



**Universidade de Brasília
Faculdade Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição**

**EFEITO DE UM MIX DE PROBIÓTICOS SOBRE A MICROBIOTA
INTESTINAL DE PACIENTES COM CONSTIPAÇÃO**

Aluno: Marcus Vinícius Rodrigues Ferreira

Matrícula: 15/0017031

Brasília – DF

2018



**Universidade de Brasília
Faculdade Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição**

**EFEITO DE UM MIX DE PROBIÓTICOS SOBRE A MICROBIOTA
INTESTINAL DE PACIENTES COM CONSTIPAÇÃO**

Trabalho apresentado ao curso de graduação em
Nutrição da Universidade de Brasília, como
requisito parcial de avaliação da disciplina
trabalho de conclusão de curso 2.

Aluno: Marcus Vinícius Rodrigues Ferreira

Matrícula: 15/0017031

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Borges Botelho

Brasília - DF

2018

Dedico este trabalho aos meus pais que não mediram esforços para ver o primeiro da família formado em uma Universidade Federal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar junto comigo e me levantar nos momentos em que eu parecia não ter mais forças. Por ter me permitido conquistas tão grandes e maravilhosas, que eu jamais sonharia que poderiam impactar a vida de tanta gente.

Agradeço aos meus pais que providenciaram tudo que era necessário e mais um pouco para que eu iniciasse e concluísse meus estudos na Universidade de Brasília. Vocês foram essenciais nessa conquista e fazem parte dela.

À minha orientadora, professora Patrícia, por ser paciente, compreensiva, mas também muito exigente, inteligente e brilhante. Este trabalho JAMAIS teria a mesma qualidade se não fosse seu auxílio e dedicação.

A Ananda, mestranda do projeto que me acompanhou na tabulação de MUITOS dados. Fico grato por poder te ajudar e ser ajudado, esses dados foram muito importantes em ambas as pesquisas e foram também minha maior experiência prática na elaboração do TCC. Além disso cabe um agradecimento aos amigos que me ajudaram nas minhas tabulações, eu não conseguiria sem vocês.

À Cifarma, empresa que financiou todo o estudo e foi muito ética e solícita quanto aos materiais, metodologia e divulgação dos resultados dos diversos estudos que saíram do mesmo projeto.

Aos amigos que me salvaram muitas vezes em trabalhos acadêmicos, me propiciaram boas risadas, RU's, SS's e MS's e fizeram dessa graduação inteira um pouco mais leve. As Amandas, Eduardo, Gabriela, Larissa, Ricardo, meu muito obrigado.

Ao CANut por ser meu maior espaço de convivência, onde conheci amigos e colegas que quero levar para vida. Lá descansei, procrastinei, me diverti, mas também estudei, conversei, debati e aprendi. Muito obrigado CANut por ser responsável por parte do meu amor pelo curso de nutrição da UnB.

À Atlética Energética, uma das minhas maiores paixões e orgulho. Obrigado por todo aprendizado, experiências, gestão, amigos, rolês, amor e sobretudo por fazer nascer e crescer em mim um ideal. Aos novos e futuros integrantes da Associação atlética acadêmica do curso de Nutrição-UnB, que vocês possam levar esse ideal adiante: Unir os alunos, promover amor, felicidade, convívio, integração, esporte e fazer com que cada um tenha mais um motivo de orgulho de estar no melhor curso desta universidade. Apesar de todas as dificuldades e pressões vocês foram pra mim um refúgio dos momentos difíceis que perpassaram a elaboração desse trabalho.

À Universidade de Brasília por me propiciar a vivência de TANTAS experiências diferentes que me fizeram enxergar o mundo de outra forma, crescer como pessoa, e me transformar no que sou hoje. Espero que estes agradecimentos não signifiquem um adeus, mas um até breve.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 SAÚDE INTESTINAL E MICROBIOMA	7
2.2 CONSTIPAÇÃO	8
2.3 CONSTIPAÇÃO X PROBIÓTICOS	9
3. OBJETIVO GERAL	11
4. METODOLOGIA	11
4.1 MATERIAIS	11
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	11
4.3 AVALIAÇÃO DO ESTILO DE VIDA	12
4.4 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL	13
4.5 QUESTÕES ÉTICAS	14
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
5. RESULTADOS	16
5.1 PERFIL DA AMOSTRA	16
5.2 ESTILO DE VIDA	18
5.3 COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA FECAL	18
6. DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÃO	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) forma um complexo ecossistema com a microbiota residente, constituindo uma barreira funcional e estrutural que protege o organismo dos ataques de patógenos (BARLEN et al., 2013). A desregulação dos componentes da barreira intestinal está associada com o nível de permeabilidade e o desenvolvimento de doenças como a doença celíaca, síndrome do intestino irritável, doenças inflamatórias intestinais (CAMILLERI *et al.*, 2012) e a constipação (ZHAO; YU, 2016). A constipação atinge cerca de 12 a 17% da população mundial adulta, com predominância no sexo feminino (cerca de 8,2% a mais que em homens) (SUARES; FORD, 2011). É caracterizada por uma disbiose intestinal com desregulação dos componentes da barreira intestinal (LEE; LEE, 2014).

A barreira intestinal é constituída por multicamadas, cada qual responsável por dificultar a passagem de microorganismos através do epitélio: o suco gástrico e pancreático, por exemplo, degradam bactérias e antígenos; as bactérias comensais por sua vez inibem o crescimento de colônias patogênicas, enquanto as camadas de muco formadas pela água e secreções de células epiteliais impedem a adesão microbiana e ainda ajudam a matar algumas bactérias patogênicas por conterem fatores antimicrobianos. Por fim, o epitélio intestinal, unido por “tight junctions”, forma a última e consistente camada contra a passagem de microorganismos e antígenos. Além disso, ocorre ainda a regulação da barreira intestinal pelo sistema imune que responde aos estímulos dos antígenos e é capaz de se integrar com o epitélio e a microbiota (CAMILLERI *et al.*, 2012).

A importância da microbiota para a saúde intestinal justifica-se pelas numerosas funções que estes microorganismos desempenham. Entre elas podemos destacar a fermentação de compostos não digeríveis; produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais podem conferir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro; modulação do sistema imune do intestino e a regulação da motilidade intestinal (LEE & LEE, 2014)

Em situações como na constipação intestinal crônica, a população microbiana pode estar em desequilíbrio, com predominância de bactérias potencialmente patogênicas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* em detrimento das estirpes de *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* de característica comensal. Nesse sentido, os sintomas de constipação ligados a perda da motilidade intestinal vêm sendo associados com a disbiose, justificando-se a importância de modular a microbiota intestinal, sobretudo quando do surgimento dessas manifestações. (ZHAO; YU, 2016).

Uma das formas de se modular a microbiota é através da ingestão de probióticos. Os probióticos são microorganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades suficientes, conferem algum benefício à saúde do hospedeiro (HILL, 2014). Evidências mais recentes apontam para o benefício do uso deste produto em pacientes com constipação, melhorando os sintomas e contribuindo com a qualidade de vida do paciente. Dimidi *et al.* (2014) demonstraram que o uso de probióticos levou a um aumento significativo da frequência semanal de evacuação em pacientes com constipação. No entanto, é necessário cautela na interpretação dos dados, uma vez que os efeitos dos probióticos são estirpe-dependentes e variam de acordo com a microbiota intestinal do hospedeiro (DIMIDI et al., 2014). Esse efeito estirpe -dependente já foi bem descrito por Wang, *et al.*, (2017) ao suplementar ratos com *B. adolescentis* de 3 variações diferentes. Os autores demonstraram que as estirpes com os melhores efeitos sobre a constipação (*B. adolescentis* 667; *B. adolescentis* 669) eram as que tinham melhor adesão às células intestinais, conseguiam crescer melhor e exercer maior efeito sobre a microbiota do hospedeiro, quando comparadas com os grupos controle e *B. adolescentis* 626. Já Faghihi *et al.*, (2015) verificaram que a suplementação de um probiótico contendo apenas *E. Coli* Nissle 1917 (uma estirpe probiótica da *E. Coli*) não apresentou efeitos significantes em humanos com constipação.

Logo, a avaliação da administração conjunta de estirpes que ainda não foram estudadas em relação a constipação se faz necessária para avaliar a real eficácia desse produto na composição da microbiota intestinal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SAÚDE INTESTINAL E MICROBIOMA

O intestino constitui um importante eixo de regulação da saúde humana. Suas principais funções são digerir e absorver nutrientes ou substâncias produzidas localmente, e impedir, por intermédio da barreira intestinal, a passagem de microorganismos e fragmentos do meio externo para o organismo. A barreira intestinal pode impedir essa adesão bacteriana por diversos mecanismos. Dentre eles, destaca-se a produção de muco pelas células caliciformes, a produção de fatores antibióticos pelas células de Paneth e a própria conformação do epitélio em “tight junctions” (WEISS, 2011).

No entanto, essas células do epitélio intestinal desempenham muitas outras funções que vão além de digerir/absorver ou impedir a passagem de compostos. Dentre essas funções, destaca-se a fina comunicação com os microorganismos (MO's) colonizadores do lúmen e com outras células que habitam o tecido intestinal, como as do sistema imune. O epitélio intestinal é capaz de identificar quais MO's são benéficos ou potencialmente deletérios e ainda secretar compostos inibidores do crescimento de colônias patogênicas, modulando a microbiota (MALOY & POWRIE, 2011). Esta, por sua vez, desempenha funções importantes para a manutenção da homeostase do epitélio intestinal, como a fermentação de resíduos dietéticos não digeríveis, a produção de ácidos graxos de cadeia curta, a degradação de oxalatos, efeitos tróficos no epitélio intestinal, a modulação do sistema imune e a regulação da motilidade intestinal (EDDINS; GRAY, 2007).

Logo, a saúde intestinal depende de um estado de equilíbrio entre três eixos: O microbioma, a integridade do epitélio intestinal e a resposta inflamatória e imune aos múltiplos e constantes estímulos. Uma vez que estes eixos têm estrita correlação e intercomunicação, quando um é desregulado os outros também são e inicia-se um processo cíclico onde a microbiota desregulada favorece a permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, a resposta inflamatória e esta, por sua vez, também afeta a integridade das células da barreira intestinal (WEISS, 2011).

A desregulação da microbiota pode ocorrer por influência de diversos fatores como hábitos alimentares não saudáveis, estilo de vida sedentário, tabagismo, estresse e até mesmo o ciclo da vida. A quantidade de fibras e compostos bioativos na dieta pode influenciar positiva ou negativamente na população bacteriana; o perfil desbalanceado de macronutrientes também pode contribuir com alterações dessa população. Dietas altas em proteína por exemplo, podem aumentar a fermentação putrefativa, produzindo compostos

tóxicos e predispondo os indivíduos a maior risco de doenças do cólon. Já dietas altas em gordura induzem elevação dos níveis de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos na circulação, provavelmente pelo aumento da permeabilidade intestinal. LPS é um potente agente inflamatório que está ligado com o desenvolvimento de doenças metabólicas (CONLON; BIRD. 2014).

Além disso, os hábitos alimentares durante toda a vida tem relação de dupla via com o tipo, quantidade e função dos microorganismos, de modo que, a cultura alimentar contribui a longo prazo com a composição da população microbiana e, por outro lado, as próprias características da microbiota podem influenciar em como o indivíduo assimila os nutrientes no intestino (CONLON; BIRD. 2014). Da mesma forma, a inatividade física, hábito de fumar e o stress podem contribuir significativamente para o crescimento de colônias de microorganismos patogênicos em detrimento dos comensais (CONLON; BIRD. 2014). Logo, um estilo de vida inadequado pode contribuir para a disbiose intestinal, favorecendo processos inflamatórios tanto crônicos quanto agudos. Por conseguinte, é possível associar tais processos à etiologia de doenças inflamatórias intestinais, como a Doença de Chron, síndrome do intestino irritável e colite ulcerativa (KHOR, et al., 2011), e também a desordens de motilidade, como a diarreia e a constipação intestinal (TUDDENHAM; SEARS, 2015; ZHAO; YU, 2016).

De maneira geral, na maioria das doenças intestinais, é observada a alteração da microbiota intestinal. No entanto, ainda não é claro, se o desenvolvimento das doenças intestinais é causado e/ou ampliado por essa alteração ou, se o contrário ocorre. Porém, é fato que a microbiota saudável e sintonizada com a microecologia intestinal são fatores protetores contra tais patologias. Assim, pode-se dizer que existe uma complexa relação bidirecional entre o hospedeiro e a microbiota, a qual é fundamental no processo de saúde-doença (TUDDENHAM; SEARS, 2015), em especial, na constipação.

2.2 CONSTIPAÇÃO

A Constipação intestinal pode ser observada pela manifestação de alguns sintomas comuns. Os critérios de ROMA III classificam os pacientes em dois grupos distintos de constipação: síndrome do intestino irritável com predominância de constipação e constipação funcional crônica. Essa classificação é realizada a partir da análise da presença dos sintomas como dificuldade e esforço excessivo para evacuar, fezes endurecidas, sensação de bloqueio anorretal e de defecação incompleta, frequência

intestinal inconstante e necessidade de manobras manuais para evacuar (SCHMULSON; DROSSMAN, 2017).

O grau de constipação pode ainda ser avaliado através da análise do tempo de trânsito e função intestinal, categorizando os pacientes constipados em três grupos: Síndrome do intestino irritável com predominância de constipação (SII), disfunção do assoalho pélvico e constipação por trânsito lento (BHARUCHA, 2007).

Os critérios de ROMA são utilizados como ferramenta diagnóstica desde 1980 e foram um dos primeiros instrumentos a serem usados para diagnosticar a constipação. Com a necessidade de atualizações foram publicados os critérios de ROMA II; III, e 28 anos depois da primeira publicação, surgiram os critérios de ROMA IV. As novidades incluem orientações multiculturais que facilitam o entendimento universal das perguntas do questionário; a adição da relação da constipação com o microambiente do trato gastrointestinal; a adição de novos distúrbios como constipação induzida por opioides e mudanças em alguns critérios diagnósticos (SCHMULSON; DROSSMAN, 2017).

Sabe-se que fatores sócio-ambientais podem contribuir para o risco aumentado de constipação. Dentre esses fatores estão o gênero feminino, herança racial não-caucasiana, idade avançada e baixa renda. Condições médicas como distúrbios neurológicos, hipertonia do assoalho pélvico e algumas medicações também aumentam o risco, assim como o estilo de vida e padrão dietético, onde o sedentarismo e dietas pobres em fibras estão fortemente associados com a constipação intestinal (EDDINS; GRAY, 2007).

A constipação também tem sido associada a alteração do microbioma. Huang *et al.*, (2018) demonstraram que indivíduos com constipação intestinal apresentam disbiose, com prevalência de bactérias gram-negativas patogênicas como as do gênero *Clostridium* e as da família *Enterobacteriaceae*. O aumento de proteobactérias também é constantemente verificado em indivíduos com disbiose (SHIN, *et al.*, 2015).

A disbiose, por sua vez, predispõe uma inflamação crônica de baixo grau na mucosa, levando a perda de motilidade intestinal e diminuição da propulsão peristáltica, e conseqüentemente, à constipação. Sendo assim, uma possível linha de tratamento seria a reversão da disbiose por meio do uso de probióticos (HUANG, *et al.*, 2018).

2.3 CONSTIPAÇÃO X PROBIÓTICOS

Nos últimos anos, muitos estudos foram desenvolvidos a fim de avaliar o uso de probióticos e o tratamento da constipação intestinal. Segundo Hill *et al* (2014) probióticos podem ser definidos como microorganismos vivos que, quando administrados nas

quantidades adequadas, conferem algum benefício de saúde ao indivíduo. Apesar da medicina já utilizar os probióticos como tratamento de doenças e promoção de saúde desde a antiguidade, apenas no século 20 é que foi descoberto cientificamente que as bactérias, em especial as ácido-láticas e gram positivas, poderiam ter alguma influência benéfica no trato digestório e no sistema imune. (BEHNSEN et al., 2013)

A maior parte dos MO's considerados probióticos são gram-positivos. Dentre eles os mais utilizados para tratar disfunções intestinais são as bactérias das dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. No entanto, não só as bactérias gram-positivas podem ser consideradas probióticas. Algumas estirpes gram-negativas, como a *Escherichia Coli* Nissle 1917 e alguns fungos como *Saccharomyces ssp.* já apresentaram efeitos benéficos em alguns estudos como no de Von Buenau, et al., (2005), e o no de Behnsen et al., (2013).

Os probióticos têm a capacidade de atuar alterando a composição da microbiota fecal. Algumas das alterações mais comumente observadas em situação de disbiose e constipação intestinal que podem ser revertidas pelo uso dos probióticos, são o aumento da população de bactérias do filo dos *Bacteriodetes* e da família *Enterobacteriaceae*, e a diminuição de bactérias ácido láticas dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (CERESOLA et al., 2018).

Ford et al (2014) em sua revisão sistemática e meta análise, analisaram 43 ensaios clínicos randomizados que avaliaram o efeito dos probióticos, prebióticos e simbióticos na constipação crônica em mais de 8000 indivíduos. Os autores encontraram evidências para suportar a hipótese de que o uso de uma combinação de probióticos é efetiva na melhoria dos sintomas de constipação. Todavia salientaram que os efeitos estirpe-específicos ainda permanecem obscuros.

O mecanismo de ação dos probióticos na motilidade intestinal e no desfecho de tempo de trânsito intestinal também ainda é pouco conhecido. No entanto, alguns estudos como o de Dimidi et al. (2017) sugerem que a estimulação do eixo intestino-cérebro através da produção bacteriana e absorção intestinal de ácidos graxos de cadeia curta e alguns peptídeos podem estimular o trânsito intestinal. Outra relação mencionada seria entre o sistema neuroendócrino do intestino e a microbiota via serotonina e 5-hidroxitriptamina, que são neurotransmissores importantes no controle das respostas motoras e secretoras.

Ainda que haja extensa quantidade de estudos avaliando a ação dos probióticos em sintomas gastrointestinais, poucos deles são considerados de boa qualidade

metodológica, e quando nos referimos aos sintomas de constipação intestinal e a composição da microbiota em indivíduos com constipação, ainda menos estudos estão disponíveis para atestar a eficácia da abordagem terapêutica (MENEES et al., 2012).

Além disso, faltam dados sobre tipos de estirpes e dosagem adequada para o tratamento específico de cada doença. Desse modo, torna-se de suma importância a produção de novos materiais que sirvam de base para o fortalecimento das evidências em torno do uso de probióticos e constipação intestinal. Portanto, a hipótese desse estudo é que um mix de probióticos é capaz de modular a microbiota intestinal e, conseqüentemente, contribuir para a saúde intestinal.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de um mix de probióticos sobre a composição da microbiota intestinal de indivíduos com constipação intestinal

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Cápsulas placebo: maltodextrina (5g)

Cápsula flora 5: mix de probióticos constituídos por pelo menos 10^9 UFC de cada uma das seguintes bactérias: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium bifidum*

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foi realizado um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, placebo controlado com 55 indivíduos com constipação. Os indivíduos foram recrutados nas dependências da UFG por meio do convite de alunos e funcionários que possuíam interesse em participar e que apresentavam os critérios de elegibilidade estabelecidos. Além disso, foi realizada a divulgação da pesquisa por meio de folhetos, na página oficial da FANUT – UFG e em redes sociais como facebook e instagram com texto convite e informações básicas para contato. A pesquisadora responsável entrou em contato por e-mail e telefone com os indivíduos que demonstraram interesse em participar, informando-os sobre todos os detalhes de sua participação. Foi aplicado inicialmente um questionário com os critérios de inclusão e exclusão para identificar os voluntários elegíveis. Os seguintes

critérios de inclusão foram utilizados: idade entre 19 e 70 anos e apresentar constipação segundo os critérios diagnósticos do ROMA IV.

Foram excluídos os indivíduos que possuíam diagnóstico de doenças no TGI ou complicações de cirurgias decorrentes dessas doenças, com presença de disfunção hepática ou renal, os que fizeram uso de antibióticos nas últimas 4 semanas, ou usaram drogas, vitaminas, minerais, alimentos, fitoterápicos ou suplementos para reduzir os sintomas digestivos e aqueles que consumiram alimentos contendo probióticos e prebióticos até 3 meses antes e durante a intervenção, ou alimentos nutracêuticos com atividade antiinflamatória.

Os indivíduos selecionados foram divididos em dois grupos:

- Grupo controle, que recebeu maltodextrina (5g) em cápsula por 4 semanas;
- Grupo probiótico, que recebeu um mix de probióticos em cápsulas, constituído por pelo menos 10^9 UFC de *Lactobacillus acidophilus*, 10^9 UFC de *Lactobacillus casei*, 10^9 UFC de *Lactococcus lactis*, 10^9 UFC de *Bifidobacterium lactis* e 10^9 UFC de *Bifidobacterium bifidum*, por 4 semanas. Estas estirpes geralmente são escolhidas pela sua viabilidade econômica e capacidade de resistência ao processo produtivo, ao tempo e temperatura de prateleira e a viabilidade celular após a passagem pelo TGI superior.

Os indivíduos foram instruídos a ingerir a cápsula diariamente pelo menos 30 minutos após a última refeição do dia, com água em temperatura ambiente. Foram instruídos também a manterem a rotina e os hábitos de vida e a evitar ingestão de produtos contendo prebióticos e probióticos.

Amostras de fezes foram coletadas pelos próprios indivíduos voluntários, conforme recomendações prévias. Em seguida, foram aplicados questionário socioeconômico e cultural, o recordatório de 24h e o questionário de atividade física.

4.3 AVALIAÇÃO DO ESTILO DE VIDA

Foram analisadas alterações do nível de atividade física e do consumo alimentar durante a intervenção. Estes dois parâmetros foram utilizados para verificar se as alterações nos marcadores foram realmente ocasionadas pelo tratamento e, se, portanto, as orientações de manutenção do estilo de vida foram seguidas.

Para avaliação do perfil alimentar e controle do consumo dietético durante o estudo foram realizados recordatório de 24 horas (R24H) e registro alimentar de 3 dias, utilizando formulário próprio. Nutricionistas treinadas conferiram os formulários preenchidos pelos pacientes. O recordatório de 24h foi aplicado na primeira consulta para

treinamento dos pacientes a fim de que se tornassem aptos a preencherem corretamente os registros alimentares em casa. Foram coletados 6 registros para cada indivíduo, sendo três referentes a primeira semana do estudo e os outros três a última semana do estudo, todos em dias alternados e com registro de um dia do fim de semana.

A avaliação do nível de atividade física se deu por equipe previamente treinada por meio da aplicação do Questionário Internacional de Atividade Física – IPAQ validado para a população brasileira. As tarefas metabólicas equivalentes (MET) foram calculadas a partir dos dados colhidos do IPAQ, segundo as fórmulas a seguir:

1. MET-minutos de caminhada/semana: $3.3 \times \text{minutos de caminhada} \times \text{dias de caminhada}$;
2. MET-minutos de atividade moderada/semana: $4.0 \times \text{minutos de atividade moderada} \times \text{dias de atividade moderada}$;
3. MET-minutos de atividade vigorosa/semana: $8.0 \times \text{minutos de atividade vigorosa} \times \text{dias de atividade vigorosa}$;
4. MET-minutos de atividade física total/semana: somatório de MET-minutos de caminhada + atividade moderada + atividade vigorosa.

O gasto energético (Kcal MET/semana) foi calculado considerando os minutos por semana para cada atividade estimado em METS, utilizando-se a seguinte fórmula: MET-minutos total \times peso do indivíduo/60 minutos

4.4 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL

As fezes foram coletadas pelos próprios indivíduos, os quais foram instruídos a evacuar em plástico limpo e seco, evitando o contato com água ou urina, e após a evacuação, coletar as amostras de fezes em swab de algodão umedecido com solução estabilizante.

As amostras foram submetidas à lise celular e posterior extração de DNA utilizando a técnica de beads magnéticas, com um protocolo proprietário (neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Amostras de isolados bacterianos (*Salmonella enterica* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (isoladas e identificadas por VITEK®2), foram submetidas ao mesmo processamento com beads magnéticas para obtenção do DNA. Foram realizadas

diluições em escala de 10X para DNA, e em escala de 1log de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) para os microrganismos isolados. Adicionalmente, uma molécula de DNA sintético foi inserida em algumas amostras, previamente à extração de DNA e em diferentes concentrações (aproximadamente 600, 6.000, 60.000 moléculas), para avaliar seu perfil de recuperação após o sequenciamento.

A identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina Inc., USA), utilizando o kit V2 de 300 ciclos, single-end, sem normalização das bibliotecas. As sequências de DNA dos microrganismos foram analisadas através de um pipeline proprietário (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil), considerando no máximo 1% de erro acumulado no sequenciamento.

Para a identificação das espécies de microrganismos presentes nas amostras, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com um banco de dados contendo outras sequências de DNA já caracterizadas para as espécies de interesse. Posteriormente às análises de bioinformática, os resultados foram carregados na plataforma Neobiome para visualização

4.5 QUESTÕES ÉTICAS

Atendendo à legislação nacional vigente, no que se refere às normas de pesquisas em seres humanos, definidas pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS), Resolução nº 466/2012, o projeto matriz deste estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Goiás (UFG) e aprovado nº do parecer 2.281.977, CAAE Nº 69990717.5.0000.5078 em 18 de setembro de 2017.

A pesquisadora responsável orientou todos os indivíduos sobre a pesquisa e aqueles que manifestaram concordância em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, conforme a resolução 466/2012 e suas complementares.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada grupo experimental observado teve seus resultados apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Os valores foram inicialmente avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Diferenças entre grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-

whitney e intra-grupos pelo teste de Wilcoxon. O valor para α de 0,05 foi adotado como crítico para rejeição da hipótese de nulidade.

5. RESULTADOS

5.1 PERFIL DA AMOSTRA

Inicialmente foram selecionados 55 indivíduos que atendiam aos critérios de elegibilidade. Dez deles não finalizaram o estudo por desistência ou por não terem cumprido o requisito de ingerir pelo menos 80% das cápsulas fornecidas, totalizando 45 indivíduos ao final do estudo.

Os indivíduos foram randomizados e pareados em dois grupos de acordo com idade, sexo e IMC. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no que diz respeito aos parâmetros utilizados para o pareamento (Tabela 1). Variáveis sócio-ambientais como renda, nível de escolaridade, ingestão e frequência de bebida alcoólica e ingestão hídrica também foram avaliadas, pois, são variáveis que podem estar associadas a diferenças na composição da microbiota intestinal (CONLON; BIRD, 2014; ENGEN, *et al*, 2015). A tabela 1 mostra que também não houve diferença entre os grupos para estes parâmetros, não sendo necessário, portanto, inseri-los no modelo estatístico.

Tabela 1- Caracterização da amostra no baseline

		Controle	Probiótico	P
N		22	25	
Idade		30,4±10,2	26,4±8,5	0,114
Sexo	Feminino	20	22	0,747
	Masculino	2	3	
IMC		24,1±4,6	23,3±3,5	0,890
Anos de estudo	Até 11 anos	5	4	0,559
	12 anos ou mais	17	21	
Renda		9133±24995	3832±3265	0,766
Ingestão de bebida alcoólica	Sim	11	12	0,773
	Não	11	13	
Frequência de ingestão de bebida alcoólica	Não bebe	11	13	0,102
	Menos de 1 vez por semana	10	6	
	Pelo menos 1 vez na semana	1	6	
	Até 1L	11	10	
Ingestão hídrica	1L a 2L	9	10	0,549
	Mais de 2L	2	5	

5.2 ESTILO DE VIDA

Não foram observadas diferenças significativas quanto a ingestão energética e de macronutrientes e o nível de atividade física ao longo da intervenção.

Tabela 2. Parâmetros do estilo de vida

	Controle			Probiótico			P*
	T0	T30	P	T0	T30	P	
Kcal/D (VET)	1521±561	1573±556	0,463	1637±535	1696±663	0,668	0,853
PTN (g)	65,9±23,2	69,2±26,0	0,723	70,6±30,5	72,8±32,8	0,732	0,672
LIP (g)	60,1±24,4	61,9±24,5	0,381	62,1±29,3	66,1±29,3	0,819	0,691
CHO (g)	179±72,5	184,7±75,8	0,653	198,8±59,7	202,4±83,9	0,797	0,916
Fibras (g)	13±6,22	11,1±4,8	0,177	15,3±5,8	13,4±6,0	0,072	0,634
MET total	2293±3505	1843±1698	0,881	1120±1054	1253±1922	0,131	0,431
MET em Kcal	2737±4282	2119±1948	0,970	1189±1350	1253±1922	0,093	0,465

P: diferença intra grupo; P*: diferença entre os grupos; Kcal/D (VET): Kcal por dia (valor energético total); PTN: proteína; LIP: lipídio; CHO: carboidrato; MET: equivalentes metabólicos.

5.3 COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA FECAL

A tabela 3 apresenta o % de abundância relativa dos filos de bactérias identificados nas fezes dos indivíduos antes e após a intervenção.

Tabela 3. Percentual de abundância relativa dos filios de bactérias nos grupos controle e probiótico

Percentual de abundância	Controle %			Probiótico %			P
	T0	T30	P	T0	T30	P	
<i>Actinobacteria</i>	1,88±1,90	1,49±2,16	0,875	1,6±2,1	1,6±2,7	0,401	0,851
<i>Bacteroidetes</i>	57,16±14,93	44,99±23,94	0,140	49,95±19,29	46,32±20,35	0,485	0,332
<i>Firmicutes</i>	36,21±15,02	35,71±21,47	0,925	37,13±17,30	37,86±21,41	0,733	0,900
<i>Fusobacteria</i>	0,071±0,183	0,291±0,649	0,138	0,041±0,109	0,220±0,514	0,056	0,972
<i>Proteobacteria</i>	2,4±1,87	3,00±3,42	0,451	5,46±6,77	2,66±2,50	0,067	0,079
<i>Cyanobacteria</i>	0,002±0,008	0,000±0,000	0,317	0,00±0,00	0,00±0,00	1,000	0,200
<i>Euryarchaeota</i>	0,064±0,123	0,028±0,054	0,767	0,509±0,097	1,32±6,12	0,894	0,742
<i>Lentisphaerae</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	1,000	0,011±0,050	0,002±0,005	0,785	0,712
<i>Synergistetes</i>	0,038±0,107	0,010±0,028	0,223	0,010±0,035	0,007±0,021	0,892	0,138
<i>Verrucomicrobia</i>	2,15±4,19	0,179±0,659	0,008	1,38±2,59	1,21±4,52	0,049	0,183

Foi encontrada uma redução marginalmente significativa do percentual de abundância relativa do filo *Proteobacteria* no grupo probiótico quando comparado ao grupo placebo (p=0,079). Houve redução intragrupo no percentual de abundância do filo *Verrucomicrobia* tanto para o grupo placebo quanto para o grupo controle, mas sem diferenças entre grupos.

Nenhuma diferença foi encontrada no que diz respeito aos filios *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, ou outros filios menores.

Ao analisar a composição da microbiota a nível de espécies foi possível observar redução significativa do percentual de abundância de *Blautia Faecis* e *Ruminococcus Torques* e redução marginalmente significante de *Clostridium Perfringens* (Figuras 1, 2 e 3). Não foram encontradas diferenças significativas no percentual de abundância de outras espécies.

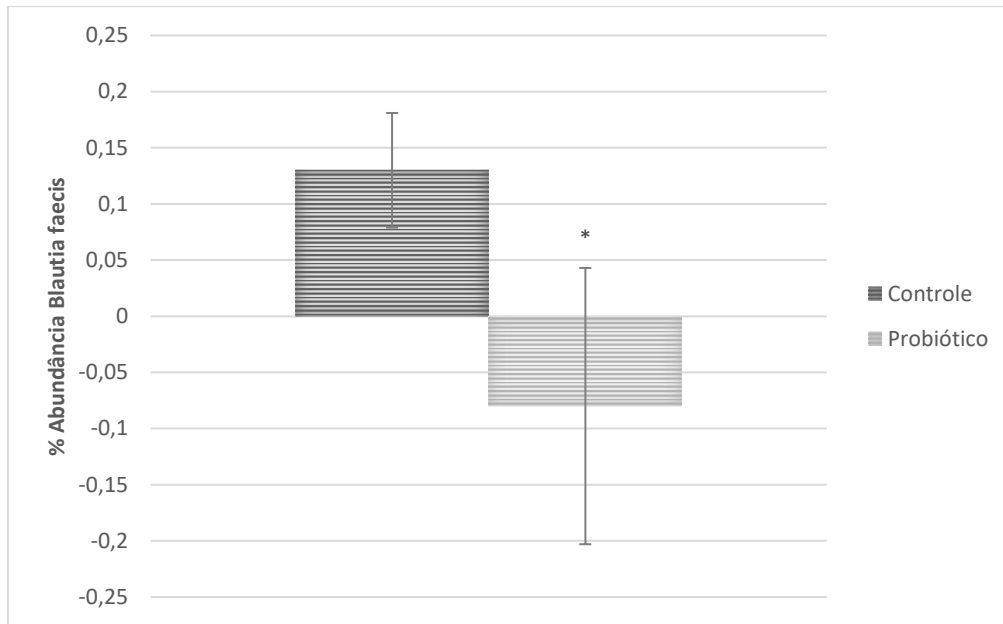


Figura 1. Diferença no percentual de abundância relativa de *Blautia Faecis* após a intervenção nos grupos controle e probiótico *p = 0,036

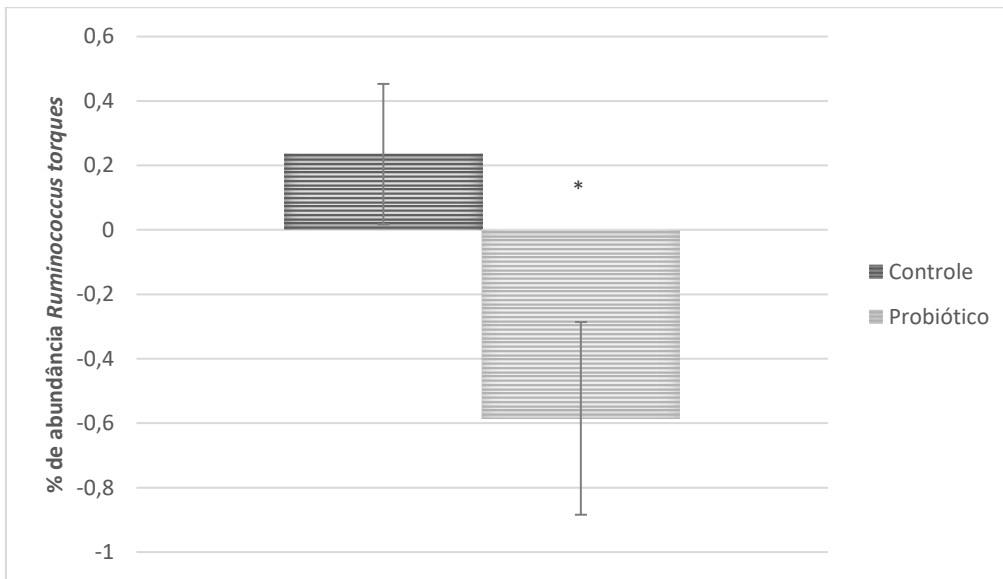


Figura 2. Diferença no percentual de abundância relativa de Ruminococcus Torques após a intervenção nos grupos controle e probiótico. * $p = 0,020$

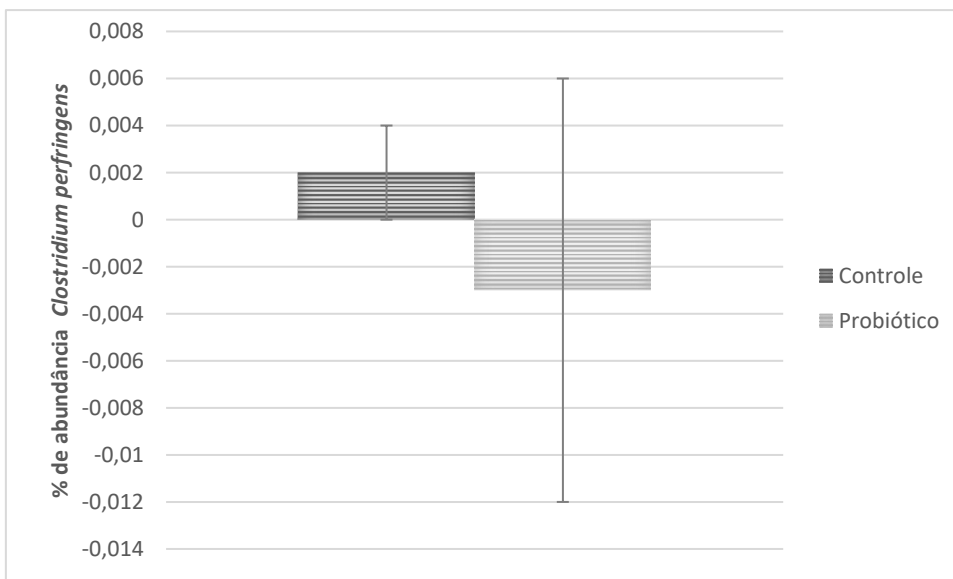


Figura 3. Diferença no percentual de abundância relativa de Clostridium Perfringens após a intervenção nos grupos controle e probiótico * $p = 0,072$

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, a suplementação de um mix de probióticos foi capaz de reduzir marginalmente a população bacteriana do filo *Proteobacteria* e a espécie *C. Perfringens* e significativamente a população de *R. Torques*, *B. Faecis*. Não foram encontradas diferenças quanto aos demais filios e espécies .

O filo *Proteobacteria* é reconhecido pela abundância de bactérias patogênicas, tais como as pertencentes ao gênero *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*. Parthasarathy *et al.* (2016) ao analisarem a microbiota fecal quanto ao poder de predição do trânsito colônico e produção de metano observaram que o filo *Proteobacteria* está correlacionado com o tempo de trânsito intestinal lento. Desse modo, nossos resultados apontam para a eficácia da intervenção, uma vez que houve redução de um filo cuja grande parte das bactérias está relacionada a distúrbios de motilidade.

A espécie *R. Torques* é uma bactéria gram-negativa e possui uma parede externa composta por lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é uma endotoxina que, ao entrar na corrente sanguínea, propicia um aumento do estado pró-inflamatório e contribui para a patogênese de diversas doenças. No intestino, a ação do LPS provoca distúrbios de motilidade intestinal retardando o esvaziamento gástrico e promovendo disfunção esfinteriana. (CERESOLA, *et al.*, 2018)

A redução da população de *R. Torques* promovida pela intervenção foi positiva se considerarmos o papel dessa espécie, e de outras espécies dos mesmos gêneros e família, no surgimento de doenças intestinais e desordens de motilidade intestinal. Mais especificamente trabalhos como o de Zhu, *et al.*, 2014 e de Blatchford, *et al.*, 2017 vêm mostrando que a família *Lachnospiraceae* e as estirpes da *Ruminococcus* presentes nessa família, como a *R. torques*, estão significativamente mais abundantes em distúrbios funcionais do trato gastrointestinal, em especial na constipação.

Do mesmo modo, esses distúrbios também foram relacionados com o aumento do gênero *Clostridium* (ZHAO; YU, 2016). A *C. perfringens* é um bastonete gram-positivo pertencente à família Clostridiaceae, conhecida por formar esporos resistentes e toxinas (NOGUEIRA *et al.*, 2009). O ensaio clínico randomizado de Liu, *et al.*, 2014 mostrou aumento de *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* e verificou redução significativa de *C. Perfringens* após suplementação de iogurte probiótico com 118 pacientes por 7 semanas. Adicionalmente mostraram a eficácia da intervenção na redução de sintomas de constipação intestinal.

Nosso estudo revelou uma redução marginalmente significativa de *C. Perfringens*. Diferentemente do estudo de Liu, *et al.*, (2014), o período de intervenção em nosso estudo foi de apenas 4 semanas. Logo, um tempo maior de intervenção poderia propiciar uma redução mais significativa.

Em nosso estudo, observamos também que o mix de probióticos foi capaz de reduzir significativamente o % de abundância da bactéria *B. Faecis*. Zhu *et al* (2014) mostraram que indivíduos com constipação possuem maior percentual de abundância de bactérias do gênero *Blautia* do que indivíduos sem constipação. Logo, o mix de probióticos propiciou a redução de uma bactéria que é comumente encontrada em indivíduos com constipação.

A literatura não é clara sobre qual o papel da bactéria *Blautia Faecis* no desenvolvimento ou proteção contra doenças intestinais e distúrbios de motilidade. Sabe-se, no entanto, que ela está mais abundante em situações específicas relacionadas a inflamação intestinal (TYLER; *et al.*, 2013) mas ainda não encontramos dados que relacionassem seu papel na constipação crônica.

Houve redução da população do filo *Verrucomicrobia* em ambos grupos, controle e probiótico, porém sem diferenças entre grupos. O tempo de intervenção e possível redução do poder da amostra após a desistência de 18% do N inicial podem ter influenciado no resultado final. A *Akkermansia municipihila* é a única bactéria deste filo que coloniza o intestino humano. De Meij *et al.*, 2016 verificaram que *A. municipihila* estava aumentada em animais com constipação intestinal quando comparados aos saudáveis. Intrigante é que, essa bactéria está correlacionada com a proteção contra doenças metabólicas e já é estudada como um probiótico em potencial (CERESOLA, 2018). Esses resultados sustentam a afirmação do efeito estirpe-específico e traz a atenção para a cautela com que devem ser direcionados os tratamentos com probióticos.

Contrariando nossas expectativas, não houve aumento nas populações de *Bifidobacteria* e *Lactobacilli*. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhu *et al.*, 2014 e por Yu *et al.*, 2017. Já Mezzassalma *et al.*, 2016, em seu ensaio clínico com 157 pacientes, subdivididos em três grupos, em que um grupo foi suplementado com um mix de *L. acidophilus* e *L. reuteri* e outro com *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, encontraram resultado oposto: aumento de *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* na fezes mesmo após 60 dias de suplementação, porém não avaliaram a composição completa das fezes e se houve redução de bactérias patogênicas. De fato, é amplamente descrito que espécies pertencentes à essas famílias estão reduzidas em pessoas com desordens de motilidade e

suplementá-las seria uma forma de aumentar sua população (HYANG; *et al.*,2010; MILLER; *et al.*, 2016) Todavia, nem sempre a adesão e formação de colônias acontece, mas os efeitos sobre a microbiota podem se dar pelos outros mecanismos já mencionados (DIMIDI; *et al.*, 2017).

Embora o desfecho de melhora dos sintomas de constipação intestinal não tenha sido objeto desse estudo, estes resultados preliminares apontam para a possibilidade desses efeitos uma vez que foram observadas alterações na composição da microbiota fecal que podem contribuir para a saúde intestinal.

Como fortalezas desse estudo, destacamos o controle de fatores que poderiam influenciar na composição da microbiota, como o nível de atividade física e as mudanças na alimentação; a existência de um grupo placebo e uma análise robusta e eficiente da microbiota fecal. Como limitações, temos a perda expressiva de seguimento de alguns pacientes e a ausência de avaliação dos sintomas da constipação.

7. CONCLUSÃO

Os achados desse estudo permitem concluir que um mix de probióticos foi capaz de alterar a composição da microbiota fecal de pacientes com constipação intestinal. Embora essa alteração tenha se dado, a nível filotípico, em apenas dois filos, e a nível de espécies, em apenas duas espécies, os resultados são animadores, visto que essas modificações estão relacionadas com a proteção do intestino contra filos de bactérias com potencial de causar distúrbios de motilidade intestinal, sobretudo na constipação.

É necessário ter cautela ao analisar os resultados preliminares. Mais estudos são necessários para determinar o mecanismo de ação estirpe-específico de cada bactéria e a atuação conjunta dessas, uma vez que elas podem trabalhar de maneira sinérgica ou podem ter efeitos antagônicos, não exercendo os benefícios esperados para todos os tipos de pacientes. Além disso as dosagens e tempo de tratamento precisam ser melhor elucidados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHNSEN, Judith et al. Probiotics: properties, examples, and specific applications. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 3, p. a010074, 2013.b
- BHARUCHA, A.E. Constipation. **Best Practice & research clinical gastroenterology**, vol.21, n. 4, p709-731, 2007.7.
- BLATCHFORD, Paul et al. Consumption of kiwifruit capsules increases *Faecalibacterium prausnitzii* abundance in functionally constipated individuals: a randomised controlled human trial. **Journal of nutritional science**, v. 6, 2017.
- CERESOLA, E. R. et al. Targeting patients' microbiota with probiotics and natural fibers in adults and children with constipation. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, n. 20, p. 7045-7057, 2018.
- CHENG, Jing et al. Contribution of the intestinal microbiota to human health: from birth to 100 years of age. In: **Between Pathogenicity and Commensalism**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 323-346.
- CHMIELEWSKA, Anna; SZAJEWSKA, Hania. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 1, p. 69, 2010.
- CONLON, Michael A.; BIRD, Anthony R. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 17-44, 2014.
- DEHINGIA, Madhusmita et al. Gut bacterial diversity of the tribes of India and comparison with the worldwide data. **Scientific reports**, v. 5, p. 18563, 2015.
- DE MEIJ, Tim GJ et al. Characterization of microbiota in children with chronic functional constipation. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0164731, 2016.
- DIMIDI, Eirini et al. Mechanisms of action of probiotics and the gastrointestinal microbiota on gut motility and constipation. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 484-494, 2017.
- DROSSMAN, Douglas A. Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features, and Rome IV. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1262-1279. e2, 2016.
- EDDINS, Carolyn; GRAY, Mikel. Do probiotic or synbiotic preparations alleviate symptoms associated with constipation or irritable bowel syndrome?. **Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing**, v. 34, n. 6, p. 615-624, 2007.

ENGEN, Phillip A. et al. The gastrointestinal microbiome: alcohol effects on the composition of intestinal microbiota. **Alcohol research: current reviews**, v. 37, n. 2, p. 223, 2015.

FAGHIHI, Amir H. et al. Efficacy of probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in patients with irritable bowel syndrome: a double blind placebocontrolled randomized trial. *Acta Medica Indonesiana*, v. 47, n. 3, 2015.

FAO/WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, October 1–4.

FORD, Alexander C. et al. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. **The American journal of gastroenterology**, v. 109, n. 10, p. 1547, 2014.

FUKUDA, Shinji; OHNO, Hiroshi. Gut microbiome and metabolic diseases. In: **Seminars in immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 103-114.

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

HUANG, Linsheng et al. Microbial treatment in chronic constipation. **Science China Life Sciences**, p. 1-9, 2018.

HUANG, Ruixue; HU, Jianan. Positive effect of probiotics on constipation in children: a systematic review and meta-analysis of six randomized controlled trials. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 153, 2017.

HYNÖNEN, Ulla et al. Isolation and whole genome sequencing of a Ruminococcus-like bacterium, associated with irritable bowel syndrome. **Anaerobe**, v. 39, p. 60-67, 2016.

KHOR, Bernard; GARDET, Agnès; XAVIER, Ramnik J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 307, 2011.

LEE, Kang Nyeong; LEE, Oh Young. Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 27, p. 8886, 2014.

LIU, Deliang et al. Zengye decoction induces alterations to metabolically active gut microbiota in aged constipated rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1361-1371, 2019.

MALOY, Kevin J.; POWRIE, Fiona. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298, 2011.

MENEES, Stacy; SAAD, Richard; CHEY, William D. Agents that act luminally to treat diarrhoea and constipation. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 11, p. 661, 2012.

MEZZASALMA, Valerio et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial: the efficacy of multispecies probiotic supplementation in alleviating symptoms of irritable bowel syndrome associated with constipation. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

MILLER, Larry E.; ZIMMERMANN, Angela K.; OUWEHAND, Arthur C. Contemporary meta-analysis of short-term probiotic consumption on gastrointestinal transit. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 21, p. 5122, 2016.

NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha et al. **Bacteriologia**. 2009

OJETTI, Veronica et al. The effect of Lactobacillus reuteri supplementation in adults with chronic functional constipation: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Gastrointestin Liver Dis**, v. 23, n. 4, p. 387-391, 2014.

PARK, Seong-Kyu; KIM, Min-Soo; BAE, Jin-Woo. Blautia faecis sp. nov., isolated from human faeces. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 2, p. 599-603, 2013.

PARTHASARATHY, Gopanandan et al. Relationship between microbiota of the colonic mucosa vs feces and symptoms, colonic transit, and methane production in female patients with chronic constipation. **Gastroenterology**, v. 150, n. 2, p. 367-379. e1, 2016.

SCHMULSON, Max J.; DROSSMAN, Douglas A. What is new in Rome IV. **Journal of neurogastroenterology and motility**, v. 23, n. 2, p. 151, 2017.

SHIN, Na-Ri; WHON, Tae Woong; BAE, Jin-Woo. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015.

SUARES, Nicole C.; FORD, Alexander C. Prevalence of, and risk factors for, chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and meta-analysis. **The American journal of gastroenterology**, v. 106, n. 9, p. 1582, 2011.

SUN, Meng-Fei; SHEN, Yan-Qin. Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's disease. **Ageing research reviews**, 2018.

TUDDENHAM, Susan; SEARS, Cynthia L. The intestinal microbiome and health. **Current opinion in infectious diseases**, v. 28, n. 5, p. 464, 2015.

TYLER, Andrea D. et al. Characterization of the gut-associated microbiome in inflammatory pouch complications following ileal pouch-anal anastomosis. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e66934, 2013.

- VON BUENAU, R. et al. Escherichia coli strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 1, p. 317-323, 2005.
- WANG, Linlin et al. Bifidobacterium adolescentis exerts strain-specific effects on constipation induced by loperamide in BALB/c mice. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 2, p. 318, 2017.
- WEISS, U. Intestinal networks in health and disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 297, 2011.
- YOON, Jun Sik et al. Effect of multispecies probiotics on irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2014.
- YU, Ting et al. Effects of prebiotics and synbiotics on functional constipation. **The American journal of the medical sciences**, v. 353, n. 3, p. 282-292, 2017.
- ZHAO, Ying; YU, Yan-Bo. Intestinal microbiota and chronic constipation. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 1130, 2016.