

O EFEITO DE UMA DIETA ANTI-INFLAMATÓRIA NA ATIVIDADE DA DOENÇA E NA QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE - ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO CONTROLADO PARALELO

MARIANA MARTINS FREITAS

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Nutrição Humana e Metabolismo
na Faculdade de Ciências Médicas | *NOVA Medical School* da Universidade NOVA de Lisboa

Setembro, 2022

**O EFEITO DE UMA DIETA ANTI-INFLAMATÓRIA NA ATIVIDADE DA DOENÇA E
NA QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE -
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO CONTROLADO PARALELO**

Mariana Martins Freitas

Orientadores: - Professora Doutora Ana Faria

NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

- Dr. Carlos Carneiro - Especialidade de Medicina Interna

Coordenador da Consulta de Doenças Autoimunes do Grupo HPA-Saúde

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Nutrição Humana e Metabolismo

Setembro, 2022

Agradecimentos

Primeiramente quero dedicar esta dissertação à Ritinha e a todos os doentes com Artrite Reumatóide. Quero também agradecer à Raquel Pinho (mãe da Ritinha e médica de Medicina Interna do Centro Hospitalar Universitário do Algarve) que me tornou parte integrante do tratamento da sua filha, me fez estudar, confiou na minha abordagem e me despertou o interesse por esta temática, tornando-se uma das principais áreas da minha atuação profissional.

Tributo aqui algumas singelas palavras de agradecimento a todos aqueles que, de alguma maneira, estiveram comigo neste percurso que levou à concretização da minha dissertação de mestrado.

Aos participantes do estudo, obrigada por toda a dedicação e compromisso no cumprimento das orientações dietéticas. Sem o vosso empenho, não teria sido possível finalizar com sucesso este trabalho.

Ao Dr. Carlos Carneiro pelo imenso conhecimento, dedicação, profissionalismo e prontidão em executar. Obrigada por me fazer parte da equipa e me deixar trabalhar com os seus pacientes. Um bem-haja pelo cuidado e entrega que tem para com os seus doentes.

À Professora Doutora Ana Faria, não tenho palavras para agradecer a excelente orientação, apoio, ajuda, profissionalismo e me levar a fazer mais e melhor. Obrigada por todo o conhecimento e experiência partilhada ao nível da microbiota e investigação. Foi uma honra trabalhar consigo.

À Shamila Ismael pela ajuda preciosa que me deu no trabalho de laboratório.

Ao HPA Saúde pelo fornecimento dos recursos para a execução do estudo.

Por último, mas não menos importante, obrigada ao Bernardo e à minha irmã Cristiana. Não existem palavras para suficientes para exprimir a minha gratidão. Obrigada por me ouvirem, ajudarem, apoiarem a seguir o meu coração e não duvidarem do meu conhecimento.

“Loucura é querer resultados diferentes fazendo tudo exatamente igual.”

Albert Einstein

Abreviaturas

APCCs	Anticorpos Anti-péptido Cíclico Citrulinado
AD	Atividade da Doença
ADO	Articulações Dolorosas
AE	Articulações Edemaciadas
AG	Ácidos Gordos
AGCC	Ácidos Gordos de Cadeia Curta
ALA	Ácido α -linolénico
ALH	Antigénio Leucocitário Humano
AR	Artrite Reumatóide
BFS	Bactérias Filamentosas Segmentadas
COX	Ciclooxigenase
DAI	Dieta Anti-Inflamatória
DAS 28	<i>Disease Activity Score 28</i>
DM	Dieta Mediterrânea
EC	Epítipo Compartilhado
ED	Escala de Dor
EULAR	<i>European Alliance of Associations for Rheumatology</i>
FR	Fator Reumatóide
HAQ	<i>Health Assessment Questionnaire</i>
IL	Interleucina
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
MAMD	Medicamentos Antirreumáticos Modificadores da Doença
MHC	Moléculas do Complexo de Histocompatibilidade
MPTs	Modificações pós-traducionais
NK	Células <i>Natural Killer</i>
PCR	Proteína C Reativa
PMAPs	Padrões Moleculares Associados a Patogénios
QV	Qualidade de Vida
RNLs	Recetores de Ligação de Nucleótidos
RRPs	Recetores de Reconhecimento de Padrões
RTLs	Recetores <i>Toll-like</i>
TFH	Células T <i>Follicular Helper</i>
TH	Células T <i>Helper</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VSE	Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

Abstract

Introduction: Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease that leads to inflammation, cartilage and bone destruction, and malformation/destruction of multiple joints; affecting the physical and mental well-being and quality of life (QL) of patients. As remission is not always achieved with pharmacotherapy, dietetic intervention has been evaluated as an adjuvant therapy. Diet is an environmental factor that can influence inflammatory activity, change the lipid profile, increase antioxidant levels, and modulate the gut microbiota (also involved in the development of the disease). In this sense, studying a diet that combines all the components with an impact on RA is a priority to complement the prescribed treatment.

Objective: The main objective of the present study was to investigate the effect of an anti-inflammatory diet (AID) (characterized by the reduction of exposure to large proteins in the intestine, mainly gluten; specification of the most suitable vegetables; limitation of yogurts to those enriched with L. Casei; and by the daily intake of specific spices and seeds), compared to a control diet (Mediterranean Diet - MD), on disease activity (DA) and on the improvement of QL, in RA patients. Furthermore, the relationship of AID with clinical and anthropometric markers, and with the modulation of the composition of the intestinal microbiota, in comparison with MD, was analyzed.

Methodology: This parallel randomized controlled clinical trial included 26 patients with RA followed in the autoimmune disease appointment at Hospital Particular do Algarve. They were randomized/allocated and educated to perform one of the two diets. The dietetic intervention lasted fifteen weeks and clinical, anthropometric and QL markers and a fecal sample was collected before and after the intervention. The composition of the intestinal microbiota was sequenced by 16S after extraction of genomic DNA from feces and the statistical treatment was performed using SPSS® version 27.

Results: It was found that the application of AID led to a greater reduce the Disease Activity Score 28 (DA) compared to MD, however, after eliminating the confounding factors, this reduction was not statistically significant between diets and both led to a moderate clinical response. About the Health Assessment Questionnaire (QL), the two interventions led to a similar reduction.

MD induced an increase in *beta* diversity and a greater number of changes in microbiota composition. With DM, a decrease in the abundance of the phylum of *Actinobacteria* and *Firmicutes* and an increase in *Bacteroidota* was verified. As for the genus, there was an increase in *Bacteroides*, *Bilophila*, *Lachnospiraceae_unclassified*, *Parabacteroides*, *Roseburia* and *Suterella* and a reduction in *Bifidobacterium*, *Subdoligranulum*, *Lachnospiraceae_ge* and *Collinsella*. However, no differences were found between diets in terms of diversity after the intervention. When comparing the relative abundance of phylum and genus between diets at the end of the intervention, it was found that the phylum *Deferribacterota* and the genus *Collinsella* showed a significant difference and were found in greater amount in the AID participants.

Conclusion: The results suggest that both interventions had a positive impact on DA, but the AID intervention had a greater impact compared to MD, and both diets had an effect on improving QL. The greater impact on the microbiota did not correspond to a superior improvement in the prognosis of the disease. In this way, changes in the microbiota did not seem to be the main significant etiologic agent in DA.

This study reinforces the viability a dietetic intervention as an adjuvant therapy in patients with moderate DA, in particular, an AID-based intervention.

Key words: Rheumatoid arthritis; disease activity; anti-inflammatory diet; microbiota; quality of life

Resumo

Introdução: A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença autoimune que leva à inflamação, destruição de cartilagem e osso, e à malformação/destruição de múltiplas articulações; afetando o bem-estar físico e mental, e a qualidade de vida (QV) dos doentes. Como nem sempre se consegue a remissão com a farmacoterapia, a intervenção dietética tem sido avaliada como terapia adjuvante. A dieta é um fator ambiental que pode influenciar a atividade inflamatória, alterar o perfil lipídico, aumentar os níveis de antioxidantes e modular a microbiota intestinal (também envolvida no desenvolvimento da doença). Neste sentido, estudar uma dieta que combine todos os componentes com impacto na AR é uma prioridade para complementar o tratamento prescrito.

Objetivo: O objetivo principal do presente estudo foi avaliar o efeito de uma dieta anti-inflamatória (DAI) (caracterizada pela redução da exposição a grandes proteínas no intestino, principalmente o glúten; especificação dos legumes mais adequados; limitação de iogurtes aos enriquecidos com *L. Casei*; e pelo consumo diário de especiarias e sementes específicas), em comparação com uma dieta controlo (Dieta Mediterrânea - DM), na atividade da doença (AD) e na melhoria da QV em pacientes com AR. Mais ainda, foi analisada a relação da DAI com os marcadores clínicos e antropométricos, e com a modulação da composição da microbiota intestinal, em comparação com a DM.

Metodologia: Este ensaio clínico controlado randomizado paralelo incluiu 26 doentes com AR seguidos na consulta de doenças autoimunes do Hospital Particular do Algarve. Foram randomizados/alocados e educados para a realização de uma das duas dietas. A intervenção dietética teve uma duração de quinze semanas, tendo sido recolhidos os marcadores clínicos, antropométricos, de QV e uma amostra fecal antes e após a intervenção. A composição da microbiota intestinal foi sequenciada por 16S após extração de DNA genómico das fezes e o tratamento estatístico foi feito com recurso ao SPSS® versão 27.

Resultados: Verificou-se que a aplicação da DAI levou uma maior redução do *Disease Activity Score* 28 (AD) em comparação com a DM, no entanto, após a eliminação dos fatores confundidores, esta redução não se mostrou estatisticamente significativa entre dietas e ambas levaram a uma reposta clínica moderada. No que diz respeito à pontuação do *Health Assessment Questionnaire* (QV), as duas intervenções levaram a uma redução semelhante.

A DM induziu um aumento na diversidade *beta* e um maior número de alterações na composição da microbiota. Com a DM aferiu-se uma diminuição na abundância do filo das *Actinobacterias* e *Firmicutes* e um aumento dos *Bacteroidota*. Quanto aos géneros, observou-se o aumento dos *Bacteroides*, *Bilophila*, *Lachnospiraceae_unclassified*, *Parabacteroides*, *Roseburia* e *Suterella* e uma redução de *Bifidobacterium*, *Subdoligranulum*, *Lachnospiraceae_ge* e *Collinsella*. No entanto, não se constatarem diferenças entre dietas no que diz respeito à diversidade após a intervenção. Quando se comparou a abundância relativa dos filós e géneros entre dietas no fim da intervenção, apurou-se que o filo *Deferribacterota* e o género *Collinsella* apresentaram uma diferença estatisticamente significativa e que se encontravam em maior quantidade nos participantes da DAI.

Conclusão: Os resultados sugerem que ambas as intervenções tiveram impacto positivo na AD, mas a intervenção DAI teve um impacto maior em comparação com a DM. Ambas as dietas apresentaram efeito na melhoria da QV. O maior impacto na microbiota não correspondeu a uma melhoria superior do prognóstico da doença. Desta forma, as alterações na microbiota pareceram não ser o principal agente etiológico significativo na AD.

Este estudo reforça a viabilidade de poder adotar uma intervenção dietética como uma terapia adjuvante em pacientes com AD moderada, em particular uma intervenção baseada na DAI.

Palavras-chave: Artrite reumatóide; atividade da doença; dieta anti-inflamatória; microbiota; qualidade de vida

Índice

Lista de tabelas	9
Lista de figuras	10
Introdução.....	11
Imunopatogéne da AR.....	11
Microbiota e Sistema Imunitário	13
Disbiose na AR.....	14
Terapia medicamentosa na AR	15
Dieta, comorbilidades e AR.....	16
Dieta Mediterrânea e a AR.....	17
Dieta Anti-inflamatória e a AR	19
Objetivos.....	22
Objetivo principal.....	22
Objetivos secundários.....	22
Metodologia.....	23
Seleção de participante e amostra final.....	23
Aspetos éticos.....	24
Métodos, instrumentos e procedimentos.....	25
Colheita das amostras, extração e quantificação de DNA, e sequenciação e análise do gene 16S rRNA bacteriano.....	27
Análise estatística.....	28
Resultados.....	29
Caracterização da amostra no início do estudo.....	29
Caraterização da amostra entre dietas no início e fim do estudo.....	30
Efeito da dieta nos marcadores clínicos, antropométricos e de QV entre dietas	31
Relação entre o DAS 28 e IMC.....	32
Caraterização e comparação da microbiota intestinal	32
DAI	32
DM.....	34
Comparação entre DAI e DM.....	36
Relação entre diversidade e a abundância relativa dos filos, e os marcadores clínicos, antropométricos e de QV após a intervenção.....	38
Relação entre a abundância relativa ao nível do género e os marcadores clínicos, antropométricos e de QV após a intervenção	39
Relação entre a razão de <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> , e o IMC e o DAS 28 após a intervenção	39
Microbiota intestinal e o tipo de medicação	40
Discussão	41
Conclusão	46
Referências.....	47
Anexos.....	55

Anexo 1 - Consentimento Informado	55
Anexo 2 - Parecer favorável da Comissão de Ética da <i>Nova Medical School</i> – Faculdade de Ciências Médicas	57
Anexo 3 - Parecer favorável da Comissão de Ética do Grupo HPA Saúde	58
Anexo 4 - Registo numa base de dados de acesso público - <i>clinicaltrials.gov</i>	62
Anexo 5 - <i>Health Assessment Questionnaire</i>	65
Anexo 6 – Exemplo plano alimentar da Dieta Anti-inflamatória	66
Anexo 7 – Exemplo plano alimentar da Dieta Mediterrânea	68
Anexo 8 - Diário alimentar	70

Lista de tabelas

Tabela 1 - Protocolo de intervenção	23
Tabela 2 - Intervenção dietética Dieta Anti-Inflamatória.....	25
Tabela 3 - Características sociodemográficas, clínicas e antropométricas iniciais dos participantes	29
Tabela 4 - Características demográficas, clínicas e antropométricas dos participantes entre dietas....	30
Tabela 5 - Diferença dos marcadores clínicos e antropométricos entre o fim e início da intervenção para ambas as dietas.....	31
Tabela 6 - Diferença da pontuação do <i>Health Assessment Questionnaire</i> entre dietas no final da intervenção.....	32
Tabela 7 - Correlação de <i>Pearson</i> entre a abundância relativa final dos géneros da microbiota e os marcadores clínicos e antropométricos	39

Lista de figuras

Figura 1 - Patogénese da Artrite Reumatóide..	12
Figura 2 - Fluxograma dos participantes..	24
Figura 3 - Correlação entre o <i>Disease Activity Score 28</i> e o Índice de Massa Corporal antes das 15 semanas de intervenção dietética em pacientes com Artrite Reumatóide.	32
Figura 4 - Índice de diversidade de <i>Shannon</i> e diversidade <i>beta</i> da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide sujeitos a uma intervenção dietética com Dieta Anti-inflamatória durante 15 semanas.	33
Figura 5 - Caracterização ao nível do filo da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide antes e depois de uma intervenção dietética com Dieta Anti-inflamatória durante 15 semanas.	33
Figura 6 - Caracterização ao nível do género da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide antes e depois de uma intervenção dietética com Dieta anti-inflamatória durante 15 semanas.	34
Figura 7 - Índice de diversidade de <i>Shannon</i> e diversidade <i>beta</i> da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide sujeitos a uma intervenção dietética com Dieta Mediterrânea durante 15 semanas.	34
Figura 8 - Caracterização ao nível do filo da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide antes e depois de uma intervenção dietética com Dieta Mediterrânea durante 15 semanas.	35
Figura 9 - Caracterização ao nível do género da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide antes e depois de uma intervenção dietética com Dieta Mediterrânea durante 15 semanas.	35
Figura 10 - Representação do índice de <i>Shannon</i> em gráfico de caixa de bigodes, em pacientes com Artrite Reumatóide antes e depois de uma intervenção dietética com Dieta Anti-inflamatória e Dieta Mediterrânea durante 15 semanas.	36
Figura 11 - Diversidade <i>beta</i> antes das intervenções e após as intervenções da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide sujeitos a diferentes intervenções dietéticas durante 15 semanas.	36
Figura 12 - Caracterização ao nível do filo da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide antes de uma intervenção dietética com Dieta Anti-inflamatória e Dieta Mediterrânea durante 15 semanas.	37
Figura 13 - Caracterização ao nível do filo da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide depois de uma intervenção dietética com Dieta Anti-inflamatória e Dieta Mediterrânea durante 15 semanas.	37
Figura 14 - Caracterização ao nível do género da microbiota intestinal (top 30) das amostras de pacientes com Artrite Reumatóide da Dieta Anti-inflamatória e da Dieta Mediterrânea antes e no final da intervenção de 15 semanas.	38

Introdução

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença sistêmica, inflamatória e crônica caracterizada por uma resposta imune persistente que leva à inflamação, destruição de cartilagem e osso, e malformação/destruição de múltiplas articulações. Os doentes sofrem de uma redução da capacidade funcional, dor e rigidez (1,2). A prevalência é de cerca de 0,5 a 1% da população mundial e a doença é mais comum entre mulheres e idosos (3).

Os mecanismos etiopatogénicos envolvidos são complexos e incluem uma interação entre a resposta imune inata e adquirida, envolvendo células apresentadoras de antígenos, formação de células T autorreativas e produção de auto anticorpos direcionados contra as suas próprias estruturas celulares, como o fator reumatóide (FR) e os anticorpos anti-péptido cíclico citrulinado (APCCs). Esses anticorpos estão frequentemente presentes no sangue, muito antes de qualquer sinal de inflamação nas articulações, sugerindo que o desencadeamento da autoimunidade pode ocorrer em diferentes locais das articulações, por exemplo, no trato gastrointestinal (4). Estudos epidemiológicos sugerem a AR como resultado de interações complexas entre genes, fatores ambientais (como o tabagismo, poluição do ar, dieta e infeções) e hormonais, e o sistema imunitário – que predispõem ao processo inflamatório caracterizado pela produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias, com consequente ativação de células do sistema imunitário, produção de espécies reativas de oxigénio e a libertação de enzimas destruidoras das articulações (5).

Existe uma suscetibilidade genética à AR: estimativas de herdabilidade sugeriram que a genética é um fator de risco responsável por 60-70% dos casos de AR. Estudos identificaram diferentes *loci* de risco associados à etiologia da AR (6). Atualmente, nesta doença, estão descritos cerca de 100 genes associados à suscetibilidade, proteção, gravidade, atividade e resposta ao tratamento. Os polimorfismos do antígeno leucocitário humano (ALH) são os fatores de risco genéticos mais importantes. O ALH é uma parte importante do sistema imunitário, estimulando as células T a produzir anticorpos (7). O epítipo compartilhado (EC), uma sequência de 5 aminoácidos nas posições 70-74 da cadeia ALH-DR β , é o fator de risco genético mais significativo para a AR (7,8).

A esperança média de vida dos pacientes com AR é reduzida em 5-10 anos em comparação com indivíduos não doentes. A terapia moderna para a AR inclui imunossupressão por medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (MAMD), anti-inflamatórios não esteróides, corticoesteróides e mais recentemente terapias biológicas (TB), como os inibidores do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O tratamento visa prevenir a destruição adicional das articulações, reduzir os sintomas e alcançar a remissão a longo prazo, mas esta só é alcançada em 10 a 50% dos pacientes com AR (9,10). Apesar da terapia moderna e mesmo que a atividade da doença (AD) seja reduzida, muitos doentes ainda sofrem de sintomas incapacitantes e a AR continua a representar uma considerável carga humana e económica. Estima-se que um terço dos pacientes com AR terminam o emprego prematuramente e, 5 anos após o diagnóstico, 30-40% dos pacientes apresentam incapacidade para o trabalho. Há muito sofrimento associado à doença, bem como redução na qualidade de vida (QV) e comprometimento do bem-estar emocional (11,12).

Sendo a AR uma doença de cariz inflamatório, caracterizada pela ativação de mecanismos imunitários, bem como pela libertação de citocinas e outros mediadores com propriedades inflamatórias, e a dieta um fator ambiental modificável que, quando saudável, pode ser um meio de controlo de inflamação, torna-se pertinente avaliar o impacto de uma intervenção dietética quer no controlo e melhoria de sintomas, quer na QV dos doentes (13).

Imunopatogénese da AR

Compreender os processos moleculares complexos que desempenham um papel na patogénese da AR ainda é um desafio. Indivíduos suscetíveis a fatores genéticos e ambientais com perda da tolerância imunitária aos autoantígenos desencadeiam os fenómenos autoimunes e a formação de autoanticorpos (14). Essa falta de tolerância imunitária representa o primeiro passo para a autoimunidade. A desregulação do sistema imunitário é caracterizada pela presença de

autoanticorpos e células T autorreativas. A produção inadequada de células B autorreativas é a alteração mais óbvia do sistema imunitário nestes pacientes, sendo detectados muito antes da doença aparecer. Os autoanticorpos mais importantes são o FR e APCCs que reconhecem diferentes proteínas na forma citrulinada (15). Juntamente com o aumento da produção de autoanticorpos, o nível de citocinas pró-inflamatórias é elevado na sinóvia articular de pacientes com AR. As articulações de pacientes com AR são tecidos complicados onde estão envolvidas células imunes inatas e adaptativas, juntamente com células residentes articulares, como sinoviócitos e condrócitos (16,17).

Vários tipos de células contribuem para o contexto patogénico da AR. Na sinóvia reumatóide, as células dendríticas são encontradas principalmente em agregados linfocíticos e vasos periféricos, sugerindo que são provenientes do sangue periférico. Os alelos das moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) são expressos por células apresentadoras de antígenos que processam peptídeos extracelulares em células T CD4+, conduzindo à secreção de citocinas pró-inflamatórias que estimulam as células B a produzir anticorpos como o FR e APCCs (14). Os pacientes com a doença apresentam uma função defeituosa das células T reguladoras (Treg) circulantes e um aumento das células T *helper* 17 (Th17) no plasma e no líquido sinovial (18). O fator de crescimento transformador β derivado de macrófagos e derivados de células dendríticas e interleucina (IL)-1 β , 6, 21 e 23 fornecem um meio que suporta a diferenciação de Th17 e suprime a diferenciação de células Treg, deslocando assim a homeostase das células T para a inflamação (17,18).

As modificações pós-transcricionais (MPTs) induzidas por agentes ambientais são críticas para a função e antigenicidade das proteínas. As três MPTs primariamente envolvidas na AR são glicosilação, carbamilação e citrulinação (14). A citrulinação resulta da conversão de arginina em citrulina, e esta é a principal modificação pós-transcricional crucial associada ao reconhecimento de autoantígenos na AR. A citrulina pode alterar a estrutura da proteína e gerar novos epítomos associados à produção de autoanticorpos (19). Os próprios autoanticorpos podem ser patogénicos pela ativação de macrófagos ou osteoclastos através da formação de imunocomplexos e envolvimento do recetor Fc ou provavelmente pela ligação de vimentina citrulinada na membrana, promovendo assim a perda óssea (4).

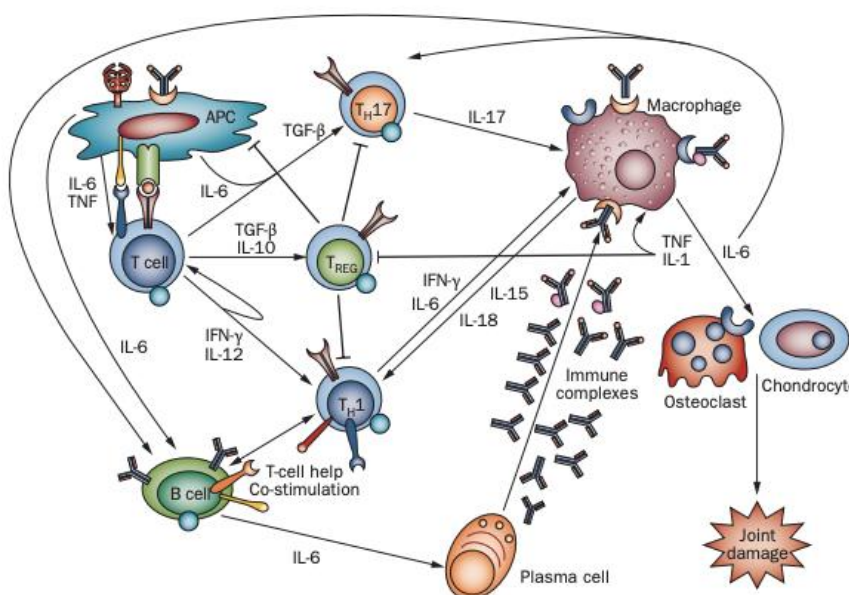


Figura 1 - Patogénese da Artrite Reumatóide. As APCs apresentam antígenos próprios ou não próprios às células T, que se diferenciam em células Th1 ou Th17 que induzem macrófagos a secretar citocinas pró-inflamatórias e ajudam as células B a produzir autoanticorpos que se ligam a antígenos alvo formando complexos imunes. Esses complexos imunes podem se ligar ao complemento e ligar-se aos recetores do complemento e/ou recetores Fc nos macrófagos, aumentando a secreção de TNF α , IL-1 e IL-6. Essas citocinas levam às manifestações clínicas e laboratoriais da AR, bem como ao dano das cartilagens e ósseo, em virtude da ativação de condrócitos e osteoclastos (este último principalmente via sistema RANKL-RANK). Essas citocinas também podem alterar e ativar a diferenciação e função das células T e células B que operam a montante na patogénese da AR. As células Treg podem inibir a função das células Th1 e Th17 num ambiente fisiológico, mas são inibidas por citocinas produzidas na resposta inflamatória.

APC - célula apresentadora de antígeno; AR- Artrite Reumatóide; RANK - ativador do receptor do fator nuclear- κ B; RANKL - ligando RANK; TCR- recetor de células T; TGF- β - fator de crescimento transformador β ; TH - célula T auxiliar; TLR - receptor tipo Toll; TREG - célula T-reguladora. Fonte: Retirado de *Smolen et al.* (20).

A membrana sinovial dos doentes portadores de AR é caracterizada pela hiperplasia e infiltração de linfócitos T (sobretudo CD4+), os quais libertam citocinas pró-inflamatórias, e a proliferação de sinoviócitos. Estas citocinas estimulam, por sua vez, a libertação de metaloproteinases destruidoras da matriz, bem como a ativação de outras células e moléculas dotadas de propriedades inflamatórias, que levam à destruição progressiva da cartilagem e osso. Ocorre ainda a ativação da resposta de fase aguda, com aumento da produção de fibrinogénio, proteína C reativa (PCR), entre outros (16).

Microbiota e Sistema Imunitário

Desde a descrição original de anticorpos como antígenos citrulinados numa subpopulação de pacientes com AR, ficou esclarecido que epítomos citrulinados de um grande número de autoantígenos, bem como antígenos derivados de microrganismos, podem ser reconhecidos por anticorpos altamente específicos para AR. Alterações em locais específicos da mucosa sugerem que fatores microbianos podem afetar a resposta imune da mucosa, também desempenhando um papel importante na patogénese da AR. Alterações na diversidade, composição e abundância da microbiota (provocada por desencadeadores ambientais como o tabaco, dieta, ...), ou seja, disbiose, podem desencadear vários tipos de doenças autoimunes e inflamatórias (17).

As exposições microbianas nos tratos gastrointestinal e respiratório são os principais determinantes da imunidade geral nessas barreiras mucosas e representam um alvo principal para futuras estratégias de intervenção (21). O intestino é uma porta de entrada para antígenos ambientais na forma de alimentos ou agentes infecciosos. A microbiota intestinal é um fator que influencia a homeostase metabólica e o sistema imunitário; é um local de notável interação entre microrganismos e o organismo. Os microrganismos estabelecem uma relação simbiótica com o tecido epitelial e linfóide (14). As bactérias intestinais sintetizam e alteram uma variedade de compostos que afetam a fisiologia e a imunidade. No entanto, nem todas as interações hospedeiro-microbiota promovem a saúde, particularmente espécies de bactérias residentes parecem ativar o sistema imunitário resultando em doenças inflamatórias. Uma microbiota diversificada e equilibrada é necessária para desenvolver uma resposta imune adequada (22).

Os benefícios fornecidos pela microbiota intestinal ao hospedeiro dependem de interações com as células hospedeiras (23). Estudos em animais mostraram o papel crucial da microbiota no desenvolvimento e manutenção do sistema imunitário do hospedeiro e preservação das suas funções, como maturação do tecido linfóide intestinal, secreção de imunoglobulina A, e a produção de peptídeos antimicrobianos importantes (24). Padrões moleculares conservados, expressos na superfície de bactérias simbióticas ou secretados no intestino, podem interagir com recetores de reconhecimento de padrões (RRPs), que são expressos em ou dentro de células epiteliais e linfóides para iniciar a tradução e transcrição de sinais de um conjunto de moléculas que medeiam a defesa do hospedeiro ou atividades metabólicas dentro do intestino(22).

A microbiota intestinal modula as respostas de células T e Tregs que são necessárias para a defesa eficaz do hospedeiro contra patógenos, evitando respostas autoimunes e outras consequências imunopatológicas (25). Como primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos, as respostas imunes inatas contam com uma família de recetores conhecidos como RRP, incluindo recetores *Toll-like* (RTLs) e recetores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação de nucleotídeos (RNLs). Os RTLs são recetores imunes inatos chave para perceber padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs). Após a deteção de PMAPs microbianos, os RTLs (presentes nas células epiteliais) permitem o início de respostas inflamatórias (25). Componentes de bactérias gram-positivas e gram-negativas interagem com RTLs para mediar a imunidade inata e adaptativa, bem como outras funções celulares da barreira mucosa. (22).

Os macrófagos e células dendríticas, que contêm os RTLs, detetam continuamente os antígenos do lúmen intestinal e avaliam a presença de antígenos prejudiciais. Após a interação com um antígeno, as células dendríticas desempenham um papel importante na diferenciação de linfócitos CD4+ imaturos em células T helpers tipo 1 (Th1), Th17 ou Th2 (26). As células dendríticas atuam como células apresentadoras de antígenos exibindo peptídeos carregados nas suas moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II. A apresentação dessas moléculas a células B ou a receptores de células T, sensibiliza-as a iniciar uma resposta imune adaptativa (18).

O tipo de antígeno microbiano influencia a diferenciação de células Th. Enquanto as células Th1 se desenvolvem em resposta a patógenos intracelulares, tanto as células Th2 como as células Th17 são estimuladas por microrganismos extracelulares (16). A resposta imune gerada pelas células T é regulada pela subpopulação conhecida como células Treg. As células Treg intestinais desempenham um papel importante na manutenção da tolerância imunitária aos antígenos dietéticos e à microbiota intestinal (27).

A disbiose pode induzir artrite influenciando a diferenciação de subgrupos de células T, influencia o grau de expressão de RTLs de células apresentadoras de antígenos e pode contribuir para um desequilíbrio na razão de células Th17/Treg. Em indivíduos predispostos, o desenvolvimento de células Th17 autoreactivas, que activam cascatas inflamatórias e causam danos nos tecidos, pode levar à autoimunidade sistémica (27).

A microbiota é a influência ambiental mais proeminente na diferenciação das células Th17. Recentemente, muita atenção tem sido dada às bactérias filamentosas segmentadas (BFS) devido à sua capacidade de induzir a produção e ativação de células Th17 no intestino, com a secreção de IL-17 (17). As BFS compreendem um grupo de bactérias gram-positivas que aderem intimamente às placas de Peyer no intestino delgado e podem estimular a resposta imune induzindo a secreção de IgA e ativando as células B (28). *Teng et al.* demonstraram que BFS desencadeiam artrite autoimune induzindo diferenciação e migração de células T *Follicular Helper* (TFH) do intestino para locais linfóides sistémicos, levando ao aumento da produção de autoanticorpos e exacerbação da artrite (29). *Block et al.* confirmaram o papel da microbiota intestinal na diferenciação das células TFH e na formação do centro germinativo. A eliminação da microbiota intestinal em ratos por antibióticos reduziu o número de células TFH e os níveis de produção de anticorpos. Os autores concluíram que a microbiota intestinal regula o desenvolvimento da artrite através do TFH independentemente das células Th17 (30).

Disbiose na AR

As alterações da microbiota estão relacionadas com o risco e gravidade da AR (31). A microbiota intestinal é a principal fonte de microrganismos que podem exercer efeitos benéficos e patogénicos na saúde humana. Estudos mostram alterações na composição da microbiota intestinal em doenças autoimunes, como a AR, o que levou ao interesse em estudar os microrganismos como potenciais candidatos ao desenvolvimento da autoimunidade(27).

Segundo a literatura, a disbiose está associada a marcadores de inflamação e à AD na AR. Além disso, também se detetam alterações no ambiente redox e no transporte e metabolismo de ferro, enxofre e zinco na microbiota de pacientes com AR, indicando que o microbioma alterado pode desempenhar um papel importante na patogénese da doença (16).

Os mecanismos fisiopatológicos pelos quais a microbiota intestinal está associada à AR são provavelmente multifatoriais; os mecanismos propostos incluem ativação de células apresentadoras de antígenos através de um efeito nos RTLs ou RNLs, capacidade de produzir citrulinização de peptídeos por ação enzimática, mimetismo antigénico, alterações na permeabilidade da mucosa intestinal, controlo do sistema imunitário do hospedeiro (desencadeando a diferenciação de células T) e aumento da inflamação da mucosa mediada pelas Th17 (32,33).

A interação entre fatores genéticos do hospedeiro, como MHC e microbiota intestinal, e seu impacto no desenvolvimento da AR, é difícil de estudar em humanos devido à alta variabilidade de fatores genéticos e ambientais, como a dieta (26). Um estudo realizado por *Gomez et al.* forneceu a primeira demonstração de que os genes ALH e o ambiente intestinal interagem, afetando a suscetibilidade à artrite. Este estudo mostrou diferenças no microbioma fecal de ratos transgênicos suscetíveis à AR em comparação com ratos resistentes ao desenvolvimento de AR. A análise mostrou que a microbiota intestinal de ratos suscetíveis à artrite apresentou maior quantidade de *Clostridium sp.*, enquanto os resistentes à artrite foram enriquecidos pelas famílias *Porphyromonadaceae* e *Bifidobacteriaceae*. Este último organismo tem sido associado à resposta anti-inflamatória no sistema imunitário da mucosa intestinal através da supressão da proliferação de células T e da produção de citocinas pró-inflamatórias e pela inibição do fator nuclear kB (34). O estudo sugere que os genes do MHC podem estar direta ou indiretamente envolvidos na determinação da composição microbiana intestinal e nas interações entre as bactérias intestinais (35).

A evidência científica descreve que o perfil fecal de bactérias é significativamente diferente em indivíduos com AR, principalmente em bactérias anaeróbicas em comparação com controles. Esta apoia o conceito de que a AR representa um estado de inflamação crônica que pode ser motivado ou agravado pelo crescimento excessivo de bactérias patogênicas ou pela falta de bactérias imunomoduladoras (36). Estudos que avaliaram a microbiota intestinal mostraram que a AR é caracterizada por uma expansão e/ou diminuição de grupos bacterianos em relação aos controles. O sequenciamento de amostras de fezes de pacientes com AR mostrou uma disbiose intestinal, e um crescimento aumentado de *Prevotella sp.*, particularmente *P. copri*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma fermentans*, *Proteus mirabilis*, *Colinsella*, *Faecalibacterium* e *Lactobacillus*; e menor quantidade de *Bifidobacteria* e *Bacteroides* (16,37).

A plasticidade da microbiota intestinal pode permitir a sua manipulação específica, especulando que, no futuro, esta manipulação pode estar incluída nas estratégias terapêuticas de indivíduos com AR (38).

Terapia medicamentosa na AR

O tratamento da AR inclui a utilização de MAMDs, anti-inflamatórios não esteróides, corticosteróides e TB, os quais atuam de forma a reduzir a dor e a inflamação articular, minimizando o compromisso funcional e a progressão do dano articular (10).

Os anti-inflamatórios não esteróides são os fármacos ideais para o alívio da dor. A sua ação é inibir as enzimas ciclooxigenase (COX), que têm função no metabolismo do ácido araquidônico para produzir as prostaglandinas pró-inflamatórias. Todavia, atendendo aos seus efeitos adversos a nível renal, cardiovascular e gastrointestinal, por vezes têm de ser substituídos por analgésicos simples, cuja eficácia fica aquém dos primeiros (10). Recentemente, os investigadores concentram-se principalmente em anti-inflamatórios não esteróides que inibem seletivamente a COX-2 dado que os seus efeitos anti-inflamatórios e de alívio da dor são semelhantes aos convencionais. Apesar disso, enquanto os seus efeitos adversos são idênticos aos outros anti-inflamatórios não esteróides convencionais, o risco de complicações gastrointestinais é menor (39).

Os corticosteróides só devem ser introduzidos quando falha o tratamento com anti-inflamatórios não esteróides, devido aos seus efeitos secundários, onde se destaca o risco osteoporótico. Os efeitos benéficos dos corticosteróides em pacientes com AR são a redução da ativação, proliferação, diferenciação e sobrevivência de várias células envolvidas na produção de mediadores inflamatórios. Podem suprimir a função e a proliferação das células Th1 e, assim, resultar na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, TNF- α , interferon- γ e IL-17. Além disso, o efeito benéfico predominante dos corticosteróides é aliviar os sintomas da artrite, como dor e inchaço. (10,39).

Os MAMDs são a medicação de primeira linha para os casos de AR recém-diagnosticados. Deste grupo, hidroxicloroquina, metotrexato, leflunomida e sulfassalazina. O metotrexato é o fármaco mais

utilizado, em virtude da sua eficácia, segurança, efeito a longo prazo, alta tolerabilidade e baixo custo, embora muitas vezes seja administrado em associação ao ácido fólico como forma de suprimir alguns dos seus efeitos secundários (10)(39).

Quando os MAMDs não promovem as melhorias necessárias, é ponderada a utilização de TB. A TB é a mais recente classe de tratamentos utilizados na terapia da AR e correspondem a compostos biológicos ou modificadores de resposta biológica. As TBs são anticorpos monoclonais quiméricos anti-CD20, rituximab, inibidores do TNF- α , como etanercept, infliximab e adalimumab, um inibidor recombinante da IL-1, anakinra, e bloqueador de co-estimulação, abatacept. Além disso, as TB recentemente em avaliação incluem novos inibidores de TNF- α , inibidores de *Janus-Activated Kinase*, tofacitinib, anticorpos monoclonais anti recetor de IL-6 e anticorpos contra moléculas vitais envolvidas na sobrevivência e desenvolvimento de células B funcionais (39). De entre as reações adversas, os TB, o efeito secundário mais preocupante é o risco de infeção (40).

Nas últimas duas décadas, o uso otimizado da medicação disponível, aumentou drasticamente o sucesso na manutenção da AR, melhorando a qualidade de vida e diminuindo a mortalidade de pacientes com AR principalmente devido à redução da mortalidade cardiovascular. Para além disso, a microbiota alterada é parcialmente restaurada ao normal (relativamente à microbiota de controlos saudáveis) em pacientes que apresentaram melhoria clínica após a prescrição da terapia medicamentosa, principalmente TB (37). No entanto, uma proporção substancial de pacientes com AR ainda não consegue atingir a remissão apenas com terapias farmacológicas, independentemente da definição de remissão utilizada, e os seus efeitos secundários não são desprezíveis. Como consequência, face à dor e limitação funcional marcadas que esta patologia acarreta e devido a alguns fármacos prescritos reduzirem a absorção de certos nutrientes, várias terapias adjuvantes não farmacológicas estão a ser exploradas atualmente, incluindo intervenções dietéticas (11,41).

Dieta, comorbilidades e AR

O potencial das intervenções dietéticas na saúde global dos pacientes com AR não deve ser subestimado. A dieta é um fator ambiental que pode influenciar a atividade inflamatória, alterar o perfil lipídico, aumentar os níveis de antioxidantes e alterar a microbiota intestinal. Vários são os estudos que têm mostrado que a alimentação possui um papel central no curso da AR, particularmente no alívio dos sintomas e na redução das complicações daí resultantes e associadas (13,42–45).

A AR está associada a diversas comorbilidades, nomeadamente, a doença cardiovascular, obesidade e diabetes. Sabe-se que a infamação sistémica da AR origina alterações no metabolismo energético e proteico, fraqueza muscular, fadiga intensa e aumento do tecido adiposo, em particular da gordura visceral (46).

A mortalidade precoce em doentes com AR tem sido amplamente atribuída a um aumento da taxa de eventos cardiovasculares, que são independentes dos fatores de risco cardiovascular tradicionais, e que estão associados ao aumento da inflamação sistémica (47). A AR está significativamente associada a um risco 50% maior de mortalidade cardiovascular do que na população geral. Pacientes com atividade da doença persistentemente alta têm uma taxa mais alta de aterosclerose subclínica, eventos cardiovasculares e maior risco de mortalidade (48).

A obesidade representa uma comorbilidade importante também para a AR, sendo um fator determinante para a resistência à insulina e para o aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes (49). Uma meta análise sobre a relação da obesidade com a AD na AR, concluiu que a obesidade é acompanhada por uma AD mais elevada, diminui a possibilidade de alcançar a remissão da doença e tem um impacto negativo na eficácia do tratamento (42). Além disso, a síndrome metabólica está associada a um alto risco de AR e o fato de já estar presente na AR diagnosticada reforça o seu papel como fator de risco e ainda mais a importância da dieta e do controlo da glicemia e perfil lipídico (50).

Existem evidências de uma forte associação entre AR e a diabetes. Uma dupla relação entre diabetes e AR tem sido descrita: alta prevalência de diabetes tipo 2 em pacientes com AR e AR como fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Estudos mostram que a AR está significativamente associada ao metabolismo anormal da glicose tanto em relação aos fatores de risco cardiovascular tradicionais (por exemplo, síndrome metabólica), como em relação às características específicas da AR, como níveis de PCR, duração da doença e extensão do dano articular (51).

Para além disso, os pacientes com AR apresentam, normalmente, uma disbiose da microbiota intestinal que influencia a resistência, integridade e função da barreira intestinal, tal como referido anteriormente. A microbiota intestinal é dinâmica e pode mudar rapidamente, em termos de composição e diversidade com intervenções dietéticas que são cada vez mais reconhecidas como uma abordagem para a prevenção e tratamento de doenças. Para além disso, a microbiota também está envolvida no metabolismo de alguns componentes da dieta e tem o potencial de modificar mediadores pró e anti-inflamatórios circulantes (16,43,52,53).

Lamentavelmente, os pacientes com AR apresentam muitas vezes qualidade alimentar insatisfatória e uma dieta mais pobre, com elevado consumo de gordura saturada e baixa ingestão de micronutrientes, quando comparado com grupos de controlo de estudos observacionais. A má qualidade da dieta está associada a uma rigidez matinal mais duradoura, mais incapacidades funcionais, stress oxidativo, inflamação, disbiose e aumento do risco de comorbilidades (42,53,54).

Dieta Mediterrânea e a AR

Os benefícios da DM estão devidamente fundamentados (55). A DM é frequentemente recomendada para pacientes com doenças inflamatórias crónicas, pois possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes com potencial para modular vias inflamatórias e a microbiota intestinal (56). A DM constitui um conjunto de conhecimentos, práticas e tradições, incluindo culturas, colheita, pesca, conservação, processamento, preparação, confeção e, em particular, o consumo de alimentos. Caracteriza-se por um modelo alimentar constituído maioritariamente por azeite, cereais integrais, fruta e vegetais, uma quantidade moderada de peixe, lacticínios e carnes (principalmente carnes vermelhas), e muitos condimentos e especiarias, acompanhados de vinho, infusões de ervas sem açúcar e chá, redução de sódio e com baixo teor de gordura (57).

Está bem estabelecido que a DM pode modular as funções imunitárias, em particular, através do tipo de ácidos gordos (AG) consumidos no peixe, azeite, frutos oleaginosos e sementes (58). Ao alterar a composição da membrana e a sua interação com enzimas e recetores ligados à membrana, os AG são capazes de modular as funções de linfócitos e monócitos, que estão crucialmente envolvidas na imunidade adaptativa e inata (59).

Vários estudos investigaram os efeitos dos AG ómega-3 (EPA, DHA) e ómega-6 (ácido glinolénico, ácido dihomo-g-linolénico, ácido araquidónico) no sistema imunitário e em particular na proliferação de linfócitos, secreção de citocinas, atividade de células natural killer (NK) e atividade de linfócitos T citotóxicos. Ácido glinolénico, EPA e DHA são os AG que parecem ter os efeitos imunitários mais eficazes (59). Foi observado, por exemplo, que o DHA diminui a capacidade das células Treg inibirem a proliferação de células T efectoras, reduz a migração de células Treg em direção às quimiocinas e regula negativamente a expressão de recetores de quimiocinas nessas células. Por outro lado, o EPA regula negativamente a resposta do tipo Th1 que está associada a doenças inflamatórias crónicas. Uma menor proliferação de linfócitos e atividade de células NK também foram observadas em relação ao ácido oleico, presente no azeite (57).

Os AG ómega-3 também demonstraram suprimir a ativação das células dendríticas e a resposta imune adaptativa que afeta a função dos linfócitos B, em particular através de modificações na organização da camada lipídica (60).

Mais especificamente na AR, uma análise transversal sobre o aporte de ómega-3 numa coorte de pacientes com AR demonstrou que o marcador de AD (*Disease Activity Score 28*(DAS 28)) foi

significativamente menor entre os indivíduos que consumiam este ácido gordo em maior quantidade (42,61).

Os AG monoinsaturados têm também um efeito benéfico adicional útil para pacientes com AR que têm um risco cardiovascular aumentado em comparação com a população saudável (62).

O consumo de frutas e hortaliças traz diversos benefícios à saúde, que podem estar amplamente relacionados às suas propriedades antioxidantes. A elevada ingestão de vegetais confere um efeito protetor no desenvolvimento de AR, bem como a menor incidência de dor articular, devido ao seu teor em compostos fenólicos (63,64). Além disso, há evidências crescentes que sugerem que os polifenóis melhoram a função da barreira intestinal (65). A ingestão de vegetais de folhas verdes também é recomendada porque são ricos em ácido fólico e, normalmente, são encontrados baixos níveis séricos de ácido fólico em pacientes com AR (63,64).

A fibra dietética, outros hidratos de carbono complexos e políois presentes nas frutas são prebióticos, e, portanto, moduladores da microbiota (32,66). A produção de AG de cadeia curta (AGCCs) é um dos mecanismos propostos pelos quais a microbiota intestinal afeta a diferenciação das células Treg e a inflamação sistêmica (67). AGCCs, particularmente butirato, acetato e propionato, são os principais produtos resultantes da fermentação microbiana de fibras alimentares e a sua quantidade também é superior quando há maior consumo de polifenóis (68,69). Quando há redução do consumo das fibras fermentáveis, as bactérias mudam para fontes energeticamente menos favoráveis para o crescimento, como aminoácidos ou gorduras alimentares, resultando na redução da atividade de fermentação da microbiota e escassez de AGCCs (67). Os AGCC são uma fonte de energia para as células epiteliais intestinais, tendo um efeito anti-inflamatório indireto, melhorando as *tight junctions* e aumentando a função da barreira intestinal (70). O butirato é a fonte de energia preferida para os colonócitos e é consumido localmente, enquanto outros AGCC absorvidos vão para a circulação sistêmica. Acredita-se que a acetilação de histonas aumente a acessibilidade à maquinaria de transcrição, para promover a transcrição de genes. O butirato e o propionato são reconhecidos inibidores da histona desacetilase. Por meio desse mecanismo, os AGCC podem atuar como moléculas anti-inflamatórias sistêmicas ou imunossupressoras. Apesar da baixa concentração na periferia, o propionato e o butirato afetam os órgãos periféricos indiretamente pela ativação dos sistemas hormonal e nervoso (67). Diferentes estudos relataram que uma maior adesão à DM está associada a uma microbiota mais diversificada e níveis mais altos de AGCCs fecais (71,72).

O consumo moderado de álcool (especialmente vinho tinto) está associado a um risco reduzido de desenvolver AR, no controle dos sintomas e na qualidade de vida em pacientes com AR. Confirma-se pela evidência científica uma associação do consumo de álcool e redução da inflamação na AR. O benefício da ingestão de quantidades baixas a moderadas de álcool durante um longo período de tempo (anos) resultou de um efeito direto nas células THF, e demonstrou diminuir os níveis de TNF- α , IL-1 e PCR (73,74).

Estudos em modelos animais e em células humanas mostraram um efeito do sódio nas células Th17 e na promoção da inflamação. Além disso, há evidências de que o aumento do consumo de sódio ativa macrófagos pró-inflamatórios, afeta a diferenciação de células Th17 e diminui as Tregs, todos atores cruciais na patogênese da AR, o que demonstra o seu efeito pró-artrítico. O alto consumo de sal também parece estar correlacionado com a inibição da secreção de células Treg responsáveis pela tolerância a autoantígenos (75). A ingestão excessiva de sal também parece fazer com que as Tregs adquiram o fenótipo Th1, Th2 ou Th17. Este mecanismo parece estar relacionado com a cínase SGK1 (cínase 1 regulada por soro/glucocorticoide), que desempenha um papel central em muitas cascatas pró-inflamatórias e em muitos mecanismos reguladores (76).

Embora a investigação no campo das relações dieta-saúde esteja a mudar o seu paradigma e o estudo de padrões alimentares completos esteja a tornar-se mais pertinente, tem-se dado mais relevância ao impacto de componentes específicos da dieta nos resultados relacionados (77). Apenas um pequeno número de ensaios se concentrou na relação entre o padrão alimentar e a AR (56). Existem evidências sugestivas de um impacto positivo da DM nos desfechos relacionados à AR (ou seja, dor, função física, AD). Um grande estudo de caso-controle revelou que o *score* da DM foi inversamente associado ao risco de início da AR. No entanto, esse efeito foi observado apenas entre homens e pacientes soropositivos (78). Outro estudo controlado randomizado mostrou que uma DM

de 12 semanas pode reduzir a AD (principalmente articulações sensíveis e saúde geral), mas não foi capaz de resgatar a função física ou a rigidez matinal (79). Mais recentemente, o estudo ADIRA (*Anti-inflammatory Diet In Rheumatoid Arthritis*) tinha intenção de testar a hipótese de que uma intervenção dietética anti-inflamatória, comparada a uma dieta regular sueca, diminuiria a AD. A dieta anti-inflamatória usada neste estudo cruzado era semelhante à DM usada no paralelo de Sköldstam et al. (45,80), com adição de probióticos, e promoveu uma redução no DAS 28 durante o período de intervenção, no entanto, não foi avaliado o impacto na QV (44). Por fim, o estudo de Diamanti et al. que comparou pacientes com adesão alta e baixa/moderada à DM revelou que o primeiro grupo apresentou menor DAS 28, bem como menor FR (43).

Dieta Anti-inflamatória e a AR

Apesar do supra explanado, a DM ainda não é considerada nas recomendações de tratamento da AR e a evidência sobre o impacto da mesma na AD, na QV e na microbiota de pacientes com AR ainda é insuficiente (13,43,45,56,78). Isto pode dever-se à DM estar destinada à população geral e não incluir determinados pressupostos que se consideram como tendo impacto na patogênese/sintomatologia da AR e na modulação da microbiota intestinal, nomeadamente, a redução da exposição a grandes proteínas no intestino, principalmente o glúten; não haver a especificação dos legumes mais adequados; não limitar o consumo de iogurtes aos enriquecidos com *L. Casei*; e não reforçar do consumo diário de especiarias e sementes específicas (42,53).

O glúten é a principal proteína do trigo, constituindo aproximadamente 80% das proteínas totais deste grão. Não surpreendentemente, os peptídeos de glúten (gliadina e glutenina) também estão contidos noutros cereais, como a cevada e o centeio (81).

O glúten tem sido investigado como uma opção de tratamento para outras condições médicas para além da doença celíaca (82). Múltiplos aspetos prejudiciais do glúten afetam a saúde humana, incluindo manifestações digestivas e extradigestivas dependentes de reações mediadas pelo glúten potencialmente imunitárias ou tóxicas que induzem a alterações gastrointestinais. O glúten afeta a microbiota e aumenta a permeabilidade intestinal (83).

A gliadina é um substrato ideal para a transglutaminase tecidual endógena e a transglutaminase microbiana exógena, ambas pertencentes à família das transglutaminases. O glúten é rico em glutamina e lisina e, portanto, um possível substrato para modificação pós-traducional de proteínas pela transglutaminase. Ambas as enzimas são capazes de desamidar ou realizar a ligação cruzada de peptídeos de glúten a vários outros peptídeos, transformando assim autoproteínas inócuas em imunogénicas. É importante ressaltar que a transglutaminase microbiana luminal, derivada de alimentos processados, ou da microbiota alterada (disbiose), é uma das principais causas de modificação pós-traducional da gliadina ou de outras proteínas virgens (84).

A desamidação da gliadina pela transglutaminase tecidual ou microbiana demonstrou aumentar o reconhecimento de peptídeos de gliadina pelas células T, podendo iniciar uma cascata de reações autoimunes que são finalmente responsáveis pela destruição da mucosa através da produção de citocinas e metaloproteínases de matriz. Essas reações implicam que a gliadina e/ou seus peptídeos de degradação atravessem a barreira epitelial intestinal e atinjam a lâmina própria da mucosa intestinal onde são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos. Sob circunstâncias fisiológicas, a barreira epitelial intestinal é descrita como sendo quase impermeável a macromoléculas. A gliadina induz a libertação de zonulina, que aumenta a permeabilidade das junções apertadas (85).

Para além disso, o glúten aumenta o stress oxidativo, afeta as modificações epigenéticas, é imunogénico, citotóxico e pró-inflamatório (interfere nos mecanismos antioxidantes). A ingestão de glúten aumenta a apoptose e diminui a viabilidade e diferenciação celular (83).

Verifica-se uma base genética compartilhada para a doença celíaca e a AR, tornando, assim, lógica a associação entre as manifestações reumáticas e a doença celíaca, bem como os sintomas

gastrointestinais em doentes com AR. Esses genes são cruciais para a ativação e regulação da imunidade adaptativa e inata (86). Verifica-se um efeito protetor da remoção do glúten na incidência cumulativa de doenças autoimunes adicionais em pacientes com doença celíaca, bem como na melhoria das manifestações reumáticas celíacas (87). De facto, modificações na dieta com remoção do glúten tiveram benefícios clínicos em pacientes com AR que podem resultar de imunorreatividade reduzida a antígenos alimentares que são eliminados por uma dieta restrita. Uma dieta *vegan* sem glúten em pacientes com AR levou a alterações que são potencialmente arteroprotetoras e anti-inflamatórias (88). É importante notar que as células T específicas do glúten restritas ao ALH DQ2/8 migraram da mucosa entérica para o sangue periférico após a provocação com glúten, indicando assim um mecanismo adicional de patologia articular na doença celíaca e sugerindo uma base para o benefício de dietas sem glúten (83).

No que toca aos hortícolas, os que estão entre os que podem piorar os sintomas da AR são os tomates, os pimentos, as beringelas e as batatas. A literatura mostra que pacientes com AR relatam um agravamento dos sintomas após a ingestão dos mesmos (64). Estes alimentos contêm solanina, um glicoalcalóide, que aumenta a permeabilidade intestinal e pode ser prejudicial para patologias artríticas (89,90).

As grandes proteínas dos laticínios não são completamente digeridas e podem alimentar bactérias proteolíticas, levando à produção de metabolitos pró-inflamatórios (91). No entanto, estudos de consumo de laticínios demonstram que os produtos lácteos, principalmente os iogurtes, têm um efeito neutro ou inverso nos níveis de biomarcadores inflamatórios circulantes. Os laticínios contêm um alto teor de AG saturados, mas também muitos dos AGCC encontrados na gordura do leite. Estes últimos têm efeitos benéficos à saúde, com importantes funções de resposta imune. Há também evidências de que as proteínas, gorduras e cálcio são benéficas na inflamação. Portanto, a eliminação total de laticínios da dieta não é recomendada para controlo dos sintomas na AR, sendo que os com maior interesse são os iogurtes, principalmente os enriquecidos com *Lactobacillus casei* (*L. casei*) (92).

Os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro” pela *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (93). Os probióticos não apenas equilibram a microbiota intestinal a favor das bactérias saudáveis, mas também têm sido sugeridos por serem benéficos na prevenção ou melhoria de um grande número de patologias (94). A regulação do sistema imunitário está entre os benefícios mais documentados de bactérias probióticas. Os resultados dos muitos estudos realizados a este respeito revelaram que os probióticos não apenas estimulam o sistema imunitário localmente, mas também afetam sistemicamente as respostas imunes inatas e adaptativas (94). Além disso, foi demonstrado que esses os microrganismos afetam as respostas imunes de uma maneira específica dependendo da estirpe; alguns estimulam o sistema imunitário o que os torna aplicáveis em pacientes que sofrem de desequilíbrios imunitários, e alguns regulam respostas imunitárias e podendo ajudar os pacientes com AR. Os *L. casei* estão entre as poucas bactérias de ácido láctico conhecidas que são usadas como probióticos e têm sido frequentemente descritas como tendo efeitos imunorreguladores nos estudos em animais e humanos (95).

As especiarias (gengibre, curcuma, canela e pimenta) são ricas em compostos fitoquímicos importantes que podem atenuar o stress oxidativo e a inflamação (inibição de citocinas: IL-2, IL-4 e IFN- γ e redução da concentração de TNF- α), modulando a resposta imune e aliviando os sintomas da AR. Estudos em modelos animais de AR mostram uma redução do dano dos tecidos e das complicações hematológicas, metabólicas e cardiovasculares (96–98). Estas especiarias também apresentam efeito na redução da permeabilidade intestinal (99). Apesar dos múltiplos efeitos protetores dos polifenóis contidos nas especiarias, não há recomendações dietéticas específicas (96–98).

As sementes de linhaça têm várias substâncias vegetais bioativas, sendo ricas fontes de AG ómega-3: ácido α -linolénico (ALA), AG polinsaturados, fibras solúveis e insolúveis: lignanas fitoestrogénicas, proteínas (glutamato/glutamina, arginina, aminoácidos de cadeia ramificada (valina e leucina) e aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina)), compostos fenólicos, vitaminas (A, C e E) e minerais (Fósforo, Magnésio, Potássio, Sódio, Ferro, Cobre, Manganês e Zinco) (100).

Tal como as sementes de linhaça, as sementes de chia são uma fonte natural de antioxidantes e são ricas em ALA. Como o organismo não pode sintetizar ALA, a chia tem um papel recém-descoberto na dieta. O óleo e mucilagem da semente de chia atenuaram o TNF- α e o inchaço da pata, melhoraram o perfil lipídico e diminuíram o stress oxidativo tanto em ratos obesos quanto não obesos mostrando efeitos anti-inflamatórios na artrite (101). Em suma, a ingestão de sementes de linhaça ou chia pode ser um suporte útil para a ingestão de quantidades adequadas de AG polinsaturados (101). .

Tendo por base o descrito e apesar do grande número de publicações sobre o efeito de diferentes alimentos na microbiota intestinal e inflamação, e mostrando uma associação entre má qualidade da dieta e inflamação em pacientes com AR, são escassos os estudos de intervenção que estudaram o potencial co-terapêutico de uma dieta especificamente delineada, que combine todos os componentes com efeito anti-inflamatório com impacto na melhoria dos sintomas da AR e na modulação da microbiota intestinal.

Objetivos

Objetivo principal

O objetivo principal do presente estudo foi averiguar o efeito de uma dieta anti-inflamatória (DAI), em comparação com uma dieta controlo (Dieta Mediterrânea- DM), na atividade da doença (AD) e na melhoria da qualidade de vida (QV) de pacientes com AR.

Objetivos secundários

Pretendeu-se ainda estudar a relação da DAI com os marcadores clínicos e antropométricos, e com a modulação da composição da microbiota intestinal, em comparação com a DM, nesta população.

Metodologia

Este ensaio clínico randomizado controlado paralelo foi realizado em pacientes com AR diagnosticada segundo as Diretrizes da Sociedade Portuguesa de Reumatologia e normas da Direção Geral da Saúde, e que eram atendidos em ambulatório na consulta de doenças autoimunes do Hospital Particular do Algarve (HPA).

A intervenção dietética baseou-se na combinação de itens alimentares individuais com efeitos em diferentes sintomas/patogénese da AR. O estudo avaliou o potencial adjuvante de tratamento de uma dieta baseada numa combinação de conceitos funcionais que se potenciam uns aos outros com os seus efeitos anti-inflamatórios. Embora a intervenção dietética não possa ter sido cega, os dois grupos foram tratados da forma mais semelhante possível, exceto pelo conteúdo da dieta (42,53).

O protocolo de atuação durante a intervenção encontra-se descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo de intervenção

Pré-intervenção	Intervenção em ambos os grupos (15 semanas)	Pós-intervenção
- Elegibilidade dos participantes - Aquisição do consentimento informado - Randomização/Alocação - Recolha de dados demográficos - Recolha de dados/marcadores bioquímicos - Recolha do DAS 28 - Aplicação do <i>Health Assessment Questionnaire</i> (HAQ) - Recolha da amostra de fezes	- Recolha de dados antropométricos - Educação para a dieta - Monitorização da adesão presencial de cinco em cinco semanas: recordatório das 24 horas anteriores e diário alimentar de cinco dias aleatórios das cinco semanas	- Recolha de dados/marcadores bioquímicos - Recolha de dados antropométricos - Recolha do DAS 28 - Aplicação do HAQ - Recolha da amostra de fezes

Seleção de participante e amostra final

Os doentes com AR foram informados pelo médico assistente da existência do estudo (quando cumpriam os critérios de inclusão e exclusão).

Critérios de inclusão:

- Idade superior a 18 anos e alfabetização;
- Presença de doença ativa, ou seja, DAS 28 $\geq$ 2,6, sob controlo e medicação adequados;
- Preenchimento do consentimento informado.

Critérios de exclusão:

- Qualquer tipo de deficiência psicológica, demência ou distúrbio alimentar;

- Presença de alergias e/ou intolerâncias alimentares;
- Ser vegetariano ou usar fitoterapia ou outros suplementos (nomeadamente, pré e probióticos);
- Ter tido acompanhamento nutricional anterior ou alteração de hábitos alimentares nos últimos 6 meses.

Foram contactados por via telefónica 45 doentes entre abril e maio de 2021, onde foram esclarecidos acerca do objetivo do ensaio, inconvenientes e condições em que o mesmo ia ser realizado. Foram também informados que, a qualquer momento, poderiam desistir sem qualquer consequência relativamente ao seu acompanhamento assistencial.

Foi solicitado o preenchimento do consentimento informado (anexo 1) e fornecido um kit (EasySampler®) para a recolha da amostra de fezes inicial. Durante a fase de seleção dos participantes, presenciou-se a desistência de 16 doentes, restando 29 indivíduos para este estudo de desenho paralelo com 2 intervenções (Figura 2). Os desistentes não foram incluídos na base de dados do estudo.

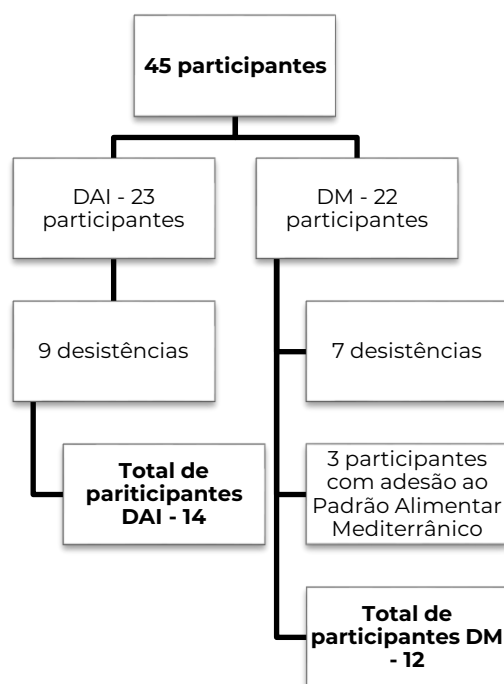


Figura 2 - Fluxograma dos participantes. DAI – Dieta Anti-inflamatória; DM – Dieta Mediterrânea.

Aspetos éticos

O estudo foi realizado com o parecer favorável da Comissão de Ética da *Nova Medical School* – Faculdade de Ciências Médicas e do Grupo HPA Saúde (Anexo 2 e 3, respetivamente). Mais importa ressaltar que foi registado numa base de dados de acesso público – clinicaltrials.gov com número NCT05336513 (anexo 4) e foram tomadas todas as precauções no sentido do respeito da privacidade dos participantes de acordo com a Declaração de Helsínquia, Lei da Investigação Clínica (Lei no 21/2014) e o novo Regulamento Geral de Proteção de Dados publicado a 4 de Maio de 2016 no Jornal Oficial da União Europeia.

Métodos, instrumentos e procedimentos

Os participantes recrutados, após assinatura do consentimento informado, foram randomizados/aleados (recurso a programa informático Excel®) para uma das duas dietas e contactados para agendar a consulta de nutrição inicial. Antes da intervenção dietética foram recolhidas amostras de sangue para a determinação de marcadores bioquímicos (PCR; Velocidade de sedimentação eritrocitária – VSE, FR e APCC), aplicado o DAS 28 na sequência da consulta com o médico assistente, e foi registada a terapêutica farmacológica.

O DAS 28 é uma ferramenta validada que inclui a contagem articular de 28 articulações dolorosas (ADO), 28 articulações edemaciadas (AE), a VSE e a escala de dor (ED) (medida de 0 a 100). Todas as variáveis são incluídas no cálculo: $DAS\ 28 = 0,56 \times \sqrt{ADO} + 0,28 \times \sqrt{AE} + 0,70 \times \ln(VSE) + 0,014 \times ED$. O cálculo fornece uma medida contínua, sendo que quanto mais alto é o valor, maior é a AD no momento da avaliação (102). É classificado como baixo quando $<3,2$ e moderado/alto quando $\geq 3,2$ (103).

As consultas de nutrição para a realização da educação alimentar tiveram início em julho de 2021. Na primeira consulta de nutrição foi solicitada a entrega da amostra de fezes. Também foi aplicado o HAQ (anexo 5). O HAQ avalia a capacidade funcional de um doente com AR e o impacto da doença no quotidiano e na QV do mesmo. É simples, autoaplicável e classifica a dificuldade de realizar uma determinada tarefa em graus, como por exemplo, arranjar-se, levantar-se, comer, andar, ... – sem qualquer dificuldade (0 pontos), com alguma dificuldade (1 ponto), com muita dificuldade (2 pontos) ou incapaz de o fazer (3 pontos). O HAQ consiste em 20 perguntas e é dividido em oito áreas das atividades de vida diárias dos doentes: arranjar-se, levantar, comer, andar, higiene, alcançar, pegar e atividades. Aceita-se o maior valor de cada domínio, somam-se estes valores e divide-se o total por oito. Quanto maior a pontuação, menor a QV do doente (104).

A consulta de nutrição inicial foi conduzida por uma nutricionista, membro efetivo da Ordem dos Nutricionistas, onde foi aplicado um questionário sobre dados sociodemográficos e de estilo de vida, foi aferido o peso utilizando uma *Tanita® BC-601* e registada a altura, em metros, reportada pelo participante. Foi realizada uma educação alimentar por forma a capacitar os participantes para a realização da dieta correspondente. Recorreu-se a materiais auxiliares, bem como ao fornecimento de um plano alimentar para exemplificar a aplicação das instruções fornecidas. Os planos alimentares, em ambas as dietas, tinham entre 25 a 30 kcal/kg peso/dia (42). Podem ver-se dois exemplares nos anexos 6 e 7.

Nos participantes com Índice de Massa Corporal (IMC) ≥ 25 , a intervenção também incluiu a redução de peso uma vez que o excesso de peso está associado à alta incidência de patologias autoimunes, como a AR (42). Nestes indivíduos aplicou-se uma restrição calórica de 500 kcal.

A intervenção dietética da DAI baseou-se nas recomendações apresentadas na tabela 2 (42,53).

Tabela 2 - Intervenção dietética Dieta Anti-Inflamatória

Recomendações principais	Com base em... (Porquê)	Implementação dietética (Como)
<u>- Reduzir o rácio de $\omega 6/3$ (2:1)</u> <u>- Aumentar a ingestão de AG monoinsaturados</u> <u>- Diminuir a ingestão de AG trans e saturados (presente na carne vermelha, alimentos processados, ...)</u>	Um rácio baixo de $\omega 6/3$ reduz a inflamação e melhora os sintomas de autoimunidade. Os AG monoinsaturados têm efeito benéfico/protetor na AR. As gorduras trans aumentam os marcadores inflamatórios e os AG saturados aumentam a inflamação.	- Azeite virgem extra (10ml/2 x/dia). - Frutos oleaginosos (30g/dia). - Peixes gordos 3 x/semana (150g). - Ingestão diária de sementes de chia(10g) e de linhaça (9g). - Evitar alimentos pré-confeccionados, processados e fritos.
<u>- Aumentar a ingestão de prébióticos</u> <u>- Ingestão diária de</u>	A fibra alimentar é um prébiótico que modula a microbiota intestinal e aumenta a produção	- 5 porções de hortofrutícolas/dia – 3 frutas e 2 hortícolas. Dentro dos

<u>probióticos</u>	de AGCC que melhoram a imunidade. Os probióticos, incluídos, por exemplo, no iogurte, reduzem os níveis de citocinas pró-inflamatórias e melhoram a AD na AR.	hortícolas, privilegiar os de folha verde e as crucíferas. - 3 porções /dia de grãos integrais, exceto com glúten, e evitar farinhas refinadas. - Iogurte enriquecidos com <i>L. Casei</i> , 2 porções/dia (125g).
<u>- Reduzir a exposição a grandes proteínas no intestino</u>	As grandes proteínas dos laticínios não são completamente digeridas e podem alimentar bactérias proteolíticas. O glúten tem sido associado ao aumento da permeabilidade intestinal e alteração na quantidade/diversidade da microbiota, stress oxidativo e alteração dos processos epigenéticos. Para além disso, o trigo e o centeio apresentam xilanos e xiloglicanos. O homem não consegue digeri-los e parece que a responsável pela sua degradação é a <i>Prevotella copri</i> .	- Substituir o leite por bebidas vegetais (amêndoa, arroz, coco, ...). - O queijo fresco magro deverá ser consumido 2 porções/semana (100g). - Iogurte com <i>L. Casei</i> entre outras espécies, 2 porções/dia (125g). - Evitar o consumo de cereais com glúten. - Preferir aveia, milho, arroz, trigo sarraceno e quinoa.
<u>- Condimentos com propriedades anti-inflamatórias</u> <u>- Eliminar o sal</u>	A curcuma, canela, pimenta preta e gengibre têm ações antioxidantes e anti-inflamatórias. A alta ingestão de sal está associada ao risco de AR e tem sido relacionada à autoimunidade.	- Temperar diariamente com curcuma, canela, pimenta preta e gengibre. Curcuma e pimenta preta devem ser usados ao mesmo tempo. - Eliminar a ingestão de alimentos processados e pré-confeccionados.
<u>- Reduzir o consumo de vegetais <i>solanaceae</i></u>	Os vegetais <i>solanaceae</i> contêm glicoalcalóides, que afetam a permeabilidade intestinal. Os vegetais com alto teor de fitoquímicos foram sugeridos como tendo propriedades anti-inflamatórias.	- Evitar o consumo de beringela, tomate e batata, e aumentar o consumo de alho, cebola, cenoura, abóbora, curgete ou vegetais de folha verde.
<u>- Diminuir o consumo de carnes vermelhas</u>	As carnes vermelhas contêm altos níveis de colina, que é o precursor do metabólito inflamatório N-óxido de trimetilamina, e AG saturados. - As leguminosas são ricas em fibra, amido, proteínas e compostos fenólicos com comprovado potencial antioxidante e anti-inflamatório.	- Reduzir o consumo de carnes vermelhas até 1 porção/semana (100g). - Substituir o seu consumo por leguminosas (feijão, lentilhas ou grão) – 50g secas ou 100g frescas, aves – 100g e peixes- 150g - 3 porções/ semana cada. Os ovos podem ser consumidos numa porção de 2 unidades, 1 x/ semana.
<u>- Evitar açúcares, alimentos açucarados e bebidas açucaradas.</u> <u>- Evitar adoçantes/edulcorantes.</u>	Alimentos e bebidas açucaradas estão associados à obesidade, alterações da microbiota e inflamação de baixo grau.	- Substituir o açúcar pelo mel. - Evitar refrigerantes e sumos.
<u>- Consumir moderadamente o café.</u>	A ingestão de café não se correlaciona com o risco de AR, nem com os sintomas. O chá verde contém polifenóis que diminuem as citocinas pró-inflamatórias em modelos animais	- Limitar o consumo de cafeína a um máximo de 300mg/dia. Ou seja, cerca de 3 cafés curtos por dia. - Se possível, substituir o café por chá verde.

e in vitro de AR.		
- <u>Aumentar a ingestão de antioxidantes, vitaminas fitoquímicas e flavonóides</u>	Antioxidantes, fitoquímicos, flavonóides e vitaminas têm propriedades anti-inflamatórias. Podem inibir enzimas regulatórias ou fatores de transcrição importantes para controlar a inflamação.	- Vegetais (principalmente de folha verde), frutas e cereais integrais contêm grandes quantidades de antioxidantes, vitaminas fitoquímicas e flavonóides.
- <u>Consumir moderadamente bebidas alcoólicas</u>	A ingestão de quantidades baixas a moderadas de álcool durante um longo período de tempo (anos) demonstrou diminuir os níveis de TNF- α , IL-1 e PCR.	- O consumo de vinho tinto está indicado até 1 porção/dia – 125ml.
AG - Ácidos gordos; AR – Artrite Reumatóide; TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa; IL - Interleucina		

A dieta controlo baseou-se na “Nova Roda dos Alimentos” seguindo os princípios da DM. Os indivíduos onde foi aplicada esta última dieta, não podiam ter uma adesão prévia à DM. Esta adesão foi avaliada com recurso ao questionário PREDIMED que foi aplicado após a randomização da amostra pelas dietas (105).

Foi encorajada a prática de atividade física regular, se autorizada pelo médico assistente.

A intervenção teve a duração de quinze semanas, e para garantir a maior retenção/adesão dos participantes, foram realizadas consultas de nutrição com intervalos de cinco semanas. Nessas consultas, foi aplicado um recordatório às 24 horas anteriores, recolhido um diário alimentar de cinco dias aleatórios das cinco semanas (exemplo no anexo 8), realizada a pesagem, registadas todas as alterações medicamentosas e dos marcadores bioquímicos, e fornecido um novo plano alimentar, reforçando os pressupostos necessários a cumprir em cada dieta.

Durante o estudo, os participantes puderam entrar em contato com a nutricionista sempre que necessário por via telefónica.

As consultas de nutrição terminaram em dezembro de 2021, sendo que após a intervenção dietética foram recolhidos os mesmos dados do início do estudo (tabela 1).

Colheita das amostras, extração e quantificação de DNA, e sequenciação e análise do gene 16S rRNA bacteriano

As amostras fecais foram recolhidas pelos participantes, conforme indicado no kit EasySampler®, em tubos estéreis contendo *RNAlater*. As mesmas foram processadas para extração e purificação de DNA genómico microbiano usando o *NZY Tissue gDNA Isolation kit* ((NZYtech, Lisboa, Portugal), conforme descrito anteriormente por Marques et al (106).

As bibliotecas foram processadas e sequenciadas seguindo o protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina* (Illumina; San Diego, CA, EUA). O conjunto de *primers* (*primers* 515F: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA; 806R: GGACTACNVGGGTWTCTAAT) foi usado para capturar a região V3-V4 do gene 16S rRNA bacteriano. As amostras carregadas no sistema *Illumina MiSeq* e sequenciadas usando uma abordagem multiplex 280 numa corrida de 2 × 250 bp, de acordo com os procedimentos do fabricante (107). O tratamento dos dados de *metabarcoding* obtidos, bem como todas as análises taxonómicas, foram realizados com o *software mothur* v.1.46.1 (108). De forma resumida, todas as sequências de baixa qualidade e quiméricas foram detetadas e removidas do conjunto de dados com o *software VSEARCH* (109). De seguida, as sequências restantes foram agrupadas em unidades taxonómicas operacionais com 97% de semelhança, utilizando a ferramenta *OptiClust* (110), sendo posteriormente classificadas contra a

base de dados taxonómica ARB-Silva v.138.1 (SSU - 16S) (111), usando o classificador RDP (112). Por fim, a ferramenta *MicrobiomeAnalyst* foi utilizada para realizar todas as análises visuais, comparativas e estatísticas adicionais (113,114).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software *SPSS®* versão 27 (*IBM SPSS Statistics, IBM Corporation, Armonk, NY, EUA*).

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste *t-student* e teste de *Mann-Whitney* conforme apropriados em função da distribuição das variáveis. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste X^2 de *Pearson*.

Um modelo linear misto *ANCOVA* foi usado para a análise principal da variação de VSE, PCR, FR, DAS 28, HAQ e IMC. O tratamento (intervenção DAI ou DM) foi incluído como efeito fixo. A Idade, sexo, IMC na linha de base, escolaridade, hábitos tabágicos e tipo de medicação foram considerados potenciais fatores de confusão e, portanto, foram incluídos como co variáveis. No entanto, nenhuma dessas variáveis apresentou qualquer efeito de confusão (definido como uma mudança na estimativa β de $\geq 10\%$) e, portanto, não foram incluídas no modelo principal. Todas as análises foram realizadas com os valores transformados.

As diferenças entre a diversidade *beta* nas intervenções foram avaliadas recorrendo ao teste *PERMANOVA* e as correlações entre o DAS 28 e o IMC, e a microbiota (filó e género) e os marcadores clínicos após 15 semanas de intervenção foram analisadas pela correlação de *Pearson*.

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), número da amostra (n), percentagem e intervalo de confiança a 95% (IC). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Caracterização da amostra no início do estudo

A população em estudo era representada por 26 participantes com diagnóstico de AR e presença de doença ativa, sendo 22 do sexo feminino e 4 do sexo masculino. Como se pode verificar através da observação da tabela 3, a maioria dos participantes da amostra era casado ou vivia em união de facto, tinha o ensino secundário e encontrava-se a trabalhar.

Os participantes tinham idades compreendidas entre 18 e 74 anos, constituindo uma média de 54 anos $\pm$ 12,1 anos. A 14 participantes foi aplicada a dieta DAI e a 12 participantes a dieta DM. Desta população, 15 participantes faziam TB e 11 MAMD.

Dos 26 participantes, apenas 6 eram fumadores e no que diz respeito à relação entre o peso e a altura, os participantes apresentavam um IMC médio de $28,1 \pm 5,9$ Kg/m², correspondendo a excesso de peso.

Antes da intervenção, os participantes apresentavam valores médios iniciais de VSE, PCR, FR, DAS 28 e HAQ, de $15 \pm 14,6$ mm/1a hora, $0,8 \pm 1,4$ mg/dL, $153,6 \pm 254,3$ UI/mL, $4,9 \pm 0,7$, $0,6 \pm 0,5$, respetivamente, e apenas 5 participantes apresentavam APCCs positivos (tabela 3). Relativamente à classificação de DAS 28, o seu valor médio correspondia a uma atividade moderada da doença (115).

Tabela 3 - Características sociodemográficas, clínicas e antropométricas iniciais dos participantes

Caraterização da amostra (n=26)		
Sexo, n	Feminino	22
	Masculino	4
Estado Civil, n	Solteiro	2
	Casado/União de facto	17
	Divorciado	4
	Viúvo	3
Grau de escolaridade, n	Primeiro ciclo	4
	Segundo ciclo	3
	Ensino secundário	10
	Licenciatura	5
	Pós-graduação	1
	Mestrado	3
	Estudante	1
Situação profissional, n	No ativo	16
	Sem ocupação profissional	2
	Reformado	7
Idade, em anos (média $\pm$ DP)		54 anos $\pm$ 12,1
Tipo de medicação, n	Biológico	15
	MAMD	11
Tipo de Dieta, n	DAI	14
	DM	12
Fumadores, n		6
IMC kg/m ² (média $\pm$ DP)		$28,1 \pm 5,9$
VSE (média $\pm$ DP)		$15 \pm 14,6$
PCR (média $\pm$ DP)		$0,8 \pm 1,4$
FR (média $\pm$ DP)		$153,6 \pm 254,3$

APCCs positivos, n	5
DAS 28 (média ± DP)	4,9 ± 0,7
HAQ (média ± DP)	0,6 ± 0,5

Dados expressos por n, Número; média ± DP, Desvio Padrão.

MAMD - Medicamentos Antirreumáticos Modificadores da Doença; DAI - Dieta Anti-inflamatória; DM, - Dieta Mediterrânea; IMC - Índice de Massa Corporal; VSE - Velocidade de Sedimentação Eritrocitária; PCR - Proteína C Reativa; FR - Fator Reumatóide; APCCs - Anticorpos Anti-péptido Cíclico Citrulinado; DAS 28 - *Disease Activity Score 28*; HAQ - *Health Assessment Questionnaire*

Caraterização da amostra entre dietas no início e fim do estudo

Considerando a tabela 4, pôde verificar-se que os participantes das duas dietas apresentavam características semelhantes (idade, sexo, tipo de medicação e hábitos tabágicos). Relativamente aos parâmetros analíticos, VSE, PCR, FR, APCCs, DAS 28, pontuação de HAQ e IMC, verificou-se que no início do estudo os participantes não apresentavam diferenças entre eles, comprovando-se a homogeneidade da amostra recrutada.

Tabela 4 - Características demográficas, clínicas e antropométricas dos participantes entre dietas

		DAI		DM		<i>p</i> ^a		
Sexo, n	Feminino	11		11		0,366		
	Masculino	3		1				
Idade, em anos (média ± DP)		52 ± 10		56 ± 15		0,385		
Tipo de medicação, n	Biológico	9		6		0,471		
	MAMD	5		6				
Fumadores, n		3		3		0,838		
		Inicial	Final	<i>p</i> ^b I vs F	Inicial	Final	<i>p</i> ^b I vs F	<i>p</i> ^c entre início DAI e início DM
VSE (média ± DP)		14,2 ± 12,4	14,6 ± 13,1	0,903	15,92 ±17,4	21,5 ± 21,3	0,072	0,774
PCR (média ± DP)		0,5 ± 1	1 ± 1,6	0,135	1,1 ± 1,6	1,2 ± 1,6	<0,001	0,318
FR (média ± DP)		151,9 ± 302,4	72,7 ± 115,5	0,208	155,8 ± 188,6	99,9 ± 137,92	0,053	0,975
APCCs positivos, n		3	-	-	2	-	-	0,840
DAS 28 (média ± DP)		5 ± 0,73	3,7 ± 0,6	0,001	4,8 ± 0,7	4 ± 0,7	0,219	0,485
HAQ (média ± DP)		0,5 ± 0,4	0,3 ± 0,4	0,038	0,7 ± 0,6	0,5 ± 0,4	0,045	0,236
IMC (média ± DP)		28,7 ± 6,8	28,2 ± 6,8	0,067	27,4 ± 5,0	26,5 ± 4,5	<0,001	0,607
Categorização IMC, %	Baixo peso	7,1	7,1	-	0	0	-	-
	Peso adequado	14,3	21,4	-	25	41,7	-	-
	Pré-obesidade	50	42,9	-	41,7	25	-	-
	Obesidade	28,6	28,6	-	33,3	33,3	-	-

Dados expressos por n, Número; média ± DP, Desvio Padrão; %, Percentagem.

As diferenças médias entre resultados foram avaliadas recorrendo ao teste *t-student* e *X2 de Pearson*, e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando *p* < 0,05. *p*^a DAI vs DM; *p*^b I vs F; *p*^c início DAI vs início DM.

DAI - Dieta Anti-inflamatória; DM - Dieta Mediterrânea; MAMD - Medicamentos Antirreumáticos Modificadores da Doença; I- Inicial; F- Final; VSE - Velocidade de Sedimentação Eritrocitária; PCR - Proteína C Reativa; FR - Fator Reumatóide; APCCs - Anticorpos Anti-péptido Cíclico Citrulinado; DAS 28 - *Disease Activity Score 28*; HAQ - *Health Assessment Questionnaire*; IMC - Índice de Massa Corporal;

Após quinze semanas de intervenção, no que diz respeito às mudanças nos marcadores clínicos e antropométricos, em ambas as intervenções dietéticas verificaram-se reduções estatisticamente significativas. A aplicação da DAI levou a uma melhoria clínica e de QV, uma vez que se verificou uma diminuição do DAS 28 e da pontuação do HAQ. Quanto à DM, constatou-se uma diminuição no IMC e da pontuação do HAQ.

Efeito da dieta nos marcadores clínicos, antropométricos e de QV entre dietas

No fim da intervenção dietética, avaliaram-se novamente os parâmetros bioquímicos, antropométricos e pontuação de HAQ para verificar se houve alteração da AD, QV e composição corporal.

Usando o modelo de análise linear misto ANCOVA, constatou-se que havia uma maior tendência para a redução do FR e DAS 28 com a DAI em comparação com a DM (tabela 5). Com a DM obteve-se uma maior tendência para a redução do IMC. No entanto, estas diferenças entre dietas não se mostraram estatisticamente significativas. No que diz respeito à pontuação do HAQ, ambas as intervenções levaram a uma redução média semelhante.

Tabela 5 - Diferença dos marcadores clínicos e antropométricos entre o fim e início da intervenção para ambas as dietas

	DAI	DM	<i>p-value</i> <i>a</i>
Diferença VSE, média (IC a 95%)	-0,177 (-6,831;7,185)	-6,207 (-13,826;1,412)	0,229
Diferença PCR, média (IC a 95%)	-0,466 (-1,075;0,144)	-0,054 (-0,724;0,617)	0,380
Diferença FR, média (IC a 95%)	126,287 (- 6,496;259,068)	33,793 (- 133,819;201,404)	0,365
Diferença DAS 28, média (IC a 95%)	1,286 (0,648;1,925)	0,841 (0,147-1;535)	0,353
Diferença HAQ, média (IC a 95%)	0,208 (-0,034;0,450)	0,184 (-0,079;0,447)	0,895
Diferença IMC, média (IC a 95%)	0,610 (0,070;1,151)	0,856 (0,280;1,443)	0,384

Dados expressos por média e IC, Intervalo de confiança a 95%

As diferenças médias controladas foram obtidas recorrendo ao modelo de análise linear misto ANCOVA, e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. p^a DAI vs DM.

DAI - Dieta Anti-inflamatória; DM - Dieta Mediterrânea; MAMD - Medicamentos Antirreumáticos Modificadores da Doença; IMC - Índice de Massa Corporal; VSE - Velocidade de Sedimentação Eritrocitária; PCR - Proteína C Reativa; FR - Fator Reumatóide; DAS 28 - *Disease Activity Score 28*; HAQ - *Health Assessment Questionnaire*

a - valor de p relativamente às diferenças iniciais e finais dos marcadores clínicos e antropométricos entre dietas.

Para averiguar a resposta dos participantes à intervenção, foram aplicados os critérios da *European Alliance of Associations for Rheumatology* (EULAR) para ensaios clínicos. Nenhuma resposta é definida como uma redução no DAS 28 $\leq 0,6$ unidades, ou $>0,6$ a $\leq 1,2$ unidades combinada com DAS 28 $> 5,1$ após o tratamento. A resposta moderada é definida como uma redução de $>0,6$ a $\leq 1,2$ unidades em combinação com DAS 28 $\leq 5,1$ ou uma redução de $>1,2$ unidades em combinação com DAS 28 $> 3,2$. Finalmente, uma boa resposta é definida como uma redução de $>1,2$ unidades em combinação com um DAS 28 $\leq 3,2$. Posto isto, podemos concluir que, apesar da redução ser superior com a aplicação da DAI, ambas as intervenções levaram a uma reposta clínica moderada (80).

No que diz respeito à pontuação do HAQ, reduções de 0,19 já podem ser consideradas como uma melhoria mínima na função. Através da tabela 6, conseguimos verificar que a percentagem de participantes que apresentou uma melhoria mínima da função foi semelhante entre dietas (116).

Tabela 6 - Diferença da pontuação do *Health Assessment Questionnaire* entre dietas no final da intervenção

		DAI	DM
Diferença HAQ, n (%)	Sem melhoria mínima na função	8 (57,1%)	7 (58,3%)
	Com melhoria mínima na função	6 (42,9%)	5 (41,7%)

Dados expressos por n, Número; %, Percentagem;

DAI - Dieta Anti-inflamatória; DM - Dieta Mediterrânea; DAS 28 - *Disease Activity Score 28*; HAQ - *Health Assessment Questionnaire*

Relação entre o DAS 28 e IMC

Tendo em conta que a evidência científica mostra que o excesso de peso está associado ao aparecimento de doenças autoimunes e ao aumento da AD na AR (42), tentou perceber-se se estas duas variáveis poderiam relacionar-se. Verificou-se uma tendência para a existência de uma correlação positiva entre a o IMC e o DAS 28 ($r = 0,321$) (figura 3). À medida que o IMC aumentava, o DAS 28 também apresentou uma tendência para aumentar, ou seja, quanto a maior era o peso, maior a AD ($p = 0,110$).

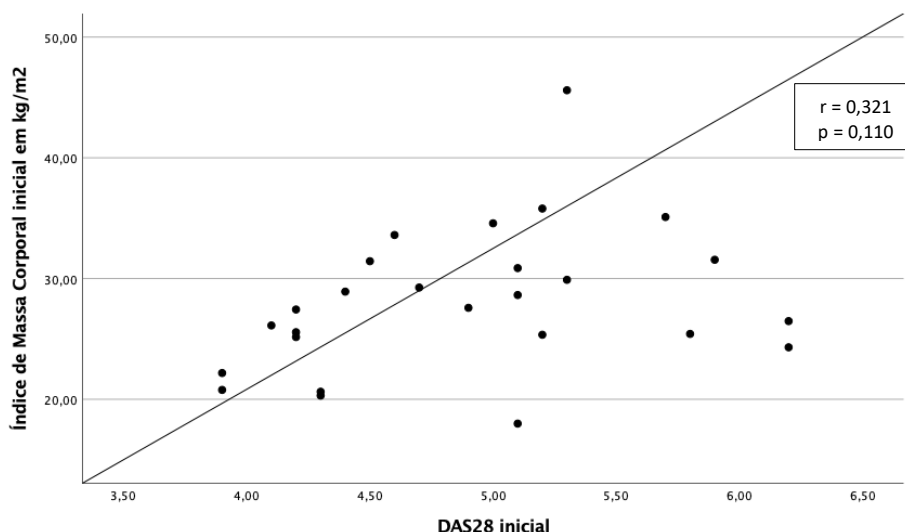


Figura 3 - Correlação entre o *Disease Activity Score 28* (DAS 28) e o Índice de Massa Corporal antes das 15 semanas de intervenção dietética em pacientes com Artrite Reumatóide ($n=26$). A avaliação foi feita através da Correlação de *Pearson* (r – coeficiente de correlação) e considerada significativa quando $p < 0,05$.

Caraterização e comparação da microbiota intestinal

DAI

Para a análise da diversidade *alfa* foi utilizado o índice de *Shannon*. Este índice tem em conta a diversidade e riqueza microbiana das amostras estudadas (117).

Para medida da diversidade *beta* que é a diversidade entre populações, foram realizadas análises de coordenadas principais baseada no índice de *Bray-Curtis*, para demonstrar similaridades ou dissimilaridades entre as amostras analisadas (118).

Segundo a figura 4, não se verificou nenhum efeito ao nível da diversidade *alfa* com a intervenção DAI (apesar de se verificar uma tendência para o seu aumento), nem na diversidade *beta*.

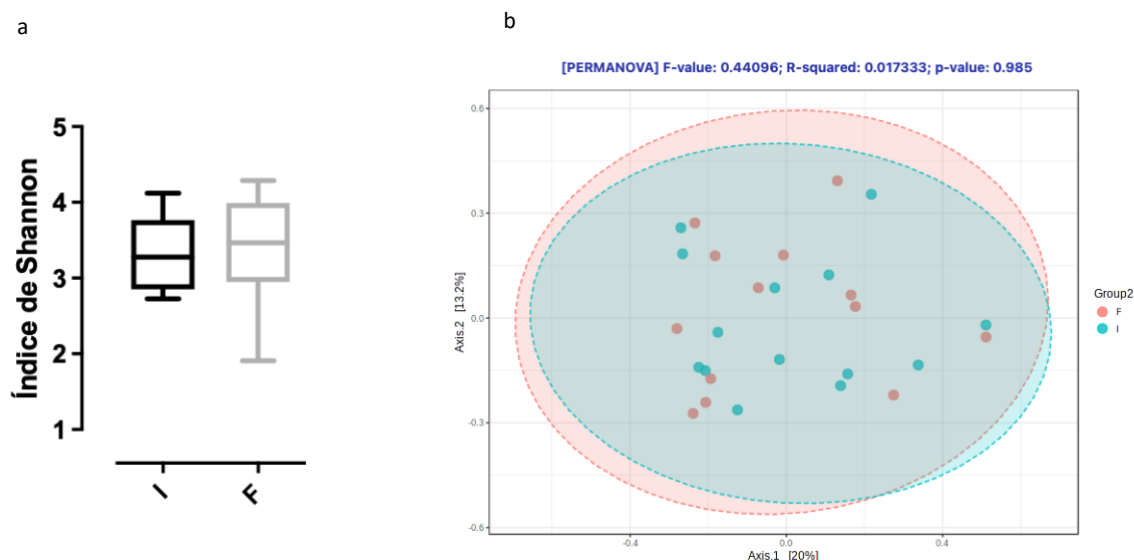


Figura 4 - Índice de diversidade de *Shannon* (a) e diversidade *beta* (b) da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide (n=15) sujeitos a uma intervenção dietética com Dieta Anti-inflamatória (DAI) durante 15 semanas. As diferenças entre o início (I) e o fim (F) da intervenção do índice de *Shannon* foram avaliadas recorrendo ao teste *t-Student*. As diferenças entre o início e o fim da intervenção da diversidade *beta* foram avaliadas recorrendo ao teste *PERMANOVA*.

Através da análise dos dados representados na figura 5 podemos aferir que não existiam diferenças significativas, ao nível do filo, entre o início e fim da intervenção.

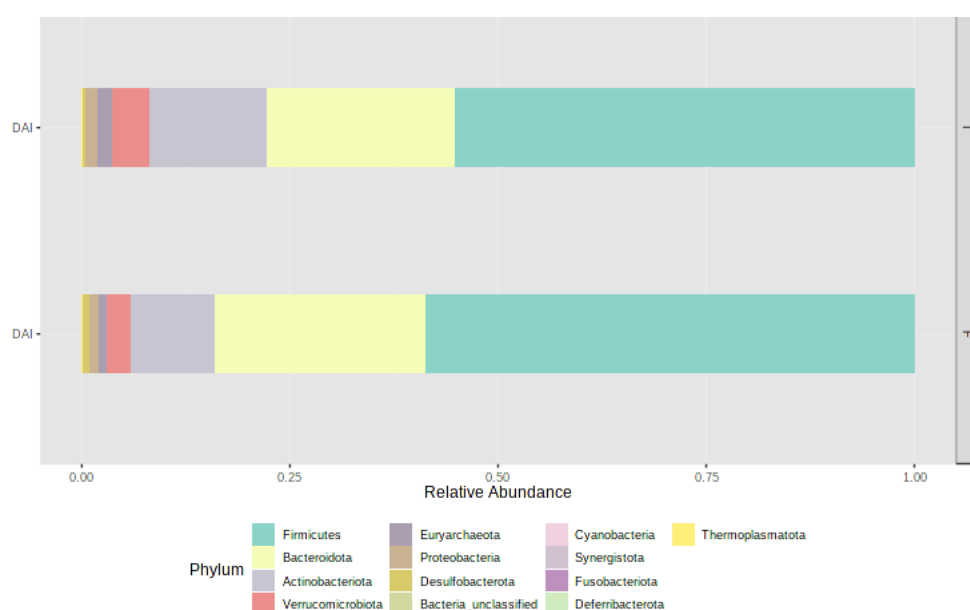


Figura 5 - Caracterização ao nível do filo da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide (n=15) antes (I- inicial) e depois (F- final) de uma intervenção dietética com Dieta anti-inflamatória (DAI) durante 15 semanas.

Com a intervenção DAI, ao nível do género, verificou-se a diminuição de *Actinomyces*, *Blautia*, *Collinsella* e uma tendência para a diminuição de *Coprococcus*. Verificou-se ainda um aumento no género *Desulfovibrio* e uma tendência para aumentar *Roseburia* e *Sutterella* (figura 6).

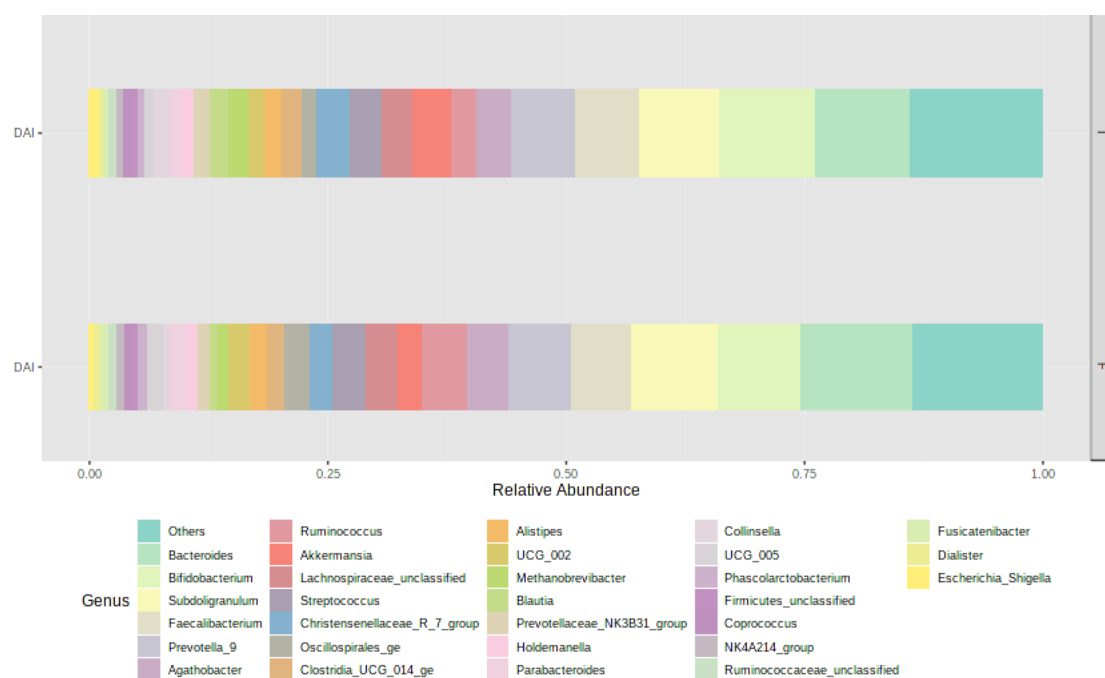


Figura 6 - Caracterização ao nível do género da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide (n=15) antes (I- inicial) e depois (F- final) de uma intervenção dietética com Dieta anti-inflamatória (DAI) durante 15 semanas.

DM

Após as quinze semanas de intervenção baseada na DM houve uma tendência para aumento da diversidade *alfa* e uma alteração significativa da diversidade *beta*, como demonstrado na figura 7.

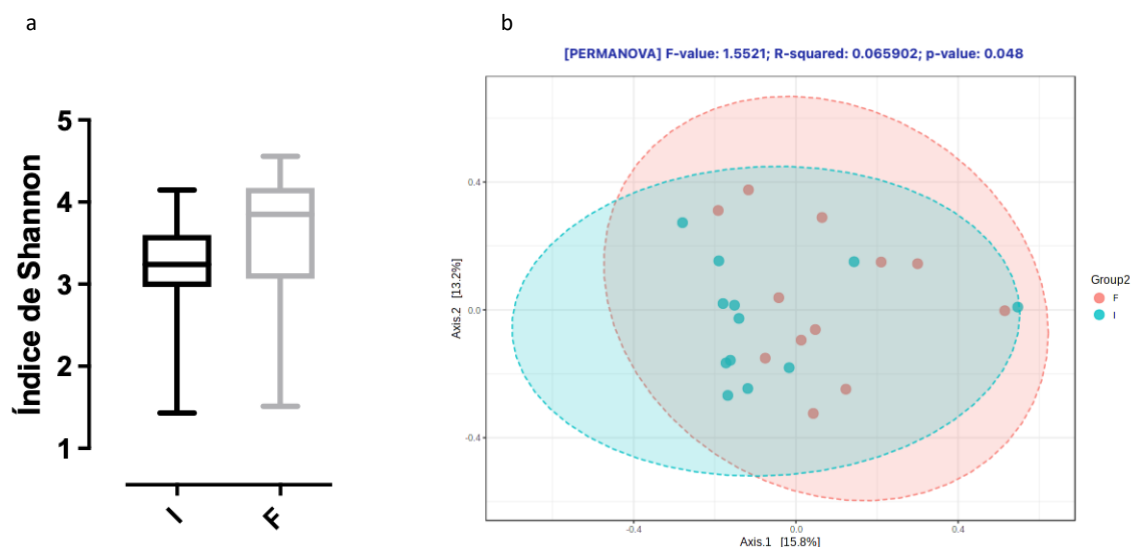


Figura 7 - Índice de diversidade de *Shannon* (a) e diversidade *beta* (b) da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide (n=11) sujeitos a uma intervenção dietética com Dieta Mediterrânea (DM) durante 15 semanas. As diferenças entre o início (I) e o fim (F) da intervenção do índice de *Shannon* foram avaliadas recorrendo ao teste *t-Student*. As diferenças entre o início e o fim da intervenção da diversidade *beta* foram avaliadas recorrendo ao teste *PERMANOVA*.

Ao nível do filo, verificou-se uma diminuição na abundância das *Actinobacterias* e *Firmicutes* com a intervenção. Os *Bacteroidota* aumentaram com a intervenção (figura 8).

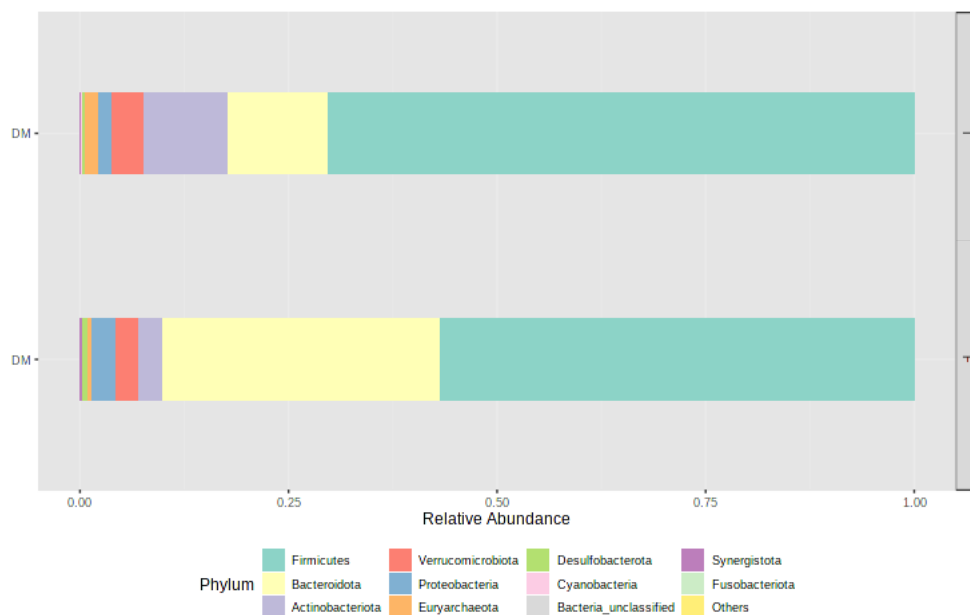


Figura 8 - Caracterização ao nível do filo da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide (n=11) antes (I- inicial) e depois (F- final) de uma intervenção dietética com Dieta Mediterrânea (DM) durante 15 semanas.

Ao nível do género, observou-se um aumento dos *Bacteroides*, *Bilophila*, *Lachnospiraceae_unclassified*, *Parabacteroides*, *Roseburia* e *Suterella* após a intervenção com esta dieta. Relativamente às *Bifidobacterium*, *Lachnospiraceae_ge* e *Collinsella* (figura 9), diminuíram significativamente com a intervenção.

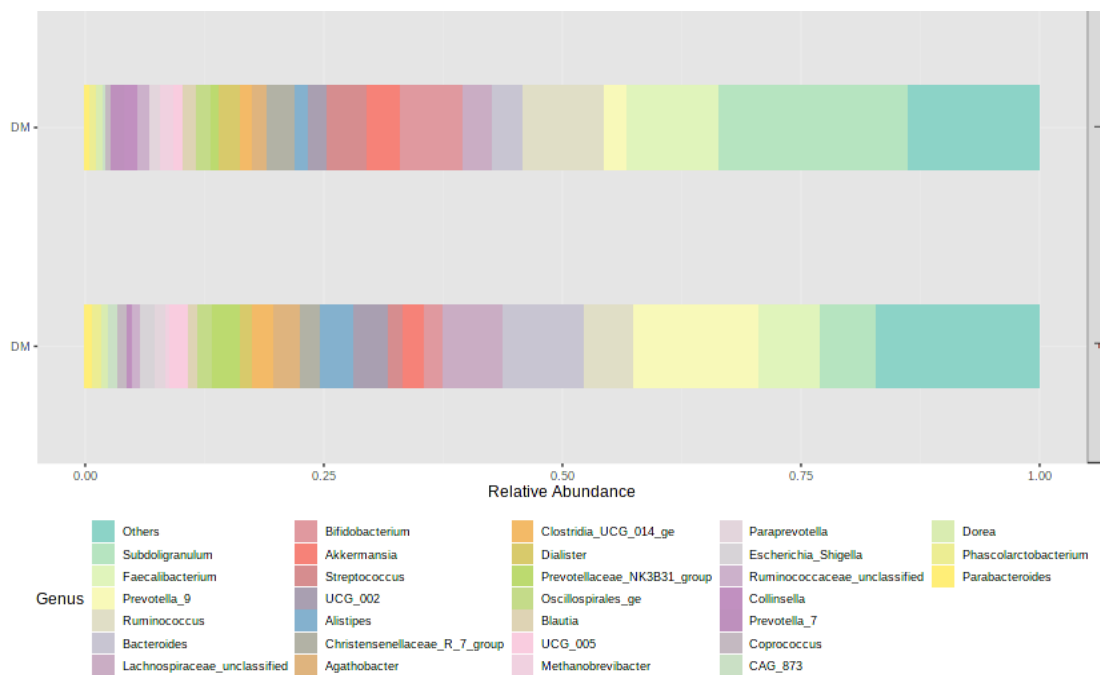


Figura 9 - Caracterização ao nível do género da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide (n=11) antes (I- inicial) e depois (F- final) de uma intervenção dietética com Dieta Mediterrânea (DM) durante 15 semanas.

Comparação entre DAI e DM

Alfa e Beta diversidade

Relativamente ao índice de *Shannon* observou-se que era semelhante entre grupos de dieta no início do estudo, pelo que se constatou que existia uma homogeneidade da população ($p=0,439$).

Verificou-se ainda que ambas as intervenções nutricionais tenderam a aumentar diversidade *alfa* (figura 10). Este aumento mostrou-se superior com a implementação da DM, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa ($p = 0,833$).

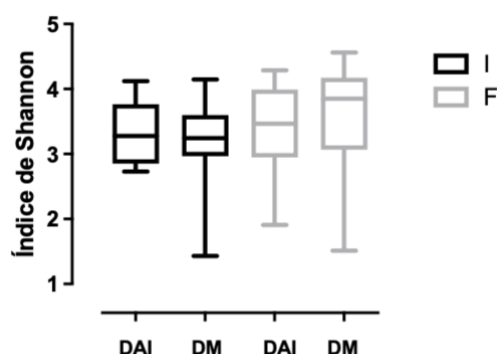


Figura 10 - Representação do índice de *Shannon* em gráfico de caixa de bigodes, em pacientes com Artrite Reumatóide antes (I- inicial) e depois (F- final) de uma intervenção dietética com Dieta Anti-inflamatória (DAI; n=15) e Dieta Mediterrânea (DM; n=11) durante 15 semanas. As diferenças entre as dietas do índice de *Shannon* foram avaliadas recorrendo ao teste *t-Student*.

Relativamente à diversidade *beta* verificou-se que as comunidades não diferiram significativamente com a intervenção (figura 11) antes e depois da intervenção.

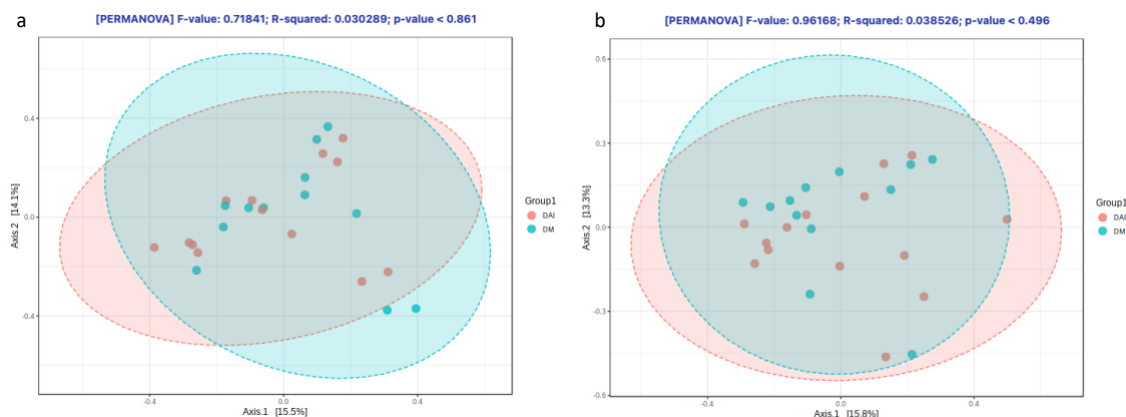


Figura 11 - Diversidade *beta* antes das intervenções (a) e após as intervenções (b) da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide sujeitos a diferentes intervenções dietéticas durante 15 semanas. As diferenças entre a diversidade *beta* nas intervenções foram avaliadas recorrendo ao teste *PERMANOVA*.

Filo

A análise ao nível dos filós das amostras em estudo, mostrou que havia uma homogeneidade entre dietas no início do estudo, excetuando ao nível do filo *Firmicutes* ($p= 0,023$) encontrando-se em maior quantidade nos participantes onde foi aplicada a DM. Percebe-se também uma tendência para a existência de mais *Bacteroidota* na DAI do que DM (figura 12).

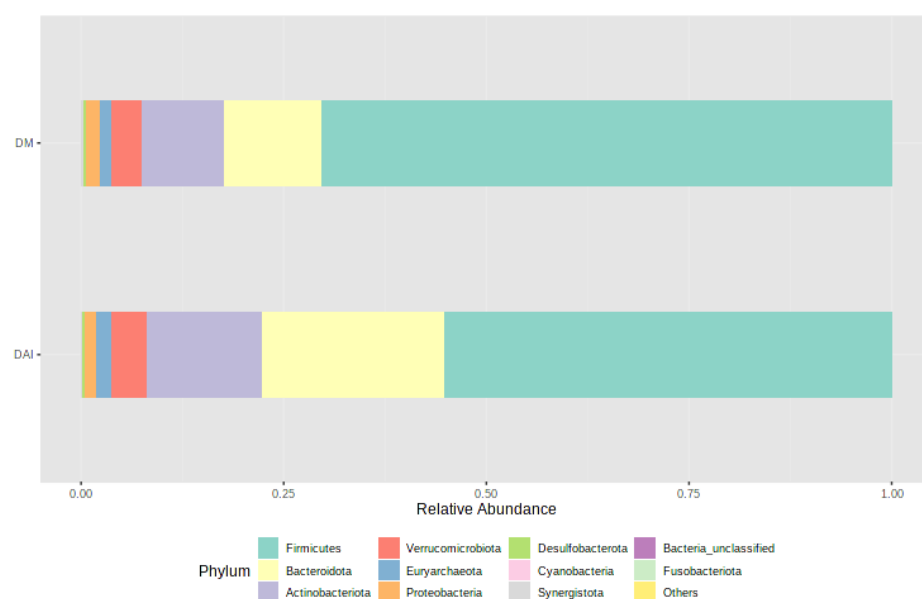


Figura 12 – Caracterização ao nível do filo da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide (n=26) antes de uma intervenção dietética com Dieta Anti-inflamatória (DAI) e Dieta Mediterrânea (DM) durante 15 semanas.

Quando se comparou a abundância relativa dos filós de microbiota entre dietas no fim da intervenção, apurou-se que o apenas o filo *Deferribacterota* diferia (figura 13), sendo que este filo apresentava uma abundância relativa maior nos participantes da DAI no fim da intervenção, bem como apresentou um maior aumento do início para o fim do estudo.

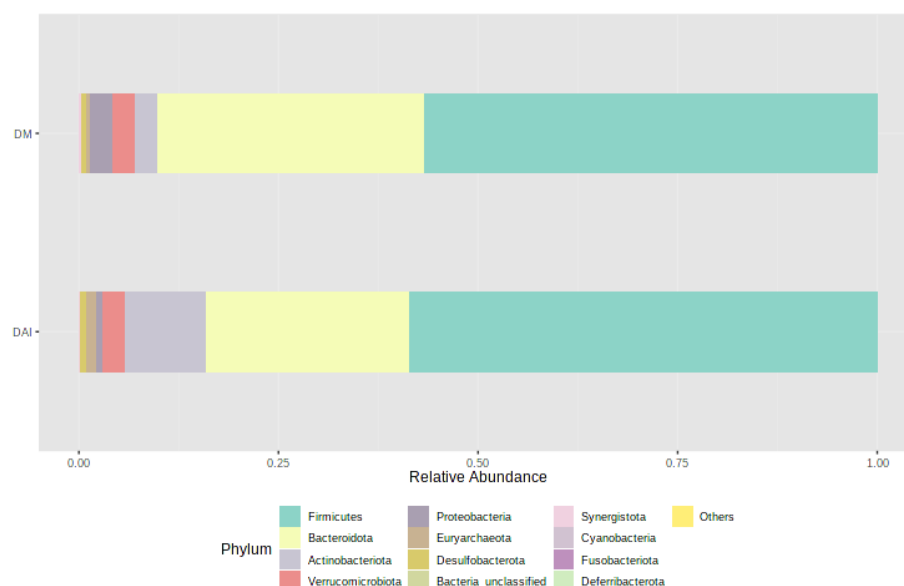


Figura 13 - Caracterização ao nível do filo da microbiota intestinal de pacientes com Artrite Reumatóide (n=26) depois de uma intervenção dietética com Dieta Anti-inflamatória (DAI) e Dieta Mediterrânea (DM) durante 15 semanas.

Género

Ao nível do género, verificou-se que a abundância média relativa era semelhante no início da intervenção entre dietas (figura 14).

Quando se comparou a abundância relativa dos gêneros de microbiota entre dietas no fim da intervenção, apurou-se que o apenas o gênero *Collinsella* apresentava a uma abundância relativa maior nos participantes da DAI em comparação com os da DM (figura 14).



Figura 14 - Caracterização ao nível do gênero da microbiota intestinal (top 30) das amostras de pacientes com Artrite Reumatóide da Dieta Anti-inflamatória (DAI) e da Dieta Mediterrânea (DM) antes (a) e no final (b) da intervenção de 15 semanas.

Relação entre diversidade e a abundância relativa dos filos, e os marcadores clínicos, antropométricos e de QV após a intervenção

Após a intervenção de 15 semanas verificou-se que não existiam correlações entre o índice de Shannon e o FR, DAS 28, pontuação de HAQ e o IMC. O mesmo se verificou para as correlações entre os filos da microbiota no fim do estudo com o FR e o IMC.

No que diz respeito ao DAS 28, verificou-se uma correlação significativa positiva a 5% com o filo *Proteobacteria* ($r = 0,410$; $p = 0,042$).

Por fim, quanto à pontuação do HAQ, constatou-se uma correlação positiva a 1% com o filo *Desulfobacterota* ($r = 0,601$; $p = 0,01$) e o *Synergistota* ($r = 0,573$; $p = 0,003$).

Relação entre a abundância relativa ao nível do género e os marcadores clínicos, antropométricos e de QV após a intervenção

Para verificar se a abundância ao nível do género se correlacionava com alterações de parâmetros clínicos, antropométricos e de QV, foram selecionados os géneros com uma prevalência superior a 20% em ambas as dietas e o FR, DAS 28 HAQ e IMC após a intervenção. Ao nível dos géneros da microbiota intestinal, aferiu-se, através da Correlação de *Pearson*, uma correlação positiva a 5% entre o FR e a quantidade de *Lachnospirales_unclassified* e *Lachnospiraceae_ge*, e entre o DAS 28 e a abundância de *Streptococcus* e *RF39*.

Quanto à correlação entre os géneros da microbiota e a pontuação do HAQ, verificou-se uma correlação positiva a 5% com os *Bacteroides*, *Phascolarctobacterium* e *Lachnospiraceae_ge*, e uma correlação positiva a 1% com a *Roseburia*.

Por fim, verificou-se uma correlação positiva entre a diferença de IMC e *Erysipelotrichaceae_UCG_003* (tabela 7).

Tabela 7 - Correlação de *Pearson* entre a abundância relativa final dos géneros da microbiota e os marcadores clínicos e antropométricos

Géneros	FR		DAS 28		Pontuação de HAQ		IMC	
	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
<i>Streptococcus</i>	-0,110	0,627	-0,457*	0,022	-0,201	0,336	0,278	0,178
<i>Bacteroides</i>	0,178	0,429	0,266	0,198	0,481*	0,015	0,319	0,120
<i>Lachnospirales_unclassified</i>	0,473*	0,026	-0,130	0,534	0,144	0,492	-0,001	0,995
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,060	0,791	0,110	0,602	0,480*	0,015	-0,180	0,389
<i>Erysipelotrichaceae_UCG_003</i>	-0,100	0,658	0,313	0,127	0,250	0,228	0,400*	0,048
<i>RF39</i>	-0,029	0,898	0,423*	0,035	0,208	0,319	0,194	0,353
<i>Roseburia</i>	-0,120	0,594	0,011	0,958	0,562**	0,003	-0,197	0,346
<i>Lachnospiraceae_ge</i>	0,456*	0,033	0,065	0,756	0,481*	0,015	0,118	0,575

FR- Fator Reumatóide; DAS 28 - Disease Activity Score 28; HAQ - Health Assessment Questionnaire; IMC - Índice de Massa Corporal.

As correlações entre a abundância relativa dos géneros da microbiota e as diferenças dos marcadores clínicos e antropométricos no fim do estudo foram avaliadas recorrendo à Correlação de *Pearson* (*r* – coeficiente de correlação), e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

*- A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

** - A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Relação entre a razão de *Firmicutes/Bacteroidetes*, e o IMC e o DAS 28 após a intervenção

Verificou-se uma tendência para uma correlação positiva entre a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* e o IMC após a intervenção dietética ($r = 0,116$; $p = 0,580$). O mesmo se verificou para o DAS 28 ($r = 0,391$, $p = 0,053$).

Microbiota intestinal e o tipo de medicação

No início do estudo, verificou-se que o índice de *Shannon* era semelhante entre os participantes que estavam a fazer diferentes tipos de medicação. No final do estudo, esta condição manteve-se mostrando que a medicação não teve por si só um efeito na diversidade da microbiota intestinal.

Da mesma forma, verificou-se que as abundâncias relativas ao nível do filo no início e após a intervenção eram semelhantes entre indivíduos com medicações diferentes.

A nível do género, os participantes que estavam a fazer TB apresentavam uma abundância superior do género *Subdoligranulum* ($p = 0,039$) antes da intervenção.

No final da intervenção, a abundância relativa dos géneros era semelhante, com exceção do género *Alistipes* ($p = 0,014$) que existia em maior quantidade nos participantes que faziam MAMD. Sendo que do início para o fim da intervenção, os *Alistipes* reduziram ligeiramente nos pacientes com TB, e aumentaram na terapia com MAMD.

Discussão

Neste ensaio clínico randomizado controlado paralelo pretendeu-se avaliar o efeito de uma intervenção dietética baseada numa DAI, em comparação com a DM, na AD e na QV de pacientes com AR ativa. Pretendeu-se ainda identificar possíveis correlações com os marcadores clínicos, de QV e antropométricos e as características da microbiota intestinal.

A literatura sugere que a dieta desempenha um papel central na terapia da AR uma vez que reduz o stress oxidativo, e diminui a inflamação e a alteração do sistema imunitário. (42). No que diz respeito à aplicação de uma intervenção dietética especificamente elaborada para a AR, a evidência é diminuta. O estudo de *Bustamante et al.* (2020) tinha como principal objetivo delinear o processo de conceção de uma dieta adaptada à população com AR, denominada *ITIS diet*. Esta dieta acabou por ser aplicada num estudo piloto para determinar o seu efeito anti-inflamatório na dor e no inchaço das articulações em pacientes com AR, mas ainda não são conhecidos os resultados (53).

A DAI aplicada foi criteriosamente estruturada com a combinação e composição de alimentos com efeitos em diferentes sintomas/patogénese da AR, e que apesar de muito semelhante à alimentação recomendada na DM, apresenta diferenças significativas, nomeadamente: 1- a redução da exposição a proteínas de grande dimensão no intestino, nomeadamente o glúten; 2- a especificação dos legumes mais adequados; 3- a limitação do consumo de iogurtes aos enriquecidos com *L. Casei*; 4- e o reforço do consumo diário de sementes e especiarias específicas.

De acordo com a hipótese em estudo verificou-se que, através da aplicação dos critérios EULAR para ensaios clínicos, ambas as dietas apresentaram uma resposta clínica moderada e não se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre as intervenções na variação do marcador da AD, expresso pelo DAS 28, no fim do estudo (80). No entanto, apenas os participantes da DAI apresentaram uma redução estatisticamente significativa no mesmo ($\Delta \approx 1,3$). No estudo de *Sköldstam et al.*, os resultados obtidos com a aplicação da DM mostraram uma redução estatisticamente significativa de 0,56 no DAS 28, um valor bastante inferior ao verificado, no presente estudo, tanto com a intervenção DAI como com a DM ($\Delta \approx 0,8$) (45). No estudo ADIRA obteve-se uma redução média de 0,42 unidades no DAS 28, também muito inferior ao observado no presente estudo (44). Importa ressaltar que estes estudos anteriores apresentaram um tempo de intervenção inferior (12 semanas e 10 semanas, respetivamente), bem como no estudo de *Sköldstam et al.* não foi usada TB, e essas podem ser as razões pelas quais se obteve maior redução no presente estudo.

No que diz respeito à QV, avaliada pelo HAQ, os participantes de ambas as dietas tiveram uma redução na sua pontuação do início para o fim do estudo ($\Delta \approx 0,2$), com uma melhoria mínima da função semelhante (119). No estudo de *Sköldstam et al.* verificou-se uma redução de 0,15 pontos, demonstrando-se também inferior ao obtido no presente estudo em ambas as intervenções (45).

O excesso de peso/obesidade está associado a uma alta incidência de patologias crónicas autoimunes e inflamatórias, como a AR. O tecido adiposo é considerado um participante ativo que contribui para processos fisiológicos e patológicos associados à inflamação e imunidade. Além disso, o excesso de peso representa uma comorbilidade importante e cada vez mais prevalente mesmo na primeira apresentação da AR (42). O estudo de *Dar et al.* confirmou, o que foi mostrado em 2 estudos anteriores, que mais de 60% dos pacientes com AR são classificados com sobrepeso ou obesidade pelo IMC (120). No presente estudo, isto também se verificou uma vez que mais de 60% dos participantes em cada dieta apresentavam excesso de peso, com um IMC médio inicial da amostra de $28,1 \pm 5,9 \text{ Kg/m}^2$.

Quanto ao IMC e a AD verificou-se uma tendência para a existência de uma correlação positiva entre o IMC e o DAS 28 no início do estudo, ou seja, à medida que o IMC aumentava, verificou-se uma tendência para o DAS 28 também aumentar. Este resultado está de acordo com a evidência científica que relaciona o excesso de peso ao agravamento da sintomatologia e, por sua vez, ao aumento da AD na AR (42). Contrariamente ao esperado, no presente estudo, a intervenção dietética que apresentou maior redução de IMC não foi a que apresentou uma maior redução de DAS 28. Também a redução da pontuação do HAQ foi semelhante nos participantes das duas intervenções.

Este resultado mostra que a redução de IMC é apenas um dos fatores que influenciam a AD e QV e que no presente estudo não foi determinante para a melhoria clínica e melhoria na função.

Nas últimas duas décadas, os avanços nas tecnologias de sequenciação levaram a uma crescente conscientização do papel desempenhado pela microbiota (composição e função) na patogênese e no resultado (inflamação) da artrite autoimune. Também foi sugerido que a microbiota intestinal pode ser significativamente modulada por diferentes fatores ambientais, como a dieta, o tabaco e a terapêutica. Assim sendo, a dieta tem sido sugerida como uma possível estratégia adicional para o tratamento desses pacientes (43,121).

O perfil da microbiota intestinal em pacientes com AR no presente estudo revelou diferenças entre os dois grupos de dieta após a intervenção. Ambas as intervenções apresentaram uma tendência para o aumento da diversidade *alfa*, mas apenas a intervenção dietética DM aumentou a diversidade *beta*. A adesão à DM, em combinação com a terapêutica medicamentosa adequada, pode aumentar os índices de diversidade, riqueza e uniformidade de espécies da microbiota intestinal, contrariando a redução característica do desenvolvimento de doenças autoimunes, como a AR (103,122). A adesão ao padrão alimentar mediterrânico está associada ao aumento da diversidade da microbiota e promove a abundância de bactérias que produzem AGCCs. O aumento do consumo de frutas, verduras e leguminosas com baixo consumo de carne vermelha são os principais componentes que levam a esta associação (71,72,123).

Os resultados da análise taxonômica mostraram alterações ao nível do género nos participantes da DAI, mais especificamente uma diminuição das *Actinomyces*, *Blautia* e *Collinsella* e uma tendência para a diminuição de *Coprococcus*. Os géneros *Actinomyces*, *Blautia* e *Collinsella* têm sido implicados em condições inflamatórias e parecem estar aumentados na AR (37). A evidência mostra que o género *Collinsella* desempenha um papel significativo na patogénese da doença, contribuindo para o seu desenvolvimento, e está associado à gravidade da doença. O mecanismo pelo qual este género contribui para a patogénese da doença parece ser devido ao aumento da permeabilidade intestinal pela contribuição para uma inibição da expressão das junções apertadas, resultando na entrada de produtos microbianos na lâmina própria e no espaço subepitelial. Além disso, a *Collinsella* influencia a produção epitelial da citocina pró-inflamatória IL-17A e das quimiocinas CXCL1 e CXCL5, o que pode resultar no recrutamento de neutrófilos e ativação do NF-κB (37,124,125). Assim, a redução destes géneros com a aplicação da DAI pode modular a reposta inflamatória e ser benéfica para pacientes com AR.

No estudo de Wang *et al*, a abundância de *Coprococcus* diminuiu em pacientes com AR em comparação com indivíduos saudáveis. Os microrganismos deste género são reconhecidos produtores de butirato, que é conhecido pelos seus efeitos anti-inflamatórios (126). Assim, propõe-se que a depleção deste microrganismo em particular pode ser característica da doença e que o tratamento medicamentoso e alteração da dieta não são suficientes para a sua modulação/homeostase.

Ainda ao nível do género, após intervenção com a DAI verificou-se um aumento do *Desulfovibrio* e uma tendência para aumentar *Roseburia* e *Sutterella*. O género *Desulfovibrio*, um formador de esporos gram-negativos, aerotolerante, trabalha sinergicamente com as espécies de *Prevotella* para degradar a mucina (fonte de carbono, energia e azoto) (127). Além disso, *Desulfovibrio* pode utilizar exopolissacarídeos microbianos sintetizados por *Bifidobacterium* para produzir AGCCs no intestino humano (127). Curiosamente, pacientes com doença crónica após terapia com anticorpos anti-TNF-α apresentaram diminuição de *Actinomyces*, enquanto *Roseburia* estava aumentado. Assim, o género *Roseburia* foi descrito como um potencial marcador de saúde devido às suas propriedades produtoras de butirato e anti-inflamatórias (124,125). As espécies de *Sutterella* têm sido frequentemente associadas a doenças humanas, como a doença inflamatória intestinal, no entanto, o papel dessas bactérias na saúde ainda não está claro. As interações de *Sutterella* com o hospedeiro são em grande parte desconhecidas, apesar do género ser altamente prevalente. O estudo de Hiippala *et al*. indicou que os membros do género *Sutterella* são comensais amplamente prevalentes com leve capacidade pró-inflamatória no trato gastrointestinal humano e não contribuem significativamente para a rutura da homeostase epitelial associada à disbiose da microbiota. A capacidade de *Sutterella* aderir às células epiteliais intestinais indica que pode ter um papel imunomodulador (128). O aumento destes géneros na população com a intervenção dietética

DAI parece sugerir que esta dieta promove uma composição de microbiota intestinal mais saudável em doentes com AR.

A intervenção dietética DM, ao nível do filo, promoveu uma redução da *Actinobacteria* e *Firmicutes* e um aumento de *Bacteroidetes*, contrariando a composição característica da microbiota associada à AR. Os estudos realizados em doentes com AR mostram que o perfil da microbiota intestinal aparece dominado por *Firmicutes*, a abundância de *Bacteroidetes* mostra ser diminuída, enquanto o filo de *Actinobacteria* parece aumentado (125,129).

O aumento dos *Bacteroides*, *Bilophila*, *Lachnospiraceae_unclassified*, *Parabacteroides*, *Roseburia* e *Sutterella* após a intervenção com a DM pode ser potencial vantajoso já que a literatura tem mostrado que tanto os *Bacteroides* como os *Lachnospiraceae* se encontram subrepresentados em casos de AR (129,130). O papel de *Bilophila* e dos *Parabacteroides* em doenças inflamatórias ou autoimunes, nomeadamente na AR, ainda não é totalmente compreendido. Alguns estudos mostraram a associação positiva de espécies de *Bilophila* com respostas imunes pró-inflamatórias, enquanto outro estudo mostrou que espécies de *Bilophila* têm associações negativas com as respostas imunes mediadas por TNF α , induzidas por LPS, em células mononucleares (126). Como visto em cima, o género *Roseburia* foi relatado como um potencial marcador de saúde devido às suas propriedades produtoras de butirato e anti-inflamatórias e a *Sutterella* pode ter um papel imunomodulador (124,125,128).

Por outro lado, *Bifidobacterium*, *Subdoligranulum* e *Collinsella* diminuíram significativamente com a intervenção. Estudos observacionais anteriores demonstraram que *Bifidobacterium* desempenha um papel importante na patogénese de múltiplas doenças autoimunes, encontrando-se nos pacientes com AR em quantidades reduzidas (131). Os *Subdoligranulum* são bactérias produtoras de ácido butírico, no entanto, o papel deste género não está claro em doenças autoimunes e requer mais investigação, sendo que normalmente encontram-se em quantidades diminuídas na doença em questão (132). Como explanado anteriormente, o género *Collinsella* desempenha um papel significativo na patogénese da doença e costuma estar aumentado em doentes com AR (37,124,125).

Em suma, a DM induz um aumento na diversidade *beta* e um maior número de alterações na composição da microbiota, com potencial efeito benéfico ao nível da modulação de alguns géneros. Esta intervenção diminui os géneros *Bifidobacterium* e *Subdoligranulum* que são géneros de bactérias normalmente diminuídos na doença e esta intervenção não foi capaz de reverter.

Relativamente às diferenças encontradas entre as duas dietas testadas, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nas diversidades *alfa* e *beta* após a intervenção. É de realçar a abundância superior do género *Collinsella* no grupo da DAI, ou seja, houve uma redução potencialmente benéfica de *Collinsella* que foi inferior no grupo da DAI em comparação com a DM. Não é possível perceber o real impacto das alterações observadas ao nível do filo *Deferribacterota* já que a literatura é escassa relativamente a evidência para a AR da presença deste filo, e uma das razões é a sua baixa abundância, o que reforça o papel, provavelmente, menos relevante deste grupo (133).

Foi muito interessante verificar que existia uma correlação positiva entre o DAS 28 no fim do estudo e o filo *Proteobacteria*. Segundo a literatura, este filo encontra-se normalmente aumentado em pacientes com AR, sendo que um aumento da prevalência de *Proteobacteria* é uma potencial assinatura diagnóstica de disbiose e risco de doença inflamatória (129,134). O DAS 28 também se correlacionou positivamente com a abundância de *Streptococcus* e RF39, o que vai de encontro ao descrito na literatura: o género *Streptococcus* e RF39 encontram-se aumentados em pacientes com AR em comparação com os controlos saudáveis (127,129).

Estudos anteriores mostraram que a quantidade de *Lachnospirales* está aumentada numa variedade de distúrbios, como inflamação, hiperglicemia e obesidade (135). Com a Intervenção DAI verificou-se uma maior redução de *Lachnospirales_unclassified* em comparação com a intervenção DM que está concordante com uma maior diferença no FR entre o início e o fim do estudo com a DAI, corroborando a correlação entre estas bactérias e o FR.

Vários grupos de bactérias correlacionaram-se com a qualidade de vida, mensurada pelo HAQ, provavelmente porque a sua maior ou menor abundância irá modular os efeitos inflamatórios intestinais que se irão refletir numa inflamação sistémica, tendo como consequência aumento da dor e inchaço, que culmina numa menor mobilidade das articulações com consequência na QV (129,136,137). A evidência relativamente a estas bactérias e ao processo inflamatório ainda é vaga e chega mesmo a ser contraditória (129,130).

O género *Erysipelotrichaceae* tem sido identificado em maior quantidade em animais com obesidade induzida por dieta e em ratos alimentados com dieta rica em gordura ou dieta ocidental (138), o que vem ao encontro da correlação positiva encontrada entre o IMC e a abundância de *Erysipelotrichaceae*.

Várias condições inflamatórias têm sido relacionadas ao aumento da razão *Firmicutes/Bacteroidetes*, como doenças inflamatórias intestinais e obesidade. No que toca à relação entre razão de *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, o presente estudo reforça esta relação uma vez que esta razão se relacionou positivamente com o IMC e o DAS 28 (139).

São conhecidos vários mecanismos pelos quais as interações fármaco-microbiota podem influenciar a biodisponibilidade, eficácia e/ou toxicidade do fármaco. Isso inclui a ativação ou inativação direta de fármacos por enzimas microbianas que podem aumentar ou reduzir a eficácia do fármaco. As extensas capacidades metabólicas da microbiota intestinal tornaram-se um ponto de acesso para modificação de medicamentos. No entanto, os medicamentos também podem influenciar profundamente a microbiota e alterar o resultado das interações com o hospedeiro. Além disso, as assinaturas individuais da microbiota são únicas, levando a uma variação substancial nas respostas do hospedeiro a fármacos específicos (140). Os resultados do presente estudo mostraram que, sem intervenção nutricional, os pacientes a tratados com TB apresentavam, ao nível do género, uma abundância relativa superior no *Subdoligranulum*, verificando-se assim que a TB foi capaz de contrariar a redução deste género característica da doença abordada (132).

No final da intervenção, a abundância relativa dos géneros era semelhante, com exceção do género *Alistipes* que existia em maior quantidade nos participantes que faziam MAMD. Do início para o fim da intervenção, os *Alistipes* reduziram ligeiramente nos pacientes com TB, e aumentaram na terapia com MAMD. *Alistipes* é um género relativamente novo de bactérias isoladas de amostras clínicas, embora numa taxa baixa em comparação com outros dentro do filo *Bacteroidetes*. A evidência mostra efeitos contraditórios relativamente a este género, pelo que o mesmo poderia ter um papel de liderança na modulação da doença, ou apenas um papel de espectador, ou um papel co indutor (com outros micróbios intestinais). Mais estudos serão ainda necessários para decifrar os mecanismos de atuação deste género nesta doença em particular (141).

Teria sido interessante identificar a microbiota até à espécie já que o impacto das intervenções nutricionais na *Prevotella Copri* está extensamente estudado e esta bactéria é abundante em doentes com AR (35). Além disso, embora a mucosa intestinal tenha provavelmente o maior potencial de interação hospedeiro-micróbio, todas as mucosas possuem microbiota residente e reagem dinamicamente à sua presença com uma modulação imune. Bactérias gram-negativas podem causar infeções em qualquer parte do corpo. Por outras palavras, isso não significa que todos os indivíduos com AR devam ter disbiose num único local, pelo que teria sido interessante se se tivesse investigado a composição da microbiota oral e nasal (43).

A ausência de uma análise longitudinal desde o diagnóstico, incluindo o impacto da medicação realizada e por fim a resposta à dieta para uma correta avaliação da relação causa-efeito entre a medicação, dieta, e o desfecho clínico da AR e QV dos pacientes e a disbiose intestinal condiciona a perceção do impacto da intervenção dietética. O impacto da TB e outras terapias imunomoduladoras na microbiota intestinal também não está completamente esclarecido e poderá ser importante para a integração de todas as variáveis de estudo.

Os estudos clínicos são condicionados por uma variabilidade acrescida e inerente e neste estudo em particular o facto de não se ter considerado o tempo de doença ativa, as flutuações sazonais dos sintomas e o tamanho da amostra ser reduzido podem ter contribuído para um menor efeito clínico

e não ter levado a uma diferença clinicamente relevante entre intervenções dietéticas na AD. Por fim, o facto de não se ter forma de avaliar os participantes da DAI quanto à qualidade alimentar antes da intervenção como se fez com a aplicação PREDIMED, pode ter levado a que se incluíssem indivíduos com uma qualidade alimentar razoável no início do estudo e a dificuldade na realização/aquisição dos alimentos da DAI pode ter levado a resultados menos exacerbados com a intervenção DAI.

O presente estudo mostrou que ambas as intervenções dietéticas tiveram impacto positivo na AD, mas a intervenção DAI teve um impacto maior em comparação com a DM e ambas as dietas apresentaram efeito na melhoria da QV. Este estudo reforça a viabilidade de adotar a DAI como uma terapia adjuvante em pacientes com AD moderada e que o impacto da intervenção DAI não passa, por si só, pela modulação da microbiota intestinal. São necessários mais estudos prospetivos numa população maior para compreender os mecanismos específicos que interligam esta intervenção com a imunidade, inflamação e stress oxidativo.

Conclusão

O presente estudo reforça que a AD e QV dos doentes com a patologia discutida nesta dissertação é altamente afetada pela alimentação saudável, reforçando a importância da sua adoção. Para além disso, esta dissertação realça a evidência de que fatores metabólicos anteriores como o estado nutricional interferem na AD, bem como a aplicação de dietas específicas são responsáveis por alterações na microbiota intestinal.

Não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas nos marcadores clínicos de AD, QV e antropométricos entre dietas no fim da intervenção, no entanto, a DAI promoveu uma melhoria clínica superior, em comparação com a DM, por apresentar uma maior redução do DAS 28, e a melhoria da QV mostrou-se semelhante nas duas intervenções nutricionais.

Neste ensaio clínico, os resultados da análise taxonómica mostraram que a microbiota intestinal foi modulada pela intervenção dietética. A DM teve um impacto maior nesta modulação, com o aumento na diversidade *beta*, diminuição na abundância dos filos *Actinobacteria* e *Firmicutes* e um aumento dos *Bacteroidota*. Aumentou os *Bacteroides*, *Bilophila*, *Lachnospiraceae_unclassified*, *Parabacteroides*, *Roseburia* e *Suterella* e reduziu os *Bifidobacterium*, *Subdoligranulum*, *Lachnospiraceae_ge* e *Collinsella*. As alterações nos participantes tratados com DAI foram somente ao nível do género, com uma diminuição das *Actinomyces*, *Blautia* e *Collinsella* e um aumento das *Desulfovibrio*. Importa dizer que a maior alteração na microbiota intestinal não se traduziu numa maior melhoria clínica.

Após a intervenção, não se constatarem diferenças entre dietas no que diz respeito à diversidade, verificando-se apenas um aumento do filo *Deferribacterota* e do género *Collinsella* nos participantes da DAI.

De maneira a concluir, o impacto na AD demonstrado pela intervenção DAI não pôde ser explicado por si só pela modulação intestinal, não sendo a microbiota intestinal o principal agente etiológico significativo na AD. Existem vários fatores, nomeadamente, o stress oxidativo, alterações hormonais e a genética, que podem influenciar a AD, mas que não foram discutidas no presente estudo. São, claramente, necessários mais estudos para entender melhor os respetivos processos bioquímicos e biológicos.

Tendo em conta que i) a medicina personalizada está a crescer com o intuito de reduzir o risco de doença, melhorar o diagnóstico, o tratamento e a prevenção; ii) que este estudo mostra que a DAI apresenta efeitos positivos em doentes com AR e AD moderada; combinar a terapêutica medicamentosa com esta estratégia dietética pode ser uma boa via para melhorar o prognóstico da doença. Esta é uma ferramenta economicamente viável, personalizável, não invasiva e de fácil acesso, podendo vir a ser implementada como parte integrante dos cuidados de saúde.

Compreender como os efeitos de determinados alimentos e a sinergia dos mesmos no desenvolvimento da AR é essencial, uma vez que a alimentação é uma janela de oportunidade para fornecer intervenções mais efetivas para a imunomodulação e inflamação. Para responder a esta necessidade, este estudo pode ter sido um primeiro passo para a realização de estudos bem desenhados com amostras maiores numa equipa multidisciplinar de investigadores, incluindo reumatologistas e nutricionistas, e, quem sabe, para um futuro aconselhamento alimentar mais específico na AR.

Referências

1. Matcham F, Scott IC, Rayner L, Hotopf M, Kingsley GH, Norton S, et al. The impact of rheumatoid arthritis on quality-of-life assessed using the SF-36: A systematic review and meta-analysis. Vol. 44, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. W.B. Saunders; 2014. p. 123–30.
2. Khan NA, Yazici Y, Calvo-Alen J, Dadoniene J, Gossec L, Hansen TM, et al. Reevaluation of the role of duration of morning stiffness in the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Journal of Rheumatology*. 2009 Nov;36(11):2435–42.
3. Minichiello E, Semerano L, Boissier MC. Time trends in the incidence, prevalence, and severity of rheumatoid arthritis: A systematic literature review. Vol. 83, *Joint Bone Spine*. Elsevier Masson SAS; 2016. p. 625–30.
4. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: From triggering to targeting. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 60–75.
5. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: From triggering to targeting. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 60–75.
6. Karen Rodríguez-Elías A, Maldonado-Murillo K, Fernando López-Mendoza L, Ramírez-Bello J. Genética y genómica en artritis reumatoide (AR): una actualización GACETA MÉDICA DE MÉXICO ARTÍCULO DE REVISIÓN Correspondencia [Internet]. Vol. 152. 2016. Available from: www.anmm.org.mx
7. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Hashimoto A, Tohma S. Human leukocyte antigen polymorphisms and personalized medicine for rheumatoid arthritis. Vol. 60, *Journal of Human Genetics*. Nature Publishing Group; 2015. p. 691–6.
8. Pratesi F, Petit Teixeira E, Sidney J, Michou L, Puxeddu I, Sette A, et al. HLA shared epitope and ACPA: Just a marker or an active player? Vol. 12, *Autoimmunity Reviews*. 2013. p. 1182–7.
9. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis [Internet]. Vol. 376, *Seminar 1094* www.thelancet.com. 2010. Available from: www.thelancet.com
10. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):960–77.
11. Taylor PC, Moore A, Vasilescu R, Alvir J, Tarallo M. A structured literature review of the burden of illness and unmet needs in patients with rheumatoid arthritis: a current perspective. Vol. 36, *Rheumatology International*. Springer Verlag; 2016. p. 685–95.
12. Altawil R, Saevarsdottir S, Wedrén S, Alfredsson L, Klareskog L, Lampa J. Remaining Pain in Early Rheumatoid Arthritis Patients Treated With Methotrexate. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016 Aug 1;68(8):1061–8.
13. Athanassiou P, Athanassiou L, Kostoglou-Athanassiou I. Nutritional Pearls: Diet and Rheumatoid Arthritis. *Mediterr J Rheumatol*. 2020;31(3):319.
14. Lourido L, Blanco FJ, Ruiz-Romero C. Defining the proteomic landscape of rheumatoid arthritis: progress and prospective clinical applications. Vol. 14, *Expert Review of Proteomics*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 431–44.
15. Sanmartí R, Gómez-Puerta JA. Biomarcadores en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin*. 2010;6(SUPPL 3).
16. Horta-Baas G, Romero-Figueroa MDS, Montiel-Jarquín AJ, Pizano-Zárate ML, García-Mena J, Ramírez-Durán N. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Vol. 2017, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited; 2017.
17. Lee N, Kim WU. Microbiota in T-cell homeostasis and inflammatory diseases. Vol. 49, *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group; 2017.

18. Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. Vol. 7, *Nature Reviews Rheumatology*. 2011. p. 569–78.
19. Klareskog L, Amara K, Malmström V. Adaptive immunity in rheumatoid arthritis: Anticitrulline and other antibodies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Vol. 26, *Current Opinion in Rheumatology*. 2014. p. 72–9.
20. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: New insights from old clinical data? Vol. 8, *Nature Reviews Rheumatology*. 2012. p. 235–43.
21. Torow N, Marsland BJ, Hornef MW, Gollwitzer ES. Neonatal mucosal immunology. Vol. 10, *Mucosal Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 5–17.
22. Allan Walker W. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann Nutr Metab*. 2013 Nov;63(SUPPL.2):8–15.
23. Kim D, Zeng MY, Núñez G. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. Vol. 49, *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group; 2017.
24. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Infection and rheumatoid arthritis: Still an open question. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Jul;23(4):352–7.
25. Bennike TB, Ellingsen T, Glerup H, Bonderup OK, Carlsen TG, Meyer MK, et al. Proteome Analysis of Rheumatoid Arthritis Gut Mucosa. *J Proteome Res*. 2017 Jan 6;16(1):346–54.
26. Luckey D, Gomez A, Murray J, White B, Taneja V. Rheumatoid arthritis is a multifactorial autoimmune disease that requires interaction between environmental and genetic factors. Vol. 138, *Indian J Med Res*. 2013.
27. Luckey D, Gomez A, Murray J, White B, Taneja V. Rheumatoid arthritis is a multifactorial autoimmune disease that requires interaction between environmental and genetic factors. Vol. 138, *Indian J Med Res*. 2013.
28. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. Vol. 535, *Nature*. Nature Publishing Group; 2016. p. 75–84.
29. Teng F, Klinger CN, Felix KM, Bradley CP, Wu E, Tran NL, et al. Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer's Patch T Follicular Helper Cells. *Immunity*. 2016 Apr 19;44(4):875–88.
30. Block KE, Zheng Z, Dent AL, Kee BL, Huang H. Gut Microbiota Regulates K/BxN Autoimmune Arthritis through Follicular Helper T but Not Th17 Cells. *The Journal of Immunology*. 2016 Feb 15;196(4):1550–7.
31. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Vol. 46, *Immunity*. Cell Press; 2017. p. 183–96.
32. Tajik N, Frech M, Schulz O, Schälter F, Lucas S, Azizov V, et al. Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).
33. Liu X, Zeng B, Zhang J, Li W, Mou F, Wang H, et al. Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice. *Sci Rep*. 2016 Aug 2;6.
34. Gomez A, Luckey D, Yeoman CJ, Marietta E v., Berg Miller ME, Murray JA, et al. Loss of sex and age driven differences in the gut microbiome characterize arthritis-susceptible *0401 mice but not arthritis-resistant *0402 mice. *PLoS One*. 2012 Apr 24;7(4).
35. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*. 2013 Nov 5;2.
36. Newkirk MM, Zbar A, Baron M, Manges AR. Distinct bacterial colonization patterns of *Escherichia coli* subtypes associate with rheumatoid factor status in early inflammatory arthritis. *Rheumatology*. 2010 Apr 1;49(7):1311–6.
37. Chen J, Wright K, Davis JM, Jeraldo P, Marietta E v., Murray J, et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med*. 2016 Apr 21;8(1).
38. Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting [Internet]. 2008 Feb. Available from: www.nature.com/reviews/drugdisc

39. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzehi S, Alimohammadi R, Bezvan MH, Mohammadi H, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. Vol. 234, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 10018–31.
40. Dinis Mineiro R. *Medicamentos Biológicos e Doenças Autoimunes - O presente e o futuro*. Lisboa; 2017.
41. Küçükdeveci AA. Nonpharmacological treatment in established rheumatoid arthritis. Vol. 33, *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. Bailliere Tindall Ltd; 2019.
42. Rondanelli M, Perdoni F, Peroni G, Caporali R, Gasparri C, Riva A, et al. Ideal food pyramid for patients with rheumatoid arthritis: A narrative review. *Clinical Nutrition*. Churchill Livingstone; 2020.
43. Diamanti AP, Panebianco C, Salerno G, di Rosa R, Salemi S, Sorgi ML, et al. Impact of mediterranean diet on disease activity and gut microbiota composition of rheumatoid arthritis patients. *Microorganisms*. 2020 Dec 1;8(12):1–14.
44. Vadell AKE, Bärebring L, Hulander E, Gjerdtsson I, Lindqvist HM, Winkvist A. Anti-inflammatory Diet in Rheumatoid Arthritis (ADIRA) - A randomized, controlled crossover trial indicating effects on disease activity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2020 Jun 1;111(6):1203–13.
45. Sköldstam L, Hagfors L, Johansson G. An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003 Mar 1;62(3):208–14.
46. Nikiphorou E, Norton S, Carpenter L, Dixey J, Andrew Walsh D, Kiely P, et al. Secular Changes in Clinical Features at Presentation of Rheumatoid Arthritis: Increase in Comorbidity But Improved Inflammatory States. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017 Jan 1;69(1):21–7.
47. Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman K v., Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: A population-based study. *Arthritis Rheum*. 2005 Mar;52(3):722–32.
48. Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. 2012 Sep;71(9):1524–9.
49. Castillo-Hernandez J, Maldonado-Cervantes MI, Reyes JP, Patiño-Marin N, Maldonado-Cervantes E, Solorzano-Rodriguez C, et al. Obesity is the main determinant of insulin resistance more than the circulating pro-inflammatory cytokines levels in rheumatoid arthritis patients. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)*. 2017 Jul;57(4):320–9.
50. Castillo-Hernandez J, Maldonado-Cervantes MI, Reyes JP, Patiño-Marin N, Maldonado-Cervantes E, Solorzano-Rodriguez C, et al. Obesity is the main determinant of insulin resistance more than the circulating pro-inflammatory cytokines levels in rheumatoid arthritis patients. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)*. 2017 Jul;57(4):320–9.
51. Ruscitti P, Ursini F, Cipriani P, Ciccio F, Liakouli V, Carubbi F, et al. Prevalence of type 2 diabetes and impaired fasting glucose in patients affected by rheumatoid arthritis. *Medicine (United States)*. 2017 Aug 1;96(34).
52. Pianta A, Arvikar S, Strle K, Drouin EE, Wang Q, Costello CE, et al. Evidence of the Immune Relevance of Prevotella copri, a Gut Microbe, in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatology*. 2017 May 1;69(5):964–75.
53. Bustamante MF, Agustín-Perez M, Cedola F, Coras R, Narasimhan R, Golshan S, et al. Design of an anti-inflammatory diet (ITIS diet) for patients with rheumatoid arthritis. *Contemp Clin Trials Commun*. 2020 Mar 1;17.
54. Berube LT, Kiely M, Yazici Y, Woolf K. Diet quality of individuals with rheumatoid arthritis using the healthy eating index (HEI)-2010. *Nutr Health*. 2017 Mar 1;23(1):17–24.
55. Trichopoulou A, Vasilopoulou E. Mediterranean diet and longevity. 1973; Available from: <https://doi.org/10.1079/09658219738855>
56. Dourado E, Ferro M, Guerreiro CS, Fonseca JE. Diet as a modulator of intestinal microbiota in rheumatoid arthritis. Vol. 12, *Nutrients*. MDPI AG; 2020. p. 1–19.
57. Oliviero F, Spinella P, Fiocco U, Ramonda R, Sfriso P, Punzi L. How the Mediterranean diet and some of its components modulate inflammatory pathways in arthritis. Vol. 145, *Swiss Medical Weekly*. EMH Swiss Medical Publishers Ltd.; 2015.

58. Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *British Journal of Nutrition*. 2002 Jan;87(S1):S31–48.
59. Jaudszus A, Gruen M, Watzl B, Ness C, Roth A, Lochner A, et al. Evaluation of suppressive and pro-resolving effects of EPA and DHA in human primary monocytes and T-helper cells. *J Lipid Res*. 2013 Apr;54(4):923–35.
60. Rockett BD, Melton M, Harris M, Bridges LC, Shaikh SR. Fish oil disrupts MHC class II lateral organization on the B-cell side of the immunological synapse independent of B-T cell adhesion. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013 Nov;24(11):1810–6.
61. Tedeschi SK, Bathon JM, Giles JT, Lin TC, Yoshida K, Solomon DH. Relationship Between Fish Consumption and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2018 Mar 1;70(3):327–32.
62. Nocella C, Cammisotto V, Fianchini L, D’Amico A, Novo M, Castellani V, et al. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Diseases: Benefits for Human Health. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2017 Dec 18;18(1):4–13.
63. Hu Y, Sparks JA, Malspeis S, Costenbader KH, Hu FB, Karlson EW, et al. Long-term dietary quality and risk of developing rheumatoid arthritis in women. *Ann Rheum Dis*. 2017 Aug 1;76(8):1357–64.
64. Han H, Chang CB, Lee DC, Lee JY. RELATIONSHIP BETWEEN TOTAL FRUIT AND VEGETABLE INTAKE AND SELF-REPORTED KNEE PAIN IN OLDER ADULTS. *J Nutr Health Aging*. 2017;21(7):750–8.
65. Peron G, Hidalgo-Liberona N, González-Domínguez R, Garcia-Aloy M, Guglielmetti S, Bernardi S, et al. Exploring the Molecular Pathways behind the Effects of Nutrients and Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Intestinal Permeability: A Perspective on the Potential of Metabolomics and Future Clinical Applications. *J Agric Food Chem*. 2020 Feb 19;68(7):1780–9.
66. Bach Knudsen KE. Microbial degradation of whole-grain complex carbohydrates and impact on short-chain fatty acids and health. *Advances in Nutrition*. 2015;6(2):206–13.
67. Koh A, de Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Vol. 165, *Cell*. Cell Press; 2016. p. 1332–45.
68. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. Vol. 8, *Gut Microbes*. Taylor and Francis Inc.; 2017. p. 172–84.
69. Wan MLY, Ling KH, El-Nezami H, Wang MF. Influence of functional food components on gut health. Vol. 59, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.; 2019. p. 1927–36.
70. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E. Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. Vol. 17, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 742–53.
71. Mitsou EK, Kakali A, Antonopoulou S, Mountzouris KC, Yannakoulia M, Panagiotakos DB, et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and gastrointestinal characteristics in an adult population. *British Journal of Nutrition*. 2017 Jun 28;117(12):1645–55.
72. Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. Shifts on gut microbiota associated to mediterranean diet adherence and specific dietary intakes on general adult population. *Front Microbiol*. 2018 May 7;9(MAY).
73. Perrino AC, Ralevski E, Acampora G, Edgecombe J, Limoncelli D, Petrakis IL. Ethanol and pain sensitivity: Effects in healthy subjects using an acute pain paradigm. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Jun;32(6):952–8.
74. Azizov V, Dietel K, Steffen F, Dürholz K, Meidenbauer J, Lucas S, et al. Ethanol consumption inhibits TFH cell responses and the development of autoimmune arthritis. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).
75. Jung SM, Kim Y, Kim J, Jung H, Yi H, Rim YA, et al. Sodium chloride aggravates arthritis via Th17 polarization. *Yonsei Med J*. 2019 Jan 1;60(1):88–97.
76. Hernandez AL, Kitz A, Wu C, Lowther DE, Rodriguez DM, Vudattu N, et al. Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2015 Nov 2;125(11):4212–22.

77. Petersson S, Philippou E, Rodomar C, Nikiphorou E. The Mediterranean diet, fish oil supplements and Rheumatoid arthritis outcomes: evidence from clinical trials. Vol. 17, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2018. p. 1105–14.
78. Johansson K, Askling J, Alfredsson L, di Giuseppe D. Mediterranean diet and risk of rheumatoid arthritis: A population-based case-control study. *Arthritis Res Ther*. 2018 Aug 9;20(1).
79. Nelson J, Sjöblom H, Gjertsson I, Ulven SM, Lindqvist HM, Bärebring L. Do interventions with diet or dietary supplements reduce the disease activity score in rheumatoid arthritis? A systematic review of randomized controlled trials. Vol. 12, *Nutrients*. MDPI AG; 2020. p. 1–23.
80. Winkvist A, Bärebring L, Gjertsson I, Ellegård L, Lindqvist HM. A randomized controlled cross-over trial investigating the effect of anti-inflammatory diet on disease activity and quality of life in rheumatoid arthritis: The Anti-inflammatory Diet in Rheumatoid Arthritis (ADIRA) study protocol. *Nutr J*. 2018 Apr 20;17(1).
81. Willemijn Vader L, Stepniak DT, Bunnik EM, Kooy YMC, de Haan W, Drijfhout JW, et al. Characterization of Cereal Toxicity for Celiac Disease Patients Based on Protein Homology in Grains. 2003;
82. El-Chammas K, Danner E. Gluten-free diet in nonceliac disease. Vol. 26, *Nutrition in Clinical Practice*. 2011. p. 294–9.
83. Lerner A, Shoenfeld Y, Matthias T. Adverse effects of gluten ingestion and advantages of gluten withdrawal in nonceliac autoimmune disease. *Nutr Rev*. 2017 Dec 1;75(12):1046–58.
84. Lerner A, Aminov R, Matthias T. Dysbiosis may trigger autoimmune diseases via inappropriate post-translational modification of host proteins. *Front Microbiol*. 2016 Feb 5;7(FEB).
85. Clemente MG, de Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, di Pierro MR, et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*. 2003 Feb 1;52(2):218–23.
86. Lerner A, Matthias T. Rheumatoid arthritis-celiac disease relationship: Joints get that gut feeling. Vol. 14, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2015. p. 1038–47.
87. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. Celiac disease, inflammation and oxidative damage: A nutrigenetic approach. Vol. 4, *Nutrients*. MDPI AG; 2012. p. 243–57.
88. Elkan AC, Sjöberg B, Kolsrud B, Ringertz B, Hafström I, Frostegård J. Gluten-free vegan diet induces decreased LDL and oxidized LDL levels and raised atheroprotective natural antibodies against phosphorylcholine in patients with rheumatoid arthritis: A randomized study. *Arthritis Res Ther*. 2008 Mar 18;10(2).
89. Iablokov V, Sydora BC, Foshaug R, Meddings J, Driedger D, Churchill T, et al. Naturally occurring glycoalkaloids in potatoes aggravate intestinal inflammation in two mouse models of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2010 Nov;55(11):3078–85.
90. Tedeschi SK, Frits M, Cui J, Zhang ZZ, Mahmoud T, Iannaccone C, et al. Diet and Rheumatoid Arthritis Symptoms: Survey Results From a Rheumatoid Arthritis Registry. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017 Dec 1;69(12):1920–5.
91. Boudry G, Hamilton MK, Chichlowski M, Wickramasinghe S, Barile D, Kalanetra KM, et al. Bovine milk oligosaccharides decrease gut permeability and improve inflammation and microbial dysbiosis in diet-induced obese mice. *J Dairy Sci*. 2017 Apr 1;100(4):2471–81.
92. Sundström B, Ljung L, di Giuseppe D. Consumption of meat and dairy products is not associated with the risk for rheumatoid arthritis among women: A population-based cohort study. *Nutrients*. 2019 Nov 1;11(11).
93. Ontario L. Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization [Internet]. Available from: <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>
94. Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract 37 Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract [Internet]. Vol. 10, *Curr. Issues Mol. Biol*. Available from: <http://www.cimb.org>

95. Alipour B, Homayouni-Rad A, Vaghef-Mehrabany E, Khatoun S, 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. 2014.
96. Islam MA, Alam F, Solayman M, Khalil MI, Kamal MA, Gan SH. Dietary Phytochemicals: Natural Swords Combating Inflammation and Oxidation-Mediated Degenerative Diseases. Vol. 2016, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2016.
97. Aryaeian N, Shahram F, Mahmoudi M, Tavakoli H, Yousefi B, Arablou T. The effect of ginger supplementation on some immunity and inflammation intermediate genes expression in patients with active Rheumatoid Arthritis. *Gene*. 2019 May 25;698:179–85.
98. Daily JW, Yang M, Park S. Efficacy of Turmeric Extracts and Curcumin for Alleviating the Symptoms of Joint Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. Vol. 19, *Journal of Medicinal Food*. Mary Ann Liebert Inc.; 2016. p. 717–29.
99. Guerreiro CS, Calado Â, Sousa J, Fonseca JE. Diet, microbiota, and gut permeability-the unknown triad in rheumatoid arthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5(DEC).
100. Touré A, Touré T, Xueming X. Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits.
101. Mohamed DA, Mohamed RS, Fouda K. Anti-inflammatory potential of chia seeds oil and mucilage against adjuvant-induced arthritis in obese and non-obese rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2020 Jul 1;31(4).
102. 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 Development and Validation in a Prospective Longitudinal Study of Patients with Rheumatoid Arthritis. Vol. 38, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*. 1995.
103. Jeong Y, Kim JW, You HJ, Park SJ, Lee J, Ju JH, et al. Gut microbial composition and function are altered in patients with early rheumatoid arthritis. *J Clin Med*. 2019 May 1;8(5).
104. Reuma.pt - Sociedade Portuguesa de Reumatologia. Questionários de auto-preenchimento para o doente - Manual de Utilização. 2012.
105. Martínez-González MÁ, Corella D, Salas-salvado J, Ros E, Covas MI, Fiol M, et al. Cohort profile: Design and methods of the PREDIMED study. *Int J Epidemiol*. 2012 Apr;41(2):377–85.
106. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*. 2016 Feb 3;5(1):11–21.
107. Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, et al. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems*. 2016 Feb 23;1(1).
108. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Dec;75(23):7537–41.
109. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016;2016(10).
110. Westcott SL, Schloss PD. OptiClust, an Improved Method for Assigning Amplicon-Based Sequence Data to Operational Taxonomic Units. *mSphere*. 2017 Apr 26;2(2).
111. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan 1;41(D1).
112. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Aug;73(16):5261–7.
113. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jul 3;45(W1):W180–8.

114. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc.* 2020 Mar 1;15(3):799–821.
115. van Gestel AM, Haagsma CJ, C M PL, Riel J. VALIDATION OF RHEUMATOID ARTHRITIS IMPROVEMENT CRITERIA THAT INCLUDE SIMPLIFIED JOINT COUNTS. Vol. 41, *ARTHRITIS & RHEUMATISM.* 1998.
116. de Oliveira LM, Natour J, Roizenblatt S, de Araujo PMP, Ferraz MB. Monitoring the functional capacity of patients with rheumatoid arthritis for three years. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition).* 2015 Jan;55(1):62–7.
117. Willis AD. Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Front Microbiol.* 2019;10(OCT).
118. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. Vol. 73, *Applied and Environmental Microbiology.* 2007. p. 1576–85.
119. Winkvist A, Bärebring L, Gjertsson I, Ellegård L, Lindqvist HM. A randomized controlled cross-over trial investigating the effect of anti-inflammatory diet on disease activity and quality of life in rheumatoid arthritis: The Anti-inflammatory Diet in Rheumatoid Arthritis (ADIRA) study protocol. *Nutr J.* 2018 Apr 20;17(1).
120. Dar L, Tiosano S, Watad A, Bragazzi NL, Zisman D, Comaneshter D, et al. Are obesity and rheumatoid arthritis interrelated? *Int J Clin Pract.* 2018 Jan 1;72(1).
121. Picchianti-Diamanti A, Rosado MM, D'Amelio R. Infectious agents and inflammation: The role of microbiota in autoimmune arthritis. Vol. 8, *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2018.
122. Rogier R, Evans-Marin H, Manasson J, van der Kraan PM, Walgreen B, Helsen MM, et al. Alteration of the intestinal microbiome characterizes preclinical inflammatory arthritis in mice and its modulation attenuates established arthritis. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1).
123. Merra G, Noce A, Marrone G, Cintoni M, Tarsitano MG, Capacci A, et al. Influence of mediterranean diet on human gut microbiota. Vol. 13, *Nutrients.* MDPI AG; 2021. p. 1–12.
124. Forbes JD, Chen CY, Knox NC, Marrie RA, El-Gabalawy H, de Kievit T, et al. A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases - Does a common dysbiosis exist? *Microbiome.* 2018 Dec 13;6(1).
125. Wang Q, Zhang SX, Chang MJ, Qiao J, Wang CH, Li XF, et al. Characteristics of the Gut Microbiome and Its Relationship With Peripheral CD4⁺ T Cell Subpopulations and Cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Front Microbiol.* 2022 Feb 3;13.
126. Gupta VK, Cunningham KY, Hur B, Bakshi U, Huang H, Warrington KJ, et al. Gut microbial determinants of clinically important improvement in patients with rheumatoid arthritis. *Genome Med.* 2021 Dec 1;13(1).
127. Zhang L, Song P, Zhang X, Metea C, Schleisman M, Karstens L, et al. Alpha-glucosidase inhibitors alter gut microbiota and ameliorate collagen-induced arthritis. *Front Pharmacol.* 2020;10.
128. Hiippala K, Kainulainen V, Kalliomäki M, Arkkila P, Satokari R. Mucosal prevalence and interactions with the epithelium indicate commensalism of *Sutterella* spp. *Front Microbiol.* 2016 Oct 26;7(OCT).
129. Chen Y, Ma C, Liu L, He J, Zhu C, Zheng F, et al. Analysis of gut microbiota and metabolites in patients with rheumatoid arthritis and identification of potential biomarkers. *Aging.* 2021;13(20):23689–701.
130. Takahashi D, Hoshina N, Kabumoto Y, Maeda Y, Suzuki A, Tanabe H, et al. Microbiota-derived butyrate limits the autoimmune response by promoting the differentiation of follicular regulatory T cells. *EBioMedicine.* 2020 Aug 1;58.
131. Lee JY, Mannaa M, Kim Y, Kim J, Kim GT, Seo YS. Comparative analysis of fecal microbiota composition between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Genes (Basel).* 2019 Oct 1;10(10).
132. Moon J, Choi SH, Yoon CH, Kim MK. Gut dysbiosis is prevailing in Sjögren's syndrome and is related to dry eye severity. *PLoS One.* 2020 Feb 1;15(2).

133. Herp S, Brugiroux S, Garzetti D, Ring D, Jochum LM, Beutler M, et al. *Mucispirillum schaedleri* Antagonizes *Salmonella* Virulence to Protect Mice against Colitis. *Cell Host Microbe*. 2019 May 8;25(5):681-694.e8.
134. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Vol. 33, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 496–503.
135. Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobetti M, de Angelis M. The controversial role of human gut lachnospiraceae. Vol. 8, *Microorganisms*. MDPI AG; 2020.
136. Hao L, Michaelsen TY, Singleton CM, Dottorini G, Kirkegaard RH, Albertsen M, et al. Novel syntrophic bacteria in full-scale anaerobic digesters revealed by genome-centric metatranscriptomics. *ISME Journal*. 2020 Apr 1;14(4):906–18.
137. Zhao Y, Chen B, Li S, Yang L, Zhu D, Wang Y, et al. Detection and characterization of bacterial nucleic acids in culture-negative synovial tissue and fluid samples from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
138. Forbes JD, Chen CY, Knox NC, Marrie RA, El-Gabalawy H, de Kievit T, et al. A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases - Does a common dysbiosis exist? *Microbiome*. 2018 Dec 13;6(1).
139. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008 Apr 17;3(4):213–23.
140. Picchianti-Diamanti A, Panebianco C, Salemi S, Sorgi ML, di Rosa R, Tropea A, et al. Analysis of gut microbiota in rheumatoid arthritis patients: Disease-related dysbiosis and modifications induced by etanercept. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct 1;19(10).
141. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.

Anexo 1 - Consentimento Informado



Folha de Informação ao participante

“O efeito de uma dieta anti-inflamatória na atividade da doença e na qualidade de vida de pacientes com Artrite Reumatóide - Ensaio clínico randomizado controlado paralelo”

A artrite reumatoide é uma doença autoimune crónica e debilitante, caracterizada por inflamação sistémica e lesão articular, que afeta 0,5–1% da população europeia e na qual nem sempre se consegue a remissão, afetando o bem-estar físico e mental, e a qualidade de vida. Fatores genéticos e ambientais interagem durante a patogénese da doença. A dieta é um fator ambiental que pode influenciar os sintomas da artrite reumatóide, devendo ser avaliada como opção de tratamento, complementando a terapia farmacológica.

O objetivo principal deste ensaio é averiguar o efeito de uma dieta anti-inflamatória, em comparação com uma dieta controlo, na redução da atividade da doença e na melhoria da qualidade de vida de pacientes com artrite reumatóide.

Como objetivos secundários pretende-se apurar a relação da dieta anti-inflamatória com os marcadores inflamatórios e com a modulação da composição/diversidade da microbiota intestinal, em comparação com uma dieta controlo.

Para colaborar na investigação precisa de:

- Ter idade superior a 18 anos e alfabetização;
- Ter a presença de doença ativa, sob controlo e medicação adequados;
- Ausência de alergias e/ou intolerâncias alimentares;
- Não ser vegetariano e não usar fitoterapia ou outros suplementos (nomeadamente, pré e probióticos);
- Não ter tido acompanhamento nutricional anterior ou alteração de hábitos alimentares nos últimos 6 meses;
- Preencher o consentimento informado.

A sua participação incluirá a recolha de dados clínicos do seu processo, a aplicação de um questionário sobre dados sociodemográficos e a realização de uma intervenção dietética. Antes e depois dessa intervenção, será recolhida uma amostra de fezes e aplicado um questionário para avaliar a sua capacidade funcional. A intervenção terá uma duração de 6 meses, e compreenderá a realização de consultas mensais com recolha de dados antropométricos (peso, altura, perímetro da cintura e anca). A sua cooperação é voluntária, não havendo qualquer prejuízo ou custo associado.

Toda a informação que nos der é estritamente confidencial, não poderá ser utilizada de forma a que o possa identificar e será exclusivamente usada para o presente estudo.

Obrigada pela sua colaboração.

Se tiver alguma dúvida contacte:

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas

Email: mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro

- Doutora Ana Faria

Consentimento Informado, esclarecido e livre

Considerando a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial
(Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996; Edimburgo
2000; Seoul 2008; Fortaleza 2013)

“O efeito de uma dieta anti-inflamatória na atividade da doença e na qualidade de vida de pacientes
com Artrite Reumatóide - Ensaio clínico randomizado controlado paralelo”

Eu, _____ abaixo-assinado _____ (nome completo)

declaro que concordo em participar neste estudo e que compreendi a explicação que foi fornecida a cerca da natureza, objetivos, métodos, benefícios e riscos previstos do estudo pela Dra. Mariana Freitas e pelo Dr. Carlos Carneiro.

Além disso foi-me dada uma cópia da folha de informação ao participante, tive oportunidade de efetuar perguntas sobre todos os aspetos do estudo e, de todas, obtive resposta satisfatória.

Fui informado(a) que poderei recusar participar neste estudo em qualquer altura, se assim o desejar, sem que sejam usados os dados recolhidos até ao momento e sem qualquer tipo de consequências.

Fui informado(a) que a participação neste estudo não confere o direito a qualquer tipo de remuneração e tenho conhecimento de quem devo contactar se tiver alguma questão sobre este estudo.

Desta forma, aceito participar neste estudo e permito a utilização dos dados que de forma voluntária forneço, confiando que a minha identidade, os meus dados clínicos e os resultados da intervenção dietética permanecerão confidenciais e anónimos, garantias dadas pelos investigadores.

Data e assinatura

Investigador

Código atribuído: _____

Anexo 2 - Parecer favorável da Comissão de Ética da Nova Medical School – Faculdade de Ciências Médicas



Decisão final sobre o projeto

“O efeito de uma dieta anti-inflamatória na atividade da doença e na qualidade de vida de pacientes com Artrite Reumatóide - Ensaio clínico randomizado controlado paralelo”

A Comissão de Ética da NMS|FCM-UNL (CEFCM) decidiu, aprovar por unanimidade, do ponto de vista ético, o projeto de investigação intitulado ***“O efeito de uma dieta anti-inflamatória na atividade da doença e na qualidade de vida de pacientes com Artrite Reumatóide - Ensaio clínico randomizado controlado paralelo”*** (nº 44/2021/CEFCM), submetido pela Mestranda Mariana Martins Freitas, no âmbito do Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo.

Lisboa, 7 de outubro de 2021

O Presidente da Comissão de Ética,



(Professor Doutor Diogo Pais)

TO WHOM IT MAY CONCERN

The Ethics Research Committee of NMS|FCM-UNL (CEFCM) has unanimously approved, the Project entitled ***“O efeito de uma dieta anti-inflamatória na atividade da doença e na qualidade de vida de pacientes com Artrite Reumatóide - Ensaio clínico randomizado controlado paralelo”*** (No. 44/2021/CEFCM) submitted by Master's Degree Student Mariana Martins Freitas, in the scope of the Master's in Human Nutrition and Metabolism. Lisbon,

October 7th, 2021

The Chairman of the Ethics Research Committee,



(Diogo Pais, MD, PhD)

Anexo 3 - Parecer favorável da Comissão de Ética do Grupo HPA Saúde



COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE DO HOSPITAL PARTICULAR DO ALGARVE PARECER Nº 04/2021

Assunto: Estudo “ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO CONTROLADO PARALELO: O EFEITO DE UMA DIETA ANTIINFLAMATORIA NA ATIVIDADE DA DOENÇA E NA QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE”

Nos termos e para os efeitos do disposto na alínea a), do nº 1 do art.º 9º da Lei nº 21/2014 de 16 de abril, foi solicitado o parecer desta Comissão, tendo em vista a autorização para a realização do estudo acima identificado.

No âmbito das competências que lhe são conferidas pelo art.º 3º do Decreto-Lei nº 80/2018 de 15 de outubro e pelo do art.º 16º da Lei nº 21/2014 de 16 de abril, a Comissão de Ética para a Saúde do Hospital Particular do Algarve, doravante designada por Comissão, analisou o processo que lhe foi apresentado para aquele efeito e avaliou todos os aspetos apontados no nº 6 do referido art.º 16º.

1. Pertinência do estudo e sua conceção:

De acordo com a informação prestada a esta Comissão a realização deste estudo torna-se pertinente uma vez que a artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crónica e debilitante, caracterizada por inflamação sistémica e lesão articular, que afeta 0,5–1% da população europeia (sendo superior nos países ocidentais), afetando de forma importante o bem-estar físico, mental e a qualidade de vida (QV).

A inflamação que caracteriza a AR aumenta o risco de doenças cardiovasculares, que juntamente com o habitual tratamento imunossupressor, também aumenta o risco de infeções; as duas principais causas de morte destes pacientes. Consequentemente, a expectativa de vida entre pacientes com AR é reduzida em 5–10 anos, em comparação com indivíduos não doentes.

Apesar da introdução nos últimos anos de novas terapias - imunossupressão por medicamentos antirreumáticos modificadores da doença, esteroides e mais recentemente terapias biológicas -, a AR continua a representar uma considerável carga humana e económica, estimando-se que 1/3 dos pacientes com AR termina o emprego prematuramente e, 5 anos após o diagnóstico, 30–40% apresenta incapacidade para o trabalho.

Como complemento à farmacoterapia, a intervenção dietética na AR deve ser avaliada como opção de tratamento, tal como já acontece noutros contextos de doença como as doenças cardiovasculares, o cancro e a diabetes.

A dieta é um fator ambiental que pode influenciar os sintomas da AR, influenciando a atividade inflamatória, alterando o perfil lipídico, aumentando os níveis de antioxidantes e alterando a microbiota intestinal (também envolvida no desenvolvimento da doença). Sendo esta dinâmica, pode mudar rapidamente em termos de composição e diversidade com intervenções dietéticas, influenciando consequentemente o padrão e o desenvolvimento da doença.

Desta forma, o objetivo principal da presente investigação é averiguar o efeito de uma intervenção dietética anti-inflamatória, em comparação com uma dieta baseada na “Nova Roda dos Alimentos” seguindo os princípios da dieta mediterrânica, na atividade da doença e na melhoria da QV. Como objetivos secundários pretende-se apurar a relação da dieta instituída com os marcadores inflamatórios e com a modulação da composição/diversidade da microbiota intestinal, em comparação com uma dieta controlo.

Para dar cumprimento aos objetivos da investigação, os pacientes serão randomizados e instruídos a realizar uma dieta anti-inflamatória (dieta intervenção) ou dieta mediterrânica (dieta controlo) durante 6 meses. A atividade da doença e a QV serão avaliadas no término da intervenção.

2. Avaliação dos benefícios e riscos previsíveis:

Como não existem diretrizes dietéticas para a AR, este estudo pretende fornecer evidência científica acerca do impacto da dietoterapia na redução da atividade da doença e melhoria da QV.

Esperam-se como resultados primários, que o *Disease Activity Score 28* (DAS 28) apresente uma diferença entre as intervenções $>0,6$ unidades na análise de intenção de tratar e uma redução de 0,19 no *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) com a dieta anti-inflamatória. Espera-se ainda que esta redução seja superior na dieta de intervenção relativamente à dieta de controlo.

Como resultados secundários, espera-se que com a dieta de intervenção se observe uma melhoria nos marcadores inflamatórios comparativamente com a dieta de controlo, bem como uma alteração na composição e diversidade da microbiota intestinal que se relacione com impacto positivo na doença.

Este ensaio pretende ainda contribuir para a redução futura dos custos individuais e sociais destes pacientes.

A previsão de riscos associados ao estudo está omissa.

3. O protocolo, incluindo os planos de divulgação do estudo:

O projeto apresenta um desenho de investigação, sendo nomeadamente explícito relativamente às tarefas a desenvolver nos três grandes momentos do estudo: pré-intervenção, intervenção nos grupos e pós-intervenção, bem como um cronograma de atividades.

Não estão nomeados quaisquer planos de divulgação do estudo.

4. Aspetos metodológicos, incluindo o instrumento de colheita de dados e os aspetos éticos e de confidencialidade:

O projeto enviado a esta Comissão contempla alguns aspetos relativos à Metodologia de Investigação, nomeadamente: os critérios de inclusão/exclusão, o tamanho da amostra, os métodos e ferramentas a utilizar e considerações dietéticas. Apesar do projeto se intitular “um ensaio clínico randomizado controlado paralelo”, as técnicas e os aspetos inerentes à randomização não são descritas, com exceção para o termo “recurso a método informático”. Da mesma forma, os instrumentos são nomeados, mas não foram anexados ao projeto.

Relativamente aos aspetos éticos e de confidencialidade é assumido: *a investigação será registada numa base de dados de acesso publico antes do recrutamento dos participantes e irão ser tomadas todas as precauções no sentido do respeito da privacidade dos participantes de acordo com a Declaração de Helsinque, Lei da Investigação Clínica (Lei no 21/2014) e o novo Regulamento Geral de Proteção de Dados publicado a 4 de Maio de 2016 no Jornal Oficial da União Europeia. (...) Os participantes serão esclarecidos acerca do objetivo do estudo, inconvenientes e condições em que vai ser realizado. Também serão informados que, a qualquer momento, podem retirar-se do estudo. Em caso de interesse na participação, será solicitado o preenchimento do consentimento informado, cujo modelo não foi partilhado com esta Comissão.*

5. A aptidão do investigador principal e dos restantes membros da equipa:

A investigadora principal – Mariana Martins Freitas– é licenciada em Nutrição, exercendo desde há vários anos o exercício da profissão. Além disso, tendo a presente investigação enquadramento académico – obtenção do grau de mestre em “Nutrição Humana e Metabolismo” pela NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Medicas –, a investigadora principal terá a devida orientação por parte da Doutora Ana Faria, Professora Auxiliar Convidada da mesma instituição de ensino e investigadora do *Comprehensive Health Research Center* (CHRC), além da coorientação do Dr. Carlos Carneiro, médico internista, com vários anos de experiência e responsável pela Consulta de Doenças Autoimunes no Grupo HPA Saúde.

Face ao exposto e, considerando o documento entregue para a avaliação e a sua fundamentação, parece-nos que o presente projeto de investigação cumpre os compromissos éticos e o respeito dos princípios deontológicos e legais específicos para estas situações, o que permite que esta Comissão profira um parecer favorável.

Contudo, deve a investigadora enviar a esta Comissão um exemplar do consentimento informado a ser utilizado na investigação, para que o mesmo possa ser apenso ao projeto entregue.

Portimão, 15 de março de 2021

Ana Paula Fontes

Consultora do Núcleo de Formação e Desenvolvimento Profissional

Vice-Presidente da Comissão de Ética para a Saúde

Grupo Hospital Particular do Algarve



Anexo 4 - Registo numa base de dados de acesso público - *clinicaltrials.gov*

ClinicalTrials.gov PRS
Protocol Registration and Results System

ClinicalTrials.gov PRS **DRAFT Receipt (Working Version)**

Last Update: 03/25/2022 08:26

ClinicalTrials.gov ID: [Not yet assigned]

Study Identification

Unique Protocol ID: DAIAR

Brief Title: The Effect of an Anti-inflammatory Diet in Patients With Rheumatoid Arthritis (DAIAR)

Official Title: The Effect of an Anti-inflammatory Diet on Disease Activity and Quality of Life in Patients With Rheumatoid Arthritis - Parallel Controlled Randomized Clinical Trial

Secondary IDs:

Study Status

Record Verification: March 2022

Overall Status: Completed

Study Start: April 1, 2021 [Actual]

Primary Completion: December 20, 2021 [Actual]

Study Completion: December 20, 2021 [Actual]

Sponsor/Collaborators

Sponsor: Universidade Nova de Lisboa

Responsible Party: Sponsor

Collaborators: Hospital Particular do Algarve - HPA Saúde

⚠ **WARNING** : "Hospital Particular do Algarve - HPA Saúde" is not a recognized organization name.

Oversight

U.S. FDA-regulated Drug: No

U.S. FDA-regulated Device: No

U.S. FDA IND/IDE: No

Human Subjects Review: Board Status: Approved

Approval Number: Parecer nº 04/2021

Board Name: Comissão de Ética para a Saúde do Hospital Particular do Algarve

Board Affiliation: Hospital Particular do Algarve

Phone: 00351282420400

Email: autoimuneshpa@gmail.com

Address:

Eligibility

Minimum Age: 18 Years
Maximum Age:
Sex: All
Gender Based:
Accepts Healthy Volunteers: No
Criteria: Inclusion Criteria:

- Age over 18 years;
- Presence of active disease, (DAS28 $\geq$ 2.6), under adequate control and medication.
- Able to sign informed consent

Exclusion Criteria:

- Any type of psychological deficiency, dementia or eating disorder;
- Presence of food allergies and / or intolerances;
- Be vegetarian or use Phytotherapy or other supplements (namely, pre and probiotics);
- Use of antibiotics in the last 6 months;
- Have had previous nutritional monitoring or change in eating habits in the last 6 months.

Contacts/Locations

Central Contact Person: Ana Faria, PhD
Telephone: 00351218803000
Email: ana.faria@nms.unl.pt
Central Contact Backup: Mariana Freitas, Bsc
Telephone: 00351916452980
Email: mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt
Study Officials: Ana Faria, PhD
Study Principal Investigator
NOVA Medical School, Universidade Nova de Lisboa
Locations: **Portugal**
Hospital Particular do Algarve - HPA Saúde
Portimão, Portugal
Contact: Mariana Freitas, Bsc 00351916452980
mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt
Sub-Investigator: Carlos Carneiro, MD

IPDSharing

Plan to Share IPD: Undecided
 NOTE : Plan to Share IPD must be 'Yes' or 'No' to satisfy ICMJE policy ('Undecided' is not accepted).

References

Citations:

Links:

Available IPD/Information:

U.S. National Library of Medicine | U.S. National Institutes of Health | U.S. Department of Health & Human Services

Anexo 5 - Health Assessment Questionnaire



Health Assessment Questionnaire (HAQ)

Data: __/__/__

Fase da intervenção: _____

Código atribuído: _____

Abaixo, encontram-se uma série de questões às quais gostaríamos que respondesse e assinalasse a opção que melhor se adequa ao que sente.

Você é capaz de....

		Sem dificuldade (0)	Com alguma dificuldade (1)	Com muita dificuldade (2)	Incapaz de fazer (3)
Arranjar-se	1. Vestir-se, incluindo abotoar a roupa e atar os sapatos?				
	2. Lavar o cabelo?				
Levantar	3. Erguer-se de uma cadeira?				
	4. Deitar-se e levantar-se de uma cama?				
Comer	5. Cortar a carne?				
	6. Abrir pela primeira vez um pacote de leite de cartão?				
	7. Levar à boca um copo cheio?				
Andar	8. Caminhar fora de casa em terreno plano?				
	9. Subir cinco degraus?				
Higiene	10. Lavar e limpar todo o corpo?				
	11. Tomar banho?				
	12. Sentar-se e levantar-se da sanita?				
Alcançar	13. Alcançar e trazer até si um objeto de 2,5kg, colocado numa prateleira acima da sua cabeça?				
	14. Curvar-se e apanhar roupas caídas no chão?				
Pegar	15. Abrir a porta de um carro?				
	16. Abrir a tampa de frascos que já tenham sido abertos?				
	17. Abrir e fechar torneiras?				
Atividade	18. Fazer compras e recados?				
	19. Entrar e sair de um carro?				
	20. Fazer a lida de casa, como varrer ou lavar pratos?				

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;

Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Anexo 6 – Exemplo plano alimentar da Dieta Anti-inflamatória

Dieta Anti-inflamatória

Orientações alimentares:

- Utilize azeite virgem extra (10ml (1 colher de sopa) - 2 vezes por dia).
- Consuma frutos oleaginosos (30g por dia) – amêndoas, avelãs, cajú, pinhões, ...
- Consuma peixes gordos 3 vezes por semana (150g).
- Consuma diariamente sementes de chia(10g) e de linhaça (9g).
- Elimine a ingestão de alimentos pré-confecionados, processados e fritos.
- Consuma 5 porções de hortofrutícolas por dia – 3 frutas e 2 hortícolas (1 cru e outro cozinhado). Dentro dos hortícolas, privilegie os de folha verde e as couves.
- Evite o consumo de beringela, tomate e batata, e aumente o consumo de alho, cebola, cenoura, abóbora, curgete ou vegetais de folha verde.
- Evite o consumo de cereais com glúten (grãos, farinhas e amidos com glúten – Cevada, Centeio, Cuscuz, Trigo (farelo de trigo, gérmen de trigo, amido de trigo), Kamut, Seitan, Espelta e Triticale).
- Prefira aveia, milho, arroz, trigo sarraceno e quinoa.
- Consuma 3 porções por dia de grãos integrais, exceto com glúten, e evite farinhas refinadas.
- logurte com *Lactobacillus Casei*, 2 porções por dia (125g).
- Substitua o leite por bebidas vegetais (amêndoa, arroz, coco, ...).
- O queijo fresco magro deverá ser consumido 2 porções por semana (100g).
- Tempere diariamente com curcuma, canela, pimenta preta e gengibre. A curcuma e a pimenta preta devem ser usadas ao mesmo tempo.
- Evite/elimine o consumo de sal.
- Reduza o consumo de carnes vermelhas até 1 porção por semana (100g).
- Substitua o consumo de carnes vermelhas por leguminosas (feijão, lentilhas ou grão) – 50g secas ou 100g frescas, aves – 100g e peixes- 150g - 3 porções por semana cada. Para melhorar a tolerabilidade às leguminosas, pode consumi-las descascadas ou em sopas.
- Os ovos podem ser consumidos numa porção de 2 unidades, 1 vez por semana.
- Substitua o açúcar pelo mel.
- Evite refrigerantes e sumos.
- O consumo de vinho tinto está indicado até 1 porção por dia – 125ml.
- Limite o consumo de cafeína a um máximo de 300mg/dia. Ou seja, cerca de 3 cafés curtos por dia. Se possível, substituir o café por chá verde.
- Beba entre 1,5 a 2L de água por dia.

Observações:

-No caso de apresentar excesso de peso ou obesidade, aconselha-se a sua redução, uma vez que o excesso de peso e a obesidade estão associados ao agravamento da sintomatologia devido à inflamação associada à presença de gordura corporal.

- Pratique exercício físico diariamente.

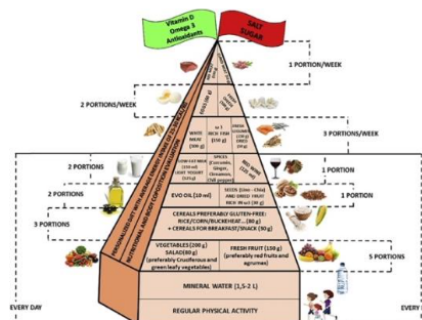


Figura 1 - Rondanelli M et al., Ideal food pyramid for patients with rheumatoid arthritis: A narrative review, Clinical Nutrition,

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;

Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Plano alimentar:

Data: __/__/__

Refeição	Descrição
	Ao acordar – 1 a 2 copos de água + 1 fruta
Pequeno-almoço (7:45)h	Pão sem glúten (ex: aveia) (75g) com 1 colher de sobremesa de doce 100% fruta ou azeite ou ½ queijo fresco magro pequeno ou 1 colher de sobremesa de manteiga de amêndoa + café sem açúcar Ou 1 iogurte enriquecido com L. Casei + 4 colheres de sopa de corn flakes ou 3 colheres de sopa de aveia + canela + 1 colher de sobremesa de chia e 1 colher de sobremesa de linhaça triturada
Meio da manhã (10:30)h	1 fruta + 30g de nozes, amêndoas, avelãs,...
Almoço (13:00)h	Metade do prato com legumes ou salada ou sopa sem batata 125g de carne limpa de gordura (1 vez por semana – carne vermelha)/peixe (3 vezes por semana, no mínimo) ou 2 ovos (1 vez por semana) ou 80g de feijão, grão ou lentilhas 3 colheres de sopa de arroz integral/massa sem glúten ou massa de arroz (30g) ou 3 colheres de sopa de feijão, grão, ervilhas, lentilhas, favas, miho (40g) ou 1 batata doce (50g) Só usar 1 colher de sopa de azeite para confeccionar ou temperar Temperar com curcuma, gengibre e pimenta preta
Meio da tarde (17:00)h	1 fruta + 1 iogurte enriquecido com L. Casei ou 1 pacote de bebida vegetal + canela + 1 colher de sobremesa de chia e 1 colher de sobremesa de linhaça triturada. Se sentir fome – 2 bolachas de arroz/milho ou 2 colheres de sopa de aveia ou 3 colheres de sopa de corn flakes
Jantar (20:00/20:30)h	Metade do prato com legumes ou salada ou sopa sem batata 125g de carne limpa de gordura (1 vez por semana – carne vermelha)/peixe (3 vezes por semana, no mínimo) ou 2 ovos (1 vez por semana) ou 80g de feijão, grão ou lentilhas Só usar 1 colher de sopa de azeite para confeccionar ou temperar Temperar com curcuma, gengibre e pimenta preta
	Ao deitar – 1 chá de gengibre

Obrigada pela sua colaboração.

A nutricionista,

(Mariana Freitas – CP2097N)

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;
Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Anexo 7 – Exemplo plano alimentar da Dieta Mediterrânea

Dieta Mediterrânea

Orientações alimentares:

- Frugalidade e cozinha simples, tendo como base as preparações que protegem os nutrientes, como as sopas, os cozidos, os ensopados e as caldeiradas.
- Consumir alimentos de origem vegetal em detrimento do consumo de alimentos de origem animal, nomeadamente de produtos hortícolas, fruta, pão de qualidade e cereais pouco refinados, leguminosas secas e frescas e frutos oleaginosos.
- Consumir alimentos de origem vegetal, produzidos localmente, frescos e da época.
- Consumir hortofrutícolas (5 porções por dia), nomeadamente, citrinos, uva, romã, figo, ameixa, melão, melancia, pêssego, maçã, pera, cerejas, alho, cebola, o tomate, pimento, pepino e vegetais folhosos verdes, como as beldroegas ou as acelgas.
- Usar as ervas aromáticas como condimento (alho, alecrim, cebolinho, coentros, hortelã, louro, manjerição, orégãos, salsa, sálvia e tomilho) por forma a reduzir a utilização de sal.
- Consumir cereais integrais e pouco refinados.
- Usar o azeite, como principal fonte de gordura.
- Consumir frutos oleaginosos com moderação.
- Consumir leguminosas regularmente, podendo ser uma alternativa à carne, se combinadas com cereais ou derivados.
- Consumir frequentemente peixe, pelo menos, 2 vezes por semana.
- Preferir lacticínios pobres em gordura, privilegiando o queijo e iogurte (2 vezes por dia).
- Consumir vinho moderadamente e integrado no momento de refeição.
- Beber 1,5l (mulheres) ou 1,9l (homens) de água por dia. Pode ser substituída por infusões.
- Não consumir carnes vermelhas mais do que duas vezes por semana e as carnes processadas não mais do que uma vez por semana.
- Consumir batatas, 3 ou menos vezes por semana e dar preferência aos cereais como principal acompanhamento da fonte da proteína (peixe, carne, ovo ou leguminosas).
- Consumir alimentos açucarados em ocasiões especiais e em pequenas quantidades (no máximo 2 vezes por semana).
- Fazer as refeições em família ou entre amigos, promovendo a convivência entre as pessoas à mesa.

Observações:

- No caso de apresentar excesso de peso ou obesidade, aconselha-se a sua redução, uma vez que o excesso de peso e a obesidade estão associados ao agravamento da sintomatologia.
- Pratique exercício físico diariamente.



Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;

Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Plano alimentar:

Data: __/__/__

<i>Refeição</i>	<i>Descrição</i>
	Ao acordar – 1 a 2 copos de água
Pequeno-almoço – 7:30h	1 fatia/carcaça de pão integral, centeio ou mistura (75g) com borrifar com azeite leve/suave e alho ou ½ queijo fresco magro pequeno ou 1 a 2 fatias de queijo light + 1 café sem açúcar
Meio da manhã – 10:30h	1 fruta + 1 iogurte sólido magro natural
Almoço – 13:00h	Metade do prato com legumes ou salada ou sopa sem batata 125g de carne limpa de gordura (2 vezes por semana – carne vermelha no máximo, 2 vezes por semana - carne branca)/peixe (no mínimo, 2 vezes por semana) ou 80g de feijão, grão ou lentilhas ou 2 ovos (2 vezes por semana) 3 colheres de sopa de arroz integral/ massa integral ou 3 colheres de sopa de feijão, grão, lentilhas, favas, ervilhas ou milho (mais de 2 vezes por semana) ou 1 batata do tamanho de 1 ovo (doce ou branca) (menos de 3 vezes por semana) Só usar azeite para confeccionar/temperar
Meio da tarde – 17:00h	1 sólido magro natural ou 1 queijo fresco magro pequeno + 1 fruta + 30g de nozes, castanhas do pará, nozes pecan, amêndoas, avelãs,...
Jantar – 20:00h	Metade do prato com legumes ou salada ou sopa sem batata 125g de carne limpa de gordura (2 vezes por semana – carne vermelha no máximo, 2 vezes por semana - carne branca)/peixe (no mínimo, 2 vezes por semana) ou 80g de feijão, grão ou lentilhas ou 2 ovos (2 vezes por semana) 3 colheres de sopa de arroz integral/ massa integral ou 3 colheres de sopa de feijão, grão, lentilhas, favas, ervilhas ou milho (mais de 2 vezes por semana) ou 1 batata do tamanho de 1 ovo (doce ou branca) (menos de 3 vezes por semana) Só usar azeite para confeccionar/temperar
Ceia – 23:00h	1 fruta

Obrigada pela sua colaboração.

A nutricionista,

(Mariana Freitas – CP2097N)

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;
Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Anexo 8 - Diário alimentar

Diário Alimentar

Leia com atenção e tente cumprir as instruções de utilização.

Instruções de utilização

- É necessário anotar tudo o que foi ingerido durante os seguintes dias: terça-feira da primeira semana, sábado da segunda semana, domingo da terceira semana, quarta-feira da quarta semana e segunda-feira da quinta semana.
- Para isso, necessitamos de uma descrição clara do alimento ou bebida que tiver consumido.
- É importante mencionar também, o tipo de alimento, usando descrições exatas. Por exemplo: leite gordo, leite magro, queijo da serra, queijo flamengo, ...
- Se comer fora de casa, deve levar sempre consigo as folhas de registo e anotar tudo o que comer e beber, imediatamente após o consumo. Não esquecer também de apontar tudo o que é consumido no intervalo das refeições, como por exemplo, bolachas, fruta, café, rebuçados, pastilhas, etc.
- Em cada dia, deve registar as refeições que consumiu, a hora a que foram consumidas, e a porção exata do que comeu.

Indicações de utilização da tabela

Na coluna "refeições" deve indicar a respetiva refeição, iniciando sempre por ordem cronológica. Ex: pequeno-almoço, meio da manhã, ...

Na coluna "hora" deve colocar a hora a que realizou a refeição respetiva.

Na coluna "local" deve explicar o local onde foi tomada a refeição. Ex: casa, restaurante, cadeia de fast food, cafetaria, etc.

Na coluna indicativa da "descrição da refeição" deverá descrever cada alimento que tomou nessa refeição, sendo a mais descritiva e específica possível. Incluir também porções. Ex: um iogurte sólido com 125g, de aroma a morango, magro, Danone.

Por fim, a coluna "método de confeção" deve indicar que tipo de técnica culinária foi utilizada na confeção do alimento. Ex: frito, cozido, grelhado, ... Assim como o tipo de gordura usada na preparação desse prato, no caso de haver possibilidade de saber. Se a comida for comprada feita, referir esse facto.

Atenção: É necessário preencher o diário alimentar, por forma, a ser entregue no dia em que vem à consulta.

É importante que não tenha qualquer tipo de receio, ou constrangimento, no preenchimento do diário. Quanto mais sincero for, mais nos está a ajudar.

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;
Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Data: __/__/__

Dia e número semana: _____

Nº participante: _____

Refeição	Hora	Local	Descrição da refeição	Método de confeção

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;
Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Data: ____/____/____

Dia e número semana: _____

Nº participante: _____

Refeição	Hora	Local	Descrição da refeição	Método de confeção

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;
Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Data: ____/____/____

Dia e número semana: _____

Nº participante: _____

Refeição	Hora	Local	Descrição da refeição	Método de confeção

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;
Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Data: __/__/__

Dia e número semana: _____

Nº participante: _____

Refeição	Hora	Local	Descrição da refeição	Método de confeção

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;
Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt

Data: __/__/__

Dia e número semana: _____

Nº participante: _____

Refeição	Hora	Local	Descrição da refeição	Método de confeção

Investigadora principal: Dra. Mariana Freitas; Orientadores: - Dr. Carlos Carneiro e Doutora Ana Faria;
Mestrado em Nutrição Humana e Metabolismo da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
mariana.m.freitas@edu.nms.unl.pt