–1796, 2016.
- KNEZEVIC, J. et al. Thyroid-gut-axis: How does the microbiota influence thyroid function? **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1–16, 2020.
- LEE, J. Y. et al. Comparative analysis of fecal microbiota composition between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. **Genes**, v. 10, n. 10, 2019.
- LERNER, A.; MATTHIAS, T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 6, p. 479–489, 2015.
- LI, Q. et al. The pathogenesis of thyroid autoimmune diseases: New T lymphocytes – Cytokines circuits beyond the Th1–Th2 paradigm. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 3, p. 2204–2216, 2019.
- LI, Y. R. et al. Genetic sharing and heritability of paediatric age of onset autoimmune diseases. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–10, 2015.
- LIBBEY, J. E. et al. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis through colonisation of the gut with Escherichia coli. **Beneficial microbes**, v. 11, n. 7, p. 669–684, nov. 2020.
- 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. The Composition of Gut Microbiota in Patients Bearing Hashimoto's Thyroiditis with Euthyroidism and Hypothyroidism. **Hindawi International Journal of Endocrinology**, v. 2020, 2020.

- LU, Q. The critical importance of epigenetics in autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 41, p. 1–5, 2013.
- MACPHERSON, A. J. et al. The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 2, p. 145–149, 2009.
- MAIUOLO, J. et al. The Contribution of Gut Microbiota – Brain Axis in the Development of Brain Disorders. v. 15, n. March, 2021.
- MARCHESI, J. R. et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 330–339, 2016.
- MARIAT, D. et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–6, 2009.
- MATSUOKA, K.; KANAI, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. **Semin Immunopathol**, v. 37, p. 47–55, 2015.
- MCLEOD, D. S. A.; COOPER, D. S. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. **Endocrine**, v. 42, n. 2, p. 252–265, 2012.
- MESQUITA, D. et al. Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**, v. 55, n. 11, 2010.
- MI, H. et al. Bifidobacterium Infantis Ameliorates Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis Via Regulating T Cell Immunity in Colorectal Cancer Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 2330–2341, 2017.
- MOURA, E. G. D.; MOURA, C. C. P. DE. Regulation of thyrotropin synthesis and secretion. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 48, n. 1, p. 40–52, 2004.
- MU, Q. et al. Leaky Gut As a Danger Signal for Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. May, p. 1–10, 2017.
- MURDACA, G. et al. Vitamin d and microbiota: Is there a link with allergies? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 1–18, 2021.
- NAVARRO, J. et al. Bases Do Sistema Imunológico Associado À Mucosa Intestinal. **Sistema digestório: integração básico-clínica**, p. 1–20, 2016.
- NEUMAN, H. et al. Microbial endocrinology: The interplay between the microbiota and the endocrine system. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 4, p. 509–521, 2015.
- NOTO, D.; MIYAKE, S. Gut dysbiosis and multiple sclerosis. **Clinical Immunology**, p. 108380, 2020.
- OAMI, T.; COOPERSMITH, C. M. Measurement of Intestinal Permeability During Sepsis. **Methods in molecular biology**, v. 2321, p. 169–175, 2021.

- OLSHAN, K. L. et al. Gut microbiota in Celiac Disease: microbes, metabolites, pathways and therapeutics. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 16, n. 11, p. 1075–1092, 2020.
- PIROLA, I. et al. Selenium supplementation in patients with subclinical hypothyroidism affected by autoimmune thyroiditis: Results of the SETI study. **Endocrinología Diabetes y Nutrición**, v. 67, n. 1, p. 28–35, 2020.
- PUJO, J. et al. Bacteria-derived long chain fatty acid exhibits anti-inflammatory properties in colitis. **Gut**, v. 70, n. 6, p. 1088–1097, 2021.
- QI, Y. et al. Intestinal Permeability Biomarker Zonulin is Elevated in Healthy Aging. **J Am Med Dir Assoc**, v. 18, n. 9, p. 1–8, 2017.
- RAGUSA, F. et al. Hashimotos' thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 33, n. 6, p. 101367, 2019.
- RALLI, M. et al. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 10, p. 102649, 2020.
- REMBACKEN, B. Ultrastructural changes in enterocytes in subjects with Hashimoto's thyroiditis. **Gut**, p. 1877–1880, 2004.
- RIBEIRO, R. DE A.; WANDERLEY, R. C. P. L. J. M. H. L. P. DE S. C. A. V. G. L. C. W. DE S. Bases da resposta inflamatória do trato gastrointestinal. **Gastrointestinal, Tract**, p. 763–804, 2010.
- ROBERTS, M. H.; ERDEI, E. Comparative United States autoimmune disease rates for 2010-2016 by sex, geographic region, and race. **Autoimmun Rev**, v. 19, n. 1, 2020.
- ROCHA-RAMÍREZ, L. M. et al. Probiotic Lactobacillus Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017.
- ROJAS, M. et al. Molecular mimicry and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, n. October, p. 0–1, 2018.
- ROSE, D. R.; YANG, H.; SERENA, G. ET AL. Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. **Brain Behav Immun**, v. 70, p. 354–368, 2018.
- ROSE, N. R. Prediction and prevention of autoimmune disease in the 21st Century: A review and preview. **American Journal of Epidemiology**, v. 183, n. 5, p. 403–406, 2016.
- SAWICKA-GUTAJ, N. et al. Influence of cigarette smoking on thyroid gland — an update. **Endokrynologia Polska**, v. 65, n. 1, p. 54–62, 2014.

SCHOULTZ, I.; KEITA, Å. V. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1–30, 2020.

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. 1–14, 2016.

SHALABY, S. M. et al. Promoter methylation and expression of intercellular adhesion molecule 1 gene in blood of autoimmune thyroiditis patients. **Molecular Biology Reports**, n. 0123456789, 2019.

SHAPIRA, Y.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. 168–177, 2010.

SHEN, X. et al. Dynamic construction of gut microbiota may influence allergic diseases of infants in Southwest China. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

SHI, P. et al. Treatment of Guillain-Barré syndrome with Bifidobacterium infantis through regulation of T helper cells subsets. **International Immunopharmacology**, v. 61, n. March, p. 290–296, 2018.

SHI, Y. et al. Differentiation imbalance of Th1/Th17 in peripheral blood mononuclear cells might contribute to pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 72, n. 3, p. 250–255, 2010.

SHIN, J. H. et al. Lifestyle and geographic insights into the distinct gut microbiota in elderly women from two different geographic locations. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 35, n. 1, p. 1–9, 2016.

SHMUELY, H.; SHIMON, I.; GITTER, L. A. Helicobacter pylori infection in women with Hashimoto thyroiditis A case-control study. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 29, p. 1–5, 2016.

SIRIN, F. B. et al. Serum zonulin levels in type 2 diabetes patients with diabetic kidney disease. **Endokrynologia Polska**, maio 2021.

SNETHLAGE, C. M. F. et al. Auto-immunity and the gut microbiome in type 1 diabetes: Lessons from rodent and human studies. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, n. xxxx, p. 1–11, 2021.

SOMERS, E. C. Pregnancy and autoimmune diseases. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 64, p. 3–10, 2020.

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

SONG, Y. et al. Thyroid-stimulating hormone levels are inversely associated with serum total bile acid levels: A cross-sectional study. **Endocrine Practice**, v. 22, n. 4, p. 420–426, 2016.

SORINI, C. et al. Commensal Bacteria-Specific CD4+ T Cell Responses in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. November, 2018.

SPAGGIARI, G. et al. Probiotics ingestion does not directly affect thyroid hormonal parameters in hypothyroid patients on levothyroxine treatment. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. NOV, p. 1–9, 2017.

STEVENS, B. R. et al. Increased human intestinal barrier permeability plasma biomarkers zonulin and FABP2 correlated with plasma LPS and altered gut microbiome in anxiety or depression. **Gut**, v. 67, n. 8, p. 1555–1557, 2018.

STURGEON, C.; FASANO, A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. **Tissue Barriers**, v. 4, n. 4, p. 1–19, 2016.

TAMBURINI, S. et al. The microbiome in early life: Implications for health outcomes. **Nature Medicine**, v. 22, n. 7, p. 713–722, 2016.

TAYLOR, P. N. et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 5, p. 301–316, 2018.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 0, p. 1823–1836, 2017.

VIRILI, C. et al. Gut microbiota and Hashimoto ' s thyroiditis. **Rev Endocr Metab Disord**, 2018.

VIRILI, C.; STRAMAZZO, I.; CENTANNI, M. Gut microbiome and thyroid autoimmunity. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, p. 1–15, 2021.

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.

WILLIS, H. J.; JOANNE L. SLAVIN. The influence of diet interventions using whole, plan food on the gut microbiota: a narrative review. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, 2019.

WU, G. D. et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. October, p. 105–109, 2011.

XU, H. et al. The gut microbiota and its interactions with cardiovascular disease. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 637–656, 2020a.

XU, H. et al. Interactions between Gut Microbiota and Immunomodulatory Cells in Rheumatoid Arthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, p. 1–14, 2020b.

YOON, W. et al. The Impact of Cholecystectomy on the Gut Microbiota: A Case-Control Study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 1, p. 79, 2019.

ZAKE, T. et al. Upregulated tissue expression of T helper (Th) 17 pathogenic interleukin (IL)-23 and IL-1 β in Hashimoto's thyroiditis but not in graves' disease. **Endocrine Journal**, v. 66, n. 5, p. 423–430, 2019.

ZENG, H. et al. Secondary bile acids and short chain fatty acids in the colon: A focus on colonic microbiome, cell proliferation, inflammation, and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, 2019.

ZHANG, D. et al. Circulating zonulin levels in newly diagnosed Chinese type 2 diabetes patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, p. 4–10, 2014.

ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. **Nature Medicine**, v. 21, n. 8, p. 1–13, 2015.

ZHANG, X. et al. Functional deficits in gut microbiome of young and middle-aged adults with prediabetes apparent in metabolizing bioactive (Poly)phenols. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 1–19, 2020.

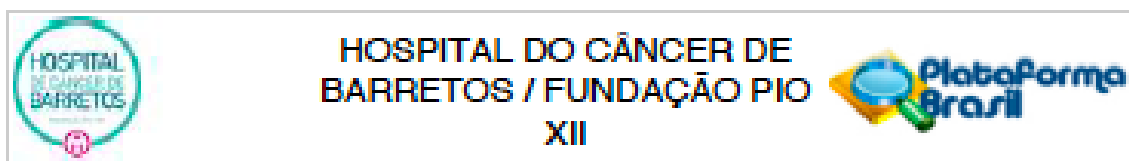
ZHAO, F. et al. Alterations of the gut microbiota in hashimoto's thyroiditis patients. **Thyroid**, v. 28, n. 2, p. 175–186, 2018.

ZHENG, J. et al. Dietary inflammatory potential in relation to the gut microbiome: results from a cross-sectional study. **Br J Nutr.**, v. 124, n. 9, p. 931–942, 2020.

ZHOU, C. et al. Metagenomic profiling of the pro-inflammatory gut microbiota in ankylosing spondylitis. **Journal of Autoimmunity**, v. 107, n. November, 2020.

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

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da disbiose intestinal em pacientes com tireoidite de Hashimoto e correlação com citocinas inflamatórias séricas

Pesquisador: Gisiane Lelis Viela de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66017617.8.0000.5437

Instituição Proponente: SISTEMA MED SERVICOS EDUCACIONAIS S.A.

Patrocinador Principal: SISTEMA MED SERVICOS EDUCACIONAIS S.A.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.990.787

Apresentação do Projeto:

A microbiota comensal do trato oral-gastrointestinal compreende várias espécies de microrganismos, principalmente bactérias, que vivem em simbiose com o ser humano e residem principalmente na porção distal do intestino. A relação de mutualismo entre a microbiota e o hospedeiro inclui contribuições como a digestão e fermentação de carboidratos, produção de vitaminas, desenvolvimento de tecidos linfoides associados à mucosa e prevenção da colonização por patógenos devido à competição. Todavia, quando essa relação de mutualismo entre hospedeiro e comensal está desregulada, condição conhecida como disbiose, a microbiota intestinal pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes. O objetivo deste trabalho será avaliar a disbiose intestinal em pacientes com tireoidite de Hashimoto (TH) e correlacionar com as concentrações séricas de citocinas inflamatórias. Serão incluídos pacientes e indivíduos controles atendidos nos postos de saúde associados à Secretaria de saúde do município de Barretos. Ambos os grupos assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido e responderão ao questionário sobre estilo de vida e hábitos alimentares. As amostras de fezes serão colhidas pelos próprios indivíduos em frascos coletores universais, após identificação e esclarecimentos a respeito da coleta. Os dados clínicos dos pacientes, tais como síndrome metabólica, ganho de peso, alopecia, cansaço, manifestações neurológicas, constipação,

Endereço: Rua Antenor Duarte Viçela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hccarbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 1.990.787

anti-tireoperoxidase (anti-TPO), anti-tireoglobulina (anti-TG), anticorpo antireceptor de TSH (TRAb) 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 pelo teste de Spearman. Esperamos encontrar diferenças na composição da microbiota intestinal de pacientes em relação aos indivíduos saudáveis e possíveis correlações com os dados clínicos e citocinas inflamatórias. Estudos adicionais sobre a disbiose em doenças autoimunes são necessários, e possivelmente, no futuro, probióticos imunomoduladores possam auxiliar no tratamento da tireoidite autoimune.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a disbiose intestinal em pacientes com Tireoidite de Hashimoto (HT) e correlacionar estes dados aos níveis séricos de citocinas inflamatórias.

Objetivo Secundário:

1. Realizar levantamento do número de pacientes com tireoidite de Hashimoto atendidos nos postos de saúde ligados à Secretaria de Saúde do município de Barretos;
2. Recrutar/selecionar pacientes com TH e indivíduos controles e aplicar o termo de consentimento livre e esclarecido e o questionário sócio-epidemiológico;
3. Caracterizar a microbiota intestinal isolada das fezes de pacientes com TH e indivíduos controles por PCR em tempo real;
4. Determinar a concentração de citocinas inflamatórias no soro de pacientes com TH e controles;
5. Correlacionar os dados da microbiota intestinal de pacientes com TH às concentrações de citocinas, aos dados clínicos e sócio-epidemiológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

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: 1.990.787

Benefícios:

Neste estudo será pesquisada a composição da flora bacteriana das fezes de pacientes com tireoidite de Hashimoto e indivíduos controles, sem a doença. Os resultados encontrados sobre as bactérias que habitam o intestino de pacientes e controles será correlacionado aos níveis de proteínas inflamatórias, presentes ou não, no sangue. Os resultados obtidos neste estudo são inéditos para a pesquisa no Brasil e poderá contribuir para o esclarecimento do papel da flora bacteriana no desenvolvimento de doenças como a tireoidite de Hashimoto. É possível que este estudo não traga benefícios diretos aos pacientes com tireoidite de Hashimoto, mas as informações obtidas poderão trazer benefícios a futuros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo tem como objetivo avaliar a microbiota intestinal de pacientes com tireoidite de Hashimoto e comparar com a microbiota de indivíduos saudáveis, para identificar disbiose nesses indivíduos. Além disso, irá avaliar as citocinas presentes no plasma desses indivíduos (pacientes e controles). Para isso, serão coletadas amostras de sangue periféricos e fezes. Trata-se de um estudo prospectivo, sendo os riscos inerentes principalmente à coleta de sangue e quebra de sigilo.

O projeto está bem escrito, há fundamentação na literatura e os resultados podem contribuir para a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na tireoidite de Hashimoto.

Os pacientes portadores de tireoidite de Hashimoto serão recrutados nos postos de saúde da cidade de Barretos, com anuência da Secretaria Municipal de Saúde no município (Autorizacao_Secretaria).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados corretamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

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, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa proposto.

Endereço: Rua Antenor Duarte Viçela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.764-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6800

E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 1.996.787

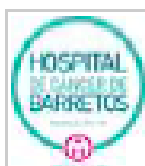
Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 30/09/2017.
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 1359/2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_880451.pdf	21/03/2017 13:16:24		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	21/03/2017 13:13:46	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Secretaria.pdf	21/03/2017 13:13:14	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Facisb.pdf	21/03/2017 13:12:49	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TH_2017.pdf	21/03/2017 13:10:24	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Outros	Financiamento.pdf	15/03/2017 21:52:12	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Responsabilidade.pdf	15/03/2017 21:51:37	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_microbiota_TH_Leonardo_2017.pdf	15/03/2017 21:45:22	Gislane Lelis Vilela de Oliveira	Aceito

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



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 1.890.707

Outros	Questionario_TH_2017.pdf	15/03/2017 21:44:31	Gisiane Leila Vilela de Oliveira	Aceito
--------	--------------------------	------------------------	-------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 30 de Março de 2017

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)3321-5800

E-mail: cnp@hccancerbarretos.com.br

Anexo B – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

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

TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação da disbiose intestinal em pacientes com tireoidite de Hashimoto e correlação com citocinas inflamatórias séricas

PESQUISADORES:

Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata, Brasil

Profa. Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira, Larissa Donadel Barreto Sargentini, Leonardo César de Freitas Cayres, Larissa Vedovato Vilela de Salis

Secretaria de Saúde do Município de Barretos

João Carlos Cicogna Paiolo

O QUE É ESTE DOCUMENTO?

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo que será realizado na Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata – FACISB, em colaboração com a Secretaria de Saúde e Ambulatório de Especialidades Médicas de Barretos para recrutamento/seleção de pacientes e controles. Este documento é chamado de “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e explica este estudo e qual será a sua participação, caso você aceite o convite. Este documento também fala dos possíveis riscos e benefícios se você quiser participar, além de dizer os seus direitos como participante da pesquisa. Após analisar as informações deste Termo de Consentimento e esclarecer todas as suas dúvidas, você terá o conhecimento necessário para tomar uma decisão sobre sua participação ou não neste estudo. Não tenha pressa para decidir. Se for preciso, leve para a casa e leia este documento com os seus familiares ou outras pessoas que são de sua confiança.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO?

Nos últimos anos, pesquisadores têm demonstrado a importância das bactérias (um tipo de microrganismo) que naturalmente são encontradas no intestino humano e são chamadas de microbiota ou flora bacteriana normal. Quando a boa relação entre o ser humano e estas bactérias é prejudicada, a flora bacteriana normal pode se alterar e contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes inflamatórias (condição em que o sistema de defesa ataca o próprio organismo). Um dos principais efeitos da quebra da boa relação entre os micróbios que habitam nosso intestino e o ser humano é a ativação desregulada de células do sistema de defesa, provocando a inflamação. A desregulação deste sistema de defesa induz a produção de proteínas, chamadas citocinas inflamatórias, que favorecem o desenvolvimento de doenças autoimunes, como a tireoidite de Hashimoto. No entanto, ainda não sabemos se a quebra da boa relação entre micróbios e corpo humano pode ser vista como agente causador da doença ou como uma consequência dela.

O QUE ESTE ESTUDO QUER SABER?

Este estudo tem como objetivo a caracterização e comparação das bactérias presentes nas fezes de pacientes com tireoidite de Hashimoto e de indivíduos sem a doença, conhecidos como grupo controle, e relacionar estes resultados com as proteínas inflamatórias presentes no sangue de pacientes e controles.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO DURANTE O ESTUDO?

O(A) senhor(a) responderá à um questionário que terá duração de aproximadamente 60 minutos. O questionário é sobre o histórico de doenças na família, medicações utilizadas, hábitos de vida, como ingestão de álcool e uso do tabaco, e hábitos alimentares, como consumo de vegetais, frutas, leite e

derivados, carne vermelha e outros. Você tem o direito de recusar-se a responder às perguntas que causem qualquer tipo de constrangimento. Após assinatura deste termo de consentimento e a entrevista para responder às perguntas do questionário, será solicitado a você que doe uma pequena amostra de sangue (2 tubos pequenos), que será colhido por profissionais de saúde treinados. A amostra de sangue será utilizada para estudar as possíveis proteínas inflamatórias presentes no sangue dos pacientes e controles. Após a coleta de sangue, será entregue à você um frasco devidamente identificado para a coleta de fezes em sua residência, e todas as dúvidas a respeito da forma mais adequada para a coleta e o prazo de entrega serão esclarecidos. As fezes serão utilizadas para a descrição e comparação das bactérias presentes na flora bacteriana de pacientes e controles. Alguns dados clínicos (exames) que foram realizados a pedido de seu médico podem ser pesquisados pelo grupo do estudo no prontuário dos pacientes com tireoidite de Hashimoto. Esta pesquisa não será realizada para os indivíduos controles.

HAVERÁ ALGUM RISCO OU DESCONFORTO SE EU PARTICIPAR DO ESTUDO?

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

HAVERÁ ALGUM BENEFÍCIO PARA MIM SE EU PARTICIPAR DO ESTUDO?

Neste estudo será pesquisada a composição da flora bacteriana das fezes de pacientes com tireoidite de Hashimoto e indivíduos controles, sem a doença. Os resultados encontrados sobre as bactérias que habitam o intestino de pacientes e controles será correlacionado aos níveis de proteínas inflamatórias, presentes ou não, no sangue. Os resultados obtidos neste estudo são inéditos para a pesquisa no Brasil e poderá contribuir para o esclarecimento do papel da flora bacteriana no desenvolvimento de doenças como a tireoidite de Hashimoto. É possível que este estudo não traga benefícios diretos aos pacientes com tireoidite de Hashimoto, mas as informações obtidas poderão trazer benefícios a futuros pacientes.

QUAIS SÃO AS OUTRAS OPÇÕES SE EU NÃO PARTICIPAR DO ESTUDO?

Não há procedimentos alternativos.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS SE EU QUISER PARTICIPAR DO ESTUDO?

Você tem direito a:

- 1) Receber as informações do estudo de forma clara;
- 2) Ter oportunidade de esclarecer todas as suas dúvidas;
- 3) Ter o tempo que for necessário para decidir se quer ou não participar do estudo;
- 4) Ter liberdade para recusar a participação no estudo, e isto não trará qualquer problema para você;
- 5) Ter liberdade para desistir e se retirar do estudo a qualquer momento;
- 6) Ter assistência a tudo o que for necessário se ocorrer algum dano por causa do estudo, de forma gratuita, pelo tempo que for preciso;
- 7) Ter direito a reclamar indenização se ocorrer algum dano por causa do estudo;
- 8) Ser ressarcido pelos gastos que você e seu acompanhante tiverem por causa da participação na pesquisa, como por exemplo, transporte e alimentação;
- 9) Ter acesso aos resultados dos exames realizados durante o estudo;
- 10) Ter respeitado o seu anonimato (confidencialidade);
- 11) Ter respeitada a sua vida privada (privacidade);
- 12) Receber uma via deste documento, assinada e rubricada em todas as páginas por você e pelo pesquisador;

- 13) Ter liberdade para retirar o consentimento para que usem ou guardem o material biológico que foi removido de você;

O QUE ACONTECERÁ COM O MATERIAL QUE FOR COLETADO DE MIM?

Todos os materiais biológicos coletados durante este estudo (sangue e fezes) e os resultados obtidos durante o estudo não serão utilizados para outros fins além daqueles explicados neste Termo de Consentimento. Estes 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.

SE EU TIVER DÚVIDAS SOBRE OS MEUS DIREITOS OU QUISER FAZER UMA RECLAMAÇÃO, COM QUEM EU FALO?

Fale diretamente com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos. Este comitê é formado por pessoas que analisam a parte ética dos estudos e autorizam ele acontecer ou não. Você pode entrar em contato com este Comitê por telefone (tel: (17) 3321-0347 ou (17) 3321-6600 - ramal 6647), e-mail (cep@hcancerbarretos.com.br) carta (Rua Antenor Duarte Vilela, 1331, Instituto de Ensino e Pesquisa, 14784-057) ou pessoalmente. O horário de atendimento é de 2ª a 5ª feira, das 8h00 às 17h00, e 6ª feira, da 8h00 às 16h00. O horário de almoço é de 12h00 às 13h00.

SE EU TIVER DÚVIDAS SOBRE O ESTUDO, COM QUEM EU FALO?

Fale diretamente com o pesquisador responsável. As formas de contato estão abaixo:
Profa. Dra. Gislane Lelis Vilela de Oliveira, (17) 33213060, (17) 997439417 ou pelo e-mail glelisvilela@facisb.edu.br

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu entendi o estudo. Tive a oportunidade de ler o Termo de Consentimento ou alguém leu para mim. Tive o tempo necessário para pensar, fazer perguntas e falar a respeito do estudo com outras pessoas. Autorizo a minha participação na pesquisa. Ao assinar este Termo de Consentimento, não abro mão de nenhum dos meus direitos. Este documento será assinado por mim e pelo pesquisador, sendo todas as páginas rubricadas por nós dois. Uma via ficará comigo, e outra com o pesquisador.

CAMPO DE ASSINATURAS

Anexo C – Questionário Socioepidemiológico

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

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

1	Identificação	
2	Nome	
3	Registro hospitalar	
4	Grupo 1- Tireoidite de Hashimoto; 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- Cesárea; 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	
12	Ocupação/Profissão exercida por mais tempo ESPECIFICAR	
13	Ocupação/Profissão - Tempo ANOS	
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	
18	Usou algum anti-inflamatório nos últimos 15 dias? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
19	Anti-inflamatório ESPECIFICAR	
20	Usou algum antibiótico nos últimos 15 dias? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
21	Antibiótico ESPECIFICAR	
22	Usou corticoide ou algum outro imunossupressor nos últimos 30 dias? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	

23	Corticoide/outra imunossupressor 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 algum tipo de cirurgia do trato gastrointestinal ou outras? 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 ml½ 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 ml½ 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 ml½ 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	
50	Idade que parou ANOS	
51	Cigarro de palha 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
52	Número de cigarros por dia ESPECIFICAR	
53	Idade de início ANOS	
54	Idade que parou 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) 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, seleta 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 tireoidite de Hashimoto 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, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Graves, artrite reumatoide, pênfigo 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, 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, atualmente, 2- Sim, passado	
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 superior ESPECIFICAR	
88	Tem alergia? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
89	Alergia ESPECIFICAR	
90	Tem asma? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	

Anexo D – Publicação resultante dos dados iniciais do projeto



Detection of Alterations in the Gut Microbiota and Intestinal Permeability in Patients With Hashimoto Thyroiditis

Leonardo César de Freitas Cayras^{1†}, Larissa Vedovato Vilão de Salis^{2†},
Guilherme Siqueira Pardo Rodrigues¹, André van Halvoort Langert³,
Ana Paula Custódio Biondi¹, Larissa Donadel Barreto Sargentini¹, João Luiz Brisotti¹,
Eloni Gomes² and Gislane Lelis Vilão de Oliveira^{1,2,4*}

¹Microbiome Study Group, School of Health Sciences Dr. Paulo Pires, São Paulo, Brazil, ²Microbiology Program, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil, ³Bernart Cancer Hospital, São Paulo, Brazil, ⁴Food Engineering and Technology Department, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Yuan Kun Lee,
National University of
Singapore, Singapore

Reviewed by:

Huwei Yi,
Ocean University of China, China
Zhifeng Sun,
Inner Mongolia Agricultural
University, China

*Correspondence:

Gislane Lelis Vilão de Oliveira
gilevilo@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 09 October 2020

Accepted: 04 February 2021

Published: 05 March 2021

Citation:

Cayras LCdF, de Salis LV,
Rodrigues GSP, Langert AvH,
Biondi APC, Sargentini LDB,
Brisotti JL, Gomes E and de
Oliveira GLV (2021) Detection of
Alterations in the Gut Microbiota and
Intestinal Permeability in Patients With
Hashimoto Thyroiditis.
Front. Immunol. 12:579140.
doi: 10.3389/fimmu.2021.579140

Hashimoto thyroiditis (HT) is the most common autoimmune disease worldwide, characterized by chronic inflammation and circulating autoantibodies against thyroid peroxidase and thyroglobulin. Patients require hormone replacement with oral levothyroxine, and if untreated, they can develop serious adverse health effects and ultimately death. There is a lot of evidence that the intestinal dysbiosis, bacterial overgrowth, and increased intestinal permeability favor the HT development, and a thyroid-gut axis has been proposed, which seems to impact our entire metabolism. Here, we evaluated alterations in the gut microbiota in Brazilian patients with HT and correlated this data with dietary habits, clinical data, and systemic cytokines and zonulin concentrations. Stool samples from 40 patients with HT and 53 controls were analyzed using real-time PCR, the serum cytokine levels were evaluated by flow cytometry, zonulin concentrations by ELISA, and the dietary habits were recorded by a food frequency questionnaire. We observed a significant increase ($p < 0.05$) in the *Bacteroides* species and a decrease in *Bifidobacterium* in samples of patients with HT. In addition, *Lactobacillus* species were higher in patients without thyroid hormone replacement, compared with those who use oral levothyroxine. Regarding dietary habits, we demonstrated that there are significant differences in the consumption of vegetables, fruits, animal-derived proteins, dairy products, saturated fats, and carbohydrates between patients and control group, and an inverse correlation between animal-derived protein and *Bacteroides* genus was detected. The microbiota modulation by diet directly influences the inflammatory profile due to the generated microbiota metabolites and their direct or indirect action on immune cells in the gut mucosa. Although there are no differences in systemic cytokines in our patients with HT, we detected increased zonulin concentrations, suggesting a leaky gut in patients with HT. These findings could help understand the development and progression of HT, while further investigations to clarify the underlying mechanisms of the diet-microbiota-immune system axis are still needed.

Keywords: intestinal dysbiosis, inflammatory cytokines, dietary habits, gut microbiota, Hashimoto thyroiditis, autoimmune disease, intestinal permeability

INTRODUCTION

The Hashimoto thyroiditis (HT) is an organ-specific autoimmune disease and one of the most common diseases worldwide (1). HT is characterized by chronic inflammation, with tertiary lymphoid follicles development and increased concentrations of circulating autoantibodies against thyroid peroxidase (anti-TPO) and thyroglobulin (anti-Tg) (2). The thyroid parenchyma is replaced by the lymphocytes infiltration, inducing organ enlargement, gland fibrosis, and destruction (3). The progressive thyrocyte depletion leads to decreased thyroid hormone function and clinical hypothyroidism, a condition marked by a reduced metabolic activity in several tissues. The disease is correlated with decreased cardiovascular contractility, coronary artery disease, infertility, dementia, neurosensory and musculoskeletal changes, and reduced colonic activity and orocecal time transit (4, 5). Patients require hormone replacement with oral levothyroxine, and if untreated, they can develop serious adverse health effects and ultimately death (6, 7).

Hashimoto thyroiditis has become a global public health concern, and the worldwide prevalence reaches 10–12%, affecting 10 times more women, and the peak incidence is between 30 and 50 years old (5, 6). In the United States of America, HT affects ~4% of women aged 18–24 years and 21% of women older than 74 years (6). In Europe, the prevalence varies between 0.2 and 5.3% in the general population, and 7.5% of women in the United Kingdom presented elevated thyroid-stimulating hormone (TSH) concentrations (8). In Brazil, the prevalence of elevated TSH in adult women in Rio de Janeiro was 12.3%, reaching 19.1% among those over 70 years old. In the metropolitan region of São Paulo, the HT prevalence reached 8.0%, and in an elderly population, the prevalence was 6.5 and 6.1% for women and men, respectively (9). The economic impact can be significant taking into account the direct effects of the disease, with the HT side effects, which range from depression and to a greater propensity to develop differentiated thyroid cancer and extra-thyroidal cancers (5, 10–13).

Although the HT etiology remains unknown, epidemiological studies suggest that HT is caused by an interaction between genetic and environmental factors (14). The genetic predisposition plays a crucial role in the loss of tolerance to self-antigens and loci linked to immune-modifying genes such as human leukocyte antigens (HLA class I and II) and cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) could be involved in the autoimmune process. The interactions between these loci and environmental factors might influence disease phenotype and severity (3). The environmental factors that may be involved in the HT triggering include excessive iodine consumption; selenium, iron, zinc, and vitamin D deficiencies; bacterial infections, such as *Helicobacter pylori* and *Yersinia enterocolitica*; viral infections, such as hepatitis C, Epstein-Barr virus, and enteroviruses; smoking; pollutants; and chemical agents, and also, factors such as stress, climate, age, and gender (15). More recently, it is hypothesized that gut microbiota might play an important role in triggering HT (16).

There is a lot of evidence that the intestinal dysbiosis, bacterial overgrowth, and increased intestinal permeability

(leaky gut) favor HT development, and a thyroid-gut axis has been proposed which seems to impact our entire metabolism (17, 18). The commensal gut bacteria influence the innate, cellular, and humoral immunity by interacting with epithelial cells and mucosal immune cells via pattern recognition receptors. Depending on the generated metabolites, microbiota can activate a proinflammatory or anti-inflammatory program (19). Moreover, gut microbiota can affect the thyroid hormone concentrations by controlling iodine uptake, degradation, and enterohepatic recycling of these hormones, and the levothyroxine bioavailability (L-thyroxine). There is a prominent effect of minerals on microbiota-host interactions, mainly by zinc, selenium, and iron. In addition, the microbiota may play role in thyroid disorders by influencing neurotransmitters, the hypothalamus-pituitary axis, the dopamine production, and consequently the TSH secretion (17).

The short-chain fatty acids (SCFAs), metabolites from anaerobic microbiota fermentation, function as an energy source for enterocytes and, together with thyroid hormones, mainly T3, induce enterocyte differentiation, and strengthen the epithelial barrier integrity (20). In addition to SCFAs, the microbiota produce secondary bile acids in the colon, which present systemic effects and interfere with TSH levels (21). Secondary bile acids can regulate type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the gut, molecules involved in thyroid metabolism, and the lipopolysaccharides (LPS) derived from Gram-negative bacteria inhibits intestinal D2 and hepatic D1, and decreases the expression of thyroid hormones in the liver (22).

In animal models, the association between the gut microbiota and thyroid functions has been proposed since 1970s. The depleted microbiota in antibiotic-treated rats induced a decrease in thyroid functions, when evaluated by radioactive iodine uptake (23). In the same line, the germ-free mice present an increase in TSH levels when compared with the conventionally raised mice (22).

In humans, few studies have been carried out in order to understand the relationship between intestinal microbiota and HT. Some recent studies have demonstrated the existence of intestinal dysbiosis in patients with HT and showed an increase in the *Bacteroides*, *Escherichia-Shigella*, and *Parasutterella* genera and a decrease in the *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, and *Dialister* genera in the gut microbiota in patients with HT (23). Another study showed an increase in the relative abundance of *Blautia*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Romboutsia*, *Dorea*, *Fusicatenibacter*, and *Eubacterium* genera and a decrease in *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotella*, and *Lachnospirillum* genera in the gut microbiota in patients with HT (24).

On the basis of this background and the fact that there are no studies evaluating the gut microbiota in Brazilian patients with HT, the aim of this study was to evaluate the presence of some specific bacteria in stool samples of patients with HT and to correlate these data with dietary habits, clinical data, and systemic cytokines and zonulin concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Patients With HT and Control Subjects

Patients diagnosed with HT, with increased TSH and decreased free thyroxine levels (FT4), associated or not associated with elevated anti-TPO and anti-Tg antibodies, were enrolled for this study. The Barretos Cancer Hospital Ethics Committee (Process number 1,359/2017) approved this study, and all participants signed the informed consent form.

About 40 patients with HT aged 23–82 years (mean age $\pm$ SD = 48.9 ± 13.3 years) were enrolled. Fifty-three healthy controls aged 18–79 years (mean age $\pm$ SD = 45.6 ± 16.7 years) were recruited for the study. Exclusion criteria, for both groups, include the use of anti-inflammatory, immunosuppressant drugs, antibiotics, and vaccination in the last 30 days, with gastrointestinal surgeries, inflammatory bowel diseases, and chronic diarrhea.

After the informed consent, patients and controls answered a food frequency questionnaire (FFQ), containing questions about frequency and consumption of vegetables, fruits, animal-derived proteins, dairy products, carbohydrates, and saturated fat. After that, the peripheral blood was collected, and stool samples were collected within 3–5 days. Table 1 summarizes demographic data and clinical parameters in patients with HT.

DNA Extraction From Stool Samples and Real-Time PCR

DNA was obtained from 200 mg of stool samples of patients with HT and controls by using QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany), according to the instructions of the manufacturer. The composition of the gut microbiota was determined by specific primers for *Bacteroides* (*Bac*), *Bifidobacterium* (*Bif*), *Clostridium coccoide* (*Ccoc*), *Clostridium coccoide-Eubacterium rectale* (*CEub*), *Clostridium leptum* (*Clept*), *Lactobacillus* (*Lac*), *Prevotella* (*Prev*), and *Roseburia* (*Ros*). The primers were described previously and designed by using the 16S rRNA gene sequences from the Ribosomal Database Project (25). PCR was performed by using 7.5 μ l of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 4.0 μ l of ultrapure water (Uniscience Corporation, Hialeah, FL, USA), 1.0 μ l of each primer (2 μ M), and 1.5 μ l of DNA (5 ng). The normalization was performed by dividing the DNA copy numbers obtained for target primers (*Bac*, *Bif*, *Ccoc*, *CEub*, *Clept*, *Lac*, *Prev*, and *Ros*) and for the copy numbers of universal primer (*Univ*). The relative abundance was quantified by using cycle threshold (Ct) values and was expressed in relative expression units (REUs) per 200 mg of stool (26).

Cytokine Serum Quantification by Flow Cytometer

Approximately 8.5 ml of peripheral blood were collected from patients with HT and healthy individuals in gel tube with clot activator (BD Vacutainer SST II Advance, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). After collection, samples were incubated at room temperature for 1 h and centrifuged at $1,372 \times g$ for 5 min. The supernatant was withdrawn, and the serum

was used for cytokine quantification that was performed by cytometric bead array assay (Human Th1/Th2/Th17 Kit, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The levels of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, interferon-gamma (IFN- γ), and tumor necrosis factor (TNF) were detected by a flow cytometer (FACSCanto™ II, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Results were analyzed by BD FACSArray™ software and were expressed in pg/ml.

Zonulin Serum Quantification by Sandwich-ELISA

After peripheral blood collection, samples were incubated in gel tube with clot activator for 50 min and then centrifuged at $1,372 \times g$ for 5 min. The serum samples were used for zonulin quantification by using the Human Zonulin ELISA Kit (Elabscience, Bethesda, MD, USA). Standards and samples were added to plates precoated with specific antibodies to human zonulin and incubated for 1 h at 37°C. Then, a biotinylated detection antibody specific for human zonulin and avidin-horseradish peroxidase conjugate was added and incubated for 30 min. Unbound and free molecules were washed away. The substrate solution was added to each well and incubated for 15 min. When the enzyme-substrate reaction was blocked by stop solution, the color turned to yellow. The optical density was measured in a spectrophotometer at 450 nm. The standard curve was constructed, and the zonulin concentrations were calculated by converting the obtained optical density in ng/ml.

Statistical Analysis

The data extracted from the surveys on dietary habits of patients with HT and controls were analyzed by the Pearson chi-square test, the REUs of the gut microbiota were analyzed by the non-parametric Mann-Whitney U-test, and the serum concentrations of cytokines and zonulin were performed by unpaired t-test with the Welch's correction. Correlations of the gut microbiota, clinical data, cytokines, and zonulin concentrations were performed by the Spearman's rank correlation coefficient. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Increased *Bacteroides* and Decreased *Bifidobacterium* in the Gut Microbiota in Patients

To analyze the composition of the gut microbiota in patients with HT, we investigated some bacterial species in stool samples by real-time PCR. We detected an increase in the REUs of *Bacteroides* species in the samples derived from patients (median *Bac*: 2,344 REU/200 mg stool; $p < 0.0001$) compared with control subjects (median *Bac*: 221.3 REU/200 mg stool) (Figure 1A). A significant decrease in the REUs of *Bifidobacterium* species was observed in the stool samples isolated from patients with HT (median *Bif*: 70.86 REU/200 mg stool; $p = 0.005$) when compared with controls (median *Bif*: 830.6 REU/200 mg stool) (Figure 1B). There are no significant differences ($p >$

TABLE 1 | Demographic data and clinical parameters from patients with Hashimoto thyroiditis (HT).

Patient	Gender/Age	Ethnicity	TSH ($\mu\text{U}/\text{mL}$)	FT4 (ng/dL)	TPO Ab (U/mL)	Tg Ab (U/mL)	Disease duration (years)	Current treatment
HT01	F/28	Caucasian	ND	ND	ND	ND	08 y	LT4
HT02	F/57	Caucasian	1.61	0.84	51.27	ND	01 y	NR
HT03	F/55	Caucasian	ND	ND	ND	ND	01 y	NR
HT04	F/28	Afrodescendent	ND	ND	ND	ND	05 y	NR
HT05	F/55	Caucasian	ND	ND	ND	ND	03 y	LT4
HT06	F/29	Caucasian	0.01	2.6	356	ND	13 y	NR
HT07	F/50	Caucasian	5.17	1.23	ND	ND	25 y	LT4
HT08	F/20	Caucasian	6.55	1.2	>600	241.3	04 y	LT4
HT09	F/42	Caucasian	9.86	ND	71	ND	12 y	LT4
HT10	F/67	Caucasian	12.21	1.1	463	ND	05 y	LT4
HT11	F/40	Caucasian	17	0.92	325	ND	03 y	LT4
HT12	M/58	Caucasian	7.58	1.2	ND	ND	05 y	LT4
HT13	F/50	Afrodescendent	51	0.3	109	111	02 y	LT4
HT14	F/53	Afrodescendent	14	0.87	1,083	6,052	42 y	LT4
HT15	F/54	Caucasian	3.41	1.21	ND	ND	25 y	NR
HT16	F/64	Caucasian	1.53	1.84	>2,000	ND	25 y	LT4
HT17	F/52	Caucasian	9.85	0.57	250	11.58	05 y	LT4
HT18	F/45	Caucasian	5.51	0.82	160	137.8	02 y	LT4
HT19	F/63	Afrodescendent	ND	ND	ND	ND	17 y	LT4
HT20	F/53	Caucasian	ND	ND	ND	ND	10 y	LT4
HT21	F/62	Afrodescendent	ND	ND	ND	ND	10 y	NR
HT22	F/54	Caucasian	ND	ND	211.8	56.53	20 y	LT4
HT23	F/38	Afrodescendent	ND	ND	ND	ND	14 y	LT4
HT24	F/65	Caucasian	4.52	ND	ND	ND	10 y	LT4
HT25	F/52	Afrodescendent	10.1	ND	ND	ND	06 y	LT4
HT26	F/65	Afrodescendent	4.72	ND	ND	ND	05 y	LT4
HT27	M/62	Caucasian	16.8	2.05	10.82	42.81	03 y	LT4
HT28	F/47	Caucasian	1.26	1.1	ND	ND	21 y	LT4
HT29	F/55	Caucasian	9.48	ND	ND	ND	07 y	LT4
HT30	F/51	Afrodescendent	3.2	0.89	270	143.23	18 y	NR
HT31	F/45	Caucasian	4.33	1.06	159	214	04 y	LT4
HT32	M/66	Caucasian	ND	ND	ND	ND	03 y	NR
HT33	M/56	Caucasian	0.52	1.73	970	26	0.9 y	LT4
HT34	F/23	Caucasian	2.03	0.96	1,840	8.58	05 y	LT4
HT35	F/44	Caucasian	0.97	ND	ND	ND	07 y	LT4
HT36	F/45	Caucasian	ND	ND	ND	ND	ND	LT4
HT37	F/49	Caucasian	4.91	0.95	0.52	57	07 y	LT4
HT38	F/43	Caucasian	0.48	1.1	366	5.06	02 y	LT4
HT39	F/52	Caucasian	4.89	1.24	282	>1,000	10 y	LT4
HT40	F/27	Caucasian	ND	ND	ND	ND	ND	LT4

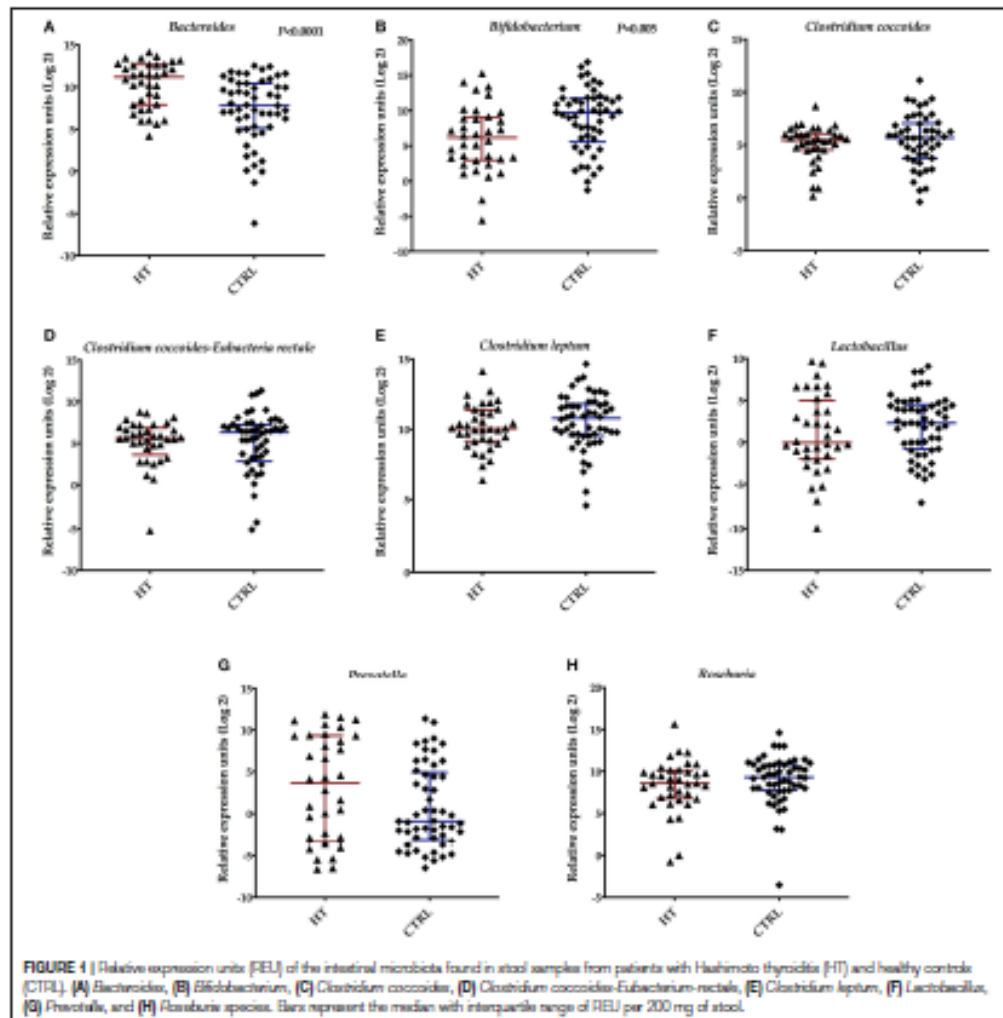
HT, Hashimoto thyroiditis; F, female; M, male; TSH, thyroid stimulating hormone (Reference: 0.26–5.23 $\mu\text{U}/\text{mL}$); FT4, free thyroxine (Reference: 0.54–1.24 ng/dL); TPO Ab, anti-thyroid peroxidase antibodies (Reference: <9 U/mL); Tg Ab, anti-thyroglobulin antibodies (Reference: <4 U/mL); y, years; ND, not determined; LT4, oral levothyroxine sodium; NR, non-thyroid hormone replacement.

0.05) in the REU/200 mg stool obtained from *Clostridium coccoides* (median Ccoc: 43.51), *Clostridium coccoides-Eubacteria rectale* (median CIEub: 48.03), *Clostridium leptum* (median Clept: 1.060), *Lactobacillus* (median Lac: 0.974), *Prevotella* (median Prev: 12.53), and *Roseburia* species (median: 385.8) in stool samples of patients with HT, when compared with the healthy individuals (median Ccoc: 51.21; CIEub: 78.04; Clept:

1,762; Lac: 4.933; Prev: 0.530; and Ros: 635.9, respectively) (Figures 1C–H).

Dietary Habits and Correlations With the Gut Microbiota

To evaluate the dietary habits from patients and controls, we applied an FFQ regarding the frequency of consumption



of vegetables, fruits, animal-derived proteins, dairy products, saturated fats, and carbohydrates. The interviewed subjects reported the daily ingestion of vegetables [patients (HT) = 59%; controls (C) = 53.3%; fruits (HT = 38.5%; C = 43.3%), proteins (HT = 51.3%; C = 30%), dairy products (HT = 48.7%; C = 60%), saturated fats (HT = 17.9%; C = 16.7%), and carbohydrates (HT = 38.5%; C = 43.3%)]. When we compared the dietary habits between patients with HT and controls, we observed a significant difference ($p < 0.05$) in the consumption of vegetables, fruits, proteins, dairy products, saturated fats, and carbohydrates. The

results concerning the dietary habits from patients and controls were shown in Table 2.

In order to detect correlations between diet and gut microbiota composition in patients with HT, we used the consumption frequencies and the REUs of *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium coccoideus*, *Clostridium coccoideus-Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, and *Roseburia*. We found an inverse correlation ($p = 0.002$; $r = -0.61$) between animal-derived protein consumption by patients and the REUs of *Bacteroides* species.

TABLE 2 | Dietary habits of the patients with HT and control subjects.

Dietary variables (consumption frequency)	Patients with HT N (%)	Controls N (%)	p-value
VEGETABLES			
Less than once per month	1 (2.6%)	0	p = 0.001
1–3 times per month	2 (5.1%)	2 (6.7%)	
1–2 times a week	2 (5.1%)	4 (13.3%)	
On most days	11 (38.2%)	8 (26.7%)	
Every day	23 (50%)	16 (53.3%)	
FRUITS			
Less than once per month	3 (7.7%)	0	p = 0.001
1–3 times per month	4 (10.3%)	4 (13.3%)	
1–2 times a week	7 (17.8%)	8 (26.7%)	
On most days	10 (25.6%)	5 (16.7%)	
Every day	15 (38.5%)	13 (43.3%)	
PROTEINS			
1–3 times per month	1 (2.6%)	1 (3.3%)	p = 0.001
1–2 times a week	6 (15.4%)	11 (36.7%)	
On most days	12 (30.8%)	9 (30.0%)	
Every day	20 (51.3%)	9 (30.0%)	
DAIRY PRODUCTS			
Never consumes	5 (12.8%)	1 (3.3%)	p = 0.001
Less than once per month	3 (7.7%)	0	
1–3 times per month	4 (10.3%)	3 (10.0%)	
1–2 times a week	3 (7.7%)	6 (20.0%)	
On most days	5 (12.8%)	2 (6.7%)	
Every day	19 (48.7%)	18 (60.0%)	
SATURATED FAT			
Never consumes	7 (17.8%)	7 (23.3%)	p = 0.005
Less than once per month	2 (5.1%)	1 (3.3%)	
1–3 times per month	8 (20.5%)	10 (33.3%)	
1–2 times a week	11 (28.2%)	6 (20.0%)	
On most days	4 (10.3%)	1 (3.3%)	
Every day	7 (17.8%)	5 (16.7%)	
CARBOHYDRATES			
Never consumes	1 (2.6%)	0	p = 0.001
Less than once per month	2 (5.1%)	0	
1–3 times per month	6 (15.4%)	2 (6.7%)	
1–2 times a week	13 (33.3%)	6 (20.0%)	
On most days	2 (5.1%)	9 (30.0%)	
Every day	15 (38.5%)	13 (43.3%)	

Correlations Between the Gut Microbiota and Clinical Data

To evaluate the connection between gut microbiota composition and clinical parameters, we correlated the REUs of *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium coccoides-Eubacteria rectale*, *Clostridium leptum*, *Lactobacillus*, *Prevotella*,

and *Roseburia* with concentrations of TSH, FT4, TPO, and Tg autoantibodies. We detected positive correlations among the REUs of *Clostridium coccoides* ($p = 0.023$; $r = 0.40$) and *Clostridium coccoides-Eubacteria rectale* ($p = 0.010$; $r = 0.45$) and in the TSH levels (Figure 2A). The REUs of *Roseburia* species inversely correlated ($p = 0.015$; $r = -0.49$) with FT4 levels (Figure 2B). We also found a positive correlation between *Clostridium coccoides* ($p = 0.040$; $r = 0.30$) and disease duration (Figure 2C). There are no correlations ($p > 0.05$) among gut microbes and TPO and Tg autoantibodies. Besides that, we observed significant differences in the REUs of *Lactobacillus* between patients who did thyroid hormone replacement therapy ($N = 28$) and those who did not ($N = 8$) (median *Lac* LT4: 0.8065 REU/200 mg stool; median *Lac* NR: 47.73; $p = 0.020$; Figure 2D).

Systemic Cytokine Profile in Patients With HT Was Similar to Controls

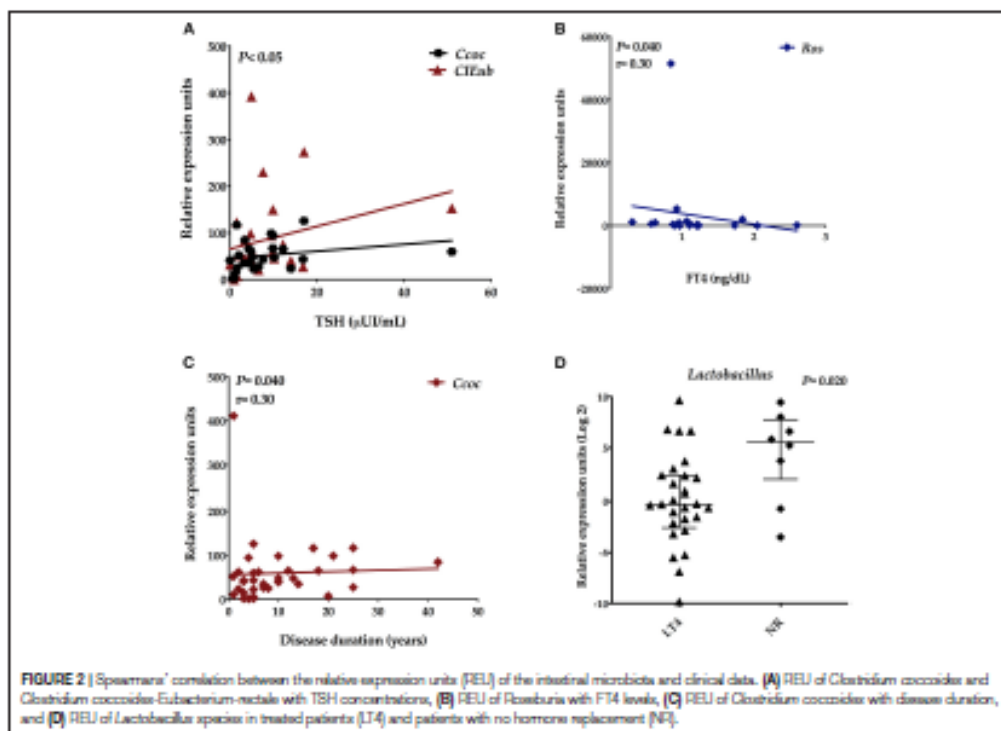
To investigate whether the alterations of intestinal microbiota impacted on systemic cytokine profile in patients with HT, we analyzed the serum concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , and TNF by flow cytometer. Significant differences in these cytokines were not detected ($p > 0.05$) (mean $\pm$ SE for IL-2: 0.3369 ± 0.0638 pg/ml; IL-4: 0.4081 ± 0.0542 pg/ml; IL-6: 1.121 ± 0.1599 pg/ml; IL-10: 0.3192 ± 0.0333 pg/ml; IL-17A: 0.5835 ± 0.2388 pg/ml; IFN- γ : 0.4473 ± 0.1023 pg/ml; and TNF: 1.154 ± 0.1090 pg/ml) when compared with controls (mean $\pm$ SE for IL-2: 0.3800 ± 0.0527 pg/ml; IL-4: 0.3791 ± 0.0541 pg/ml; IL-6: 1.375 ± 0.2492 pg/ml; IL-10: 0.2884 ± 0.0414 pg/ml; IL-17A: 0.3981 ± 0.1985 pg/ml; IFN- γ : 0.3438 ± 0.0951 pg/ml; and TNF: 1.317 ± 0.1711 pg/ml) (Figures 3A–G).

Detection of Increased Intestinal Permeability in Patients With HT

In order to find out whether patients with HT were presented with a leaky gut, since alterations in the gut microbiota were detected, we evaluated the serum zonulin concentrations in patients with HT and controls. The zonulin serum concentrations were significantly increased ($p = 0.002$) in samples of patients with HT (mean $\pm$ SE: 30.92 ± 2.36 ng/ml) when compared with controls (mean $\pm$ SE: 19.01 ± 2.98 ng/ml) (Figure 4A). Besides that, the zonulin concentrations positively correlated with systemic IFN- γ levels ($p = 0.042$; $r = 0.52$; Figure 4B) and inversely correlated with IL-2 concentrations ($p = 0.042$; $r = -0.51$) in patients with HT (Figure 4B).

DISCUSSION

There is a lot of evidence that alterations in the gut microbiota are associated with autoimmune diseases development (16, 27–29). Researchers suggested that the molecular mimicry, bystander T-cell activation, post-translational modification of luminal proteins by altered microbiota, a shift to proinflammatory milieu in the gut mucosa, intestinal dysbiosis, bacterial overgrowth, and leaky gut could contribute to autoimmunity and HT trigger in genetically susceptible individuals (17, 18, 30, 31). The commensal microbiota play an important



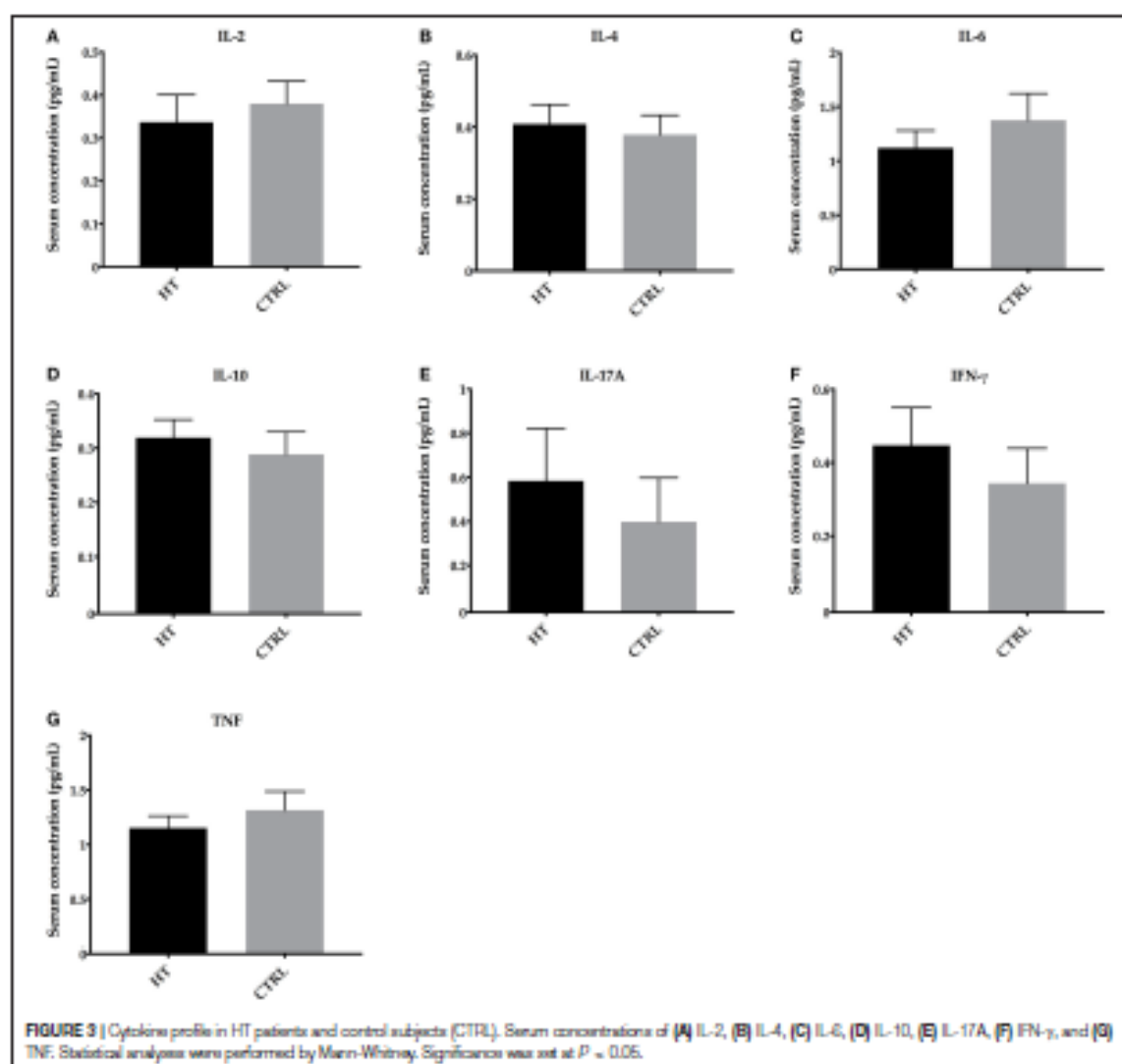
role in our physiological processes, influencing the mucosal innate and adaptive immunity and host metabolism, including carbohydrate digestion and fermentation, vitamin synthesis, hormones production and secretion, secondary bile acid synthesis, absorption of micronutrients, including iron, zinc, and iodine, which directly affect thyroid function (22, 32). In the present study, we investigated the alterations in the gut microbiota in Brazilian patients with HT and correlated these data with dietary habits, clinical data, and systemic cytokines and zonulin concentrations.

There are four studies that compared the gut microbiota from patients with euthyroid and hypothyroid HT in Chinese population, and researchers detected intestinal dysbiosis when compared with healthy controls (23, 24, 33, 34). Ishaq et al. (23) investigated the microbial composition in 29 patients with HT and 12 healthy controls by PCR-DGGE, real-time PCR, and 16S pyrosequencing (17, 19). Authors showed a reduction in Firmicutes and Bacteroidetes, and increased Proteobacteria and Cyanobacteria phyla in HT samples. Findings of the DGGE analysis showed a different fingerprint between patients and controls and the predominance of pathogenic microbes, such as *Bacteroides uniformis*, *B. pyogenes*, *B. vulgatus*, *Shigella dysenteriae*, *B. intestinalis*, *Escherichia coli*, *Sporomusa*

ovate, *Shigella flexneri*, and *Bacillus* species. By real-time PCR, authors observed a significant decrease in copy numbers of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, and an increase in *E. coli* in patients with HT. By the 16S pyrosequencing, researchers detected a predominance of *Bacteroides*, *Escherichia-Shigella*, and *Parasutterella* genera, and a reduction in *Prevotella* and *Dialister* genera in patients with HT (23).

Another study examined the intestinal microbiota in 28 patients with euthyroid and 16 controls by 16S sequencing and showed that Firmicutes/Bacteroidetes ratio was increased and the Lachnospiraceae family was prevalent in stool of patients with HT. The abundance of *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotella*, and *Lachnospiraceae* genera was lower in patients with HT, and *Blautia*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Fusicatenibacter*, *Romboutsia*, *Dorea*, and *Eubacterium* genera were higher in samples derived from patients with HT. Furthermore, the authors reported positive correlations between Firmicutes members and anti-TPO or anti-Tg autoantibodies, while Bacteroidetes members inversely correlated with these antibodies. The abundance of *Alloprevotella* positively correlated with FT4 levels, while *Romboutsia* negatively correlated with TSH concentrations (24).

In a more recent cross-sectional work, Liu et al. (33) investigated the gut microbiota in 45 patients with euthyroid,



18 patients with HT hypothyroid, and 34 controls by 16S sequencing. Compared with healthy controls, intestinal microbiota richness and diversity were significantly decreased in subjects with HT, with predominance of *Bacteroidetes* phylum members, *Prevotella* and *Phascolarctobacterium* species. In patients with euthyroid, some microbes, such as *Lachnospiraceae incertae sedis*, *Lactonifactor*, *Alistipes*, and *Subdoligranulum* genus, were enriched in stool samples. The authors concluded that there is a different microbiota profile in patients with diverse thyroid function, and they suggest that *Phascolarctobacterium* genus could be involved in HT progression in humans (33). *Phascolarctobacterium* species, mainly *Phascolarctobacterium faecium*, can produce acetate

and propionate and influence the metabolic status of the host (35).

In accordance with the previous study, significant differences in richness and diversity of the gut microbiota were observed in 52 patients with primary hypothyroidism, compared with 40 healthy controls. The abundance of *Bacteroidetes* phylum members, *Veillonella* and *Paraprevotella* were significantly decreased, while *Neisseria* and *Rheinheimera* were increased in patients with hypothyroid. *Veillonella* and *Paraprevotella* genera positively correlated with FT3 and FT4 levels and were inversely associated with TSH concentrations. Researchers also showed that mRNA from enzymes involved in SCFAs production was decreased in the gut, and LPS serum levels were increased,

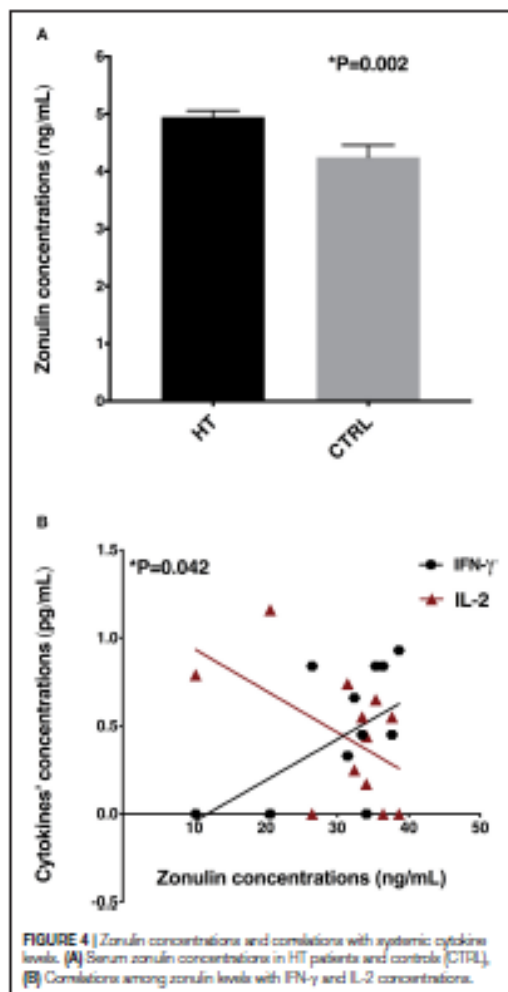


FIGURE 4 | Zonulin concentrations and correlations with systemic cytokines levels. **(A)** Serum zonulin concentrations in HT patients and controls (CTRL). **(B)** Correlations among zonulin levels with IFN- γ and IL-2 concentrations.

suggesting a leaky gut in these patients. Additionally, mice that received fecal microbiota transplantation from patients with hypothyroid presented lower serum total thyroxine levels, decreased tight junction mRNA in the colon, and increased serum LPS (34).

There are neither any studies evaluating the gut microbiota in Brazilian patients with HT, nor are these data correlating with dietary habits, clinical data, and cytokines and zonulin concentrations. Here, we evaluated the gut microbiota in 40 Brazilian patients with HT and 53 healthy controls, and we observed a HT-associated microbiota imbalance, with an increase in *Bacteroides* and a significant decrease in

Bifidobacterium genus. Our data concerning the decreased abundance of *Bifidobacterium* are in agreement with real-time PCR results from Ishaq et al. (23). *Bifidobacterium* is the first microbial colonizer of the intestines in newborns, and it plays key roles in immune system maturation and dietary metabolism (36). Some *Bifidobacterium* strains are considered probiotic because of their beneficial effects, and some studies demonstrated the beneficial role of *Bifidobacterium* species in inflammatory conditions (37, 38). The discrepancies in relation to other studies and between studies may be due to different methodologies or even due to geographic location, lifestyle, and dietary habits.

In our study, we also observed significant differences in *Lactobacillus* abundance between patients who realized thyroid hormone replacement therapy and those who did not. *Lactobacillus* are acid-lactic producing bacteria and belong to the Firmicutes phylum, the second most prevalent in the human gut (39). Recently, a study showed that *Lactobacillus* promote gut barrier integrity by producing L-Ornithine from arginine amino acid (40). We suggest that this increase in *Lactobacillus* in patients with no hormone replacement could be associated with the small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) in patients with HT (41). Lauritano et al. studied 50 patients with HT and 40 controls and found that 54% of patients presented SIBO, in contrast with the control group (4). A clinical trial conducted by Yao et al. (42) demonstrated that the intestinal microbiota in patients with hypothyroidism, randomly divided to receive L-thyroxine ($N = 49$) or no treatment ($N = 68$), did not show significant differences with respect to alpha diversity. However, the relative abundance of *Enterococcus* and *Odoribacter* genera varied slightly depending on the dosage of L-thyroxine (42).

There are no studies correlating dietary components and gut microbiota in patients with HT. In our study, we found significant differences in dietary habits between patients with HT and controls regarding the frequency of the consumption of vegetables, fruits, animal-derived proteins, dairy products, saturated fats, and carbohydrates. Furthermore, we found an inverse correlation between animal-derived protein consumption and the abundance of *Bacteroides* genus. The main role of diet in microbiota modulation and its role in the host metabolism regulation can be exemplified by the establishment of the resident microbiota in early childhood, through the oligosaccharides ingestion from the breast milk, and also by the increase in the microbiota diversity associated with the solid food introduction (43, 44). The gut bacteria overgrowth can be directly affected by the nutrients, and these, in turn, affect both relative and absolute microbiota abundances and bacterial kinetics (45). Alterations in the ingestion of macronutrients, including proteins, carbohydrates, and fats, induce a significant shift in the gut microbiota (46). The microbiota modulation by diet directly influences on the inflammatory profile due to the generated microbiota metabolites and their direct or indirect action on immune cells from the mucosal immune system (47–51). From fermentation of dietary fibers, the intestinal microbes can generate metabolites or SCFAs with anti-inflammatory properties and preserve gut homeostasis (47). In a recent study,

Sepahi et al. showed that SCFAs produced by gut microbes in response to dietary fibers influence the expansion on innate lymphoid cells in the gut through G-protein-coupled receptors and can impact the immune responses in the distant tissues depending on the host condition (51). On the other hand, dietary fats are involved in decreased microbiota diversity and richness, which increased intestinal permeability and low-grade systemic inflammation (48).

In the present study, although we demonstrated significant differences in the dietary habits and alterations in the gut microbes in patients with HT, we did not observe significant differences in the cytokine profile in patients when compared with controls. We suggest that this factor can be related to patients' diet, lifestyle, or hormone replacement and disease control. In a recent study, Tabasi et al. (52) evaluated the gut microbiota by real-time PCR and cytokine concentrations in 23 patients with obese hypothyroid and 79 obese control subjects. Researchers reported no significant differences in the gut microbes between patients with hypothyroid and controls. However, similar to our findings, the serum cytokine concentrations, including IL-1 β , IL-6, IFN- γ , and TGF- β , were similar in patients and controls (52).

Finally, although there are no differences in systemic cytokines in patients with HT, we detected an increased intestinal permeability, seen by the higher zonulin concentrations in the serum of patients, when compared with controls. Similar to our study, a case-control work investigated the leaky gut in 30 patients with HT (children and adolescents), and 30 patients with congenital hypothyroidism, and reported a significant increase in serum zonulin in patients with HT. Moreover, zonulin levels positively correlated with levothyroxine dose, suggesting a connection between the increased intestinal permeability and disease severity (53). Zonulin is a physiological modulator of intercellular tight junctions, involved in macromolecules trafficking, epithelial and endothelial barrier integrity, and immune tolerance in the gut mucosa (54). Intestinal dysbiosis can activate the zonulin pathway and stimulate their release and allow the traffic of luminal contents through the epithelial barrier. The leaky gut induces inflammatory cytokines release that themselves promote an increased permeability, a vicious circle favoring the entry of antigens derived from diet and gut microbes, triggering the activation of innate and adaptive immunity in the gut mucosa (55). The main factors involved in zonulin release are the bacterial overgrowth and gluten, and the increased intestinal permeability can induce a tolerance breakdown, and then, activated immune cells can remain in the gut mucosa or migrate to distant organs, participating in chronic inflammatory and autoimmune diseases (55–57).

REFERENCES

- Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev*. (2014) 13:391–7. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.007
- Teichlich E, Wahl R. Thyroid autoimmunity: role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front Immunol*. (2017) 8:521. doi: 10.3389/fimmu.2017.00521
- Ajjan RA, Wootman AP. The pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis: further developments in our understanding. *Horm Metab Res*. (2015) 47:702–10. doi: 10.1055/s-0035-1548832

CONCLUSIONS

We concluded that there are alterations in the microbiota and intestinal permeability in Brazilian patients with HT. In addition, we suggest that diet might have played an important role in modulating the gut microbiota in patients with HT. These findings could help understand the HT development and progression, while further investigations to clarify the underlying mechanisms of the diet-microbiota-immune system axis are still needed.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Barretos Cancer Hospital Ethics Committee (Process number 1,359/2017). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LC and LVVS: enrollment of patients with HT, DNA extraction and quantification, cytokine determination, data acquisition, and manuscript writing. LC, GR, and AB: enrollment of controls and sample collection. AL: PCR real-time experiments and cytokine determination. LDBS: responsible for clinical data from patients with HT. JB: support for blood samples collection. EG: manuscript writing and revision. GO: experimental design, data interpretation, manuscript writing, and revision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by the Brazilian Governmental Agency, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Grant numbers #2017/07444-2 and 2021/01035-9), and by the School of Health Sciences from Barretos Dr. Paulo Prata (PAP Grant number #2017).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Microbiology Program from Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences (IBILCE), São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, Brazil.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 02/07/2021

Larissa Vedovato Vilela de Sales

Assinatura do autor