



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LIGIA APARECIDA TRINTIN CANNARELLA

**EFEITO DO CONSUMO DE UMA MISTURA DE  
PROBIÓTICOS NO ESTRESSE OXIDATIVO / NITROSATIVO,  
NOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NA ATIVIDADE DA  
DOENÇA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE:  
UM ESTUDO RANDOMIZADO, DUPLO CEGO E PLACEBO  
CONTROLADO**

---

Londrina  
2020

LIGIA APARECIDA TRINTIN CANNARELLA

**EFEITO DO CONSUMO DE UMA MISTURA DE  
PROBIÓTICOS NO ESTRESSE OXIDATIVO / NITROSATIVO,  
NOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NA ATIVIDADE DA  
DOENÇA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE:  
UM ESTUDO RANDOMIZADO, DUPLO CEGO E PLACEBO  
CONTROLADO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C224 Cannarella, Ligia Aparecida Trintin Cannarella.  
Efeito do consumo de uma mistura de probióticos no estresse oxidativo / nitrosativo, nos parâmetros inflamatórios e na atividade da doença em pacientes com artrite reumatoide: um estudo randomizado, duplo cego e placebo controlado. / Ligia Aparecida Trintin Cannarella Cannarella. - Londrina, 2020.  
100 f. : il.

Orientador: Andrea Name Colado Simão Simão.  
Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Probióticos - Tese. 2. Artrite Reumatoide - Tese. 3. Citoquinas - Tese. 4. Estresse Oxidativo - Tese. I. Simão, Andrea Name Colado Simão. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 616-092

LIGIA APARECIDA TRINTIN CANNARELLA

**EFEITO DO CONSUMO DE UMA MISTURA DE PROBIÓTICOS NO  
ESTRESSE OXIDATIVO / NITROSATIVO, NOS PARÂMETROS  
INFLAMATÓRIOS E NA ATIVIDADE DA DOENÇA EM PACIENTES  
COM ARTRITE REUMATOIDE:  
UM ESTUDO RANDOMIZADO, DUPLO CEGO E PLACEBO  
CONTROLADO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado  
Simão  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Sayonara Rangel de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Naiara Lourenço Mari  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Jesus Cristo por me amar incondicionalmente independente do que sou ou faça. A Deus por ter me colocado onde estou e por me capacitar para realizar os Seus planos.

Agradeço a minha mãe Dirce Dias pelo amor, carinho, educação, por sempre ter me estimulado desde criança a estudar e por fazer tudo o que fosse preciso para isso acontecer.

Agradeço a meu marido Felipe, meu tudo, amor da minha vida. Obrigada pelo apoio e por todos esses anos juntos. Graças a você sou uma pessoa feliz e realizada.

Agradeço aos meus filhos Artur, Gabriel, Guilherme e Manuela que me fazem querer buscar a perfeição embora ela ainda esteja muito longe. Vocês são a razão do meu viver e o motivo pelo qual busco ser uma pessoa melhor para este mundo.

Ao meu irmão Lelo, pelo amor e companhia recebidos ao longo da minha vida e por me ajudar nas imagens presentes nesta dissertação.

A todos os meus familiares e amigos que no decorrer do mestrado e da minha vida sempre me deram ânimo e afeto. Obrigada a minha sogra Rosa Maria e sogro André pelas orações diárias.

Ao Dr. Isaías Dichi pelas valiosas correções e educação de sempre e a Dra. Andréia Name Colado Simão pela orientação, paciência, compreensão e por terem me aceitado como orientanda. Muito obrigada pela oportunidade que me deram de crescer profissionalmente e pessoalmente.

Aos professores do mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, todos colaboraram com seus ensinamentos e exemplos de bons mestres. Depois deste mestrado posso dizer que sou uma profissional melhor.

A Camila Cataldi, Naiara Lourenço Mari, Tatiana Iryioda, Talita Galvão, Guilherme Gomes, Neide Tomimura, Jaqueline de Paula, Tamires Flauzino, Nicole Stadtlober e Daniela Alfieri pela imprescindível ajuda e colaboração no laboratório e na avaliação dos pacientes.

Às professoras Naiara Lourenço Mari e Sayonara Rangel de Oliveira por aceitarem participar da banca examinadora contribuindo para o aperfeiçoamento do nosso trabalho.

Aos pacientes que fizeram parte desse estudo, muito obrigada por doarem seu tempo, acreditando que este trabalho daria certo, que ele possa realmente colaborar para a melhora da qualidade de vida dos pacientes portadores de artrite reumatoide.

“Muitas das falhas da vida acontecem porque as pessoas não percebem o quão perto estão quando desistem.”

Thomas Edison

CANNARELLA, Ligia Aparecida Trintin. **Efeito do consumo de uma mistura de probióticos no estresse oxidativo / nitrosativo, nos parâmetros inflamatórios e na atividade da doença em pacientes com artrite reumatoide:** um estudo randomizado, duplo cego e placebo controlado. 2020. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica, autoimune, marcada pela infiltração da membrana sinovial em múltiplas articulações com células T, células B e monócitos; pela produção de autoanticorpos e inflamação crônica. A disbiose intestinal tem sido relacionada com o desenvolvimento da AR, visto que a microbiota intestinal molda tanto a resposta imune inata, como a adaptativa, reduzindo a inflamação causada pela doença através da indução da formação de células T reguladoras e diminuição das respostas Th1 e Th17. A restauração da microbiota intestinal através da administração de probióticos, pode ser mais uma forma de modular o processo e a progressão da AR. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito da suplementação de probióticos em parâmetros inflamatórios, no estresse/nitrosativo e na atividade da doença em pacientes com AR após 60 dias de tratamento. **SUJEITOS E MÉTODOS:** Foram selecionados 42 pacientes com AR de ambos os sexos com idade entre 27 a 80 anos atendidos pelo ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina. Após a randomização, os pacientes foram divididos em dois grupos que consumiram diariamente por 60 dias, um dos compostos: Grupo Probiótico (n=21), pacientes que consumiram diariamente suplemento probiótico contendo 5 cepas, *Lactobacillus acidophilus* LA-14 ( $10^9$  UFC/g), *Lactobacillus casei* LC-11 ( $10^9$  UFC/g), *Lactococcus lactis* LL-23 ( $10^9$  UFC/g), *Bifidobacterium lactis* BL-04 ( $10^9$  UFC/g) e *Bifidobacterium bifidum* BB-06 ( $10^9$  UFC/g); Grupo Placebo (n=21), pacientes que ingeriram suplemento de maltodextrina. A atividade da doença foi determinada pelo escore *Disease Activity Score* 28 (DAS-28). A contagem de leucócitos totais foi realizada por citometria de fluxo. Os níveis séricos de Proteína C reativa ultrasensível (PCRus) foram determinados por turbidimetria enquanto os de ferritina foram avaliados por quimioluminescência em micropartículas. A velocidade de hemossedimentação (VHS) foi determinada por automação. Os níveis plasmáticos de interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e adiponectina foram determinados por imunofluorimetria utilizando a plataforma Luminex®. Os níveis plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e a capacidade antioxidante total plasmática avaliada pelo TRAP (*Total radical-trapping antioxidant parameter*) foram determinados por quimioluminescência, enquanto os níveis de proteínas carbonílicas (PC), metabólitos de óxido nítrico (NOx) e grupamentos sulfidríla (SH) foram avaliados por espectrofotometria. **RESULTADOS:** O grupo probiótico apresentou redução na contagem de leucócitos totais (p=0.012) e nos níveis de TNF- $\alpha$  (p=0.004), e IL-6 (p=0.039). Os grupos não diferiram quanto aos níveis de IL-10, adiponectina, PCRus, VHS, ferritina e DAS-28. Na avaliação do estresse oxidativo/nitrosativo, o grupo probiótico apresentou aumento do TRAP (p=0.019), de SH (p=0.028) e diminuição dos níveis de NOx (p=0.004). Não houve diferença entre os grupos quanto aos níveis de LOOH e PC. **CONCLUSÃO:** O consumo da mistura de probióticos por 60 dias foi capaz de diminuir o processo inflamatório e os níveis

de metabólitos de óxido nítrico assim como também melhorar as defesas antioxidantes dos pacientes com AR após 60 dias de tratamento. No entanto, essas alterações não se refletiram na redução da atividade da doença talvez devido ao curto período do estudo. Mais estudos são necessários para investigar o potencial efeito dos probióticos na redução da atividade da AR.

**Palavras-chave:** Probióticos. Artrite reumatoide. Citocinas. Estresse oxidativo. Oxido nítrico.

CANNARELLA, Ligia Aparecida Trintin. **Effect of consumption of a probiotic mixture on oxidative / nitrosative stress, inflammatory parameters and disease activity in patients with rheumatoid arthritis:** a randomized, double blind, and placebo-controlled study. 2020. 97 f. Dissertation (Master in Clinical and Laboratory Physiopathology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic, autoimmune inflammatory disease, marked by the infiltration of the synovial membrane in multiple joints with T cells, B cells and monocytes and the production of autoantibodies and chronic inflammation. Intestinal dysbiosis has been linked to the development of RA, as the intestinal microbiota shapes both the innate and adaptive immune responses, reducing inflammation caused by the disease by inducing the formation of regulatory T cells and decreasing Th1 and Th17 responses. The restoration of the intestinal microbiota through the supplementation of probiotics can modulate the RA process and progression. **OBJECTIVE:** The aim of this study is to evaluate the supplementation on the inflammatory parameters, oxidative stress profile and disease activity score (DAS-28) in RA patients after 60 days of treatment. **SUBJECTS AND METHODS:** A total of forty seven patients aged between 27 and 80 years, with RA diagnosis, were recruited from the rheumatology ambulatory of the University Hospital of Londrina. After randomization, the patients were divided into two groups: probiotic group (n=24) patients who were supplemented with a daily ingestion of probiotics consisted of a sachet with five strains: *Lactobacillus acidophilus* LA-14 ( $10^9$  UFC/g), *Lactobacillus casei* LC-11 ( $10^9$  UFC/g), *Lactococcus lactis* LL-23 ( $10^9$  UFC/g), *Bifidobacterium lactis* LL-23 ( $10^9$  UFC/g) and *Bifidobacterium bifidum* BB-06 ( $10^9$  UFC/g) and placebo group (n=23), patients who had a daily ingestion of maltodextrin. The disease activity status was determined using the Disease Activity Score 28 (DAS28) index. White blood cell counts (WBC) was performed by flow cytometry and ESR were determined using hematological autoanalyzer's. High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) serum levels were measured using a turbidimetric assay. Ferritin serum levels were determined by chemiluminescent microparticle immunoassay. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6) and adiponectin plasma levels were determined using microspheres multiplex immunoassay. Lipid hydroperoxide (LOOH) were evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) and the total antioxidant capacity was evaluated by total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) by measuring the chemiluminescence. Carbonyl protein (PC), nitric oxide (NO) concentration and sulfhydryl groups (SH) was evaluated by spectrophotometric assay. **RESULTS:** The probiotic group showed a significant reduction in white blood cell counts (p=0.012), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ , p=0.004), and interleukin 6 (IL-6) plasma levels (p=0.039). However, the groups did not differ about IL-10, adiponectin, high-sensitivity C- reactive protein (hs-CRP), erythrocytes sedimentation rate, ferritin, and Disease Activity Score 28 (DAS-28). Regarding oxidative/nitrosative stress biomarkers, the probiotic group had increase in total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP, p=0.019), in sulfhydryl group (SH, p=0.028) and had decrease in NOx (p=0.004). However, the groups did not differ about LOOH and PC (p>0.05). **CONCLUSION:** The consumption of a mixture of probiotics for 60 days

decreased the inflammatory process and the levels of nitric oxide metabolites, as well as improving the antioxidant defenses of RA patients after 60 days of treatment. However, these results are not reflected in the reduction of disease activity, perhaps due to a short period of study. Further studies are needed to investigate the potential effect of probiotics on reducing RA activity.

**Key words:** Probiotic. Rheumatoid arthritis. Cytokines. Oxidative stress. Nitric oxide.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Etapas da progressão do desenvolvimento de artrite reumatoide .....	17
<b>Figura 2</b>	Etapas de ativação da resposta autoimune e aspectos patogênicos na AR.....	19
<b>Figura 3</b>	Exemplos de composição taxonômica da microbiota intestinal.....	26
<b>Figura 4</b>	Nichos metabólicos no microbioma intestinal.....	27
<b>Figura 5</b>	Mecanismos de defesa do hospedeiro e tolerância a micro-organismos intestinais.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	American College of Rheumatology
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
anti-CCP	Anti-cyclic Citrullinated Peptid (Anticorpo anti-peptídeo citrulinado)
AR	Artrite reumatoide
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CAT	Catalase
CIA	Collagen-induced arthritis (Artrite induzida por colágeno)
CL-LOOH	Hidroperóxidos lipídicos iniciados por Tert-Butil
COX-2	Ciclo-oxigenase - 2
DAS 2	8 - Disease Activity Score 28 (Escore de atividade da doença de 28 articulações)
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido 2,2-ditiobisnitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EULAR	European League Against Rheumatism
FODMAPs	Fermentable Oligo-, Di-, Mono-saccharides and Polyols (Oligossacarídeos, Dissacarídeos, Monossacarídeos e Polióis fermentáveis)
HLA	Human Leukocyte Antigen
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
GPR-43	Receptor acoplado a proteína G-43
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal

LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo de histocompatibilidade principal)
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinases de matriz
NOD	Receptores do tipo oligomerização nucleotídica citosólica
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
NO <sub>2</sub> -	Nitritos
NO <sub>3</sub> -	Nitratos
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PC	Proteínas carbonílicas.
PCRus	Proteína C-reativa ultrasensível
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina 2
PPRs	Pattern Recognition Receptors (Receptores de Reconhecimento de Padrões)
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B)
SH	Sulfhydryl group (Grupos sulfídricos)
SOD	Superóxido dismutase
TCLE	Termo de esclarecimento livre e esclarecido
TLR	Toll like receptors (Receptores do Tipo Toll)
Thf	Células T foliculares
TGI	Trato gastrointestinal
Th	T-helper (Células T auxiliares)
TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter
Treg	Células T reguladoras
TNF	Fator de necrose tumoral
VAS	Escala visual analógica
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VHS	Velocidade de hemossedimentação
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	ARTRITE REUMATOIDE .....	14
1.1.1	Fisiopatologia da AR.....	15
1.1.2	Citocinas e Adiponectina na AR .....	19
1.1.3	Estresse Oxidativo/Nitrosativo e AR .....	21
1.2	MICROBIOTA INTESTINAL.....	23
1.3	MICROBIOTA E AR .....	28
1.4	PROBIÓTICOS E AR.....	35
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	42
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
3.1	OBJETIVO GERAL .....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>4</b>	<b>SUJEITOS E MÉTODOS</b> .....	44
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	44
4.2	PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS .....	45
4.3	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO.....	46
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	48
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	71
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73
	<b>APÊNDICES</b> .....	86
	APÊNDICE A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	86

APÊNDICE B	Ficha de avaliação dos pacientes com artrite reumatoide .....	89
<b>ANEXOS</b>	.....	91
ANEXO A	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos .....	91
ANEXO B	Parecer favorável do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina à realização do Projeto de Pesquisa .....	95
ANEXO C	Avaliação do <i>Disease Activity Score 28 Joints</i> .....	96
ANEXO D	Avaliação da Saúde Global pelo Paciente .....	97

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica, autoimune, que se caracteriza pelo acometimento das articulações sinoviais, principalmente mãos, de forma crônica e com potencial destrutivo e incapacitante. É considerada a artropatia crônica de origem autoimune mais comum e tem um efeito social substancial em termos de custos, incapacidade e perda de produtividade (LEE, WEINBLATT, 2001).

A AR tem uma prevalência mundial de 0.5% da população. As mulheres são acometidas, sendo de duas a três vezes mais frequente em mulheres que em homens (ALETAHA; SMOLEN, 2018). A incidência é de 40,9 casos por 100.000 habitantes e o pico máximo de incidência ocorre na faixa etária de 65 a 74 anos, diminuindo em pessoas com idade de 75 anos ou mais (MYASOEDOVA *et al.*, 2010).

Uma fase pré-artrite reumatoide precede o aparecimento da doença articular evidente, pode ter duração de meses até anos e é caracterizada pela presença de autoanticorpos circulantes, aumento dos níveis de citocinas inflamatórias e metabolismo alterado (FIRESTEIN; MCINNES, 2017). Após essa fase, a AR já tem potencial de ser estabelecida sendo caracterizada por inflamação crônica, remodelação e dano ao tecido (MCINNES; SCHETT, 2017). Manifestações extra-articulares podem ocorrer e estão associadas à piora do prognóstico, diminuição da capacidade funcional e mortalidade. Nódulos reumatoides são as manifestações mais comuns e estão presentes em 30% dos pacientes. Síndrome de Sjögren, anemia, doenças crônicas e manifestações pulmonares surgem em 6 a 10% dos pacientes (YOUNG; KODURE, 2007). Outros fatores que afetam a qualidade de vida do paciente são os psicossociais como fadiga, depressão, disfunção cognitiva, redução do desempenho ou incapacidade para o trabalho (CUTOLO, *et al.*, 2014).

O diagnóstico da AR é individualizado e compreende dados clínicos como manifestações articulares e extra articulares; laboratoriais como velocidade de hemossedimentação, proteína C-reativa, fator reumatoide, anticorpos antiproteínas e anticorpos antipeptídeos citrulinados; e exames complementares como radiografia, ultrassonografia e ressonância magnética (MOTA, *et al.*, 2011).

Existem critérios de classificação da AR que são utilizados como auxiliares no estabelecimento do diagnóstico e como base para inclusão dos pacientes em estudos terapêuticos; tais critérios são propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR- do inglês, *American College of Rheumatology*) e pela Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR- do inglês, *European League Against Rheumatism*).

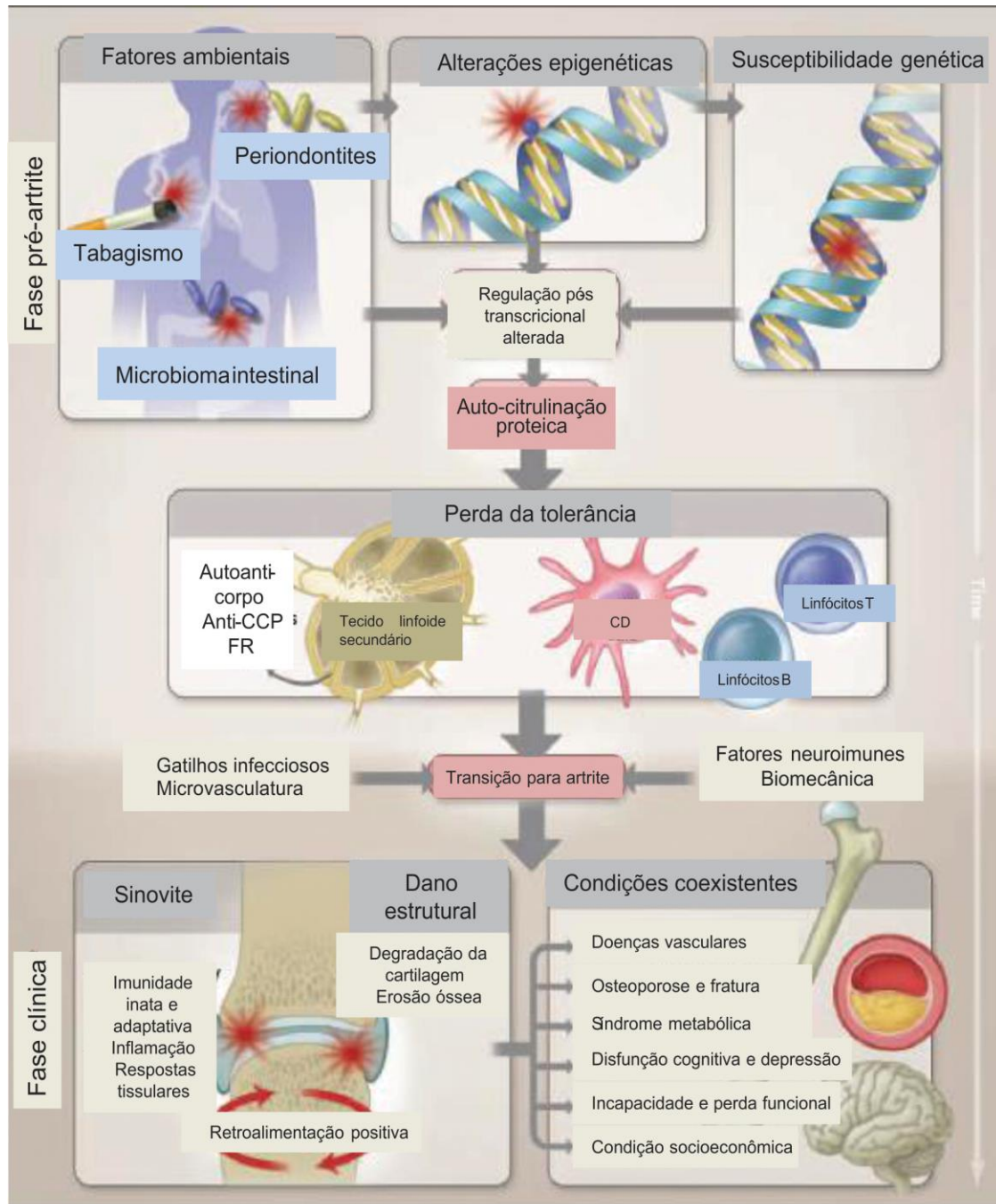
Para a avaliação da atividade clínica da doença, utiliza-se o *Disease Activity Score 28* (DAS 28) que consiste na contagem articulações dolorosas ou edemaciadas ou ambas dentre vinte e oito articulações pré-determinadas, mais o valor da velocidade de hemossedimentação ou o valor da proteína C-reativa e avaliação da saúde global do paciente através de uma escala visual analógica. As definições de doença em remissão, baixa atividade, moderada atividade e alta atividade referem-se aos valores obtidos com o DAS 28 cujos valores são: menor que 2,6 para remissão; de 2,6 a 3,2 para atividade leve da doença; maior que 3,2 até 5,1 para atividade moderada da doença e maior que 5,1 para alta atividade (PREVOO, *et al.*, 1995).

### 1.1.1 Fisiopatologia da AR

A etiologia da AR não está bem estabelecida, os estudos mostram que fatores ambientais, imunológicos, hormonais e genéticos atuam em conjunto e levam a modificações epigenéticas que podem favorecer o desenvolvimento da AR (figura 1). Indivíduos com uma história familiar positiva tem risco de 3 a 5 vezes maior de adquirirem a doença caracterizando o fator hereditário como uma das causas de sua etiologia (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). A predisposição e a gravidade da AR têm sido associada a vários genes com polimorfismos, mas o sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), particularmente o HLA-DRB1 continua a ser o de maior influência (ALAM; JANTAN; BUKHARI, 2017).

Dentre os fatores ambientais, o tabaco e a exposição à sílica favorecem a citrulinização de proteínas originando autoanticorpos direcionados a proteínas citrulinadas (ALAM; JANTAN; BUKHARI, 2017; KLARESKOG *et al.*, 2006) que aparecem precocemente no início da doença e são específicos da AR (ALARCON; ANDRADE, 2007).

Figura 1 – Etapas da progressão do desenvolvimento de artrite reumatoide.



As interações ambiente-gene descritas promovem perda de tolerância a autoproteínas que contêm um resíduo de citrulina, gerado por modificação pós-tradução. Essa resposta anticitrulina pode ser detectada nos compartimentos das células T e B e provavelmente é iniciada em tecidos linfóides secundários ou na medula óssea. Posteriormente, a localização da resposta inflamatória ocorre na articulação em virtude de mecanismos pouco compreendidos que provavelmente envolvem vias microvasculares, neurológicas, biomecânicas ou outras vias específicas de tecidos. A sinovite é iniciada e perpetuada por ciclos de retroalimentação positiva e, por sua vez, promove distúrbios sistêmicos que compõem a síndrome da artrite reumatoide. Anti-CCP: Anticorpo antipeptídeo citrulinados. FR: fator reumatoide

**Fonte:** Adaptado de McInnes, Schett (2011).

A infecção pode desencadear a doença através da geração de autoanticorpos devido ao mimetismo molecular, sendo que *Proteus mirabilis* (EBRINGER; WILSON, 2000) e o vírus *Epstein Barr* (TOUSSIROT; ROUDIER, 2008) são os principais micro-organismos envolvidos. Já a bactéria *Porphyromonas gingivalis* causadora de periodontite pode também provocar a AR, não por mimetismo molecular, mas por ser capaz de expressar a enzima peptidil-arginina deaminase, que é responsável pela citrulinização de proteínas, que resulta na quebra da tolerância imune (FARQUHARSON; BUTCHER; CULSHAW, 2012; NUNES, *et al.*, 2018).

Um número crescente de evidências sugere que a microbiota intestinal também desempenha um papel no desenvolvimento de uma série de doenças autoimunes, incluindo a AR (MAEDA; TAKEDA, 2017). Pacientes portadores de AR podem apresentar a microbiota intestinal alterada, desencadeando a formação de peptídeos citrulinados cíclicos ou ativação das células T-helper (Th) 17 na mucosa intestinal (SCHER, *et al.*, 2010).

A figura 2 demonstra as etapas de ativação da resposta autoimune em AR. Fatores externos podem causar citrulinização de proteínas resultando em autoantígenos que agem como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) guiando a resposta do sistema imune inato até as mucosas. Os antígenos citrulinados são processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) para as células Th nativas (Th0), que se diferenciam em células Th1, Th17 ou células T foliculares (Thf) que produzem e produzem citocinas que ativam os macrófagos e células B levando a produção de autoanticorpos (CATRINA, *et al.* 2016).

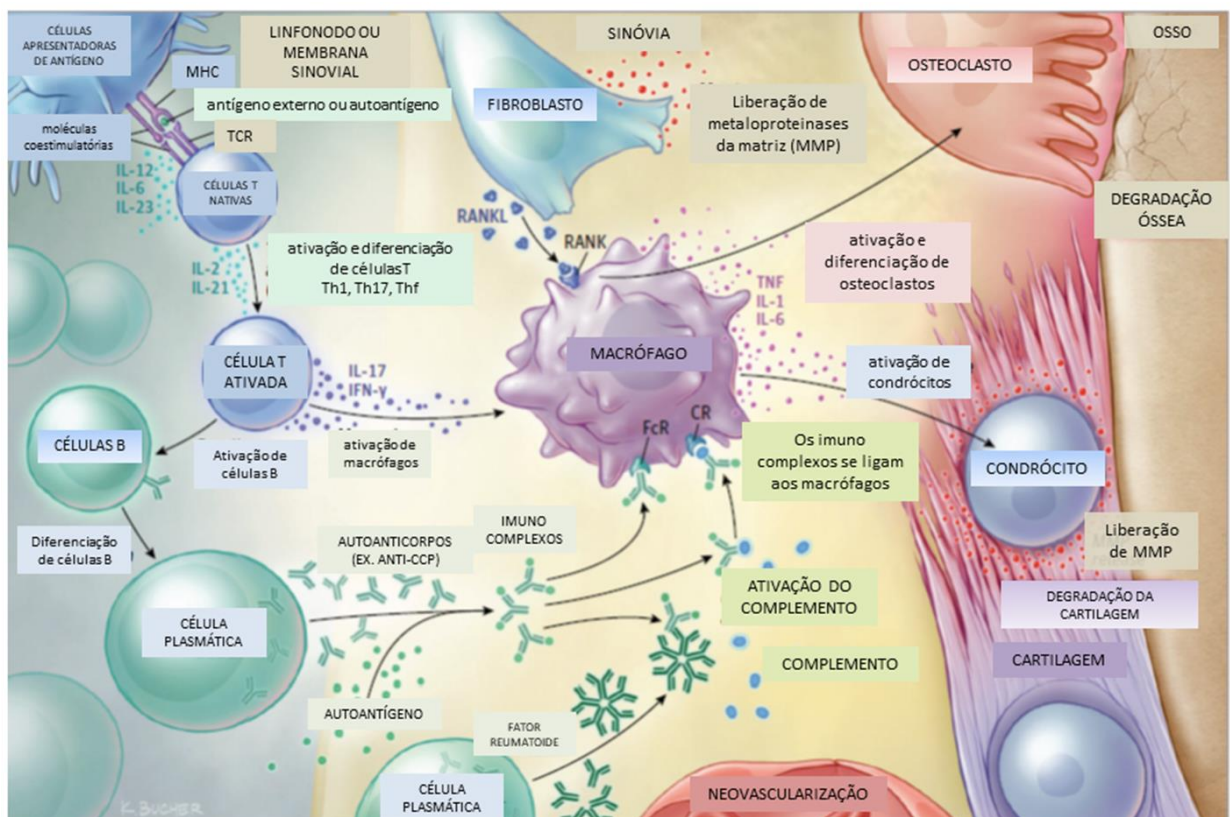
Os autoanticorpos ligam-se aos respectivos antígenos formando imunocomplexos na sinóvia, onde se acumulam. Os imunocomplexos, através de sua porção Fc, estimulam outras células B para formar anticorpos anti-imunoglobulina (Ig) G - fator reumatoide, que aumentam os imunocomplexos e podem fazer a ativação do complemento. Além disso, eles podem se ligar a macrófagos e outras células através de receptores Fc e receptores complementares ativando-os; ocorre a secreção de citocinas pro-inflamatórias e outros mediadores da inflamação, como fator de necrose tumoral **alfa** (TNF- $\alpha$ ) e interleucina (IL) -6, além da ativação de macrófagos por linfocinas, como interferon (IFN) - $\gamma$  ou IL-17, que derivam das células T ativadas. Fibroblastos que expressam receptores ativadores do ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), especialmente

na presença de citocinas pró-inflamatórias, podem ativar macrófagos a se diferenciarem de pré-osteoclastos em osteoclastos que reabsorvem o osso do local sinovial, este processo começando na junção entre cartilagem-osso. Essas citocinas também ativam os condrócitos para secretarem enzimas que degradam a cartilagem (ALETAHA; SMOLEN, 2018).

A cartilagem sofre danos por efeitos catabólicos dos condrócitos após estimulação das citocinas; a matriz cartilaginosa é degradada por metaloproteinases e outras enzimas; as citocinas ligam-se a receptores cognatos e desencadeiam vários eventos extracelulares ativando uma matriz de genes que causam ou agravam a infiltração e o dano (SMOLEN, ALETAHA, MCINNES, 2016).

Além da atividade imunológica, os neutrófilos, monócitos e macrófagos produzem uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), contribuindo para a lesão sinovial. Há evidências de que essas ERO e ERN participam do fenômeno da dor, como a dor relatada pelos pacientes com artrite reumatoide (BALBIR-GURMAN, *et al.*, 2011).

Figura 2 - Etapas de ativação da resposta autoimune e aspectos patogênicos na AR



A figura mostra os mecanismos de ativação da resposta imune na AR, desde o reconhecimento do antígeno ou autoantígenos pelas moléculas de MHC, até seus efeitos na degradação da cartilagem e na degradação óssea. CR: receptor de complemento; FcR: receptor Fc; TCR: receptor de célula T. Fonte: Adaptado de Aletaha, Smolen (2018)

### 1.1.2 Citocinas e Adiponectina na AR

A liberação de citocinas específicas na circulação sistêmica é observada em várias doenças inflamatórias, como por exemplo, a AR, e suas concentrações normalmente refletem a severidade da doença e seu prognóstico. Na AR, o balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias determina o grau e a extensão da inflamação e portanto, pode levar a diferentes situações clínicas.(SIVALINGAM, *et al.*,2007).

A sinóvia inflamada e o *pannus* compreendem células T, fibroblastos sinoviais e macrófagos que produzem citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17 que ativam os osteoclastos, levando à destruição óssea (TATEIWA; YOSHIKAWA; KAITO, 2019; MCINNES; SCHETT, 2011).

O TNF-  $\alpha$  é produzido principalmente por macrófagos ativados no tecido da membrana sinovial inflamada em pacientes com AR. As ações do TNF- $\alpha$  importantes na patogênese da AR incluem sua capacidade de induzir a produção de outras citocinas (igualmente) pró-inflamatórias, incluindo IL-1 e IL-6, juntamente com sua capacidade de induzir a produção e liberação de quimiocinas que atraem leucócitos do sangue para o tecido inflamado. Além disso, o TNF-  $\alpha$  induz a produção de enzimas proteolíticas e metaloproteinases que provocam a destruição da cartilagem e ativam a capacidade reabsortiva dos osteoclastos levando a destruição do osso. (BRENNAN; MCINNES, 2008).

O nível de IL-6 é altamente elevado em pacientes com AR e essa elevação tem sido diretamente correlacionada com os índices clínicos de atividade da doença (ALI; JABBAR; MOHAMMED, 2019). A IL-6 tem papel na sinovite da AR, juntamente com o TNF-  $\alpha$ , ela estimula, de forma autócrina, o crescimento e ativação de sinoviócitos tipo B, que geram espessamento da camada de revestimento da íntima da sinóvia e que, quando ativados, produzem substâncias biotivas como MMP (metaloproteinases de matriz), RANKL, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) e IFN-  $\gamma$  produzindo sintomas artríticos, incluindo dor nas articulações, inchaço, erosão óssea e destruição da cartilagem. Além disso, a IL-6 é liberada sistemicamente e provoca sintomas sistêmicos, como fadiga, anemia e reações de fase aguda; induz ativação imune e desencadeia o círculo vicioso da escalada da atividade da doença da AR (OGATA, *et al.*, 2019).

Em relação a IL-17, ela age de forma sinérgica com o TNF-  $\alpha$  e é considerada preditiva de piora de prognóstico na AR (KIRKHAM, *et al.*, 2006), promove o recrutamento de neutrófilos e monócitos através da indução de várias quimiocinas que podem, por sua vez, mediar a inflamação na AR (SHAHRARA, *et al.*, 2009). A IL-17 aumenta a produção de IL-6, induz a degradação do colágeno e diminui a síntese de colágeno pela sinóvia e também a síntese de proteoglicanos na cartilagem (LEONAVICIENE; BRADŪNAITE; ASTRAUSKAS, 2004).

Os mecanismos subjacentes para a degradação articular induzida por IL-17 compreendem a indução de MMP, a expressão de RANKL em células T e regulação positiva em células mesenquimais, incluindo sinoviócitos, levando ao aumento da osteoclastogênese (GAFFEN, 2009).

A IL-1 está envolvida no processo inflamatório da AR através da ativação de monócitos-macrófagos e linfócitos T e B, ela, da mesma forma, induz a expressão de moléculas de adesão, de outras citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas e de fatores angiogênicos através da estimulação da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e indução da óxido nítrico sintetase; promove a degradação da cartilagem mediante a promoção da proliferação das células sinoviais e aumento da produção de metaloproteínas pelos condrócitos (DAYER, 2003).

A adiponectina é uma adipocina liberada pelos adipócitos e estimula a liberação de mediadores pró-inflamatórios na AR (FATEL, *et al.*, 2018) Tanto o soro como o líquido sinovial de pacientes com AR, têm concentrações mais altas de adiponectina, e em culturas de fibroblastos sinoviais isolados de AR, observa-se que a adiponectina estimula a produção de IL-6, MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1) e PGE2 (prostaglandina 2) e induz a expressão de COX-2 e mPGES-1 resultando no aumento da produção de PGE2 pelos fibroblastos sinoviais. (LIU; LUO; LI, 2015).

A adiponectina pode ter um papel na perpetuação da sinovite na AR. Choi e colaboradores (2009) mostraram que ela estimulou os níveis de VEGF e MMPs, como a MMP-1 e MMP-13 em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos tanto quanto IL-1 $\beta$ . (CHOI, *et al.*, 2009).

### 1.1.3 Estresse Oxidativo/Nitrosativo e AR

O estresse oxidativo (EO) é causa de lesão tecidual e contribui para o surgimento e agravamento de diversas doenças. Nos últimos anos, o EO, assim como a diminuição da atividade antioxidante, têm sido observados em pacientes com AR caracterizando-os como prováveis causas da inflamação articular (DESAI, *et al*, 2010). O EO está envolvido na patogênese da AR, assim como a própria AR é uma das condições que induzem o EO (QUIÑONEZ-FLORES, *et al.*,2016).

As ERO e ERN, em conjunto com as citocinas pró-inflamatórias, estão envolvidas como mediadores do dano tecidual na AR (FILIPPIN, *et al.*,2008). ERO e ERN danificam diretamente os elementos celulares na cartilagem e os componentes da matriz extracelular, direta ou indiretamente, regulando positivamente os mediadores de degradação da matriz como as metaloproteinases. A produção excessiva de ERO pode danificar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e componentes da matriz. Eles também **atuam** como importantes moléculas de sinalização intracelular que amplificam a resposta inflamatória-proliferativa sinovial (HITCHON; EL-GABALAWY, 2004).

Há evidências de EO crônico em linfócitos T sinoviais originado de ERO intracelularmente produzidas, não secundárias à exposição à radicais livres ambientais (REMANS, *et al.*, 2005). As ERO e ERN produzidas endogenamente em locais de inflamação crônica têm efeitos genotóxicos e podem levar ao desenvolvimento de mutações no gene supressor de tumor p53 e de outros genes reguladores importantes que podem ajudar a converter a inflamação em doença crônica na artrite reumatoide (TAK, *et al.*,2000).

Estudo realizado por Altindag e colaboradores (2007) para determinar o EO em pacientes com AR, mensurou o estado oxidativo total (realizado com base na oxidação do íon ferroso em íon férrico); os danos ao DNA (ácido desoxirribonucleico), avaliado por ensaio de cometa (eletroforese em gel de célula única para medir as quebras da fita do DNA nas células eucarióticas COLLINS, 2004) em linfócitos periféricos, e o estado antioxidante total (avaliado através do efeito antioxidante contra reações de radicais livres iniciadas pelo radical hidroxila) e mostrou que o estado oxidativo total e os danos ao DNA são maiores e o estado antioxidante total menor em pacientes com AR quando comparados a controles saudáveis (ALTINDAG, *et al.*,2007).

Um aumento nos biomarcadores do dano oxidativo tais como produtos da peroxidação lipídica, proteínas carbonílicas (PC), glutathiona oxidada e mieloperoxidase e diminuição dos níveis de antioxidantes como glutathiona, das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase e superóxido dismutase (SOD) são encontrados em pacientes com doença articular inflamatória crônica (FEIJÓO, *et al.*, 2010).

DESAI e colaboradores (2010) revelaram altos valores de malondialdeído (MDA), produto secundário da oxidação lipídica, e baixos valores de SOD e glutathiona redutase em pacientes com AR quando comparados com controles saudáveis (DESAI, *et al.*, 2010). Em pacientes do sexo feminino diagnosticadas com AR, os níveis de peróxido de hidrogênio e o índice de peroxidação lipídica foram maiores quando comparados a controles saudáveis, havendo também diminuição da atividade antioxidante comprovada pela diminuição da SOD e CAT (VRANIC *et al.*, 2017).

Estudo conduzido por Veselinovic e colaboradores (2014) constatou que os níveis de pró-oxidantes como o radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico apresentam altos níveis nestes pacientes. Níveis elevados dos metabólitos do óxido nítrico também foram encontrados nos pacientes com AR, principalmente naqueles com maior atividade da doença, sustentando, portanto, a associação entre estresse oxidativo/nitrosativo e AR (VESELINOVIC, *et al.*, 2014).

Mateen e colaboradores (2016) demonstraram uma diminuição significativa na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e glutathiona redutase e dos antioxidantes não enzimáticos vitamina C e glutathiona reduzida nos pacientes portadores de AR, ademais, os marcadores de peroxidação lipídica e oxidação proteica e a produção de ERO estavam em níveis significativamente maiores nos pacientes com AR quando comparados a controles saudáveis (MATEEN *et al.*, 2016).

Costa e colaboradores (2016) comprovaram que o índice de EO (calculado através dos produtos avançados de oxidação proteica divididos pela capacidade antioxidante total plasmáticas) é significativamente maior em pacientes com AR em comparação com indivíduos sem a doença (COSTA *et al.*, 2016).

Posteriormente, Costa e colaboradores (2018) ao avaliarem o EO em pacientes com AR, identificaram que os metabólitos do óxido nítrico e a razão entre

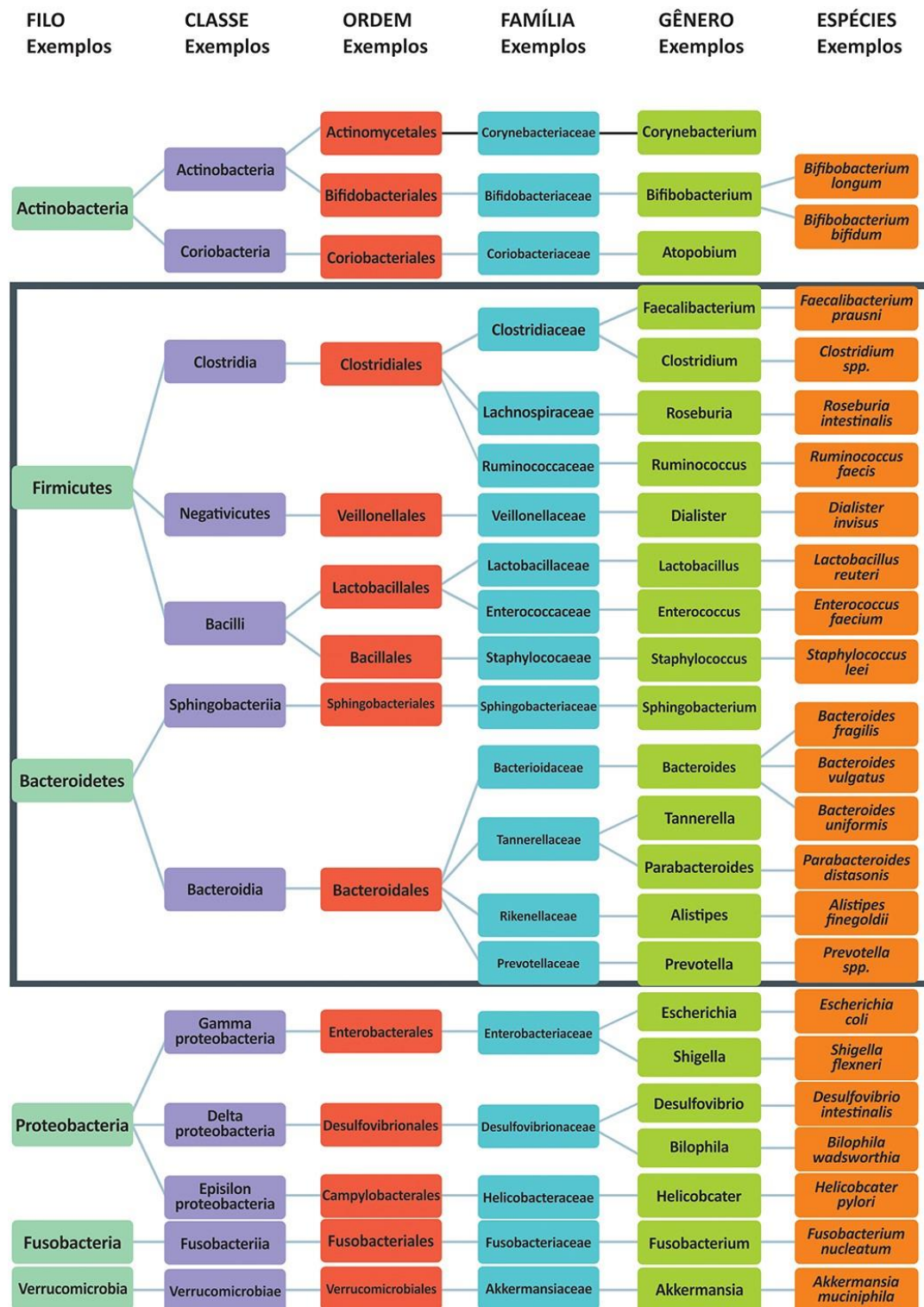
os metabólitos do óxido nítrico e a capacidade antioxidante total plasmática estavam significativamente aumentados quando comparados a controles saudáveis, e associam fortemente estes marcadores à AR (COSTA *et al.*, 2018).

## 1.2 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal é uma complexa comunidade ecológica de micro-organismos que habitam o intestino humano, (STEPHANI; RADULOVIC; NIESS, 2011) e que contem um material genético o qual chamamos de microbioma que supera em aproximadamente 150 vezes o genoma humano (QIN, *et al.*, 2010). A microbiota é diversa e complexa em termos taxonômicos, através de suas atividades metabólicas coletivas e sua interação com o hospedeiro influencia a fisiologia normal e a susceptibilidade às doenças (LOZUPONE, *et al.*, 2012).

Várias espécies de micro-organismos compõem a microbiota intestinal, incluindo bactérias, leveduras e vírus. Taxonomicamente, as bactérias são classificadas de acordo com filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies. Os filos microbianos intestinais dominantes são os Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobactéria, Proteobactéria, Fusobactéria e Verrucomicrobiota, com os dois filos Firmicutes e Bacteroidetes representando noventa por cento da microbiota intestinal (figura 3) (RINNINELLA *et al.*, 2019).

Figura 3 - Exemplos de composição taxonômica da microbiota intestinal

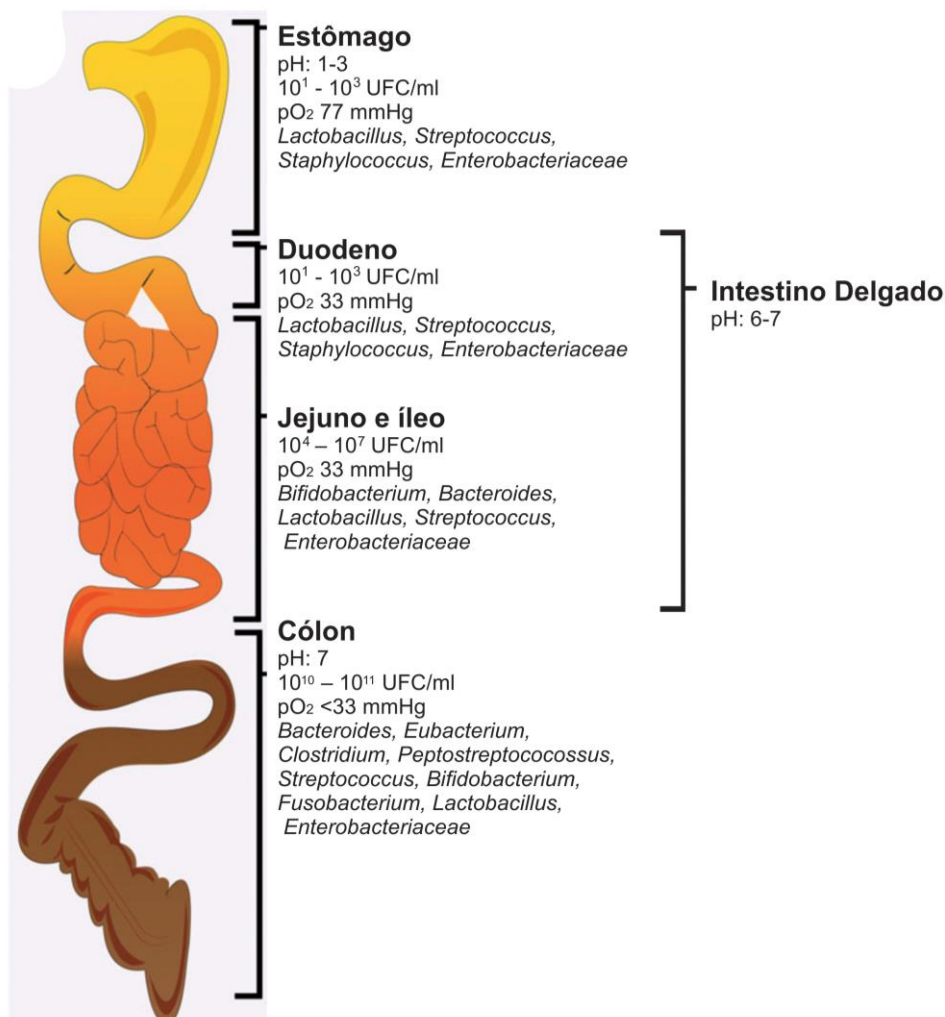


Na caixa em destaque são citados exemplos de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes e Bacteroidetes, representando 90% da microbiota intestinal.

Fonte: Adaptado de Rinninella, *et al.*, 2019.

As bactérias do ambiente intestinal diferem marcadamente entre diferentes regiões anatômicas em termos de fisiologia, fluxo da digestão, disponibilidade de substrato, secreções do hospedeiro, pH e tensão de oxigênio (figura 4). Diferenças importantes no ambiente intestinal ocorrem entre as regiões proximal e distal, e entre o lúmen e a superfície intestinal. O intestino grosso, que é caracterizado por taxas de fluxo lento e pH neutro a levemente ácido, possui a maior comunidade microbiana (dominada por bactérias anaeróbicas). Em comparação, o intestino delgado fornece um ambiente desafiador para colonizadores microbianos dados os tempos de trânsito razoavelmente curtos (3–5 h) e altas concentrações de bile (FLINT, *et al.*, 2012).

Figura 4 – Nichos metabólicos no microbioma intestinal



A localização e organização espacial da microbiota intestinal não são uniformes ao longo do trato gastrointestinal. Esse ecossistema dinâmico do intestino consiste em muitos recursos exclusivos, como micro nichos, gradientes de pH e interações dinâmicas entre tecidos e micro-organismos. As pressões parciais de oxigênio ao longo do trato gastrointestinal também contribuem para esses nichos metabólicos.

Fonte: Adaptado de Clarke, *et al.*, 2019.

A dieta exerce um fator importante na modulação da microbiota intestinal. Alterações dietéticas agudas, como por exemplo, dietas estritamente de origem vegetal ou de origem animal podem induzir a alterações da estrutura da comunidade microbiana em um intervalo de 24 horas (SINGH, *et al.*, 2017). A dieta baseada em animais aumenta a abundância de microrganismos tolerantes à bile (*Alistipes*, *Bilophila* e *Bacteroides*) e diminuiu os níveis de Firmicutes que metabolizam os polissacarídeos vegetais da dieta (*Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*) (DAVID, *et al.*, 2014).

As dietas ao estilo 'ocidental', com alto teor de gordura / açúcar e baixo teor de fibras, diminuem os Firmicutes benéficos que metabolizam polissacarídeos derivados de plantas da dieta em AGCC e aumentam as proteobactérias associadas à mucosa - incluindo patógenos entéricos (SIMPSON, CAMPBELL, 2015).

A microbiota necessita de nutrientes para o crescimento e reprodução, esses nutrientes são encontrados nos alimentos ingeridos que não foram absorvidos (fibras e carboidratos não digeridos, por exemplo), como também materiais provenientes do hospedeiro (muco e células mortas) e metabólitos provenientes da atividade enzimática bacteriana (DAVIDSON; CARVALHO, 2008) como os polifenóis (QUEIPO-ORTUNÕ, *et al.*, 2012).

As fibras não digeríveis promovem a redução do Ph intestinal, a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e tem ação anti-inflamatória, o que favorece a produção de acetato e butirato e o crescimento de bifidobactérias. (MURTAZA, *et al.*, 2016). A diversidade de filos da microbiota fecal é diferente em mamíferos carnívoros, onívoros e herbívoros, sendo maior em ordem crescente respectivamente (LEY, *et al.*, 2008).

De Filippo e colaboradores (2010) comparando a microbiota de crianças europeias com crianças de uma comunidade rural africana onde a dieta é rica em fibras, encontrou um aumento significativo de Bacteroidetes e depleção de Firmicutes, com uma abundância do gênero *Prevotella* e *Xylanibacter*, conhecido por conter um conjunto de genes bacterianos para a hidrólise de celulose e xilano, completamente carentes nas crianças europeias. Além disso, a presença de AGCC foi significativamente maior nas crianças africanas do que nas crianças europeias (DE FILIPPO, *et al.*, 2010).

De Filippis e colaboradores (2015) analisando indivíduos com seus tipos de dieta e sua microbiota, detectaram que a alta adesão à dieta Mediterrânea, com

altos consumos de vegetais como frutas, verduras e legumes está associada ao aumento dos níveis fecais de AGCC, Prevotelle e algumas bactérias do filo Firmicutes, por outro lado, indivíduos com uma baixa adesão à dieta Mediterrânea apresentaram altos níveis de óxido de trimetilamina urinário (DE FILIPPS, et al., 2015).

A dieta com baixos teores de *FODMAPs* (*Fermentable Oligo-, Di-, Mono-saccharides and Polyols*) pode diminuir os sintomas da síndrome do intestino irritável, porém promove uma diminuição dos carboidratos fermentáveis, o que diminui a diversidade de bactérias benéficas intestinais, incluindo a *Akkermansia mucinifera* (HALMOS, et al.2015).

Ley e colaboradores (2006), através da análise da microbiota fecal de pacientes obesos, demonstraram que os indivíduos obesos têm uma menor proporção de bactérias do filo Bacteroidetes e uma maior do filo Firmicutes quando comparados a indivíduos controles magros, e que após a perda de peso, a proporção de Bacteroidetes aumentou e a de Firmicutes reduziu proporcionalmente de acordo com a quantidade de peso perdida (LEY, et al., 2006)

Bervoets e colaboradores (2013) analisando a microbiota fecal de crianças entre seis e dezesseis anos de idade (26 obesas e 27 magras) do mesmo modo encontraram que as crianças obesas apresentavam uma relação elevada entre Firmicutes e Bacteroidetes em comparação com crianças magras (BERVOETS, et al., 2013)

Uma das possíveis causas dessa diferença seria que o microbioma associado à obesidade tem uma maior capacidade de extração de energia da dieta do hospedeiro e abriga um aumento substancial de genes que codificam enzimas envolvidas na quebra de polissacarídeos dietéticos, como por exemplo, o amido caracterizando a microbiota intestinal com um fator adicional contribuinte para a fisiopatologia da obesidade (TURNBAUGH, et al., 2006).

A microbiota intestinal desempenha várias funções, as bactérias comensais são as principais reguladoras da digestão, processo que começa na boca e continua ao longo do TGI; são importantes para a extração, síntese e absorção de nutrientes, incluindo os ácidos biliares, lipídeos, aminoácidos, vitaminas e AGCC, além disso, as bactérias comensais produzem também produtos microbianos independentes da dieta como os lipopolissacarídeos e o peptidoglicano (BRESTOFF; ARTIS, 2013).

A microbiota fornece resistência contra infecção oportunista através da concorrência do nicho; ao competir por locais de colonização e absorção de nutrientes limitam a expansão patogênica no epitélio do hospedeiro (KHOSRAVI, MAZMANIAN, 2013). Ademais, produzem fatores que impedem a adesão de patógenos como as bacteriocinas (REID; HOWARD; GAN, 2001).

A microbiota intestinal molda as respostas imunes, pois tanto a imunidade inata como a adaptativa são influenciadas por ela, localmente no intestino, como também sistemicamente (WIELE, *et al.*, 2016), através da regulação e diferenciação dos vários tipos de células T (CHUNG; PAMP; HILL, 2012).

A modulação imunológica que a microbiota desempenha faz com que o sistema imunológico fique pronto para reagir contra bactérias patogênicas, além de se manter tolerante em relação aos membros do microbioma (TADDEI; FEFERBAUM, 2017). As interações da microbiota regulam muitos aspectos da imunidade e a adesão microbiana ao epitélio intestinal ajuda a regular o equilíbrio entre as respostas das células T pró e anti-inflamatórias (KIM, 2018).

### 1.3 MICROBIOTA INTESTINAL E AR

A homeostase do sistema imune depende da microbiota intestinal. Uma microbiota diversa e equilibrada é necessária para desenvolver uma resposta adequada do sistema imune e há fortes evidências de que a ruptura do processo normal de colonização pode levar a alterações nessa importante relação simbiótica necessária para a homeostase imunológica (WALKER, 2013).

Existe uma sinalização constante entre micro-organismos e o hospedeiro no epitélio intestinal. As células do sistema imune inato da lâmina própria examinam constantemente o conteúdo do lúmen intestinal para identificar antígenos estranhos; as bactérias comensais diferem na sua capacidade de estimular os receptores da imunidade inata, sendo que o padrão de liberação de mediadores químicos varia significativamente determinando respostas pró ou anti-inflamatórias. Micro-organismos estabelecem uma relação simbiótica com tecido epitelial e linfóide; no entanto, nem toda a interação hospedeiro-microbiota promove a saúde, algumas parecem ativar o sistema imunológico, resultando em doenças inflamatórias (HORTA-BASS, *et al.*, 2017).

A importante distinção entre micro-organismos inofensivos e micro-organismos patogênicos que determina se o sistema imune está regulado ou ativado é determinado por receptores de reconhecimento padrão, [*pattern recognition receptors* (PRRs)], tais como receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) receptores do tipo oligomerização nucleotídica citosólica (NOD) e colectinas secretoras e também por células dendríticas (WIELE, *et al.*, 2016).

As células dendríticas podem discriminar diferenças entre diferentes compostos patogênicos através da expressão de vários PRRs. A ativação subsequente de diferentes PRRs nas células dendríticas causa a cascata de diferenciação celular, sinalizando caminhos com direcionamento para a secreção de citocinas e seus metabólitos. Os TLRs são importantes receptores do sistema imune inato que identificam PAMPs; para detectar PAMPs microbianos, os TLRs permitem a iniciação de respostas inflamatórias e eventualmente a eliminação dos invasores patogênicos. (FERRAZ, *et al.*, 2011)

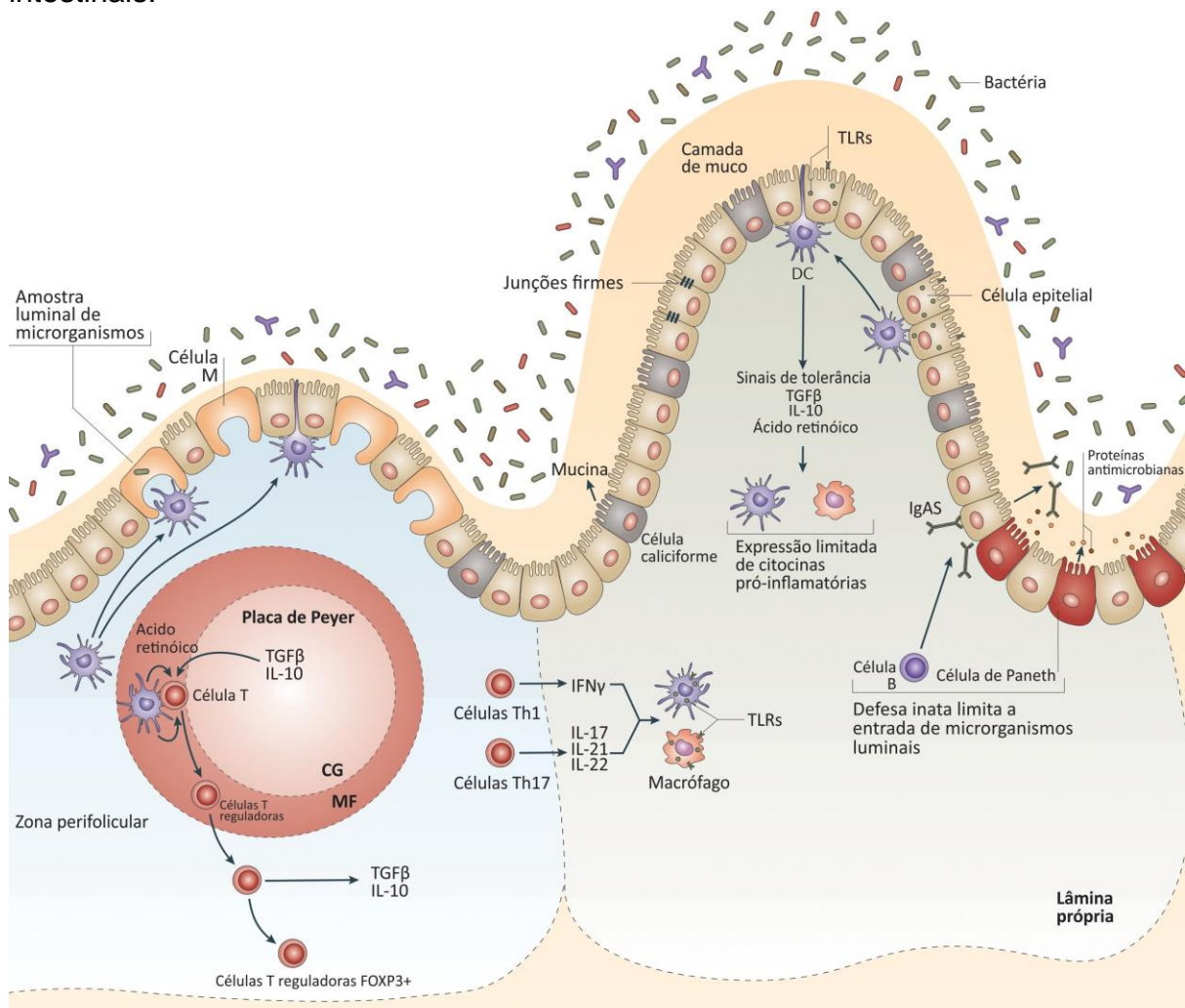
Os componentes de bactérias gram-positivas e gram-negativas interagem com os TLRs para mediar ambos os sistemas imunes inato e adaptativo, por exemplo, lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas se ligam ao TLR-4, (KAISHO; AKIRA, 2006) enquanto que peptidoglicano da parede celular de bactérias gram-positivas geram uma resposta imune via TLR-2. (JOOSTEN, *et al.*, 2016)

Os componentes da membrana celular de micro-organismos vão mediar a secreção de citocinas; quando esses componentes são ativados, as células dendríticas irão adquirir sinais que promovem o desenvolvimento e diferenciação de células T auxiliares imaturas em células Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), Th17 (IL-17, IL-22 e IL-26) ou células T reguladoras (Treg) (ESMAEILI, *et al.*, 2017; WIELE, *et al.*, 2016). Nesse contexto a diferenciação de células T auxiliares parece ser profundamente influenciada pela microbiota intestinal. A disbiose provoca o desbalanço das subpopulações de células T, como as Th1, Th2, Th17 e Treg (LEE, KIM, 2017).

As células dendríticas atuam como APCs, exibindo peptídeos em suas moléculas de MHC (complexo de histocompatibilidade principal) de classe II; a apresentação dessas moléculas para células B ou para receptores de células T sensibiliza essas células e induzem o início de uma resposta do sistema imune adaptativo. Os macrófagos juntamente com as células dendríticas continuam a

avaliar e detectar no lúmen intestinal a presença de antígenos deletérios; dependendo do antígeno microbiano, citocinas são liberadas para diferenciação de células T auxiliares (figura 5) (SCHER; ABRAMSON, 2011).

Figura 5 - Mecanismos de defesa do hospedeiro e tolerância a micro-organismos intestinais.



O ambiente intestinal modula a diferenciação celular no sistema imunológico para controlar a defesa contra patógenos e a tolerância a espécies comensais. As células epiteliais intestinais fornecem uma barreira física entre os micro-organismos luminis e os tecidos intestinais subjacentes para controlar a homeostase e a tolerância. Células epiteliais especializadas produzem uma camada de muco (células caliciformes) e secretam proteínas antimicrobianas (células Paneth) que limitam a exposição bacteriana às células epiteliais. A produção de grandes quantidades de imunoglobulina A secretora (IgAS) pelos linfócitos B fornece proteção adicional contra a microbiota luminal. A detecção microbiana via sistema imune inato realizada por células epiteliais, células dendríticas (DCs) e macrófagos é mediada por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como receptores do tipo Toll (TLRs). A ativação de PRRs nas células imunes inatas normalmente induz caminhos que mediam a morte microbiana e ativam células Th1, Th17 e células imunes adaptativas. No entanto, durante a manutenção da homeostase e tolerância imunológica, a ativação de PRRs nos macrófagos e DCs na lâmina própria do intestino não resulta em secreção de citocinas pró-inflamatórias. As DCs apresentam antígeno às células T nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, e isso pode levar à diferenciação das populações de Treg que são reguladas pela interleucina-10 (IL-10), pelo fator de crescimento e transformação beta (TGF-β) e pelo ácido

retinóico. A homeostase intestinal pode ser perturbada pela ausência ou excesso de representação de certos grupos de bactérias – disbiose. IL: interleucina.  
Fonte: Adaptado BRON, van BAARLEN, KLEEREBEZEM, 2012.

A microbiota intestinal pode induzir a formação de células Treg que desempenham um papel importante na manutenção da tolerância imunológica aos antígenos da dieta e da microbiota intestinal e um papel central na supressão de respostas inflamatórias e alérgica evitando a doença autoimune. Células Treg CD4+ e CD25+ são células supressoras, que expressam o fator de transcrição Fox p3 e são indispensáveis para a manutenção da autotolerância e homeostase, suprimindo uma resposta imune excessiva (FURUSAWA, *et al.*, 2013); produzem IL-10, e são capazes de prevenir protegem contra autoimunes (STEPHENS, *et al.*, 2001)

A microbiota intestinal ainda é responsável pela fermentação e produção de AGCC, particularmente, acetato, propionato e butirato (MACFARLANE; MACFARLANE, 2011) que exercem profundos efeitos anti-inflamatórios e modulam o sistema imunológico, além de evitarem a hiperpermeabilidade intestinal (RICHARDS, *et al.*, 2016).

Os AGCC são ligantes exógenos do receptor acoplado a proteína G-43 (GPR-43) que é expresso em adipócitos humanos, células epiteliais do cólon e células mononucleares do sangue periférico, que tem o potencial de modular a inflamação (ANG; DING, 2016). A interação entre os AGCC e GPR-43 é necessária para a resolução normal das respostas inflamatórias. Maslowski e colaboradores (2009) mostraram que camundongos deficientes em GPR-43 em modelos de colite, artrite e asma apresentam não resolução ou exacerbação da inflamação (MASLOWSKI, *et al.*, 2009) e Kobayashi e colaboradores (2017) demonstraram que o GPR-43 pode exercer efeito anti-inflamatório em células epiteliais renais através da inibição da proteína quimioatrente de monócitos 1 induzida por TNF- $\alpha$  (KOBAYASHI, *et al.*, 2017).

Estudo realizado por Smith e colaboradores (2013) alimentando camundongos *germ-free* durante três semanas com AGCC, mostrou que os AGCC em combinação ou individualmente aumentaram seletivamente as células Treg no intestino grosso, sendo que a maioria destas células Treg expressava o fator de transcrição Helios e sugerem que os AGCC induzem células Treg produtoras de Foxp3 e IL-10 (SMITH, *et al.*, 2013).

Fukuda e colaboradores (2011) realizaram um experimento com ratos colonizados com  $10^8$  UFC e infectados por *E. coli* O157:H7, bactéria que pode causar a morte por enterohemorragia e síndrome hemolítico-urêmica, e mostraram que o acetato produzido por bifidobactérias foi capaz de inibir a hiperpermeabilidade intestinal e proteger o hospedeiros contra a infecção letal (FUKUDA, *et al.*, 2011).

Furusawa e colaboradores (2013) mostraram que o butirato produzido por bactérias intestinais induz a formação de células Treg, especificamente as Treg CD4+, através da regulação epigenética do gene Foxp3 da célula T (FURUSAWA, *et al.*, 2013). As alterações epigenéticas dão origem a várias doenças autoimunes como, por exemplo, a AR (ZHANG; ZHANG, 2015).

Mudanças na composição da microbiota intestinal ou alterações na abundância de certos filos em relação a outros, ou seja, o desequilíbrio da microbiota intestinal, também denominado disbiose pode elevar a inflamação do hospedeiro e, posteriormente, favorecer o desenvolvimento de distúrbios intestinais, distúrbios metabólicos relacionados, como diabetes, esteatose hepática e hepatite não alcoólica, doenças cardiovasculares (WIELE, *et al.*, 2016) e doenças autoimunes (HILL, *et al.*, 2014.)

Evidências de que a microbiota intestinal influencia o desenvolvimento de doenças autoimunes têm sido demonstradas em vários estudos, inclusive utilizando a metagenômica. A disbiose pode ser detectada nas doenças inflamatórias intestinais, esclerose múltipla (BERER, *et al.*, 2017), diabetes tipo 1 (MURRI, *et al.*, 2013), lúpus eritematoso sistêmico (ROSSER; MAURI, 2016), hepatite autoimune (LIN, *et al.*, 2015) e artrite reumatoide (MAEDA; TAKEDA, 2017).

Pacientes com AR podem apresentar disbiose intestinal com diminuição das concentrações de *Bacteroides spp.*; *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* e populações de estirpes típicas *E. coli* com aumento de *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus spp.*, formas atípicas de *E. coli*, *Candida spp.* (KUCHMAK, *et al.*, 2014) e *Prevotella copri* (SCHER, *et al.*, 2013).

Os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal está associada a AR são provavelmente multifatoriais; outros mecanismos além da alteração da homeostase do sistema imune incluem a capacidade de produzir citrulinização de peptídeos por ação enzimática, mimetismo antigênico e aumento das células Th17 mediado pela inflamação da mucosa (HORTA-BASS, *et al.*, 2017). A disbiose, em um ou mais

locais da mucosa, leva à quebra da autotolerância à autoantígenos citrulinados (HOLERS, 2013).

A disbiose é associada a índices clínicos como titulação de fator reumatoide, anticorpo antipeptídeo citrulinado (anti-CCP) e autoanticorpos (WU, *et al.*, 2016). Os locais da mucosa têm sido associados à infecção bacteriana, por exemplo, doença periodontal, onde os patógenos exógenos estão implicados no desenvolvimento de autoimunidade por meio de um gatilho infeccioso. As proteases produzidas nos locais das mucosas, tanto pelas bactérias como pelo hospedeiro humano, podem induzir a liberação de proteínas expressas na matriz extracelular humana a adquirirem propriedades de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), revelando assim neoepítopos que podem ser citrulinados e conduzir a uma resposta de autoanticorpos com a produção adicional de anti-CCP (SOFAT, *et al.*, 2015).

Pianta e colaboradores (2017), avaliando epítopos de células T de *Prevotella copri* (*P. copri*), um microrganismo intestinal, no tecido sinovial ou em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com AR, identificaram um peptídeo apresentado por HLA-DR a partir de uma proteína de *P. copri* que estimulou as respostas Th1 em 42% dos pacientes com AR recente. Além do peptídeo, foi apresentado também em um subgrupo de pacientes com AR recente e AR crônica, anticorpos IgA a proteína de *P. copri* que correlacionaram com as respostas de citocinas Th17 e com anti-CCP. Um outro subgrupo apresentou anticorpos IgG *P. copri* que estavam associados ao DNA de *P. copri* no líquido sinovial e respostas Th1 específicas de *P. copri*. No entanto, foram raras as respostas a anticorpos *P. copri* em pacientes saudáveis ou com outras doenças reumáticas (PIANTA, *et al.*, 2017).

Sher e colaboradores (2013) utilizando a técnica de sequenciamento 16S em 114 amostras de fezes de pacientes com AR, igualmente demonstraram que a *P. copri* é fortemente correlacionada com a AR recente não tratada e que o aumento de *P. copri* está correlacionado com a redução de bacteroides e uma perda de micro-organismos benéficos para AR (SHER, *et al.*, 2013).

Em estudo com modelos de animais artríticos K/BxNA, a introdução de bactérias filamentosas segmentadas promoveu a AR sistêmica através do aumento da população de células Thf nas placas de Peyer, como também em locais sistêmicos como baço e gânglios linfáticos. As respostas de células Thf induzidas

pelas bactérias filamentosas segmentadas antecederam o aparecimento da artrite e foram necessárias para o desenvolvimento da autoimunidade (TENG, *et al.*, 2016).

O mimetismo molecular advindo das bactérias intestinais também pode ser a causa da AR em indivíduos geneticamente predispostos com hiperpermeabilidade intestinal. O intestino humano é a conexão entre o ambiente e os sistemas do corpo humano e, portanto, o principal reservatório de micro-organismos intestinais que são mantidos isolados dos demais sistemas do corpo humano através da barreira da mucosa intestinal; a perda dessa barreira pode resultar no que chamamos de hiperpermeabilidade intestinal o que aumenta a exposição aos micro-organismos e pode levar ao mimetismo antigênico e à autoimunidade (NEGI; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2017; RIBEIRO, *et al.*, 2016).

Stewart e colaboradores (2018) mostraram que o homólogo de ubiquitina humana BfUbb codificado pelo gene da bactéria *Bacteroides fragilis*, um membro da microbiota intestinal normal conhecida como a única bactéria por codificar um homólogo de ubiquitina eucariótica, pôde gerar anticorpos IgG em humanos e a similaridade estrutural de BfUbb e ubiquitina humana resultou em epítomos reativos (STEWART, *et al.*, 2018).

Estudo *in silico* (executado em computador) realizado para identificar peptídeos bacterianos intestinais encontrou grande número de peptídeos bacterianos intestinais principalmente pertencentes aos filos Firmicutes e Proteobacteria que são homólogos a peptídeos humanos e se ligam a alelos HLA-II, o que pode desencadear respostas autoimunes caso haja a hiperpermeabilidade intestinal (NEGI; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2017).

Chen e colaboradores (2003) estudando a presença de componentes bacterianos no líquido sinovial de pacientes com AR, verificaram a presença de ácido murâmico, um componente do peptidoglicano das paredes celulares de bactérias gram-positivas, no líquido sinovial de alguns pacientes com AR e osteoartrite. Assim, a exposição aos micro-organismos desencadeada pela hiperpermeabilidade intestinal pode promover a entrada de componentes da parede celular de bactérias para a corrente sanguínea colaborando para a inflamação sistêmica (CHEN, *et al.*, 2003).

Além do peptidoglicano, outros padrões moleculares associados aos micro-organismos, como o ácido lipoteicoico, a flagelina e o lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular de bactérias gram-negativas, são reconhecidos pelos

PPRs, TLRs, NOD e receptores tipo RIG nas células epiteliais e imunes (MEDZHITOV, 2007). O LPS e o ácido lipoteicoico estimulam os TLR4 e TLR2 respectivamente, particularmente nos monócitos e macrófagos, ativam as moléculas imunoregulatórias, incluindo os fatores pro-inflamatórias, induzindo um aumento importante da produção de TNF- $\alpha$  (HOAREAU, *et al.*, 2010).

A IL-17, juntamente com o TNF- $\alpha$ , mostrou-se preditiva de mau prognóstico na AR ( KIRKHAM, *et al.*, 2006), sendo que a IL-17 é implicada na patogênese da AR estimulando a ocorrência de *pannus*, osteoclastogênese e neoangiogênese sinovial (WU, *et al.*, 2016).

A microbiota intestinal regula o equilíbrio de Th17/Treg na lâmina própria intestinal (IVANOV, *et al.*, 2008). Wu e colaboradores (2010) ao introduzirem bactérias filamentosas segmentadas no intestino em modelos de camundongos *germfree* mostraram que a AR foi rapidamente desencadeada através da indução de células Th17 e da produção de autoanticorpos (WU, *et al.*, 2010).

O *Bacteroides fragilis*, embora citado anteriormente como gerador de epítomos, em outro estudo, utilizando animais *germfree* que foram colonizados com *B. fragilis*, o polissarídeo A produzido por ele, foi capaz de induzir a formação de células Treg e aumentar a produção de IL-10 no cólon (ROUND; MAZMANIAN, 2010).

#### 1.4 PROBIÓTICOS E AR

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (HILL, *et al* 2014). O termo probiótico em grego significa “pró vida”, foi cunhado por Lilly e Stillweel em 1965 para definir fatores de crescimento secretadas por um microrganismo que são capazes de estimular o crescimento de outros (LILLY; STILLWEEL, 1965).

Elie Metchnikoff em 1907 já preconizava que os probióticos estavam relacionados com a longevidade humana através do consumo de leite fermentado (METCHNIKOFF, 1907). Atualmente, os probióticos vêm sendo utilizados como ferramenta na manutenção ou restauração da microbiota do trato gastrointestinal (TGI) e, portanto, na prevenção e auxílio ao tratamento de várias doenças desde doenças do TGI, como diarreia infecciosa, diarreia associada ao uso de antibióticos,

síndrome do intestino irritável, bolsite (*pouchitis*), *Helicobacter pylori*, diarreia associada ao *Clostridium difficile* (RITCHIE; ROMANUK, 2012), enterocolite necrozante (CHANG, *et al.*, 2017), cólicas do recém-nascido (XU,*et al.*, 2015) até a doenças extraintestinais como obesidade, diabetes (HAMPE; ROTH, 2017), síndrome metabólica (BERNINI, *et al.*, 2018), depressão (HUANG; WANG; HU, 2016) imunodepressão e doenças autoimunes como artrite reumatoide, lúpus eritematoso, esclerose múltipla e doença inflamatória intestinal (LIU; ALOOKARAN; RHOADS, 2018).

A utilização de mais de uma cepa ou gênero de probióticos parece ser mais benéfica do que a utilização de apenas uma cepa isolada, o uso de multiespécies contendo mais de um gênero pode ser ainda melhor. Um conceito emergente no campo dos probióticos é reconhecer que alguns mecanismos de atividade probiótica são compartilhados entre as diferentes cepas, espécies e/ou inclusive gêneros (GUARNER *et al.*, 2017).

Em uma revisão sistemática sobre o uso de probióticos na obesidade, Zhang e colaboradores (2016) sugerem que os efeitos são maiores quando há a administração de mais de uma espécie de probióticos na redução do peso corporal e no índice de massa corporal (ZHANG, *et al.*, 2016). Vários estudos também já demonstraram a eficácia da utilização da mistura probiótica VSL#3 (*Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis*, e *Streptococcus thermophilus* – 450 bilhões de colônias/sachê) no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (GIONCHETTI, *et al.*, 2003; BIBILON, *et al.*, 2005; CHAPMAN, *et al.*, 2006).

A tabela 1 demonstra as diferenças e benefícios entre utilizar apenas uma cepa ou multiespécies de probióticos.

TABELA 1- diferenças e benefícios entre utilizar apenas uma cepa ou multiespécies de probióticos

PROBIÓTICO MONOESTIRPE	PROBIÓTICOS MULTIESPÉCIES
Colonização bem sucedida	
A sobrevivência depende das propriedades de apenas uma específica estirpe. Essa estirpe tem que superar por conta própria todas as barreiras utilizadas pelo hospedeiro e sua microbiota endógena.	Diferentes estirpes com diferentes características têm maiores chances de colonização. Maior divergência de fortes pontos; maiores chances de sobrevivência de pelo menos uma ou várias estirpes. Criação de um nicho de probióticos; melhorando as chances de uma colonização bem sucedida de outras estirpes através de, por exemplo: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Redução da atividade de antagonismo da microbiota endógena do hospedeiro contra as estirpes probióticas.</li> <li>- Indução de uma faixa ótima de pH.</li> <li>- Criação de um nicho anaeróbico.</li> <li>- Adesão aprimorada.</li> </ul>
Efeitos exercidos na saúde pela preparação probiótica.	
O efeito probiótico é limitado pelas propriedades específicas da estirpe.	O efeito probiótico é melhorado devido a propriedades específicas da combinação das estirpes. <ul style="list-style-type: none"> <li>- Efeito complementar como a colonização de diferentes nichos.</li> <li>- Efeitos sinérgicos de diferentes cepas com propriedades específicas; o efeito total dos probióticos pode ser maior do que a soma das propriedades separadas.</li> </ul> Inter-relações positivas entre estirpes melhoram suas atividades biológicas. <ul style="list-style-type: none"> <li>- Simbiose entre estirpes diferentes devido a troca de diferentes metabólitos.</li> </ul>

Fonte: adaptado de TIMMERMAN, *et al.*, 2004.

A ação anti-inflamatória dos probióticos vem despertando muito interesse atualmente, onde a suplementação de bactérias probióticas mostra-se relevante na diminuição da inflamação em vários tipos de doenças, sendo que os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm efeitos anti-inflamatórios potentes (LUCKEY, *et al.*, 2013; O'MAHONY, *et al.*, 2008) e a utilização das duas espécies concomitantemente é mais eficaz na resposta imune, pois atuam sinergicamente (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

A suplementação da mistura probiótica VSL#3 por seis semanas em indivíduos com excesso de peso corporal - índice de massa corporal (IMC) > 25 Kg/m<sup>2</sup>, diminuiu os níveis plasmáticos de PCRus. Quando comparados com o grupo placebo que recebeu celulose cristalina, o grupo VSL#3 apresentou uma redução significativa de 24,5% nos valores de PCRus e quando a mistura probiótica foi associada a suplementação de ômega-3 observou-se uma redução ainda maior na PCRus, sendo de 34,6%. Interessante ressaltar que neste estudo foi avaliada a

composição da microbiota intestinal e, indivíduos com PCRus elevadas - maior do que 3 mg/L, apresentaram contagem total de lactobacilos, bifidobactérias e *Streptococcus thermophilus* significativamente menor e contagem de *E. coli* maior, quando comparados a indivíduos com PCRus menor que 3 mg/L (RAJKUMAR, *et al.*, 2014).

Milajerdi e colaboradores (2019) em uma metanálise com 42 ensaios clínicos sobre o efeito da suplementação com probióticos nos biomarcadores inflamatórios, encontraram diminuição significativa nas concentrações séricas de PCRus, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-4 após a suplementação. Houve ainda aumento significativo das concentrações séricas de IL-10 com a suplementação com probióticos (MILAJERDI *et al.*, 2019).

Em um estudo randomizado, controlado por placebo, realizado em pacientes com transtorno depressivo maior, suplementados com cápsulas contendo três cepas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* -  $2 \times 10^9$  UFC/g, *Lactobacillus casei* -  $2 \times 10^9$  UFC/g, e *Bifidobacterium bifidum* -  $2 \times 10^9$  UFC/g), durante oito semanas, as concentrações de PCRus diminuíram significativamente, bem como houve um aumento dos níveis de glutathione quando comparados ao grupo placebo (AKKASHEH, *et al.*, 2016).

Em indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica, a suplementação de capsulas de probióticos contendo *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus* -  $2 \times 10^7$  UFC/dia, ou a suplementação do prebiótico inulina diminuíram significativamente os valores de séricos de TNF- $\alpha$  e aumentaram a capacidade antioxidante total. Ao associar ambos probióticos e prebióticos, além da melhora dos níveis de TNF- $\alpha$  e da capacidade antioxidante total, houve também uma redução significativa nos valores de PCRus (JAVADI, *et al.*, 2018).

Asemi e colaboradores (2013) ao avaliarem o efeito da suplementação com múltiplas cepas (*Lactobacillus acidophilus* -  $2 \times 10^9$  UFC (unidade formadora de colônia), *L. casei*  $7 \times 10^9$  UFC, *L. rhamnosus* -  $1.5 \times 10^9$  UFC, *L. bulgaricus* -  $2 \times 10^8$  UFC, *Bifidobacterium breve* -  $2 \times 10^{10}$  UFC, *B. longum* -  $7 \times 10^9$  UFC, *Streptococcus thermophilus* -  $1.5 \times 10^9$  UFC, e 100 mg de fruto-oligossacarídeos) durante oito semanas em pacientes com diabetes tipo 2, mostraram uma redução significativa nas concentrações de PCR ultrasensível (PCRus) e um aumento dos níveis de glutathione (ASEMI, *et al.*, 2013).

Metanálise realizada com mulheres grávidas diagnosticadas com diabetes gestacional e uso de probióticos identificou que a suplementação pode diminuir os níveis séricos de PCRus e do marcador de EO MDA, sem neste caso, efeitos significativos nos níveis de glutathione (CHEN, *et al.*, 2019).

Como mostrado acima, alguns estudos também comprovaram a função antioxidante dos probióticos, cujos mecanismos antioxidantes dos probióticos são a capacidade quelante de  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ; a eliminação de ERO como radical hidroxila e peróxido de hidrogênio e ainda atividade redutora (LIN; YEN, 1999; LEE, *et al.*, 2005). Ademais, os probióticos possuem suas próprias enzimas antioxidantes; produzem metabólitos antioxidantes; regulam positivamente as atividades das enzimas antioxidantes do hospedeiro; aumentam os níveis de metabólitos antioxidantes do hospedeiro e regulam as atividades das enzimas produtoras de ERO (WANG, *et al.*, 2017).

Sun e colaboradores (2010) utilizando um modelo de fermentação colônica mostrou que *Lactobacillus paracasei* Fn032, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Lactobacillus sp.* Fn001 na quantidade de  $5 \times 10^8$  UFC/ml reduziram significativamente os radicais hidroxilas produzidos por íon ferroso (SUN, *et al.*, 2010).

Utilizando linhas celulares HepG2 de carcinoma hepatocelular humano submetidas ao estresse oxidativo por terc-Butil Hidroperóxido, Ou e colaboradores (2012) mostraram redução na formação de EROS em 52% a 73% quando essas células eram tratadas com células mortas pelo calor de bactérias ácido-lácticas *Lactobacillus acidophilus* La12, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* Lb23, *Bifidobacterium longum* Bl36, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* St28 na quantidade de  $10^8$  UFC (OU, *et al.*, 2012).

Pela sua capacidade antioxidante, os probióticos foram alvo de estudo em atletas com exercício físico intenso, atividade que sabidamente aumenta o estresse oxidativo, onde as cepas *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 e *Lactobacillus paracasei* IMC 502 na quantidade de  $10^9$  UFC exerceram uma forte atividade antioxidante aumentando os níveis plasmáticos de antioxidantes e neutralizando as ERO como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio. (MARTARELLI, *et al.*, 2011).

Deste modo, devido aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, e a presença de disbiose intestinal, a suplementação de probióticos em pacientes com AR torna-se promissora e estudos em animais e em humanos, utilizando bactérias

probióticas, mostram que a administração de probióticos melhora os sintomas, as manifestações clínicas, os marcadores do estresse oxidativo e marcadores inflamatórios na AR.

A ingestão de *Lactobacillus casei* na quantidade de  $2 \times 10^8$  UFC por 28 dias em modelos animais com artrite induzida por colágeno (CIA), inibiu significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  e a intensidade do infiltrado inflamatório articular (AMEKAR, *et al.*, 2011). Na quantidade de  $5 \times 10^9$  três vezes por semana, durante 12 semanas foi capaz de suprimir a CIA e reduzir o inchaço da pata em camundongos, reduzindo as moléculas pró-inflamatórias IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IFN-, TNF- e Cox-2 e aumentando a IL-10 (SO, *et al.*, 2008)

Além do *Lactobacillus casei*, outras bactérias do gênero *Lactobacillus* também mostraram resultados positivos em estudos com animais, tanto o *Lactobacillus casei* como o *Lactobacillus acidophilus* administrados em água destilada em uma dose de  $2 \times 10^8$  UFC/ml durante 20 dias em camundongos com CIA promoveu uma redução dos parâmetros pró-inflamatórios como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17; diminuição do EO evidenciado pelo aumento da glutathione, glutathione peroxidase e superóxido desmutase, diminuição da catalase e peroxidação lipídica e melhora dos parâmetros clínicos (AMDEKAR, *et al.*, 2013).

*Lactobacillus GG* na quantidade de  $10^{11}$  UFC, administrados durante 31 dias, promoveram histologicamente uma menor inflamação em camundongos com artrite induzido pela tropomiosina (BAHARAV, *et al.*, 2004) e a ingestão de *Lactobacillus fermentum* na quantidade de  $10^8$  UFC/ml em água durante 4 semanas foi capaz de melhorar os parâmetros clínicos e histológicos em camundongos utilizados como modelos experimentais de AR induzida pelo adjuvante Freund-*Mycobacterium butyricum* (RODRIGUEZ-CABEZAS, *et al.*, 2008).

Hatakka e colaboradores (2003), em um estudo piloto, fornecendo terapia probiótica com *Lactobacillus GG* ( $\geq 5 \times 10^9$  para UFC/capsula) para pacientes com AR (8 pacientes com probiótico e 13 placebo), observaram melhora na atividade da doença com redução do número de contagem de articulações dolorosas e edemaciadas e relato de bem estar pelos pacientes ao longo de 12 meses, embora não tenha encontrado valores de P significativos (HATAKKA, *et al.*, 2003).

Pineda, e colaboradores (2011) oferecendo uma suplementação de probióticos *Lactobacillus rhamnosus GR-1* e *Lactobacillus reuteri RC-14* na quantidade de  $2 \times 10^9$  UFC ao dia durante três meses para pacientes com AR,

obtiveram melhora significativa na pontuação de um questionário sobre a avaliação da saúde, porém não obtiveram resultados significativos nas alterações de citocinas (PINEDA, *et al.*, 2011).

Vaghef-Mehrabany e colaboradores (2014) utilizando cápsulas de *Lactobacillus casei 01* com no mínimo  $10^8$  UFC durante oito semanas em pacientes com AR obtiveram vários resultados positivos como diminuição significativa do DAS 28 e da VAS (escala visual analógica), diminuição significativa da PCRus, do TNF- $\alpha$  e da IL-12, aumento significativo da IL-10 e aumento significativo da proporção entre IL10/IL12 (Vaghef-Mehrabany, *et al.*, 2014).

De modo semelhante, Alipour e colaboradores, 2014, utilizando também *Lactobacillus casei 01* com no mínimo  $10^8$  UFC durante oito semanas em pacientes com AR, mostraram diminuição significativa da proteína C-reativa ultra sensível, diminuição significativa da IL-12 e do TNF- $\alpha$ , diminuição dos valores da DAS 28 e aumento significativo da IL-10 (ALIPOUR, *et al.*, 2014).

O uso de cápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* na quantidade de  $2 \times 10^9$  UFC/g, *Lactobacillus casei* na quantidade de  $2 \times 10^9$  UFC/g e de *Bifidobacterium bifidum* na quantidade de  $2 \times 10^9$  UFC/g em pacientes com AR provocou melhora significativa do DAS 28, diminuição significativa dos níveis de insulina e do índice de avaliação de resistência à insulina HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) e da PCRus (ZAMANI, *et al.*, 2016)

## 2 JUSTIFICATIVA

O EO e o processo inflamatório estão intrinsicamente envolvidos na fisiopatologia da AR assim como em sua progressão e atividade. Além disso, têm sido demonstrados que tanto a inflamação quanto o EO podem contribuir para disbiose intestinal que acomete pacientes com AR. Alguns estudos têm avaliado o consumo de probióticos individualmente ou em combinação como tratamento complementar de algumas doenças, no entanto, os dados na AR ainda são bastante escassos. Até o presente momento, não temos conhecimento de estudos que tenham avaliado o uso de uma combinação de probióticos (como a proposta neste estudo) nos parâmetros inflamatórios e no perfil de EO. Desta forma, Os resultados obtidos nesse estudo poderão contribuir para qualificar o uso de probióticos como terapia adjuvante no tratamento da AR.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de uma mistura de probióticos nos parâmetros inflamatórios, no estresse oxidativo/nitrosativo e na atividade da doença em pacientes com AR após 60 dias de tratamento.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do consumo da combinação de probióticos após 60 dias de tratamento na atividade da AR avaliada pelo DAS-28;
- Comparar os parâmetros laboratoriais inflamatórios no início (T0) e após 60 dias (T60) de tratamento com placebo ou com probióticos;
- Avaliar o perfil de estresse oxidativo/nitrosativo no início (T0) e após 60 dias (T60) de tratamento com placebo ou com probióticos;
- Comparar os tratamentos (placebo *versus* probióticos) em relação aos efeitos nos parâmetros inflamatórios, nos níveis de citocinas e no perfil oxidativo em pacientes portadores de AR.

## 4 SUJEITOS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um ensaio clínico randomizado, duplo cego, placebo controlado que foi conduzido de acordo com os *guidelines* da Declaração de Helsink e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, parecer número 2.744.755 (Anexo A). Todos os pacientes receberam informações detalhadas sobre os procedimentos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

Foram selecionados quarenta e sete pacientes com AR, de ambos os sexos, com idade entre 27 e 80 anos, atendidos pelo ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina. O diagnóstico de AR foi realizado de acordo com o ACR e pela EULAR. Os critérios de exclusão foram a existência de doenças renais, hepáticas, gastrointestinais, adrenais, infecciosas, diabetes, câncer, ou outra doença autoimune. Os pacientes também não poderiam estar utilizando suplementos de vitaminas, antioxidantes, terapia de reposição hormonal ou outro suplementos com micro-organismos probióticos e não poderiam fazer uso de bebidas alcoólicas regularmente. As pacientes não poderiam estar grávidas ou em lactação e todos os pacientes foram orientados a manter sua dieta e atividade física habituais durante o período de estudo. A inclusão dos pacientes, avaliação clínica e coleta de dados foram realizadas de agosto a dezembro de 2018.

A avaliação clínica foi realizada de forma cega por dois reumatologistas, sendo que a atividade da doença foi determinada pelo índice de atividade da doença em 28 articulações (*Disease Active Score*, DAS- 28) de acordo com a fórmula proposta por Prevoo e colaboradores (1995) utilizando o VHS, mais a contagem de articulações dolorosas ou edemaciadas ou ambas em vinte e oito articulações pré-determinadas (Anexo C) e a avaliação da saúde global do paciente através de uma escala visual analógica (Anexo D). Dados demográficos (sexo, idade, etnia), dados clínicos relacionados a AR (duração da doença desde o diagnóstico, presença de manifestações extra-articulares e medicações), tabagismo e prática de atividade física foram coletadas durante a anamnese (Apêndice B). Os parâmetros clínicos e laboratoriais foram avaliados antes do início dos tratamentos (tempo zero, T0) e após 60 dias (T60).

Os pacientes foram randomizados através de sorteio e foram divididos em dois grupos: **pacientes que ingeriram diariamente suplemento probiótico (grupo probiótico) e pacientes que ingeriram suplemento de maltodextrina (grupo placebo).** Ambos por 60 dias juntamente com a medicação usual. Do total de quarente e sete **pacientes selecionados, cinco pacientes do sexo feminino foram excluídas por apresentarem baixa adesão ao tratamento, sendo três pacientes do grupo probiótico e duas do grupo placebo permanecendo cada grupo com 21 pacientes** A suplementação de probióticos foi na forma de pó em sachê contendo cinco cepas liofilizadas: *Lactobacillus acidophilus* LA-14 ( $10^9$  UFC/g), *Lactobacillus casei* LC-11 ( $10^9$  UFC/g), *Lactococcus lactis* LL-23 ( $10^9$  UFC/g), *Bifidobacterium lactis* BL-04 ( $10^9$  UFC/g) e *Bifidobacterium bifidum* BB-06 ( $10^9$  UFC/g); Outros ingredientes presentes no sachê eram amido de milho e maltodextrina. O grupo placebo recebeu a maltodextrina também na forma de pó em sachê. O peso dos sachês de probióticos e da maltodextrina era de dois gramas.

O peso corporal foi aferido através de balança digital com precisão de 0,1 Kg devidamente calibrada no período da manhã com os pacientes vestindo roupas leves e sem sapatos. A altura foi medida por meio de um estadiômetro com escala de 0,1 cm. Após a verificação do peso e da altura, utilizou-se os valores obtidos para a realização do cálculo do índice de massa corporal (IMC) de acordo com a fórmula: peso (kg) dividido pela altura (m) elevada ao quadrado conforme preconizado por Keys e colaboradores (1972) (KEYS, *et al.*, 1972)

#### 4.2 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

As amostras de sangue foram coletadas após 12 horas de jejum. O sangue venoso foi obtido por coleta à vácuo em tubos estéreis contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. O sangue total foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 min e as amostras de plasma e soro foram separadas e divididas em alíquotas e depois armazenadas a  $-80^{\circ}$  C para análise subsequente.

A contagem de leucócitos totais e a velocidade de hemossedimentação (VHS) foram determinadas por automação utilizando o autoanalisador hematológico. Os níveis de PCRus foram medidos por ensaio turbidimétrico (C8000, Abbott, Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA). Os níveis séricos de ferritina foram

determinados por imunoensaio quimioluminescente de micropartículas (CMIA, Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, EUA).

Os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e da anti-inflamatória (IL-10) e adiponectina foram determinados simultaneamente, utilizando kit ProcartaPlex (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria), por imunofluorimetria utilizando a plataforma Luminex no instrumento MAGPIX® (Luminex Corp., TX, USA).

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

A avaliação da formação de lipoperóxidos (LOOH) foi realizada por determinação de hidroperóxidos lipídicos iniciados por Tert-Butil (CL-LOOH) conforme descrito anteriormente por Gonzalez-Flecha, Llesuy e Boveris (1991) (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991) e os resultados foram expressos em unidades relativas de luz (URL).

O teor de proteínas carbonílicas (PC) foi medido como descrito por Reznick e Parker (1994) (REZNICK; PACKER, 1994). O teor de carbonil foi calculado pela leitura do pico de absorvência de amostras tratadas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e comparado com amostras tratadas apenas com ácido clorídrico. O conteúdo de carbonil foi expresso em nanogramas por mililitro de proteína total.

A concentração de óxido nítrico (NO) na amostra foi estimada pela medição de NO<sub>x</sub> - nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) - utilizando-se esferas de cádmio para redução de nitrato em nitrito. As concentrações destes metabólitos foram posteriormente determinadas de acordo com o método proposto por Navarro-González (1998) (NAVARRO-GONZÁLVEZ; GARCÍA-BENAYAS; ARENAS, 1998). Os valores de NO foram expressos em  $\mu$ M.

Os grupos sulfídricos de proteína foram avaliados no plasma através de ensaio espectrofotométrico baseado no ácido 2,2-ditiobisnitrobenzóico (DTNB), como relatado anteriormente e os resultados foram expressos em  $\mu$ M (HU, 1994).

A capacidade antioxidante total foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Repetto et al (1996) (REPETTO, *et al.*, 1996). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma medindo o tempo de inibição induzida por 2,2-azobis (2- aminopropano). O sistema foi calibrado com o

analógico da vitamina E (Trolox), e os valores de TRAP foram expressos em equivalente de  $\mu\text{M}$  Trolox / mg de ácido úrico.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi estimado estatisticamente para cada grupo considerando um poder estatístico de 80% e o nível de significância bilateral de  $p < 0,05$ . O tamanho da amostra foi calculado para detectar diferenças estatísticas de pelo menos 10% nos parâmetros avaliados. O programa Cal Stat foi utilizado para o cálculo do tamanho da amostra, com base na média e desvio padrão para alguns dos parâmetros avaliados anteriormente em outros estudos.

Os dados categóricos foram analisados com o teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. Número absoluto e porcentagem demonstraram os resultados. O teste de pares casados de Wilcoxon foi realizado para verificar as mudanças desde o início (alterações intragrupo). O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparar os valores basais e as diferenças entre os grupos de tratamento (alterações intergrupos). Os dados são expressos como medianas e percentis (25%- 75%). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism software versão 6.0. Os testes foram bicaudais e um nível alfa de 0,05 indicou resultados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação foram apresentados em um artigo científico intitulado “Mixture Of Probiotic Reduces Nitric Oxide Metabolites, Inflammatory Biomarkers And Improve Antioxidant Defense In Patients With Rheumatoid Arthritis: A Randomized Double-Blind and placebo-controlled study”, que foi submetido para o periódico *Nutrition* com fator de impacto 3.591.

**Mixture Of Probiotic Reduces Nitric Oxide Metabolites, Inflammatory Biomarkers And Improve Antioxidant Defense In Patients With Rheumatoid Arthritis: A Randomized Double-Blind and placebo-controlled study.**

Effects of probiotic on Rheumatoid Arthritis

Ligia Aparecida Trintin Cannarella<sup>1,2</sup>, Naiara Lourenço Mari<sup>2</sup>, Camila Cataldi de Alcântara<sup>2</sup>, Tatiana Mayumi Veiga Iryioda<sup>2,3</sup>, Neide Tomimura Costa<sup>4</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>2,5</sup>, Isaias Dichi<sup>6</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL), Londrina, PR, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>3</sup> Department of Rheumatology, Pontifical Catholic University of Paraná (PUC/PR), Londrina, PR, Brazil

<sup>4</sup> Department of Rheumatology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>5</sup> Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina, Brazil.

<sup>6</sup> Department of Internal Medicine, Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

\* Corresponding author: Andréa Name Colado Simão.

Postal address: Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – Rua Robert Koch, n 60. University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440. Tel.: +55-43-3371-2321; Fax: +55-43-3371-2619.

## ABSTRACT

**Background:** Studies have demonstrated that the population of gut microbes gets altered in rheumatoid arthritis (RA) and could influence inflammation and oxidative stress. **Objective:** to evaluate the effects of mixture of probiotics (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* and *Bifidobacterium bifidum*) supplementation in cytokines plasma levels, inflammatory biomarkers, oxidative stress profile and disease activity score (DAS-28) in RA patients after 60 days of treatment. **Subjects and Methods:** This was a randomized and double-blind placebo-controlled study where forty two patients with RA were divided into two groups: probiotic group (n=21) patients who were supplemented with a daily ingestion of probiotics in a sachet containing ( $10^9$  CFU/g), of each five freeze-dried strains: *Lactobacillus acidophilus* LA-14, *Lactobacillus casei* LC-11, *Lactococcus lactis* LL-23, *Bifidobacterium lactis* LL-23 and *Bifidobacterium bifidum* BB-06 and placebo group (n=21) patients who had a daily ingestion of maltodextrin, for 60 days. **Results:** The probiotic group showed a significant reduction in white blood cell counts (p=0.012), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ , p=0.004), and interleukin 6 (IL-6) plasma levels (p=0.039). However, the groups did not differ about IL-10, adiponectin, C reactive protein, erythrocytes sedimentation rate, ferritin, and Disease Activity Score 28 (DAS-28). Regarding oxidative/nitrosative stress biomarkers, the probiotic group had decrease in NOx (p=0.004), and increase in sulfhydryl group (SH, p=0.028) and total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP, p=0.019). However, the groups did not differ about LOOH and PC (p>0.05). **Conclusion:** The mixture of probiotics contributed to the reduction of inflammation, **diminishment NOx and increase antioxidants defenses in RA patients.**

**Key words:** probiotic, rheumatoid arthritis, cytokines, oxidative stress, nitric oxide

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune inflammatory disease that affects ~0.5% to 1% of the overall population, being two to three times more common in women than men. RA is a prototype chronic inflammatory process characterized by erosive arthritis, auto-antibody production and systemic features. It primarily involves the joints, but should be considered a syndrome that includes extra-articular manifestations, such as rheumatoid nodules, pulmonary involvement or vasculitis, and systemic comorbidities (Smolen, *et al.*, 2016; Sandhya *et al.*, 2016).

The triggering of RA involves the interaction of human leukocyte antigen (HLA) genes and environmental factors, such as smoking and infections (Klareskog *et al.*, 2006). Among possible nongenetic triggers, the microbiome has been identified as a possible inciting factor (Brusca, Abramson, Scher, 2014), dysbiosis has been identified as a possible trigger factor for autoimmunity and RA development. (Brusca, Abramson, Scher, 2014; Kim, Yoo, Kim, 2016). Studies have demonstrated that the population of gut microbes gets altered in RA and could influence local and systemic immunity and might trigger joint inflammation (Toivanen, 2003; Bielski *et al.*, 2013; Zhang, *et al.*, 2015; Rogers, 2015). Thus, the modulation of intestinal microbiota is a potential alternative approach for maintaining health and preventing and/or treating diseases.

The probiotics can change the population of microorganisms in the gut microbiota and control the functioning of the ecosystem of gut microbiota (Azad, *et al.*, 2018). Probiotics are defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Hill, *et al.*, 2014). Lactic acid-producing bacteria, including *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* from human origin, are the most commonly used probiotics (FAO, 2001). Probiotic effects can be direct or indirect through modulation of the endogenous intestinal microflora (Calder, *et al.*, 2019) or modulate both innate and adaptive immunity in the host (Jandhyala, *et al.*, 2015) and **also reduces oxidative stress (Gomes, *et al.*, 2014). Thus** probiotics may be used as adjuvant therapy to treat RA (Pineda, *et al.*, 2011; Zamani, *et al.*, 2016; Vaghef-Mehrabany, *et al.*, 2014; Alipour, *et al.*, 2014).

In the present study, we aimed to evaluate the effects of mixture of probiotics (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* and *Bifidobacterium bifidum*) supplementation in cytokines plasma levels, oxidative stress profile and activity disease in RA patients after 60 days of treatment.

## SUBJECTS AND METHODS

### *Patients and Study Design*

This was a randomized, double-blind and placebo-controlled study. It was conducted according to the guidelines in the Declaration of Helsinki and approved by the Ethical Committee involving humans of the University of Londrina, Parana, Brazil (CAAE: 2744755).

A total of forty seven patients (forty two women and five men), aged between 27 and 80 years, with RA diagnosis according to the American College of Rheumatology criteria/ European League Against Rheumatism (EULAR), (Aletaha, *et al.*, 2010) were recruited from the rheumatology ambulatory of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. They received detailed information about the purpose and procedures of the study and agreed to participate and signed a consent form. The sample size was estimated statistically for each group considering a statistical power of 80% and the two-sided significance level of  $p < 0.05$ . The sample size was calculated in order to detect statistical differences of at least 10% in the evaluated parameters. The Cal Stat program was used. The patients were randomized by sortition and divided into two groups: probiotic group (n=24) patients who were supplemented with a daily ingestion of probiotics and placebo group (n=23) patients who had a daily ingestion of maltodextrin for 60 days. Forty two patients completed the study after 60 days, twenty one in the probiotic group and twenty one in the control group. Five patients did not complete the study due to poor compliance (three in the probiotics and two in control group, figure 1). The study was conducted between August and December 2018. Exclusion criteria were thyroid, adrenal, renal, hepatic, gastrointestinal, infectious or oncological diseases, diabetes, the utilization of hormone replacement therapy, vitamins, antioxidant supplements, antibiotics, and ingestion of foods or supplements containing probiotic microorganisms. The individuals of both groups did not drink alcohol regularly. Interviews were performed to assure no change in lifestyle factors and treatment had happened throughout the study.

The probiotics supplement consisted of a sachet with five freeze-dried strains: *Lactobacillus acidophilus* LA-14 ( $10^9$  UFC/g), *Lactobacillus casei* LC-11 ( $10^9$  UFC/g), *Lactococcus lactis* LL-23 ( $10^9$  UFC/g), *Bifidobacterium lactis* LL-23 ( $10^9$  UFC/g) and *Bifidobacterium bifidum* BB-06 ( $10^9$  UFC/g). Other ingredients in the sachet were maize starch and maltodextrin. Participants in the placebo group received a maltodextrin sachet.

Both sachets (probiotic supplement and placebo) weighed 2 grams. The sachet with probiotic mix contained maltodextrin (48.3%), modified starch (24.21%), xylitol (24.21%), silicium dioxide 0.97%), and  $1 \times 10^9$  CFU of each of the probiotic strains: *Lactobacillus acidophilus* LA-14, *Lactobacillus casei* LC-11 *Lactococcus lactis* LL-23, *Bifidobacterium bifidum* BB-06, and *Bifidobacterium lactis* BL-04. The placebo product was similar to the active product in appearance, smell, and taste. Patients were instructed to ingest one sachet dissolved in water daily before breakfast for 8 weeks.

### ***Steps taken to optimize compliance***

Several measures were taken to optimize and assess patient compliance. Sachets were handed out at the initial interview. Subjects were asked to bring back any unconsumed sachet to assess unmonitored compliance. In addition, telephone interviews were performed to evaluate if the patients were correctly using the supplement and the patients were recommended to avoid lifestyle changes. Treatment adherence of the participants of the study was approximately 95%.

### ***Clinical Evaluation***

Anthropometric measurements and laboratory parameters were assessed in baseline (T0) and after 60 days (T60) of probiotic or placebo ingestion. Patients were at least 6 months on the same treatment. The usual medications were maintained in both groups during the study. Body weight was measured to the nearest 0.1 kg in the morning by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing and no shoes. Height was measured to the nearest 0.1 cm by using a stadiometer.

The clinical evaluation was done by two blinding rheumatologists and disease activity status was determined using the Disease Activity Score 28 (DAS28) index according to the formula on the DAS website ([www.das-score.nl](http://www.das-score.nl)), using erythrocyte sedimentation rate (ESR), global health assessment by the patient (utilizing a 100 mm visual analogue scale where 0=best, 100=worst), and the number of tender and swollen joints on the basis of the 28-joint count (20 (Prevoo, *et al.*, 1995).

### ***Inflammatory Parameters***

White blood cell counts (WBC) and ESR were determined using hematological autoanalyzer's. High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) serum levels were measured using a turbidimetric assay (C8000, ABBOTT, Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Ferritin serum levels were determined by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA, Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-6 (IL-6), and adiponectin plasma levels were determined using microspheres multiplex immunoassay (Novex Life Technologies, Frederick, MD, USA) for Luminex platform (MAGPIX®, Luminex Corp., Austin, TX, USA).

### ***Oxidative and Nitrosative Stress Biomarkers***

Samples for evaluating oxidative stress and total antioxidant capacity were performed with EDTA as anticoagulant and antioxidant. All samples were centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes and plasma aliquots stored at -70°C until assayed.

Lipid hydroperoxide (LOOH) were evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) as previously described (Gonzalez, Llesuy, Boveris, 1991) and the results were expressed in relative light unit (RLU). **Protein carbonyl** (PC) was measured as described by Reznick and Parker (Reznick, Packer, 1994) and expressed in nanograms per milliliter total protein. Nitric oxide (NO) concentration in sample was estimated by measuring nitric oxide metabolites nitrites (NO<sup>-2</sup>) and nitrates (NO<sup>-3</sup>) using cadmium beads for the reduction of nitrate to nitrite. The concentrations of these metabolites were later determined according to the method proposed by (Navarro-González, García-Benayas, Arenas, 1998). The values were expressed in  $\mu$ M. Sulfhydryl groups (SH) of protein were evaluated in plasma by a spectrophotometric assay based on 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), as reported previously (Hu, 1994) and the results were expressed in  $\mu$ M. The total antioxidant capacity was evaluated by total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) (Repetto, 1996). This method detects hydro soluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-aminopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog Trolox, and the values of TRAP were expressed in equivalent of  $\mu$ M Trolox/mg uric acid.

### *Statistical Analyses*

Categorical data were analyzed with the chi-square or Fisher's exact test. Absolute number and percentage demonstrated the results. The Wilcoxon matched pairs test was performed to verify changes from baseline (intra-group changes, T60 vs T0). Mann-Whitney test was performed to compare baseline values (T0 x T0) and differences across treatment group (inter-group changes). Data are expressed as the medians and percentiles (25% - 75%). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software 6.0. Tests were 2-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant results.

## **RESULTS**

There were no differences at the baseline values between the patients with RA who ingested probiotics or not in relation to age, sex, ethnicity, disease duration, smoking, and physical activity ( $p > 0.05$ ). The majority of patients were being treated with steroids and one or more disease-modifying anti-rheumatic drugs in stable doses for at least four months: prednisone 5mg/day, methotrexate 15mg/week and hydroxychloroquine 400mg/day. The methotrexate treatment was more frequent in the probiotic group ( $p = 0.024$ ) than control group. However, prednisone use was more frequent in control group ( $p = 0.001$ ) (Table 1).

Table 2 shows the antropometric parameters and the parameters related to inflammatory status and disease activity in the patients at the beginning of the study and after 60 days in the control and the probiotic groups. There were no differences at the baseline values between the groups. Intra-group changes were verified in the probiotic group, which had a decrease in WBC ( $p = 0.012$ ) after 60 days (inter-group changes,  $p < 0.05$ ). No significant in baseline, intra-group and inter-group change were observed in BMI, hsCRP, ESR, ferritin, and DAS 28 ( $p > 0.05$ ).

Figure 2 demonstrated the cytokines plasma levels in both groups in baseline and after 60 days of treatment. There were no differences at the baseline values between the groups ( $p > 0.05$ ). However, at the end of the 60-day treatment period compared to baseline values, the probiotic group showed a significant reduction in TNF- $\alpha$  ( $p = 0.004$ ) and IL-6 plasma levels ( $p = 0.039$ ). There was significant differences about the treatments (inter-group change,  $p < 0.05$ ). The groups did not differ about IL-10 and adiponectin (baseline, intra-group, and inter-group;  $p > 0.05$ ).

Regarding oxidative and nitrosative stress biomarkers, the probiotic group had a significant decrease in NOx ( $p=0.004$ ) and a significant increased SH ( $p=0.028$ ), and TRAP ( $p=0.019$ ) after 60days of treatment (intergroup change,  $p<0.05$ ). However, the groups did not differ about LOOH and PC (baseline, intra-group, and inter-group;  $p>0.05$ ) (table 3).

## DISCUSSION

The main finding of this study was that the mixture of probiotics was able to decrease inflammatory parameters (WBC, TNF- $\alpha$  and IL-6) and nitrosative stress (NOx) and increased antioxidant defenses (TRAP, SH). The mixture of probiotics (three strains of *Lactobacillus* and two strains of *Bifidobacterium*) can achieve a greater diversity of probiotic strains and reach a greater range of performance in the intestine, because each strain acts in different parts of the gastrointestinal tract. The potential monostrain probiotics may be underestimated, in that they cannot contain all the desired properties to treat multifactorial diseases, thus, multispecies probiotics might be more appropriate than monostrain probiotics to induce uniform immunomodulatory effects in a heterogeneous patient population. (Timmerman, *et al.*, 2007). In the current study, we used the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which have powerful anti-inflammatory effects (Luckey, *et al.*, 2013; O'Mahony, *et al.*, 2008). The use of both species concomitantly is more appropriate, as it acts synergistically (Kopp-Hoolihan, 2001).

The intestinal microbiota influences both innate and adaptive immunity, locally in the intestine, but also systemically (Wiele, *et al.*, 2016) through the regulation and differentiation of the various types of T cells (Chung, Pamp, Hill, 2012). The intestinal microbiota can induce the formation of Treg cells that play an important role in maintaining immune tolerance to dietary antigens and intestinal microbiota and a central role in suppressing inflammatory and allergic responses caused by autoimmune diseases. CD4 + and CD25 + Treg cells are suppressor cells, which express the Fox p3 transcription factor and are indispensable for the maintenance of self-tolerance and homeostasis, suppressing an excessive immune response (FURUSAWA, *et al.*, 2013); produce IL-10, and are able to protect against autoimmune (STEPHENS, *et al.*, 2001) . Dysbiosis, which may be present in RA patients, causes unbalance of the subpopulations helper T cells (Th) and regulatory T cells (Treg) and consequently affects cytokine levels (Lee, Kim, 2017) promoting inflammation. TNF- $\alpha$  and IL-6 are pro-inflammatory cytokines that play a crucial pathogenic role in RA, inducing activating molecules of the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, prostaglandins

and matrix metalloproteinases to mediate signs and symptoms of the disease; cartilage and bone damage (Aletaha, Smolen, 2018). In the present study we demonstrated that probiotic treatment diminished total leucocytes count, TNF- $\alpha$ , and IL-6 plasma levels in RA patients after 8 weeks. However, CRP, ESR, ferritin, IL-10, and DAS 28 did not change with the mixture probiotic ingestion. Studies evaluating probiotic intake and markers of inflammation are controversial and difficult to compare. Previous studies showed that RA female patients treated with *Lactobacillus casei* 01 ( $10^8$  CFU or placebo for eight weeks) had diminished of DAS 28, CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, (Vaghef-Mehrabany, *et al.*, 2014; Alipour, *et al.*, 2014). In addition, Zamani *et al.* (Zamani, *et al.*, 2016) supplementing *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus acidophilus* ( $2 \times 10^9$  CFU /g per strain), for eight weeks), demonstrated significant improvement of DAS 28, and decrease usPCR in patients with RA (Zamani, *et al.*, 2016). However, a three-month double-blind, placebo-controlled study was performed using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 capsules administered orally twice daily did not find any reduction in cytokine plasma levels (Pineda, *et al.*, 2011). Those results are agreement with another previous study that not demonstrated change in CRP, ESR, IL-1b, IL-6, TNF-a, IL-10, IL-12 levels after *Lactobacillus rhamnosus* treatment. There was not difference in disease activity (Hatakka *et al.*, 2003).

In our study, we also evaluated adiponectina plasma levels, but we did not find differences between the placebo and probiotic groups. Adiponectin is an adipokine secreted by adipocytes, related to play a proinflammatory role in the pathogenesis of RA by stimulating the secretion of inflammatory mediators (Fatel, *et al.*, 2018). In addition, the cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  also increase the secretion of adiponectin and patients with RA have higher levels of adiponectin when compared to healthy controls (Chen, *et al.*, 2013). Until now, there are no studies that evaluated adiponectin and probiotic consumption in RA patients.

The comparison between previous studies and this current study is relatively difficult because the strains and concentrations used varied widely between studies. Moreover, we used sachets and not capsules as the other studies. To date, there are no studies that have evaluated the same probiotic mixture used by us. Another important difference is the different inclusion criteria for RA patients, especially in relation to disease activity, which is generally higher in other studies (Pineda *et al.*, 2011; Zamani *et al.*, 2016).

The oxidative stress and antioxidants play an important role in the pathophysiology of RA (Altindag, *et al.*, 2007; Quiñonez-Flores, *et al.*, 2016; Mateen *et al.*, 2016, Costa *et al.*,

2018). In addition, previous studies have demonstrated that probiotic could have antioxidant functions and reduces damages caused by oxidation (Sun *et al.*, 2010; Ou, *et al.*, 2012; Martarelli *et al.*, 2011) but the results are contradictories (Vaghef-Mehraban *et al.*, 2016; Zamani *et al.*, 2016). Antioxidant mechanisms of probiotics are chelating ability for either Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>, scavenge of reactive oxygen species like hydroxyl radical and hydrogen peroxide and reducing activity (Lin, Yen, 1999; Lee, 2005). Probiotics also possess their own antioxidases; produce antioxidants metabolites; up-regulate antioxidases activities of the host; increase levels of antioxidants metabolites of the host and down-regulate activities of enzymes producing ROS (Wang *et al.*, 2017). Few studies have evaluated the effect of probiotic supplementation on oxidative stress in patients with RA and no significant effect of probiotic supplementation was observed on the oxidative status compared to placebo (Vaghef-Mehraban *et al.*, 2016; Zamani *et al.*, 2016).

In the present study the groups (treatment) did not differ about LOOH and PC. However, the mixture of probiotic diminished NO<sub>x</sub> and increase antioxidants defenses. Several studies have consistently shown increased NO<sub>x</sub> in serum and/or synovial fluids of patients with RA and that the increased levels correlate with clinical manifestations of the disease, such as morning joint stiffness and the number of tender or swollen joints, which suggests that NO plays a key role in RA pathogenesis (Ueki, 1996; Nagy, *et al.*, 2010; Farrell, *et al.*, 1992; Vasant, Nalini, Rajasekhar, 2009; Veselinovic, *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2018). NO is produced endogenously by several types of mammalian cells in response to inflammatory stimuli as a result of upregulation of the inducible form NO synthase (iNOS) (Majano, 1998). Inhibition of *iNOS* has been studied in RA as it attenuates arthritis, inhibits apoptosis and cytokine production, suggesting that inhibition of *iNOS* may become an interesting therapeutic approach for the treatment of RA (Costa, *et al.*, 2018). In the present study, we demonstrated that the mixture of probiotic can reduce NO<sub>x</sub> plasma levels. Our data is in disagreement of Zamani *et al.*, (2016) that did not find difference in NO<sub>x</sub> levels after probiotic intake freeze-dried strains: *Lactobacillus acidophilus* (2x10<sup>9</sup> colony-forming units [CFU]/g), *Lactobacillus casei* (2x 10<sup>9</sup> CFU/g) and *Bifidobacterium bifidum* (2 x 10<sup>9</sup> CFU/g) for 8 weeks. NO plays an important role in the pathogenesis of RA as it acts in bone resorption and connective tissue destruction in inflamed joints (Reddy, *et al.*, 2005). In addition, NO high levels can participate in nitrosative stress (Costa, *et al.*, 2018) and are correlated significantly with serum TNF-alpha and IL-6 levels (Ueki, 1996). Therefore, decreasing levels in RA patients can play a very beneficial role in protecting the joints.

The decrease in NOx can be explained by the property of the probiotics inhibit the NF- $\kappa$ B pathway (Petrof *et al.*, 2004), furthermore, it is possible that the reduction in NOX levels is associated to the improvement of the antioxidant capacity and decrease of the inflammatory process, since oxidative stress activates Nf- $\kappa$ B (Glezer, 2000) .

Another possible mechanism may be the effect of maintaining the intestinal barrier and the reduction of intestinal hyperpermeability promoted by the probiotics, which decreases the entry of LPS in the intestinal blood capillaries and general circulation, since the LPS induces many genes involved in the immune, inflammatory, and acute phase responses like the iNOX gene (Sugita *et al.*, 2002)

There is evidence that antioxidant defenses are unable to cope with excessive oxidative stress in RA patients. TRAP and several other markers of impaired antioxidant capacity have been reported in RA (Kajanachumpol *et al.*, 2000; Situnayake, *et al.* 1991). Our data demonstrated that RA patients that received probiotic mixture demonstrated increase of SH groups and TRAP. Sulfhydryl groups are responsible for maintaining the structure and function of proteins, enzymes and membranes as well as they can decrease the damage caused by oxidative stress (Mateen, *et al.*, 2016). In addition, the TRAP methodology evaluates hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants and the measure of antioxidant capacity considers the cumulative action of all the antioxidants present in plasma (Ghiselli, 2000). Vaghef-Mehraban *et al.* (2016) evaluated the effects of  $10^8$  colony-forming units of *Lactobacillus casei* 01 for 8 weeks. No significant within- and between-group differences were observed for serum malondialdehyde, total antioxidant capacity, or catalase. In addition, Zamani *et al.* (2016) also evaluated the total antioxidant capacity total and did not observe any significant effect on biomarkers of oxidative stress after probiotic intake freeze-dried strains. To the best of our knowledge, is the first study to demonstrate improvement in oxidative and nitrosative stress after supplementation of probiotics in patients with RA.

There are some limitations that must be considered in this study. First, the small number of the subjects in the groups. Second, the present study does not allow extrapolation of the results with different strains, especially the data on oxidative stress, which can be highly specific. Third, the gut microbiota was not performed before and after the intervention. However, some strengths of the study can be pointed out. We propose a mixture of probiotics not yet used in studies, besides evaluating a profile of oxidative stress parameters, which allows a more robust analysis of the results. Therefore, we rigorously tried to ensure that the patients did not take any drug or presented any disease that could interfere with the results.

In conclusion, the hypothesis of beneficial effects of mixture of probiotic in inflammation and oxidative stress was partially confirmed by the decrease of cytokines and improve of oxidative/nitrosative profile but not in activity disease in RA patients. Further studies are needed to investigate whether the decrease in the inflammatory process is directly related to the reduction of oxidative stress or whether these are phenomena independently associated with the use of probiotics. These findings may open new dietary supplementation opportunities for the management of RA.

### **Acknowledgements**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Finance Code 001. This study was also supported by the National Council of Brazilian Research-CNPq and by Araucária Foundation from the state of Paraná. We thank the University Hospital of State University of Londrina and HUTec Foundation for technical and administrative supports.

**Contribution:** LT: conception and design of the study; collection, analysis and interpretation of data; drafting the manuscript; approval of the final version of the manuscript. NLM, CCA, and MABL: collection, analysis and interpretation of data; drafting the manuscript; approval of the final version of the manuscript. NTC and TMVY: assisted the patients and drafting of the manuscript; ANCS and ID: conception and design of the study; interpretation of data; drafting the manuscript; approval of the final version of the manuscript.

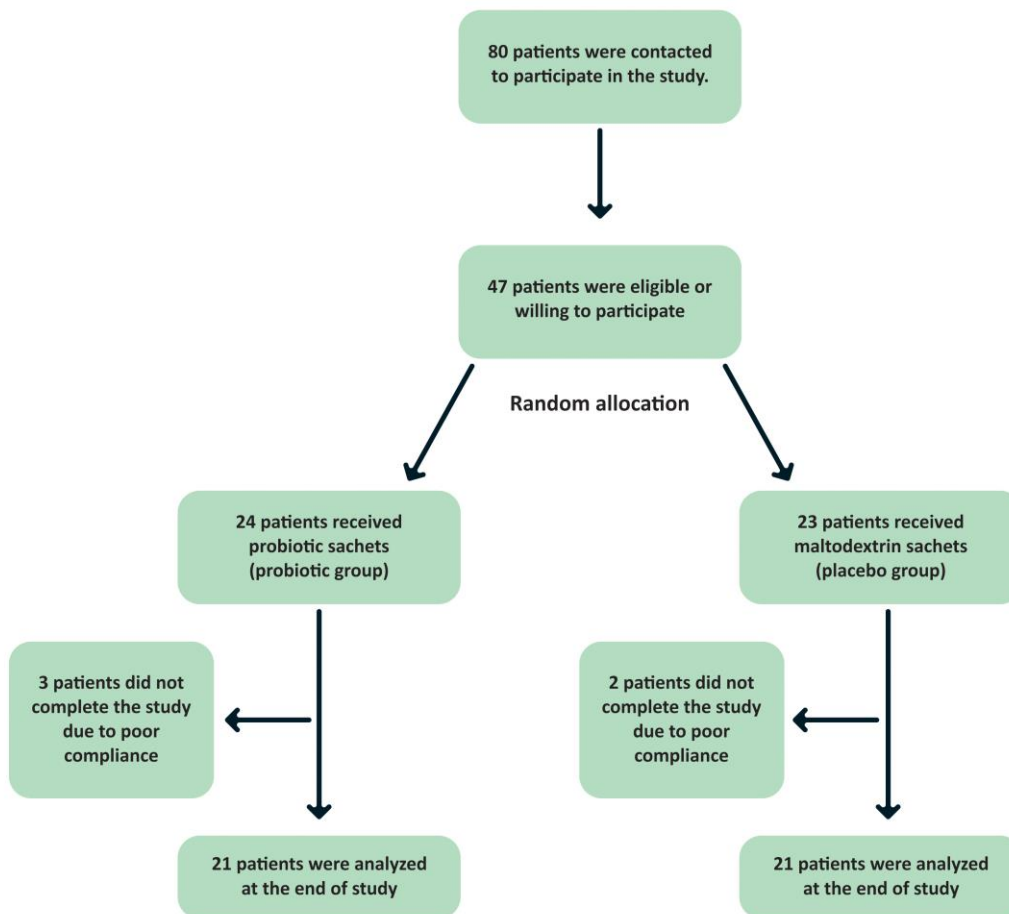


Figure 1 Summary of patient flow.

**Table 1 – Demographic and clinical characteristics in the control group and probiotic group of patients with rheumatoid arthritis (RA) at the baseline.**

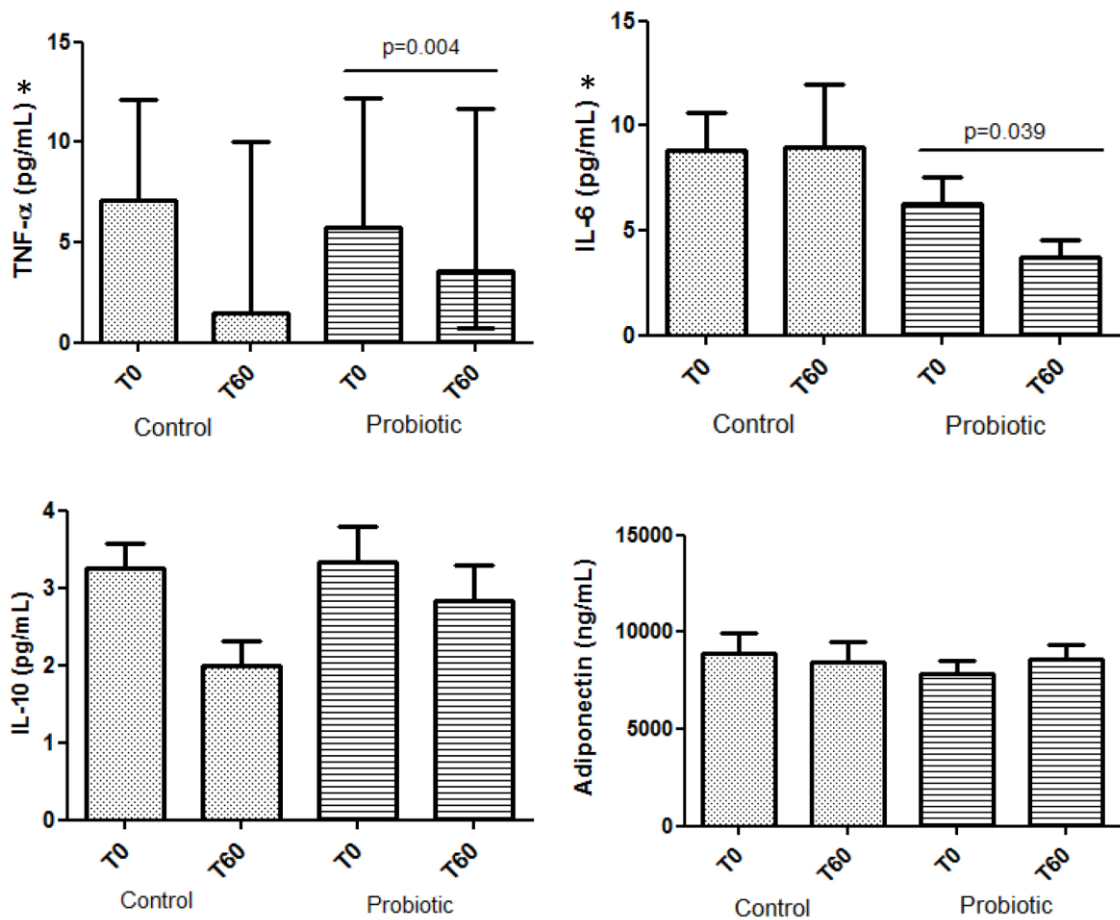
	Control (n=21)	Probiotic (n=21)	p value
Age (years)	57 (48-64)	59 (49-68)	0.237
Sex (F/M)	19 (90.5%) / 2 (9.52%)	18 (85.7%) / 3 (14.3%)	0.634
Ethnicity (C/NC)	13 (61.9%) / 8 (38.09%)	15 (71.4%) / 6 (28.5%)	0.513
Disease duration (years)	12 (7-20)	18 (10-25)	0.072
Tabagism	3 (14.28%)	2 (9.52%)	0.634
Physical Activity	8 (38.09%)	9 (42.85%)	0.753
<b>Treatment</b>			
Metrotexate	10 (47.61%)	17 (80.95%)	<b>0.024</b>
Prednisone	15 (71.42%)	7 (33.33%)	<b>0.001</b>
< 5 mg	12 (80%)	6 (85.71%)	
> 5mg	3 (20%)	1 (14.28%)	
Hydroxychloroquine	7 (33.33%)	7 (33.33%)	1.00
Leflunomide	8 (38.09%)	11 (52.38%)	0.352
TNF- $\alpha$ -inhibitor	5 (23.80%)	4 (19.04%)	0.707
IL-6- inhibitor	1 (4.76%)	2 (9.52%)	0.549

Data are shown in median and interquartile range (25% -75%) and absolute number (n) and percentage (%). Categorical data were analyzed with the chi-square or Fisher's exact test. Continuous data were analyzed with the Mann Withney test. C/NC. caucasian/not caucasian;

**Table 2: Evaluation of anthropometric parameter, and clinical and inflammatory biomarkers in patients with rheumatoid arthritis treated with placebo (control group) or probiotic for 60 days.**

	Control (n=21)			Probiotic (n=21)		
	T0 <sup>A</sup>	T60	p	T0 <sup>B</sup>	T60	p
<b>BMI (Kg/cm<sup>2</sup>)</b>	28.4 (24.6-29.8)	27.4 (23.3-29.4)	0.126	27.10 (25.47-30.13)	26.87 (25.54-29.35)	0.424
<b>WBC (10<sup>3</sup>uL)*</b>	6.19 (4.65-7.12)	5.57 (4.77-6.56)	0.338	7.01 (5.79-9.05)	6.49 (5.64-7.61)	<b>0.012</b>
<b>hsCRP (mg/L)</b>	4.00 (2.30-7.40)	2.90 (1.80-14.40)	0.626	4.70 (1.50-11.90)	4.60 (2.40-9.30)	0.765
<b>ESR (mm/H)</b>	23.00 (9.00-48.50)	29 (12.00-39.00)	0.717	19.50 (14.50-33.00)	25.00 (16.00-42.00)	0.197
<b>Ferritin (ng/L)</b>	143.7 (96.7-246.7)	143.8 (91.4-167.8)	0.239	164.3 (84.7-256.8)	144.1 (68.8-260.7)	0.467
<b>DAS 28</b>	3.83 (2.75-4.69)	3.88 (3.29-4.45)	0.411	3.20 (2.47-4.21)	3.18 (2.49-3.96)	0.526

Data are shown in median (25% -75%). The Wilcoxon test was performed to verify changes from baseline (intra-group changes). The Mann-Whitney test was performed to compare differences between the baseline values (AxB) and across treatment groups (inter-group changes, \*p<0.05). The groups did not differ about baselines (AxB). T0: baseline, until of treatment; T60: after 60 days of treatment; BMI: Body Mass Index; WBC: White blood cell counts; hsCRP: high sensitive C reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; DAS 28, Disease Activity Score 28.



**Figure 2: Cytokines plasma levels in patients with rheumatoid arthritis treated with placebo (control group) or probiotic for 60 days.** Data are shown in mean ( $\pm$ SD). The Wilcoxon test was performed to verify changes from baseline (intra-group changes). The Mann-Whitney test was performed to compare differences between the baseline values (T0 control vs T0 probiotic) and across treatment groups (inter-group changes, \* $p < 0.05$ ). T0: baseline, until of treatment; T60: after 60 days of treatment). TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha; IL-6: interleukin 6; IL-10: interleukin 10.

**Table 3: Oxidative and nitrosative stress biomarkers in patients with rheumatoid arthritis treated with placebo (control group) or probiotic for 60 days.**

	Control (n=21)		P	Probiotic (n=21)		p
	T0 <sup>A</sup>	T60		T0 <sup>B</sup>	T60	
<b>LOOH (RLU)</b>	140.9 (128.9-160.6)	146.4 (130.8-163.0)	0.626	153.1 (136.6-163.5)	160.3 (135.4-161.1)	0.487
<b>NOx (μM)<sup>#*</sup></b>	8.43 (7.48-11.37)	10.13 (7.98-11.30)	0.135	13.93 (8.66- 19.35)	8.13 (6.40- 12.61)	<b>0.004</b>
<b>PC (nmol/mg protein)</b>	1.85 (1.67-2.00)	1.93 (1.73-2.06)	0.868	1.82 (1.65-2.05)	1.80 (1.56- 2.11)	0.845
<b>SH (μM)<sup>*</sup></b>	289.93 (207.74 – 327.80)	292.49 (199.50-373.11)	0.664	262.5 (156.6- 340.2)	305.43 (260.90- 360.8)	<b>0.028</b>
<b>TRAP (μM Trolox/mg/UA)</b>	481.38 (329.41 – 600.02)	585.56 (392.87-720.31)	0.179	397.0 (315.3-556.3)	590.86 (396.0-812.7)	<b>0.019</b>

Data are shown in median and interquartile range (25% -75%). The Wilcoxon test was performed to verify changes from baseline (intra-group changes). The Mann-Whitney test was performed to compare). Differences between the baseline values (AxB, <sup>#</sup>p<0.05) and across treatment groups (inter-group changes, \*p<0.05). T0: baseline, until of treatment; T60: after 60 days of treatment. LOOH: lipid hydroperoxide; NOx: nitric oxide metabolites; PC: protein carbonyl; SH: sulfhydryl group; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter.

## REFERENCES

- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569–81.
- Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis a review. *JAMA.* 2018 Oct;320(13):1360-72.
- Alipour B, Homayouni-Rad A, Vaghef-Mehrabany E, Sharif SK, Vaghef-Mehrabany L, Asghari-Jafarabadi M, et al. Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. *Int J Rheum Dis.* 2014;17:519–27.
- Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 2007 Feb;40(3-4):167-71.
- Azad MAK, Sarker M, Li T, Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *Biomed Res Int.* 2018; 2018:1–8.
- Zamani B, Golgar HR, Farshbaf S, Emadi-Baygi M, Tajabadi-Ebrahimi M, Jafari P, et al. Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Rheum Dis.* 2016;19(9):869–79.
- Bielski C, Huttenhower C, Pamer EG, Abramson SB, Ubeda C, Szczesnak A, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife.* 2013 Nov;2:e01202.
- Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26(1):101–7.
- Calder PC, Albers R, Antoine J-M, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, et al. Inflammatory disease processes and interactions with Nutrition Commissioned by the ILSI Europe Nutrition and Immunity Task Force [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 2]. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0007114509377867>.
- Chen X, Lu J, Bao J, Guo J, Shi J, Wang Y. Adiponectin: a biomarker for rheumatoid arthritis? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Feb;24(1):83-9.
- Chung H, Pamp SJ, Hill JA. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell.* 2012;249:1578–93.
- Costa NT, Scavuzzi BM, Iriyoda TMV, Lozovoy MAB, Alfieri DF, Medeiros FA, et al. Metabolic syndrome and the decreased levels of uric acid by leflunomide favor redox imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med.* 2018 Aug;18(3):363-72.
- Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 1992;51:1219–22.

Fatel ECS, Rosa FT, Simão ANC, Dichi I. Adipokines in rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol*. 2018 Aug;58(1):25.

Food and Agriculture Organization Of The United Nations. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation [Internet]. Cordoba (AR): World Health Organization; 2001. (FAO Food and Nutrition Paper; 85). [cited 2019 Mar 4]. Available from: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>.

Furusawa Y. *et al.*, Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):446-50.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:1106–14.

Glezer I, Marcourakisa T, Avellarc MCW, Gorensteina C, Scavone C. O fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Rev Bras Psiquiatr*. 2000;22(1):26-30

Gomes AC, Bueno AA, Souza RGM, Mota JF. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutr J*. 2014 Jun 17;13(1):60.

Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med*. 1991;10(2):93–100.

Hatakka K, Martio J, Korpela M, Herranen M, Poussa T, Laasanen T, et al. Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis—a pilot study. *Scand J Rheumatol*. 2003;32(4):211-5.

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-14.

Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*. 1994;233:380–5.

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug; 21(29):8787-803.

Kajanachumpol S, Vanichapuntu M, Verasertniyom O, Totemchokchyakarn K, Vatanasuk M. Levels of plasma lipid peroxide products and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2000 Jun;31(2):335-8.

Kim D, Yoo SA, Kim WU. Gut microbiota in autoimmunity: potential for clinical applications. *Arch Pharm Res*. 2016;39(11):1565–76.

Klareskog L, Padyukov L, Lorentzen J, Alfredsson L. Mechanisms of Disease: genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006 Aug;2(8):425–33.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc*. 2001 Feb;101(2):229-38.

- Lee J, Hwang K-T, Chung M-Y, Cho D-H, Park C-S. Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal ion chelating effect. *J Food Sci.* 2005;70(8):388-91.
- Lee N, Kim WU. Microbiota in T-cell homeostasis and inflammatory diseases. *Exp Mol Med.* 2017;49(5):1-10.
- Lin M-Y, Yen C-L. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem.* 1999;47(4):1460-66.
- Luckey D, Gomez A, Murray J, White B, Taneja V. Bugs & us: the role of the gut in autoimmunity. *Indian J Med Res.* 2013;138(5):732–43.
- Majano PL, Garcia-Monzon C, Lopez-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernández-Ruiz E, García-Iglesias C, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. *J Clin Invest.* 1998 Apr;101(7):1343-52.
- Martarelli D, Verdenelli MC, Scuri S, Cocchioni M, Silvi S, Cecchini C, Pompei P. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Curr Microbiol.* 2011 Jun;62(6):1689-96.
- Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2016 Apr;11(4):e0152925.
- Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzás E, et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):210.
- Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem.* 1998;44(3):679–81.
- O'Mahony C, Scully P, O'Mahony D, Murphy S, O'Brien F, Lyons A, et al. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation. *PLoS Pathog.* 2008 Aug;4(8):e1000112.
- Ou C-C, Chiu Y-H, Lin S-L, Chang Y-J, Huang, H-Y, Lin, M-Y. Hepatoprotective Effect of Lactic Acid Bacteria in the Attenuation of oxidative stress from tert-butyl hydroperoxide. *J Food Drug Anal.* 2012 Mar;20(1):101-10.
- Petrof EO, Keishi K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, Simone C, et al. Probiotics Inhibit Nuclear Factor- $\kappa$ B and Induce Heat Shock Proteins in Colonic Epithelial Cells Through Proteasome Inhibition. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5):1474-87
- Pineda MA, Thompson SF, Summers K, DeLeon F, Pope J, Reid G. A randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study of probiotics in active rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit.* 2011;17(6):347–54.
- Prevoo MLL, Van't Hof MA, Kuper HH, Van Leeuwen MA, Van De Putte LBA, Van Riel PLCM. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. *Arthritis Rheum.* 1995;38(1):44–8.

- Quiñonez-Flores CM, González-Chávez AS, Del Río ND, Pacheco-Tena C. Oxidative stress relevance in the pathogenesis of the rheumatoid arthritis: a systematic review. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6097417.
- Reddy SVB, Wanchu A, Khullar M, Govindrajan S, Bamberg P. Leflunomide reduces nitric oxide production in patients with active rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2005 Jun;5(6):1085-90.
- Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta.* 1996;255:107–17.
- Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357–63.
- Rogers GB. Germs and joints: the contribution of the human microbiome to rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 2015 Aug;21(8):839–41.
- Sandhya P, Danda D, Sharma D, Scaria V. Does the buck stop with the bugs? An overview of microbial dysbiosis in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2016;19(1):8–20.
- Situnayake RD, Thurnham DI, Kootatthep S, Chirico S, Lunec J, Davis M, et al. Chain breaking antioxidant status in rheumatoid arthritis: clinical and laboratory correlates. *Ann Rheum Dis.* 1991;50:81–6.
- Smolen JS, Aletaha D, McInnes I. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2016;388:2023–38.
- Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol.* 2001 Apr;31(4):1247-54.
- Sugita H, Kaneki M, Tokunaga E, Sugita M, Koike C, Yasuhara S, et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Feb;282(2):E386-394.
- Sun J, Hu XL, Le GW, Shi YH. Lactobacilli prevent hydroxy radical production and inhibit *Escherichia coli* and *Enterococcus* growth in system mimicking colon fermentation. *Lett Appl Microbiol.* 2010 Mar;50(3):264-9.
- Timmerman HM, Niers LEM, Ridwan BU, Koning CJM, Mulder L, Akkermans LMA, et al. Design of a multispecies probiotic mixture to prevent infectious complications in critically ill patients. *Clin Nutr.* 2007 Aug;26(4):450–9.
- Toivanen P. Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(9):807–11.
- Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1996 Feb;23(2):230-6.
- Vaghef-Mehrabany E, Alipour B, Homayouni-Rad A, Sharif SK, Asghari-Jafarabadi M, Zavvari S. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition.* 2014;30(4):430–5.

Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2009;12:29–33.

Veselinovic, M. et al. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Mol Cell Biochem*, 2014; 391(1-2): 225-232.

Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*. 2017 May;9(5):521.

Wiele TV, Van Praet JT, Marzorati M, Drennan MB, Elewaut D. How the microbiota shapes rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Jul;12(7):398-411.

Zamani B, Golkar HR, Farshbaf S, Emadi-Baygi M, Tajabadi-Ebrahimi M, Jafari P, et al. Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Rheum Dis*. 2016 Sep;19(9):869-79.

Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med*. 2015 Aug;21(8):895–905.

## 6 CONCLUSÕES

- O tratamento com a mistura de probióticos não reduziu os níveis de PCRus, ferritina e não alterou o VHS. No entanto, foi capaz de reduzir significativamente a contagem de leucócitos totais;
- O tratamento com probióticos diminuiu significativamente os níveis das citocinas pro-inflamatórias, IL-6 e TNF- $\alpha$ . No entanto, não houve qualquer efeito dos tratamentos nos níveis de IL-10 e adiponectina.
- Após 60 dias de consumo da combinação de probióticos, não houve diferença na atividade da doença avaliada pelo do DAS-28.
- O tratamento com a mistura de probióticos melhorou o perfil de estresse oxidativo/nitrosativo evidenciado pela redução dos níveis de NOx e melhora das defesas antioxidantes avaliadas pelo TRAP e SH. Não houve qualquer efeito dos tratamentos nos níveis plasmáticos de PC e hidroperóxidos lipídicos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação de probióticos foi capaz de melhorar os parâmetros de estresse oxidativo/ nitrosativo com diminuição dos metabólitos do NOx e aumento do TRAP e SH, sendo o primeiro estudo a comprovar estes resultados em pacientes com AR. Os parâmetros inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6 e leucócitos totais também apresentaram diminuição após a suplementação de probióticos, no entanto não houve diferença na atividade da doença. Vale ressaltar que os resultados apresentados neste estudo não permitem extrapolação a diferentes espécies e cepas, principalmente os dados sobre o estresse oxidativo, que podem ser altamente específicos. Além disso, mais estudos são necessários para investigar se a diminuição do processo inflamatório está diretamente relacionada à redução do estresse oxidativo ou se esses são fenômenos independentemente associados ao uso de probióticos. Como limitação do estudo podemos citar que a microbiota intestinal não foi realizada antes e após a intervenção. Esses achados podem abrir novas oportunidades de suplementação alimentar para o manejo da AR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKASHEH, G. *et al.* Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrition**, Burbank, v. 32, n. 3, p. 315-320, 2016.
- ALAM, J.; JANTAN, I.; BUKHARI, S. N. A. Rheumatoid arthritis: recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, França, v. 92, p. 615–633, 2017.
- ALARCON, R. T.; ANDRADE, L. E. C. Anticorpos antiproteínas citrulinadas e a artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 180-187, maio/jun. 2007.
- ALETAHA, D. *et al.* Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 62, n. 9, p. 2569–2581, set. 2010.
- ALETAHA, D.; SMOLEN, J. S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis a review. **JAMA**, Chicago, v. 320, n. 13, p. 1360-1372, out. 2018.
- ALI, E. T.; JABBAR, A. S.; MOHAMMED, A. N. A comparative study of interleukin 6, inflammatory markers, ferritin, and hematological profile in rheumatoid arthritis patients with anemia of chronic disease and iron deficiency anemia. **Anemia**, Cairo, v. 2019, p. 3457347, apr. 2019.
- ALIPOUR, B. *et al.* Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. **International Journal of Rheumatic Diseases**, Oxford, v. 17, p. 519–527, 2014.
- ALTINDAG, O. *et al.* Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical biochemistry**, [Toronto], v. 40, n. 3/4, p. 167–171, mar. 2007.
- AMDEKAR, S. *et al.* *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* regulate inflammatory pathway and improve antioxidant status in collagen-induced arthritic rats. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, New York, v. 33, n. 1, p. 1-8, jan. 2013.
- AMEKAR, S. *et al.* *Lactobacillus casei* reduces the inflammatory joint damage associated with collagen-induced arthritis (CIA) by reducing the pro-inflammatory cytokines.: *Lactobacillus casei*: COX-2 inhibitor. **Journal of Clinical Immunology**, New York, v. 31, n. 2, p. 147–154, 2011.
- ANG, Z.; DING, J. L. GPR41 and GPR43 in obesity and inflammation: protective or causative?. **Front Immunol**, Switzerland, v. 1, n. 7, p. 28, 2016.

- AREND, W. P. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 45, n. 1, p. 101-106, 2001.
- ASEMI, Z. *et al.* Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. **Annals of Nutrition & Metabolism**, Basel, v. 63, n. 1/2, p. 1-9, 2013.
- BAHARAV, E. MOR, F.; HALPERN, M.; WEINBERGER, A. *Lactobacillus GG* bacteria ameliorate arthritis in lewis rats. **Journal of Nutrition**, United States, v. 134, n. 8, p. 1964-1969, 2004.
- BALBIR-GURMAN, A. *et al.* Consumption of Pomegranate Decreases Serum Oxidative Stress and Reduces Disease Activity in Patients with Active Rheumatoid Arthritis: A Pilot Study. **The Israel Medicine Association Journal**, Israel, v. 13, n. 8, p. 474-479, aug. 2011.
- 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, sep. 2017.
- BERNINI, L. J. *et al.* Effect of bifidobacterium lactis HN019 on inflammatory markers and oxidative stress in subjects with and without the metabolic syndrome. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.120, n. 6, p. 645-652, 2018.
- BERVOETS, L. *et al.* Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. **Gut Pathogens**, London, v. 5, n. 1, p. 1-10, apr. 2013.
- BIBILONI, R. *et al.* VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. **American Journal of Gastroenterology**. New York, v. 100, n. 7, p. 1539-1546, jul. 2005.
- BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 118, n. 11, p. 3537-3545, nov. 2008.
- BRESTOFF, J. R.; ARTIS, D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. **Nature Immunology**, New York, v. 14, n. 7, p. 676-84, 2013.
- BRON, P.A.; VAN BAARLEN, P.; KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, n. 1, p.66 -78, jan.2012.
- CATRINA, A. I. *et al.* Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 269, n. 1, p. 162–174, jan. 2016.
- CHANG, H. Y. *et al.* Multiple strains probiotics appear to be the most effective probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis and mortality: Na updated meta-analysis. **Plos One**, San Francisco, v. 12, n. 2, p. e0171579, 2017.

CHAPMAN, T. M.; PLOSKER, G. L.; FIGGITT, D. P. VSL#3 probiotic mixture: a review of its use in chronic inflammatory bowel diseases. **Drugs**, New York, v. 66, n. 10, p. 1371-1387, 2006.

CHEN, T. *et al.* Bacterial components in the synovial tissue of patients with advanced rheumatoid arthritis or osteoarthritis: analysis with gaschromatography-mass spectrometry and pan-bacterial polymerase chain reaction. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 49, n. 3, p. 328-334, jun. 2003.

CHEN, Y. *et al.* Effects of probiotics on blood glucose, biomarkers of inflammation and oxidative stress in pregnant women with gestational diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicina Clínica**, Barcelona, oct. 2019.

CHOI, H. M. *et al.* Adiponectin may contribute to synovitis and joint destruction in rheumatoid arthritis by stimulating vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-1, and matrix metalloproteinase-13 expression in fibroblast-like synoviocytes more than proinflammatory mediators. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 11, n. 6, p.1-10, 2009.

CHUNG, H. *et al.* Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. **Cell**, Cambridge, v.149, n. 7, p. 1578–1593, 2012.

CLARKE, G. *et al.* Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions. **Pharmacological Reviews**, v. 71, n. 2, p. 198-224, apr. 2019.

COLLINS A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, mar. 2004.

COSTA, N. T. *et al.* Influence of insulin resistance and TNF- $\alpha$  on the inflammatory process, oxidative stress, and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, United States, n. 12, p. 1-9, 2016.

COSTA, N. T. *et al.* Metabolic syndrome and the decreased levels of uric acid by leflunomide favor redox imbalance in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Medicine**, Milano, v. 18, p. 363–372, 2018.

CUTOLO, M. *et al.* Burden of disease in treated rheumatoid arthritis patients:going beyond the joint. **Seminars in Arthritis Rheumatism**,v. 43, p. 479-488, 2014.

DAVID, L. A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**. v. 505, n. 7484, p. 559–563, jan 2014.

DAVIDSON, P.; CARVALHO, G. Ecologia e disbiose intestinal. *In*: PASCHOAL, V.; NAVES, A.; FONSECA A. B.B.L. **Nutrição Clínica Funcional dos princípios à prática clínica**. 1. ed. São Paulo: VP Editora, 2008. p. 142-169.

DAYER, J. M. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, Oxford, v. 42, p. ii3-10, mayo 2003. Suppl. 2.

DE FILIPPO, C. *et al.* Impacto of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **PNAS**, Washington, v. 107, n. 33, p.14691-14696, 2010.

DE FILIPPS, F. *et al.* High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. **Gut**, London, v. 65, n. 11, p. 1812-1821, 2015.

DESAI, P.B. *et al.* Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 14, n. 11, p. 959-967, nov. 2010.

EBRINGER, A.; WILSON, C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. **Journal of Medical Microbiology**, England, v. 49, n. 4, p. 305-311, 2000.

ESMAEILI, S. A. *et al.* Tolerogenic probiotics: potential immunoregulators in Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 232, p.1994–2007, 2017.

FARQUHARSON, D.; BUTCHER, J. P.; CULSHAW, S. Periodontitis, porphyromonas, and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Mucosal Immunology**, New York, v. 5, n. 2, p. 112-120, 2012.

FATEL, E. C. S. *et al.* Adipokines in rheumatoid arthritis. **Advances in Rheumatology**, [London], v. 58, n. 1, p. 1-10, 2018.

FEIJÓO, M. *et al.* Oxidative stress biomarkers as indicator of chronic inflammatory joint diseases stage. **Reumatología Clínica**, Barcelona, v. 6, n. 2, p. 91–94, 2010.

FERRAZ, E.G. *et al.* Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v.59, n.3, p.483-490, jul./set., 2011

FILIPPIN, L. I. *et al.* Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 48, n. 1, p.17-24, 2008.

FIRESTEIN,G.; MCINNES, I.B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 183–196, feb. 2017.

FLINT, H. J. *et al.* **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 9, n. 10, p. 577- 589, 2012.

FUKUDA, S. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, London, v. 469, p. 543–547, jan. 2011.

FURUSAWA, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, London, v. 504, n. 7480, p. 446-450, dec. 2013.

GAFFEN, S. L. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Current Rheumatology Reports**, Philadelphia, v. 11, n. 5, p. 365-370, oct. 2009.

GIONCHETTI, P. *et al.* Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 124, n. 5, p. 1202-1209, mayo 2003.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991.

GUARNER, F. *et al.* Probióticos e prebióticos. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia**, p. 1-35, feb. 2017.

HALMOS, E. P. *et al.* Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. **Gut**, London, v. 64, n. 1, p. 93-100, 2015.

HAMPE, C. S.; ROTH, C. L. Probiotic strains and mechanistic insights for the treatment of type 2 diabetes. **Endocrine**, Houndsmills, v. 58, n. 2, p. 207-227, nov. 2017.

HATAKKA, K. *et al.* Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mildrheumatoid arthritis a pilot study. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, London, v. 32, n. 4, p. 211–215, 2003.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HITCHON, C. A; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 6, n. 6, p. 265–278, 2004.

HOAREAU, L. *et al.* Signaling pathways involved in LPS induced TNF $\alpha$  production in human adipocytes. **Journal of Inflammation**, [London], v. 7, p. 1-12, jan. 2010.

HOLERS, V. M. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 25, n. 6, p. 728–735, dec. 2013.

HORTA-BASS, G. *et al.* Intestinal dysbiosis and rheumatoid arthritis: a link between gut microbiota and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 2017, p. 1-13, 2017.

HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. C, p. 380–385, 1994.

HUANG, R.; WANG, K. E.; HU, J. Effect of probiotics on depression: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrients**, Basel, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2016.

- IVANOV, I.I. *et al.* Specific microbiota direct the differentiation of Th17 cells in the mucosa of the small intestine. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 337–349, oct. 2008.
- JAVADI, L. *et al.* Pro- and prebiotic effects on oxidative stress and inflammatory markers in non-alcoholic fatty liver disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 27, n. 5, p. 1031-1039, 2018.
- JOOSTEN, L. A. B. *et al.* Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. **Nature Reviews Rheumatology**, New York, v. 12, n. 6, p. 344–357, 2016.
- KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor function and signaling. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 117, n. 5, p. 979-87, 2006.
- KEYS, A. *et al.* Indices of relative weight and obesity. **Journal of Chronic Diseases**, St. Louis, v. 25, n. 6, p. 329-343, 1972.
- KHOSRAVI, A.; MAZMANIAN, S. Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 13, n. 2, p. 221-227, 2013.
- KIM, M. *et al.* Critical role for the microbiota in cx3cr1+ intestinal mononuclear phagocyte regulation of intestinal t cell responses. **Immunity**, Cambridge, v. 49, n. 1, p. 151-163, 2018.
- KIRKHAM, B. W. *et al.* Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 54, n. 4, p. 1122-1131, apr. 2006.
- KLARESKOG, L. *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, Atlanta, v. 54, n. 1, p. 38-46, jan. 2006.
- KOBAYASHI, M. *et al.* Short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 ligands, inhibit TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 expression by modulating p38 and JNK signaling pathways in human renal cortical epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 486, n. 2, p. 499-505, apr. 2017.
- KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 101, n. 2, p. 229-38, feb. 2001.
- KUCHMAK, O. B. *et al.* The use of probiotics in patients with rheumatoid arthritis. **Likars'ka sprava**, Kyïv, n. 12, p. 63-65, dec. 2014.
- LEE, J. *et al.* Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal ion chelating effect. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 8, p. 388-391.

LEAN, M. E. J.; HAN, T. S.; MORRISON, C. E. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. **BMJ**, London, v. 311, n. 6998, p. 158-161, 1995.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. Rheumatoid Arthritis. **Lancet**, London, v. 358, n. 9285, p. 903–911, set. 2001.

LEE, N.; KIM, W. U. Microbiota in T-cell homeostasis and inflammatory diseases. **Experimental & Molecular Medicine**, Seoul, v. 49, n. 5, p. 1-10, 2017.

LEONAVICIENE, L.; BRADŪNAITE, R.; ASTRAUSKAS, V. Proinflammatory cytokine interleukin-17 and its role in pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Medicina**, Kaunas, v. 40, n. 5, p. 419-422, 2004.

LEY, R. E. *et al.* Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, London, v. 444, n. 7122, p. 1022-1023, 2006.

LEY, R.E. *et al.* Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, v. 320, n. 5883, p.1647–1651. Jun.2008.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. v. 147, n. 3659, p.747-748, feb. 1965.

LIN, M.Y.; YEN, C.L. Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p.1460-1466, apr. 1999.

LIN, R.; ZHOU, L.; ZHANG, J.; WANG, B. Abnormal intestinal permeability and microbiota in patients with autoimmune hepatitis. **International journal of Clinical and Experimental Pathology**, Madison, v. 8, n. 5, p. 5153–5160, 2015.

LIU, D.; LUO, S.; LI, Z. Multifaceted roles of adiponectin in rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 1084-1090, oct. 2015.

LIU, Y.; ALOOKARAN, J. J.; RHOADS, J. M. Probiotics in autoimmune and inflammatory disorders. **Nutrients**, Basel, v. 10, n. 10, p. 1-19, 2018.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, London, v. 489, n. 7415, p. 220–230, set. 2012.

LUCKEY, D.; GOMEZ, A.; MURRAY, J.; WHITE, B.; TANEJA, V. Bugs & us: the role of the gut in autoimmunity. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 138, n. 5, p. 732–743, 2013.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Fermentation in the human large intestine its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 45, p. S120–S127, 2011.

MAEDA, Y.; TAKEDA, K. Role of Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 6, p. 60. Jun. 2017.

MARTARELLI, D, V. *et al.* Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. **Current Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1689-1696, jun. 2011.

MASLOWSKI, K. M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, London, v. 461, n. 7268, p. 1282-1286, 2009.

MATEEN, S. *et al.* Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. 1-15, abr. 2016.

METCHNIKOFF, É. *The Prolongation of Life: Optimistic Studies.* London: Heinemann, 1907.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. **The Lancet**, London, v. 389, n. 10086, p. 2328–2337, 2017.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 365, n. 23, p. 2205-2219, dec. 2011.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, London, v. 449, n. 7164, p. 819-826, oct. 2007.

MILAJERDI, A. *et al.* The effect of probiotics on inflammatory biomarkers: a meta-analysis of randomized clinical trials. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, p. 1-17, 2019.

MOTA, L. M. H. *et al.* Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 51, n. 3, p.207-219, 2011.

MOTA, L. M. H. *et al.* Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 52, n. 2, p.135-174, 2012.

MURRI, M. *et al.* Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. **BMC Medicine**. v.11, n. 46, p. 1-12, feb. 2013.

MURTAZA, N.; CUÍV P. Ó.; MORRISON, M. Diet and the Microbiome. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 46, n. 1, p. 49-60, mar. 2017.

MYASOEDOVA, E. *et al.* Is the incidence of rheumatoid arthritis rising? results from olmsted county, Minnesota, 1955-2007. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 62, n. 6, p. 1576–1582, 2010.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679–81, mar. 1998.

- NEGI, S.; SINGH, H.; MUKHOPADHYAY, A. Gut bacterial peptides with autoimmunity potential as environmental trigger for late onset complex diseases: *In-silico* study. **Plos One**, San Francisco, v. 12, n. 7, p. 1-17, jul. 2017.
- NUNES, J.C.R. *et al.* associação entre artrite reumatoide e citrulinização proteica por *Porphyromonas gingivalis*: revisão de literatura. **Brazilian Journal Periodontology**, Belo Horizonte, v. 28, n. 3, p. 46-52, sept. 2018.
- O'MAHONY C. *et al.* Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. e1000112, 2008.
- OGATA, A. *et al.* IL-6 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review. **Modern Rheumatology**, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 258-267, mar. 2019.
- OU, C-C. *et al.* Hepatoprotective Effect of Lactic Acid Bacteria in the Attenuation of Oxidative Stress from tert-Butyl Hydroperoxide. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. 1, p. 101-110. 2012.
- PIANTA, A. *et al.* Evidence for immune relevance of prevotella copri, a gut microbe, in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, Malden, v. 69, n. 5, p. 964–975, maio 2017.
- PICCHIANTI-DIAMANTI, A.; ROSADO, M. M.; D'AMELIO, R. Infectious agents and inflammation: the role of microbiota in autoimmune arthritis. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1-9, jan. 2018.
- PINEDA, M.A, *et al.* A randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study of probiotics in active rheumatoid arthritis. **Medical Science Monitor**, v. 17, n. 6, p.347–54, 2011.
- PREVOO, M. *et al.* Modified disease activity scores that include twenty-eight - joint counts. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 38, n. 1, p. 44–48, 1995.
- QUEIPO-ORTUNÓ, M. I. *et al.* Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 6, p. 1323-34, may 2012.
- QIN, J. *et al.* A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. **Nature**, London, v. 464, n. 7285, p. 59–65, 2010.
- QUIÑONEZ-FLORES, C. M.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A.; DEL RÍO N. D.; PACHECO-TENA, C. Oxidative stress relevance in the pathogenesis of the rheumatoid arthritis: a systematic review. **BioMed Research International**, New York, v. 2016, p. 6097417, 2016.
- RAJKUMAR, H. *et al.* Effect of Probiotic (VSL#3) and Omega-3 on Lipid Profile, Insulin Sensitivity, Inflammatory Markers, and Gut Colonization in Overweight Adults: A Randomized, Controlled Trial. **Mediators of Inflammation**, Oxford, n. 9, p. 348959, 2014.

REID, G.; HOWARD, J.; GAN, B. S. Can bacterial interference prevent infection?. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 9, p. 424-428, 2001.

REMANS, P. H. J. *et al.* Intracellular free radical production in synovial T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 52, n. 7, p. 2003-2009, jul. 2005.

REPETTO, M. *et al.* Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, n. 2, p. 107–117, 1996.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *In: Methods in Enzymology*. [s.l: s.n.]. v. 233p. 357–363.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Bases da resposta inflamatória do trato gastrintestinal. *In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. Sistema digestório: integração básico-clínica*. São Paulo: Blucher, 2016. p. 763-807.

RICHARDS, J. L. *et al.* Dietary metabolites and the gut microbiota: an alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 5. p.1-8, maio. 2016.

RINNINELLA, E. *et al.* What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, Basel, v. 7, n. 1, p. 1- 22, 2019.

RITCHIE, M. L.; Romanuk, T. N. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2012.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E. *et al.* *Lactobacillus fermentum* exerts a beneficial effect in an experimental model of rheumatoid arthritis in mice. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 67, p. E66, 2008.

ROSSER, E. C.; MAURI, C. A clinical update on the significance of the gut microbiota in systemic autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, London, v 74, p. 75-93, 2016.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **PNAS**, Washington, v. 107, n. 27, p. 12204–12209, 2010.

SANDHYA, P. *et al.* Does the buck stop with the bugs?: an overview of microbial dysbiosis in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 8–20, 2016.

SCHER, J.B. *et al.* Characteristic Oral and Intestinal Microbiota in Rheumatoid Arthritis (RA): A Trigger for Autoimmunity? **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, p. 1390, nov. 2010. Supl. 10.

SCHER, J. B.; ABRAMSON, S. B. The microbiome and rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, New York, v. 7, n. 10, p. 569–578, 2011.

SCHER, J. U. *et al.* Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **eLife**, Cambridge, v. 2, p. 2-20, 2013.

SHAHRARA, S. *et al.* M. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 182, n. 6, p. 3884–3891, mar. 2009.

SIMPSON, H. L.; CAMPBELL, B. L. Review article: dietary fibre–microbiota interactions. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**; v. 42, n. 2, p. 158–179, may 2015.

SINGH, R. K. *et al.* Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. **Journal of Translational Medicine**, [London], v. 15, n. 1, p. 1-17, 2017.

SIVALINGAM, S. P. *et al.* In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Academy of Medicine**, Singapore, v. 36, n. 2, p. 96-99, feb. 2007.

SMITH, P. M. *et al.* The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. **Science**, New York, v. 341, n. 6145, p. 1-10, aug. 2013.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, London, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, out. 2016.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, London, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, out. 2016.

SO, J. E. *et al.* *Lactobacillus casei* suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 2690-2699, may 2008.

SOFAT, N. *et al.* H. Interaction between extracellular matrix molecules and microbial pathogens: evidence for the missing link in autoimmunity with rheumatoid arthritis as a disease model. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 1-6, jan. 2015.

STEPHANI, J.; RADULOVIC, K.; NIESS, J. H. Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Warszawa, v. 59, n. 3, p. 161–177, 2011.

STEPHENS, L. A. *et al.* Human CD4+ CD25+ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 4, p. 1247-1254, 2001.

STEWART, L. *et al.* Antigenic mimicry of ubiquitin by the gut bacterium *Bacteroides fragilis*: a potential link with autoimmune disease. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 194, n. 2, p. 153-165, nov. 2018.

SUN, J. *et al.* Lactobacilli prevent hydroxy radical production and inhibit *Escherichia coli* and *Enterococcus* growth in system mimicking colon

fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 264-269. Mar. 2010.

TADDEI, C. R.; FEFERBAUM, R. **Microbiota intestinal no início da vida**. São Paulo: ILSI Brasil, 2017. (Série de publicações ILSI Brasil: força tarefa de nutrição da criança, v. 3).

TAK, P. P. *et al.* Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 78-82, feb. 2000.

TATEIWA, D.; YOSHIKAWA, H.; KAITO, T. Cartilage and bone destruction in arthritis: pathogenesis and treatment strategy: a literature review. **Cells**, Basel, v. 8, n. 8, p. 1-31, aug. 2019.

TENG, F. *et al.* Gut microbiota drive autoimmune arthritis by promoting differentiation and migration of peyer's patch t follicular helper cells. **Immunity**, Cambridge, v. 44, n. 4, p. 875–888, apr. 2016.

TIMMERMAN, H. M. *et al.* Monostrain, multistrain and multispecies probiotics: a comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 219-233, nov. 2004.

TOUSSIROT, E.; ROUDIER, J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. **Best practice & research Clinical rheumatology**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 883-896, out. 2008.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, London, v. 444, n. 7122, p. 1027-1031, dec. 2006.

VAGHEF-MEHRABANY, E. *et al.* Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition**, Burbank, v. 30, n. 4, p. 430-435, 2014.

VESELINOVIC, M. *et al.* Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, New York, v. 391, n. 1/2, mar. 2014.

VRANIC, A. *et al.* Redox status in women with rheumatoid arthritis. **Serbian Journal of Experimental and Clinical Research**, Kragujevac, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2017.

WALKER, W. A. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. **Annals of Nutrition & Metabolism**, Basel, v. 63, p. 8-15, 2013. Suppl. 2.

WANG, Y. *et al.* Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. **Nutrients**, v. 9, n. 5. p. 521, maio. 2017.

WIELE, T. V. *et al.* How the microbiota shapes rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, New York, v. 12, n. 7, p. 398-411, 2016.

WU, H. *et al.* Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. **Immunity**, Cambridge, v. 32, n. 6, p. 815–827, jun. 2010.

WU, X. *et al.* Molecular insight into gut microbiota and rheumatoid arthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 431, p. 1-11, 2016.

XU, M. *et al.* The efficacy and safety of the probiotic bacterium lactobacillus reuteri DSM 17938 for Infantile colic: a meta-analysis of randomized controlled trials. **PloS One**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1-16, out. 2015.

YOUNG, A.; KODURE, G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 5, p. 907–927, 2007.

ZAMANI, B. *et al.* Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **International Journal of Rheumatic Diseases**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 869-879, 2016.

ZHANG, Z.; ZHANG, R. Epigenetics in autoimmune diseases: Pathogenesis and prospects for therapy. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 14, n. 10, p. 854-863, 2015.

ZHANG, Q.; WU, Y.; Fei, X. Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **International Journal Of Food Sciences And Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 571–580, 2016

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“Efeito do Consumo de probiótico na Atividade da Doença, no Perfil Metabólico e Inflamatório e no Estresse Oxidativo de Pacientes com Artrite Reumatóide”**, a ser realizada em Londrina . O objetivo da pesquisa é avaliar “os efeitos da suplementação do probiótico na atividade da doença e nos exames laboratoriais”. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: participar de um dos grupos do estudo conforme sorteio (Grupo Controle (n=25): que irão ingerir uma vez ao dia um sachê contendo 2 gramas de maltodextrina e Grupo Probiótico (n=25): que irão ingerir pela manhã em jejum um sachê de mix de probióticos, comparecer em 2 avaliações clínicas realizadas (uma no início do estudo e outra no final, após 60 dias de suplementação) pelo médico Reumatologista seguidas de coleta de sangue, medida da pressão arterial, peso, altura e circunferência abdominal. Caso a pesquisa apresente resultados benéficos aos pacientes do grupo probiótico, os pacientes do grupo controle receberão a mesma dose de probióticos sem nenhum custo.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Todos os dados coletados, clínicos e laboratoriais, serão descartados após a publicação do estudo.

Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação, mas será ressarcido em relação ao transporte utilizado para a finalidade do projeto. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Quanto aos riscos, informamos que sua participação não acarretará em qualquer risco à sua saúde nem alteração de qualquer um dos seus tratamentos. A coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo. É possível que aconteça algum desconforto com o consumo do probiótico como flatulência, no entanto, este desconforto tende a desaparecer em até 15 dias, caso esses desconfortos perdurem os pacientes serão totalmente amparados pelos pesquisadores. Os benefícios esperados com este estudo possivelmente estarão relacionados à melhora na atividade da doença e no perfil metabólico.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (**Andréa Name Colado Simão, Avenida Robert Koch 60, telefone: 3371-2321, 99627-8181**), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

**Pesquisadores Responsáveis:**

**Profa Dra. Andréa Name Colado Simão**

RG: 6.226.736-4

Tel: 3371-2321 / 99627-8181

**Nutricionista Ligia Aparecida Trintin Cannarella**

RG: 26155244-2

Tel: 99937-9145

\_\_\_\_\_ (NOME POR EXTENSO DO SUJEITO DE PESQUISA), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.



Exercício Físico: ( ) Sim ( ) Não

Tipo\_\_\_\_\_frequência\_\_\_\_\_há quanto tempo

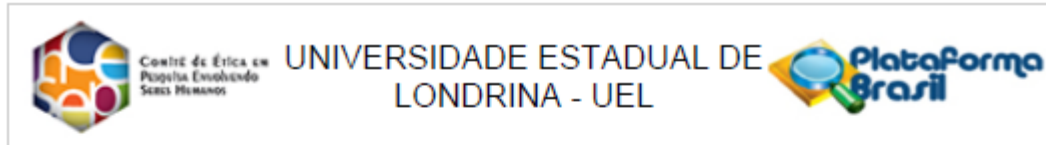
\_\_\_\_\_

**DADOS ANTROPOMÉTRICOS:**

Peso (Kg)	Altura (cm)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )

## ANEXOS

ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética da universidade Estadual de Londrina.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito do Consumo de probiótico na Atividade da Doença, no Perfil Metabólico e Inflamatório e no Estresse Oxidativo de Pacientes com Artrite Reumatóide

**Pesquisador:** Andréa Name Colado Simão

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 89055218.3.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.744.755

#### Apresentação do Projeto:

##### Resumo:

Artrite reumatoide é uma doença inflamatória sistêmica crônica autoimune que se caracteriza pelo acometimento de articulações sinoviais. Sua etiologia não está totalmente esclarecida; no entanto, a hipótese mais aceita é a de que fatores ambientais como tabagismo, bactérias, partículas de sílica ou poeira entram pela mucosa de um indivíduo geneticamente susceptível desencadeando uma resposta imune celular inata, ativando neutrófilos, células dendríticas imaturas e macrófagos, que dão início à inflamação e produção de autoantígenos. A doença se caracteriza pelo aumento das células Th17 e de citocinas inflamatórias que destroem as cartilagens e promovem alteração estrutural da sinóvia, além de manifestações extra-articulares como vasculite e a doença pulmonar reumatoide. Um crescente número de evidências sugere que a microbiota intestinal alterada (disbiose) aumenta a inflamação do hospedeiro e, portanto, desempenha papel no desenvolvimento de doenças autoimunes como a artrite reumatoide. Assim, o objetivo do presente estudo é o de avaliar a atividade da doença, perfil metabólico, inflamatório e estresse oxidativo de pacientes com AR através do consumo de um probiótico. Será realizado um estudo coorte, longitudinal prospectivo e de intervenção na qual serão selecionados 50 pacientes provenientes do Ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina com diagnóstico de AR de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia. Os pacientes com AR serão divididos em dois grupos: Grupo

**Endereço:** LABESC - Sala 14

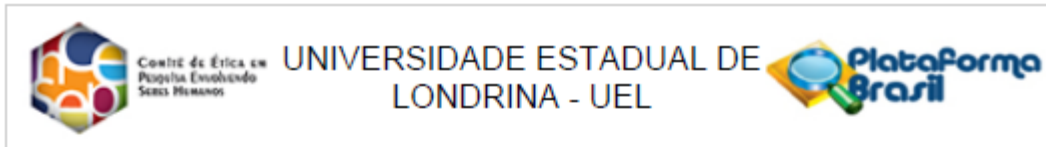
**Bairro:** Campus Universitário

**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR **Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.744.755

probiótico: pacientes que irão ingerir um sachê ao dia contendo 2 gramas de um mix de probióticos com 109 UFC de *Lactobacillus casei*; 109 UFC de *Lactobacillus acidophilus*; 109 UFC de *Lactococcus lactis*; 109 UFC de *Bifidobacterium lactis* e 109 UFC

de *Bifidobacterium bifidum*. Grupo controle: pacientes que irão ingerir uma vez ao dia um sachê contendo duas gramas de maltodextrina. Os dois grupos serão avaliados quanto à atividade da doença, marcadores antropométricos, inflamatórios, metabólicos, e de estresse oxidativo no início do estudo e após dois meses de intervenção. Para a análise estatística, os valores iniciais para os diferentes parâmetros serão comparados entre os grupos com a utilização do teste de Mann-Whitney. A comparação entre os T0 e T60 dentro do grupo será realizada utilizando-se o teste de Wilcoxon. As diferenças serão consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Espera-se com esse estudo que os pacientes com AR apresentem diminuição da atividade da doença, dos marcadores metabólicos e inflamatórios e de estresse oxidativo através da ingestão do probiótico beneficiando-os através de uma nova alternativa para o controle da doença.

**Critério de Inclusão:**

Pacientes com Artrite reumatóide, ambos os sexos e com idade de 18 a 70 anos.

**Critério de Exclusão:**

pacientes que apresentarem doenças da tireoide, renais, hepáticas, infecciosas, gastrointestinais, diabetes mellitus, câncer ou outras doenças inflamatórias ou autoimunes. Além de não apresentarem as doenças relatadas, os pacientes do estudo também não poderão fazer uso de tabaco ou estarem expostos a fumaça de cigarro, não poderão estar tomando bebidas alcoólicas, antibióticos, suplementos antioxidantes, suplementos a base de óleo de peixe, suplementos com fibras alimentares ou outro probiótico. No caso de mulheres, não poderão estar grávidas ou em lactação.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Avaliar o efeito na atividade da doença; nos indicadores antropométricos, no perfil metabólico; no perfil inflamatório e no perfil de estresse oxidativo de pacientes com AR através da utilização de probiótico.

**Objetivo Secundário:** - Avaliar a atividade da doença nos pacientes portadores de AR com e sem a ingestão de probiótico através da utilização do DAS 28.- Comparar os valores dos marcadores antropométricos, inflamatórios e metabólicos de pacientes portadores de AR com e sem a

Endereço: LABESC - Sala 14  
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970  
 UF: PR Município: LONDRINA  
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.744.755

utilização de probiótico.- Analisar os valores de estresse oxidativo de pacientes portadores de AR com e sem a utilização de probiótico.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** A coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo. É possível que aconteça algum desconforto com o consumo do simbiótico como flatulência, no entanto, este desconforto tende a desaparecer em até 15 dias, caso esses desconfortos perdurem os pacientes serão totalmente amparados pelos pesquisadores.

**Benefícios:** Espera-se com esse estudo que os pacientes com AR apresentem diminuição da atividade da doença e melhora nos indicadores antropométricos, marcadores metabólicos, inflamatórios, e estresse oxidativo através da ingestão do probiótico, beneficiando-os através de uma alternativa complementar para o controle da doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa relevante.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos apresentados foram:

1. Folha de Rosto para Pesquisa com Seres Humanos;
2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em forma de convite e com linguagem acessível;
3. Autorização da unidade coparticipante;
4. Termo de Confidencialidade e Sigilo.
5. Declaração para formação de banco de material biológico.

**Recomendações:**

Vide pendências.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após a segunda rodada de avaliação, verificou-se que as pendências foram atendidas e assim, vota-se pela aprovação do projeto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Constrói de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.744.755

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1091835.pdf	29/05/2018 22:18:36		Aceito
Outros	responsabilidade_banco_material_biológico.pdf	29/05/2018 22:18:08	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Outros	Responsabilidade_material_biológico.pdf	03/05/2018 13:47:03	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Outros	confidencialidade_sigilo.pdf	03/05/2018 13:44:28	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	material_biológico.pdf	03/05/2018 13:43:48	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaoHU.pdf	03/05/2018 13:43:30	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Folha de Rosto	scan.pdf	03/05/2018 13:39:04	Andréa Name Colado Simão	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	02/05/2018 17:08:34	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto probióticos AR.doc	02/05/2018 17:07:52	Andréa Name Colado Simão	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 29 de Junho de 2018

Assinado por:  
Adriana Lourenço Soares  
(Coordenador)

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO B - Parecer favorável do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina à realização do Projeto de Pesquisa



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
DIRETORIA SUPERINTENDENTE  
**PARECER Nº318**  
**PROCESSO 5292.2018.24**

À Pesquisadora  
Andréa Name Colado Simão

Considerando o Projeto de Pesquisa com o título: **"EFEITO DO CONSUMO DE SIMBIÓTICO NA ATIVIDADE DA DOENÇA, NO PERFIL METABÓLICO E NO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE"**, apresentado a esse Hospital Universitário, estando vinculado ao Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina;

Considerando o parecer favorável apresentado nas instâncias administrativas que envolvem a realização do estudo.

Informamos que o nosso **parecer é favorável** à realização do projeto acima nominado, resguardando-se o atendimento da legislação vigente.

Atendendo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde o projeto deverá ser analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL (CEP/UEL) para posterior operacionalização.

Conforme **Ofício Circular da Diretoria Superintendente do HU nº 214/2015**, a cópia do parecer de aprovação do CEP/UEL deverá ser apresentado à Chefia e/ou Gerente das unidades envolvidas antes do início da coleta de dados.

Solicitamos que, tão logo o Comitê de Ética emita parecer, essa Diretoria Superintendente seja notificada, para os procedimentos cabíveis relacionados à documentação da pesquisa.

Solicitamos também que, uma vez realizado o estudo, uma cópia seja apresentada a esta Diretoria, para ciência e divulgação.

Em 18/04/2018

  
Enfa. Dra. Elizabetta Silva Ursi  
Diretora Superintendente-HU

Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa Científica (CAPEC) do HU

Fone: (41)3371-2301

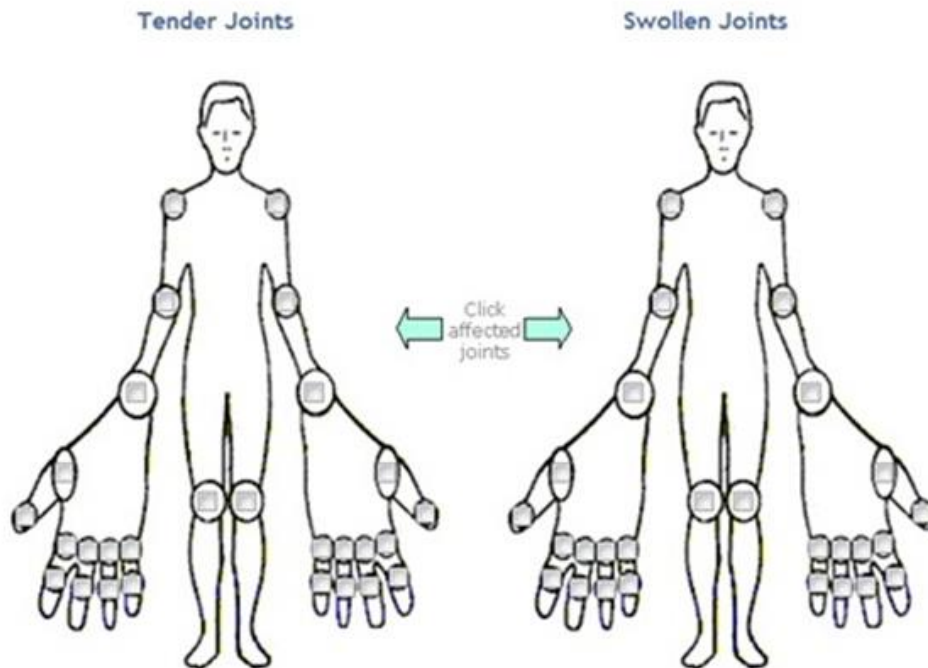
e-mail: [pesquisahu@uel.br](mailto:pesquisahu@uel.br)

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), Km 380-Fone (41) 3371-4000 -PABX - Fax 328-4440 - Caixa Postal 6001 - CEP 86051-900 - www.uel.br  
Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 60 -V. Operária - Fone (41) 3371-2000/PABX- Fax 3377-7495/CEP 86058-440- www.huel.br

LONDRINA – PARANÁ – BRASIL

Form. Código 34057 - Formato A4 (210X297)

### ANEXO C – Avaliação do *Disease Activity Score 28 Joints*



$$\text{DAS28} = 0,56 \times \sqrt{\text{NAD28}} + 0,28 \times \sqrt{\text{NAE28}} + 0,70 \times \text{Ln VHS} + 0,014 \times \text{AGS}$$

NAD28 : número de articulações dolorosas dentre 28 articulações

NAE28 é o número de articulações edemaciadas dentre 28 articulações

Ln : logaritmo

AGS : avaliação global de saúde.

Pode ser facilmente calculado com auxílio de calculadoras disponíveis na internet ([www.das-score.nl](http://www.das-score.nl)) ou por aplicativos de celular (DAS28 ACR-EULAR, disponível na APP store)

## ANEXO D – Avaliação da Saúde Global pelo Paciente

### AVALIAÇÃO DA SAÚDE GLOBAL

Marque a opção em que você se encontra em relação à artrite reumatoide (dor, capacidade funcional) considerando os últimos 7 dias:

