



Investigação nutricional aplicada

Efeito do probiótico multiespécies na composição da microbiota intestinal em indivíduos com constipação intestinal: Um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo

Patrícia Borges Botelho Ph.D. ^{a,*}, Marcus Vinícius Rodrigues Ferreira ^a, Ananda de Mesquita Araujo ^a, Marcela Moraes Mendes Ph.D. ^a, Eduardo Yoshio Nakano Ph.D. ^b

^a Departamento de Nutrição, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

^b Departamento de Estatística, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

História do artigo:

Recebido em 11 de dezembro de 2019

Recebido em forma revisada em 28 de maio de 2020

Aceito em 30 de maio de 2020

Palavras-chave:

Microbiota,
Probióticos,
Constipação

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um probiótico multiespécies na composição da microbiota intestinal e nos sintomas da constipação.

Métodos: Um estudo clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo foi realizado com 35 indivíduos com constipação por 30 dias. Os indivíduos foram randomizados em dois grupos: os grupos de cápsula controle (CC) e de cápsula probiótica (PC). Os sintomas da constipação foram avaliados pelos critérios de ROME IV e pelos diários de evacuação. A microbiota fecal foi analisada por sequenciamento do gene 16 S rRNA.

Resultados: A maioria dos participantes era do sexo feminino (85,7%). Houve uma redução significativa na porcentagem de participantes que tiveram defecação incompleta ($P = 0,034$), sensação de bloqueio ($P = 0,025$), e raramente apresentam fezes líquidas sem o auxílio de laxantes ($P = 0,046$) apenas dentro do grupo PC (mas nenhuma diferença significativa entre os grupos). Houve um aumento significativo na porcentagem de abundância relativa de *Blautia faecis* e *Ruminococcus torques* no grupo CC ($P = 0,003$ e $P = 0,011$, respectivamente), embora não tenha havido mudança significativa no grupo PC ($P = 0,794$ e $P = 0,958$, respectivamente), com uma diferença significativa entre os grupos ($P = 0,029$ e $P = 0,013$, respectivamente), sugerindo que o tratamento com probióticos evitou o aumento da abundância relativa percentual dessas duas espécies.

Conclusão: Esses resultados sugerem que os probióticos multiespécies em forma de cápsula podem modular a microbiota intestinal por meio da redução das bactérias comumente aumentadas em pacientes com constipação, contribuindo para o equilíbrio da microbiota e, consequentemente, para o bem-estar do indivíduo. Estudos futuros com maior número de pacientes são necessários.

© 2020 Elsevier Inc. Todos os direitos reservados.

Introdução

O trato gastrointestinal (GI) forma um ecossistema complexo com microbiota intestinal residente, que desempenha inúmeras funções importantes para a saúde intestinal, como fermentação de compostos não digeríveis, produção de ácidos graxos de cadeia curta; modulação

do sistema imunológico intestinal e regulação da motilidade intestinal [1].

Em situações como constipação intestinal, a microbiota intestinal pode estar desequilibrada, com uma maior abundância de bactérias potencialmente patogênicas com características comensais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, em detrimento das cepas de *Bifidobacteria* e *Lactobacillus*. Assim, os sintomas de constipação intestinal têm sido associados à disbiose intestinal [2]. Esse fato destaca a importância da modulação da microbiota intestinal, especialmente quando manifestações clássicas de constipação estão presentes.

A modulação da microbiota intestinal pode ser alcançada pela ingestão de probióticos. Probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades suficientes, podem fornecer alguns benefícios à saúde do hospedeiro [3]. Evidências recentes sugerem um benefício do uso deste produto em pacientes com constipação, melhorando os sintomas e contribuindo para a qualidade de vida do paciente [4].

Este estudo foi financiado pela empresa farmacêutica Cifarma Científica Farmacêutica, Goiânia, Goiás. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito. PBB participou da conceituação, curadoria de dados, análise de dados, captação de recursos, investigação, metodologia, administração do projeto, supervisão, redação da minuta original e revisão e edição do estudo. O MVRF participou da investigação, metodologia, realização dos experimentos e redação do rascunho original. AMA participou da investigação, metodologia e realização dos experimentos. MMM participou da análise dos dados e da redação, revisão e edição do estudo. EYN participou da análise dos dados. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final. Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

*Autor correspondente: UNB - Faculdade de Ciências da Saúde - Asa Norte, CEP: 70910-900, Brasília, Brasil.

Endereço de E-mail: patriciabotelho@unb.br (P.B. Botelho).

Em uma metanálise, Dimidi et al. [5] demonstraram que o uso de probióticos levou a um aumento significativo na frequência semanal de evacuação em pacientes com constipação. No entanto, é necessária cautela na interpretação dos dados, pois os efeitos dos probióticos dependem de cepa e variam de acordo com a composição inicial da microbiota intestinal do hospedeiro [5]. Este efeito dependente de cepa foi demonstrado por Wang et al. [6]. Os autores suplementaram ratos com três variações diferentes de *B. adolescentis* (CCFM 626, 667, 669) e descobriram que as variações 667 e 669 apresentaram melhores efeitos na constipação, pois houve uma maior adesão dessas bactérias às células intestinais e, consequentemente, um efeito maior na microbiota intestinal. Além disso, a avaliação da coadministração de diferentes cepas ainda não foi exaustivamente investigada e, portanto, ainda faltam evidências da real eficácia desse tipo de produto na saúde intestinal.

Além do efeito dependente de cepa, é importante enfatizar que existem poucos estudos que investigaram o efeito do probiótico em indivíduos saudáveis com constipação intestinal. A maioria dos estudos publicados sobre a microbiota intestinal considerou o efeito de produtos contendo probióticos apenas nos resultados da constipação [7-9], com poucos realmente investigando o efeito na composição da microbiota intestinal - o último frequentemente adotando abordagens direcionadas ou semidirecionadas [10,11]. Técnicas metagenômicas não direcionadas, como o sequenciamento 16S, oferecem uma abordagem mais abrangente para entender como a microbiota intestinal pode ser influenciada por probióticos.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de um produto probiótico multiespécie na composição da microbiota em indivíduos com constipação.

Materiais e métodos

Design experimental

Foi realizado um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, com 48 indivíduos com constipação. Os indivíduos foram recrutados entre setembro e outubro de 2017 na Universidade Federal de Goiás, Brasil, convidando estudantes e funcionários que estavam interessados em participar e que atendiam aos critérios de elegibilidade estabelecidos. Além disso, o recrutamento do estudo foi anunciado por meio de folhetos e pelo site oficial da universidade, bem como por mídias sociais, como Facebook e Instagram, com postagens digitais publicadas online contendo um convite com detalhes básicos de contato para obter mais informações.

Todos os procedimentos envolvendo participantes humanos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Goiás. Consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes. O estudo foi registrado em ensaiosclínicos.gov.br.

Um questionário foi aplicado para avaliar os critérios de inclusão e exclusão e para identificar voluntários elegíveis. Os seguintes critérios de inclusão foram usados: entre 19 e 70 anos de idade, com diagnóstico de constipação de acordo com os critérios diagnósticos ROME IV para constipação. Os indivíduos foram excluídos se apresentassem diagnóstico de doenças do trato GI ou complicações de cirurgias devido a essas doenças, apresentassem disfunção hepática ou renal ou usassem antibióticos ou vitaminas, minerais, alimentos fortificados, produtos à base de plantas ou outros suplementos com o objetivo de reduzir os sintomas digestivos nas 4 semanas anteriores. Também foram excluídos indivíduos que consumiram alimentos contendo probióticos e prebióticos ou alimentos / nutracêuticos com atividade anti-inflamatória antes ou durante a intervenção.

Os indivíduos foram randomizados em dois grupos, de acordo com sexo, idade e índice de massa corporal (IMC), utilizando o Software R 2.15.3 para Windows. O primeiro grupo foi o grupo cápsula de controle (CC). Esse grupo recebeu maltodextrina (75 mg) em cápsulas por 30 dias. O segundo grupo, o grupo da cápsula probiótica (PC), recebeu uma mistura de probióticos, contendo 5 X 10⁹ UFC de *Lactobacillus acidophilus* (NCFM), *L. casei* (Lc-11); *Lactococcus lactis* (L-23), *Bifidobacterium bifidum* (BB-06) e *B. lactis* (HN019) em cápsulas por 30 dias.

Os participantes foram instruídos a ingerir uma cápsula diariamente, pelo menos 30 minutos após a última refeição do dia, com água à temperatura ambiente. Eles também foram instruídos a manter hábitos de rotina e estilo de vida e evitar a ingestão de produtos que contenham pré e probióticos. As cápsulas e os frascos codificados fornecidos tinham a mesma aparência e cor e foram distribuídos por um pesquisador não envolvido no projeto, de acordo com o protocolo de randomização. Portanto, voluntários e pesquisadores / funcionários ficaram cegos. O código de mascaramento foi fornecido aos investigadores após a conclusão da análise estatística. A adesão foi avaliada pela devolução dos frascos com as cápsulas restantes e os indivíduos que consumiram <80% das cápsulas foram excluídos do estudo.

Ingestão de alimentos e atividade física

A ingestão de alimentos e atividade física foram avaliadas durante a intervenção. Esses dois parâmetros foram usados para verificar se as alterações nos marcadores foram realmente obtidas pelo tratamento, daí as instruções para manter o estilo de vida habitual.

Para avaliar a dieta habitual, foi utilizado um registro alimentar em 3 dias. Seis registros foram coletados para cada indivíduo, sendo três referentes à primeira semana do estudo e os outros três referentes à última semana do estudo.

A atividade física foi avaliada pelo Questionário Internacional de Atividade Física, validado para a população brasileira. Os valores do equivalente metabólico da tarefa (MET) foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

1. MET - min/sem de caminhada: 3.3 x minutos de caminhada x dias de caminhada
2. MET - min / sem de atividade moderada: 4 x minutos de atividade moderada x dias de atividade moderada
3. MET - min / sem de atividade vigorosa: 8 x minutos de atividade vigorosa x dias de atividade vigorosa
4. MET - minutos totais de atividade física / sem: soma de MET - minutos de caminhada + atividade moderada + atividade vigorosa

O gasto energético (kcal MET / sem) foi calculado considerando o min / sem para cada atividade estimada no METS, utilizando a seguinte fórmula:

MET-totalde minutos X peso do indivíduo / 60 min:

Sintomas de constipação (resultado primário)

Os participantes foram instruídos a preencher um diário intestinal com registros diários de frequência de evacuação e consistência das fezes, de acordo com a escala de Bristol. Os participantes também foram solicitados a registrar em seu diário quaisquer efeitos adversos e informar os pesquisadores imediatamente.

A saúde funcional do trato gastrointestinal foi avaliada no início e após 30 dias, por meio de um questionário contendo os critérios estabelecidos pela ROME IV: esforço excessivo em ≥25% das evacuações, fezes endurecidas e / ou secas em ≥25% das fezes, sensação de evacuação incompleta em ≥25% das evacuações, sensação de bloqueio ou obstrução anorretal, manobra manual, frequência de evacuação <3 vezes / sem, raramente apresenta fezes líquidas sem o auxílio de laxantes.

Análise da microbiota intestinal (resultado secundário)

Isolamento do DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA

As amostras fecais foram coletadas por Swabs com solução estabilizadora e submetidas à lise celular e subsequente extração de DNA utilizando a técnica de esferas magnéticas com protocolo registrado (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], *S. epidermidis* [ATCC 12228], *Acinetobacter baumannii*, e *Klebsiella pneumoniae* [isolados e identificados por VITEK2]) foram submetidos ao mesmo processamento com esferas magnéticas para obtenção de DNA. As diluições foram realizadas em uma escala de 10 E para DNA e em uma escala de 1 log de UFC para os microrganismos isolados. Além disso, uma molécula de DNA sintético foi inserida em algumas amostras antes da extração de DNA e em diferentes concentrações (~ 600, 6.000, 60.000 moléculas) para avaliar seu perfil de recuperação após o sequenciamento. A identificação de bactérias foi realizada usando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. A sequência foi realizada no equipamento MiSeq (Illumina Inc., São Diego, CA, EUA), utilizando o kit V2 de 300 ciclos de extremidade única, sem normalização da biblioteca. As sequências de DNA dos microrganismos foram analisadas por meio de um pipeline proprietário (Neopropecta 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. Após as análises de bioinformática, os resultados foram carregados na plataforma Neobiome para visualização.

Análise da composição da microbiota e estatística e análise de redes

Após a conclusão do sequenciamento Illumina MiSeq, os arquivos fastq foram cortados em sequências de baixa qualidade e quimeras usando o software Neotools proprietário. Em seguida, usando o mesmo software, as sequências que passaram nas etapas de qualidade foram identificadas para taxonomias bacterianas usando o banco de dados Neoref16S. Para as identificações taxonômicas, foi utilizado o software blastn v.2.7.1 [12], usando o menor algoritmo de ancestral comum para definição de espécies (99,8% de similaridade). As taxonomias que não atendem a esse requisito mínimo foram avaliadas para a definição de sexo, famílias ou outros níveis taxonômicos [13].

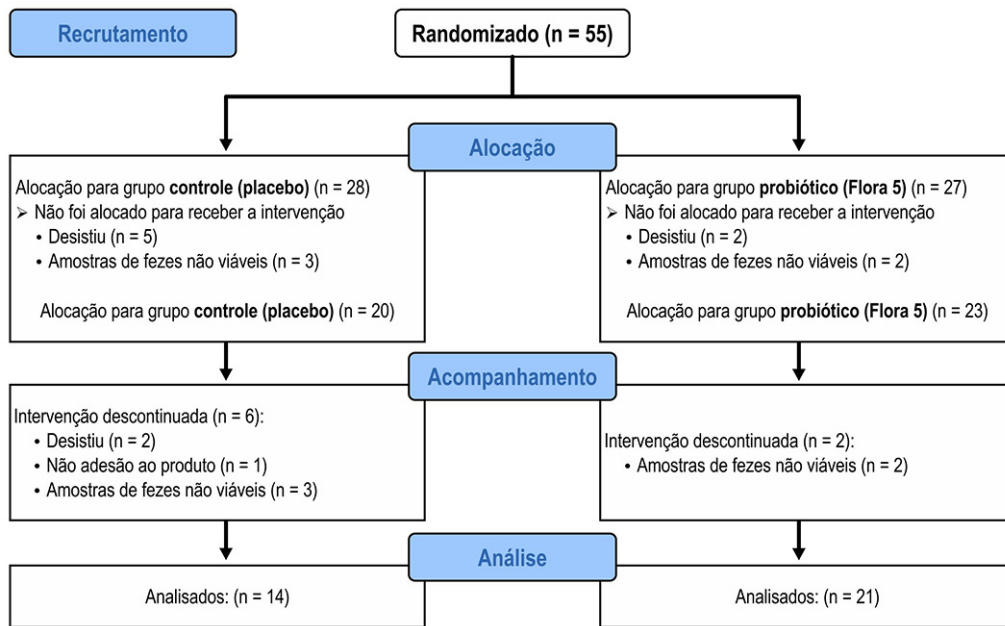


Fig. 1. Fluxograma dos voluntários do estudo.

A tabela de taxonomia e unidade de taxonomia operacional (OTU), seqüências fasta (somente clusters) e tabela de metadados foram introduzidas no pipeline de análise de diversidade α e β na versão R 3.4.4 [14]. A árvore filogenética foi feita a partir das seqüências rápidas dos clusters, as quais são exibidas na plataforma do perfil microbiológico Neopropecta. O Clustal Omega versão 1.2.3 [15], a construção da árvore filogenética FastTree versão 2.1.10 [16] e o enraizamento no ponto médio com Retree versão 3.697 do pacote Phylip [17] foram utilizados para o alinhamento da seqüência. Para a produção de índices de riqueza (observados OTUs, Chao1, ACE) e diversidade (Shannon, Simpson, InvSimpson, Fisher, Evenness); bem como outras análises de diversidade α (árvore filogenética de classificações taxonômicas) e β (análise de componentes principais e mapa de calor), o pacote do programa 1.22.3 o pacote de programa [18] foi usado. Esses dados foram normalizados pelo método da mediana e rarefação. A identificação de espécies diferencialmente abundantes nos tratamentos foram realizados com o pacote de software DESeq2 versão 1.18.1 [19]. O teste de Walt e o modelo binomial negativo foram utilizados para normalização dos dados. Bactérias diferencialmente abundantes foram consideradas com $P < 1\%$ e $\log_2\text{FoldChange} > 2$.

Análise Estatística

O cálculo amostral considerou inicialmente um efeito de desenho de 0,98 para a comparação de médias de grupos independentes, obtida a partir de dados de médias e DP da frequência de evacuação após intervenção com simbióticos [8]; um α de 0,05 e poder de teste (1-B) de 80%, e o resultado foi de 18 participantes por grupo ($n = 36$). Portanto, buscamos recrutar 54 participantes (27 para cada grupo), a fim de incluir 50% adicionais dos 36 necessários, representando possíveis desistências. O cálculo foi realizado pelo programa G * Power 3.1.9.2. Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP. Os valores foram inicialmente avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças médias entre os grupos na consulta inicial e final e na mudança total foram avaliadas pelo teste t independente ou teste de Mann-Whitney (o teste não paramétrico correspondente). A diferença média entre a consulta inicial e a final para cada grupo foi avaliada pelo teste t pareado ou pelo teste de Wilcoxon (o teste não paramétrico correspondente). O valor de $\alpha = 0,05$ foi adotado como crítico para rejeição da hipótese nula. A análise estatística foi realizada utilizando o SPSS versão 25 (IBM, Armonk, NY, EUA).

Resultados

Caracterização da população estudada

Selecionamos 55 participantes de acordo com os critérios de elegibilidade e concordamos em participar do estudo (CC: 27; PC: 28). Desses, 43 participam da visita inicial e entregaram fezes viáveis. Durante

não comparência, um para baixa aderência (ingerida $<80\%$ dos cápsulas) e cinco para amostras de fezes não viáveis. Trinta e cinco participantes foram incluídos na presente análise (CC: 14; PC: 21; Fig. 1). Não foi observada diferença entre os grupos no início do estudo (tabela 1).

Ingestão de alimentos e atividade física

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto à ingestão de energia e macronutrientes, nem ao nível de atividade física durante a intervenção (nas medidas basal e pós-intervenção; todos $P > 0,05$; Tabela 2).

Tabela 1
Características dos participantes na linha de base

Variáveis	CC (n = 14)	PC (n = 21)	Valor P*
Sexo			
Mulheres, n (%)	12(85,7)	18(85,7)	1.000y
Homens, n (%)	2(14,3)	3 (14,3)	
Idade (y)	31,00 $\pm$ 11,64	25,71 $\pm$ 7,22	0,106
IMC (kg/m ²)	24,54 $\pm$ 5,00	23,14 $\pm$ 3,57	0,374
Renda (R\$)	11.998,21 $\pm$ 31.130,20	3488,75 $\pm$ 3177,32	0,326
Anos de estudo, n (%)			
≤ 11 y	2(14,3)	4(19,1)	0.714†
≥ 12 y	12 (85,7)	17(80,9)	
Ingestão de bebidas alcoólicas, n (%)			
Sim	6 (42,8)	9 (42,8)	1.000†
Não	8 (57,2)	12(57,2)	
Frequência de álcool, n (%)			
Não bebe	8 (57,2)	12(57,1)	0.082†
1-2 vezes/semana	0	5 (23,8)	
1-3 vezes/mês	6 (42,8)	4(19,1)	
Ingestão de água, n (%), L/dia			
≤ 1	7 (50)	8(38,1)	0.555†
1-2	6 (42,8)	9 (42,8)	
>2	1 (7,2)	4(19,1)	

CC, grupo de cápsula de controle; PC, grupo cápsula de placebo

* Análise estatística: Teste t independente, salvo indicação em contrário.

† Análise estatística: teste x².

o ensaio clínico, oito participantes foram excluídos do estudo: dois para

Tabela 2
Energia, macronutrientes e ingestão de fibra e nível de atividade física dos participantes no início do estudo e após 30 dias de intervenção

Variáveis	CC (n = 14)				PC (n = 21)				
	T0	T30	D	Valor P*	T0	T30	D	Valor P*	Valor P y
Energia (kcal)	1472,98 +/- 413,63	1445,76 +/- 372,25	-27,22 +/- 374,35	0,937	1650,98 +/- 413,63	1714,73 +/- 687,36	63,75 +/- 437,60	0,681	0,815
Carboidratos (g)	172,68 +/- 55,01	269,67 +/- 61,92	-3,01 +/- 56,70	0,857	182,44 +/- 61,34	169,67 +/- 61,92	10,54 +/- 56,26	0,412	0,516
Proteína (g)	66,84 +/- 19,59	66,22 +/- 25,64	-0,61 +/- 21,25	0,937	74,85 +/- 31,80	74,44 +/- 33,66	-0,40 +/- 31,92	0,940	0,613
Lipídios (g)	57,20 +/- 17,47	55,79 +/- 14,59	-1,41 +/- 21,41	0,823	64,64 +/- 31,40	67,22 +/- 28,46	2,58 +/- 23,00	0,621	0,629
Fibras (g)	12,22 +/- 6,15	10,54 +/- 4,94	-1,68 +/- 4,17	0,191	15,39 +/- 5,72	13,81 +/- 6,02	-1,57 +/- 5,08	0,181	0,953
MET total (min)	1822,32 +/- 2078,42	2181,80 +/- 1290,37	274,69 +/- 1780,63	0,588	1333,50 +/- 1103,68	1469,37 +/- 1768,68	-174,70 +/- 1427,19	0,621	0,449
MET (kcal)	2232,59 +/- 2812,16	2584,49 +/- 1719,97	-234,71 +/- 2296,02	0,719	1426,90 +/- 1457,77	1612,30 +/- 2086,93	-175,92 +/- 1425,85	0,618	0,552

CC, grupo de cápsula de controle; PC, grupo cápsula de placebo; MET, equivalente metabólico da tarefa; T0, linha de base; T30, pós-intervenção
D = T30 - T0

* Diferenças estatísticas entre T30 e T0 dentro do mesmo grupo.

y Diferenças estatísticas entre os valores D dos grupos de controle e de tratamento.

Índices de riqueza e diversidade α

Houve um aumento significativo dos índices de Shannon, Simpson e InvSimpson apenas dentro do grupo PC (P = 0,002; P = 0,013;

P = 0,006, respectivamente). Um aumento dos índices de Fisher, OTUs observados e Chao1 e ACE ocorreu nos dois grupos (todos P <0,001). Não foram observadas diferenças significativas para esses índices entre os grupos (P > 0,05; Fig. 2A, B).

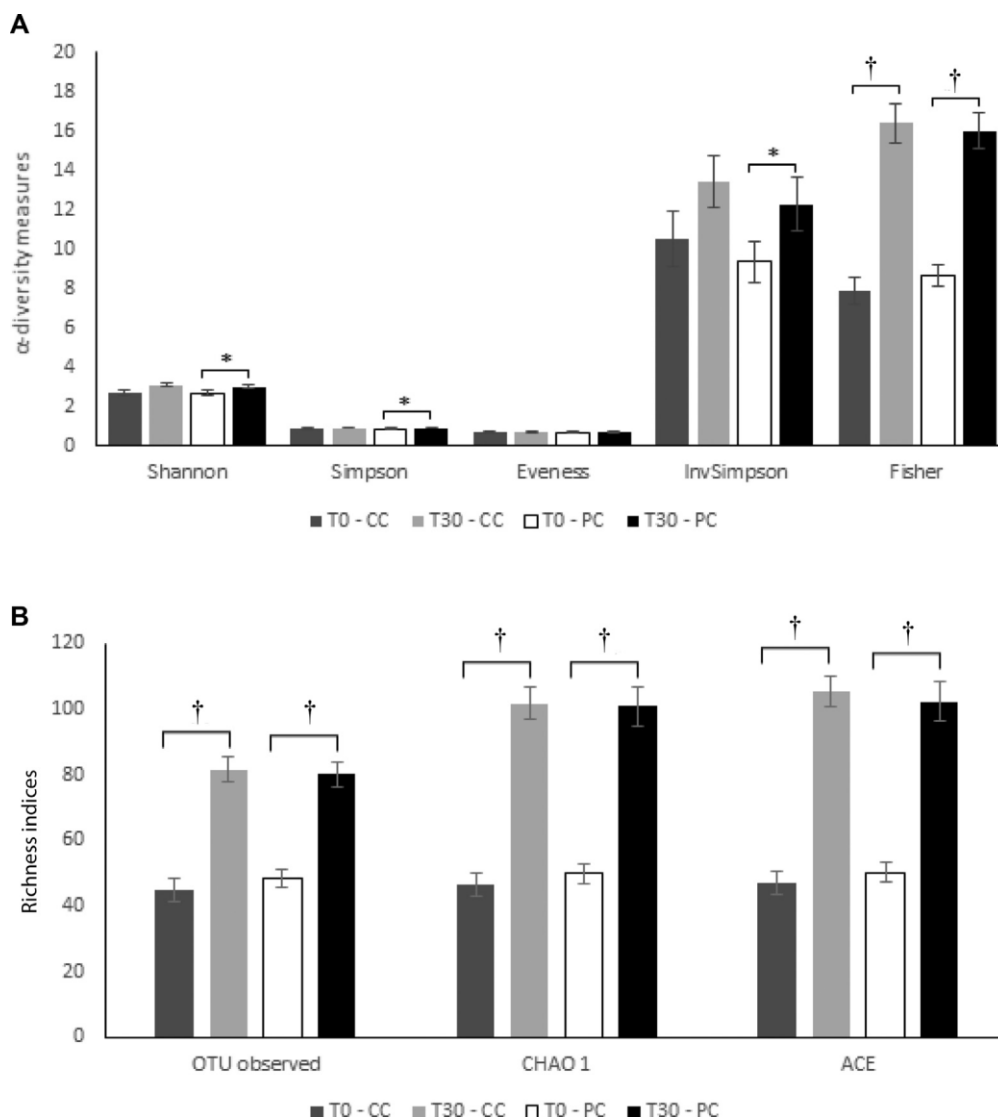


Fig. 2. Efeito do probiótico sobre (A) índices de diversidade α (Shannon, Simpson, InvSimpson, Fisher, Evenness) e (B) de riqueza (OTUs observados, Chao1, ACE). *P < 0,05. †P < 0,001. CC, grupo de cápsula de controle; OTU, unidade de taxonomia operacional; PC, grupo de cápsulas de placebo.

diversidade B

Entre as amostras, 251 espécies de bactérias foram identificadas. Dessas, 75 apresentaram $P < 1\%$ (corrigido pela taxa de falsas descobertas) e 41 diferiram em frequência absoluta entre as amostras, sendo considerados diferencialmente abundantes uma vez que apresentaram $P < 1\%$ e $\log_2\text{Fold-Change} > 2$ pelo DEseq. O mapa de calor e a árvore filogenética das espécies detectadas pelo DEseq revelaram mudanças significativas dentro do grupo nos dois grupos, mas sem diferença estatística entre os grupos (Fig. 3A, B). O perfil de agrupamento das amostras por análise de componentes principais não variou entre os tratamentos.

A variação observada pode ser explicada pela soma dos dois componentes principais, o que resulta em $\sim 19\%$ (Fig. 4).

Percentagem de abundância relativa

Outras análises foram conduzidas para determinar as diferenças na porcentagem de abundância relativa entre os grupos de tratamento para o filo e para 75 espécies apresentaram $P < 1\%$ (corrigido pela taxa de descoberta falsa; dados normalizados pela mediana).

As bactérias pertencentes a oito filos foram identificadas nas amostras (Tabela 3). Os filos mais abundantes foram Bacteroidetes (CC:

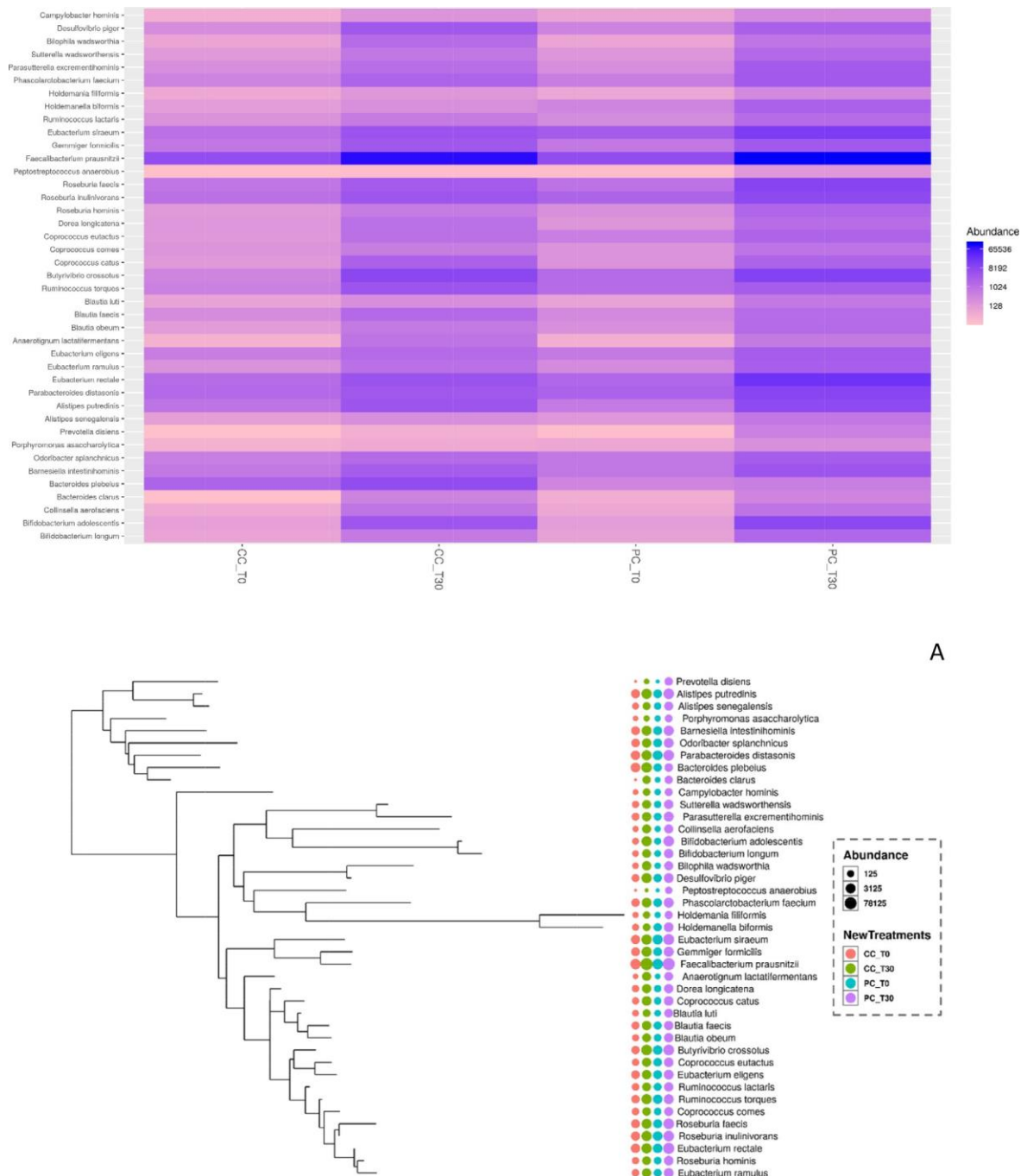


Fig. 3. (A) Árvore filogenética e (B) mapa de calor com frequência de espécies bacterianas identificadas como diferencialmente abundantes pelo DEseq2 ($\log_2 \text{FoldChange} > \pm 2$). CC, grupo de cápsula de controle; PC, grupo de cápsulas de placebo.

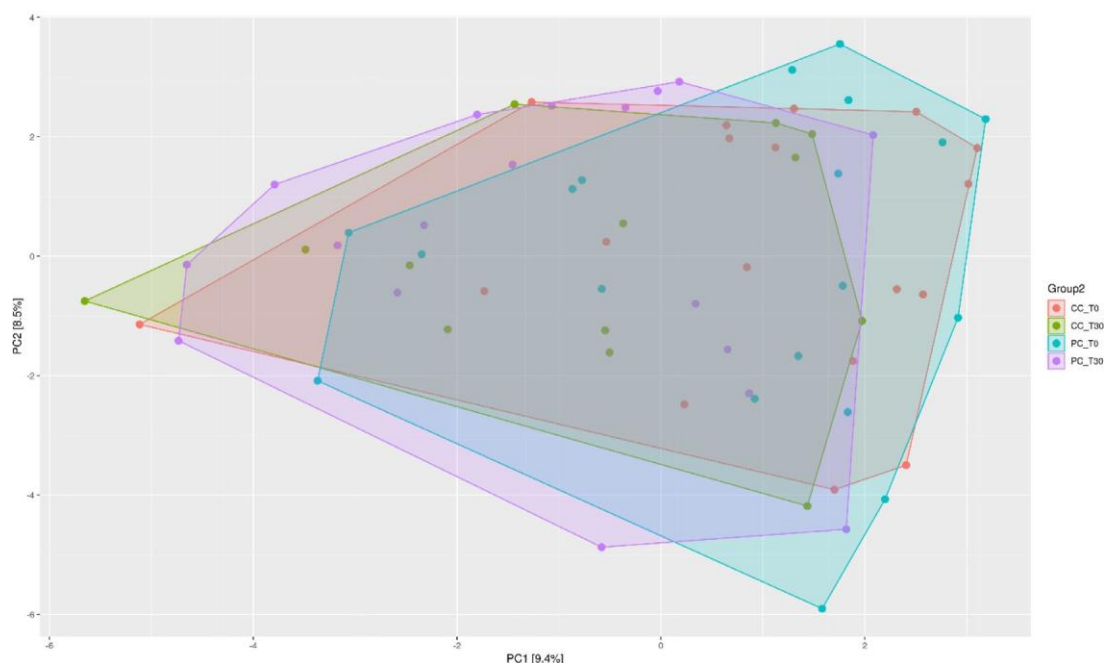


Fig. 4. Perfil de cluster de amostras de acordo com a análise PCA. CC, grupo de cápsula de controle; PC, grupo cápsula de placebo; PCA, análise de componentes principais.

Tabela 3

Efeito do probiótico multiespécies na porcentagem de abundância relativa do filo

Filo	CC (n = 14)				PC (n = 21)				Valor P*	Valor P†
	T0	T30	Δ		T0	T30	Δ			
Bacteroidetes	73,68 +/- 9,79	53,21 +/- 14,63	-20,47 +/- 14,96	<0,001	70,34 +/- 1,42	51,41 +/- 14,12	-18,93 +/- 12,66	<0,001		0,744
Firmicutes	21,68 +/- 8,44	40,18 +/- 13,98	18,50 +/- 15,26	0,001	24,93 +/- 10,16	41,39 +/- 15,52	16,46 +/- 12,44	<0,001		0,667
Fusobactérias	0,38 +/- 0,16	0,53 +/- 0,79	0,15 +/- 0,68	0,925	0,39 +/- 0,20	0,35 +/- 0,43	-0,04 +/- 0,39	0,357		0,840
Proteobactérias	1,92 +/- 0,76	3,00 +/- 2,45	1,08 +/- 2,33	0,106	2,18 +/- 1,19	2,60 +/- 1,75	0,42 +/- 1,78	0,291		0,350
Verrucomicrobia	0,96 +/- 1,46	0,45 +/- 0,83	-0,50 +/- 1,48	0,064	0,78 +/- 0,89	1,73 +/- 4,99	0,95 +/- 4,58	0,876		0,312
Synergistetes	0,09 +/- 0,04	0,07 +/- 0,11	-0,02 +/- 0,11	0,109	0,08 +/- 0,04	0,05 +/- 0,07	-0,03 +/- 0,08	0,042		0,814
Actinobactéria	1,11 +/- 0,38	2,44 +/- 2,37	1,32 +/- 2,33	0,300	1,17 +/- 0,55	2,36 +/- 3,17	1,18 +/- 3,33	0,590		0,567
Euryarchaeota	0,17 +/- 0,16	0,10 +/- 0,14	-0,07 +/- 0,20	0,064	0,14 +/- 0,08	0,11 +/- 0,13	-0,02 +/- 0,14	0,322		0,934
Firmicutes / Bacteroidetes	0,31 +/- 0,16	0,91 +/- 0,67	0,60 +/- 0,65	0,004	0,39 +/- 0,23	0,97 +/- 0,67	0,58 +/- 0,56	<0,001		0,936

CC, grupo de cápsula de controle; PC, grupo cápsula de placebo; MET, equivalente metabólico da tarefa; T0, linha de base; T30, pós-intervenção

Δ T30 - T0

* Diferenças estatísticas entre T30 e T0 dentro do mesmo grupo.

† Diferenças estatísticas entre os valores D dos grupos de controle e de tratamento.

73,68 +/- 9,79, PC: 70,34 +/- 1,42), *Firmicutes* (CC: 21,68 +/- 8,44, PC: 24,93 +/- 10,16), e *Proteobactérias* (CC: 1,92 +/- 0,76, PC: 2,18 +/- 1,19). Não houve diferença entre os grupos quanto à porcentagem relativa de abundância para qualquer filo. No entanto, houve uma redução significativa de *Synergistetes* filos apenas no grupo PC (P = 0,043).

Houve um aumento significativo dentro do grupo para a porcentagem relativa de abundância de *Blautia faecis* (T0: 0,19 +/- 0,14; T30: 0,39 +/- 0,25; P = 0,003) e *Ruminococcus torques* no grupo CC (T0: 0,49 +/- 0,37; T30: 1,21 +/- 1,12; P = 0,011), enquanto no grupo CP, a abundância não mudou (*B. faecis*: T0: 0,33 +/- 0,67; T30: 0,26 +/- 0,22; P = 0,794; *R. Torques*: T0: 0,68 +/- 0,73; T30: 0,65 +/- 0,83; P = 0,958). Houve também uma diferença significativa entre os grupos (P = 0,029 e P = 0,013, respectivamente), sugerindo que o tratamento probiótico evitou o aumento da abundância relativa percentual dessas duas espécies pertencentes ao filo *Firmicutes* (Fig. 5). Nenhuma diferença foi observada para as outras 73 espécies (dados não mostrados).

Das cepas probióticas administradas, apenas *Lactococcus lactis* e *Bifidobacterium bifido* foram identificadas nas fezes, mas sem diferenças

significativas entre os dois grupos de intervenção (P = 0,400 e P = 0,213, respectivamente).

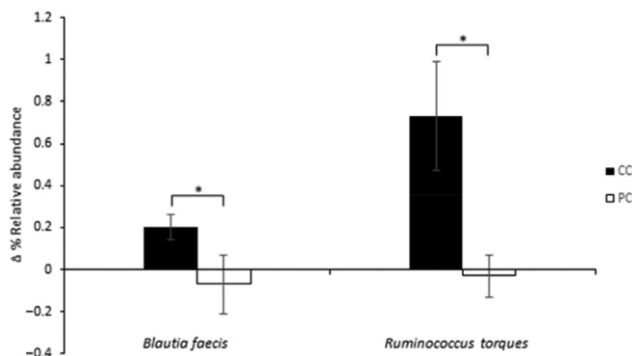


Fig. 5. Alteração da porcentagem de abundância relativa dos torques de *Blautia faecis* e *Ruminococcus*. *P < 0,05. CC, grupo de cápsula de controle; PC, grupo de cápsulas de placebo.

Tabela 4
Efeito do probiótico multiespécies nos sintomas da constipação

Critérios ROME IV	Controle (CC) (n = 14)			Probiótico (PC) (n = 21)			Valor P [†]
	T0	T30	Valor P*	T0	T30	Valor P*	
Frequência de evacuação, n (%), vezes / semana			0,006			0,013	0,222
1	1 (7,1)	0 (0)		3 (14,3)	0 (0)		
<3	7 (50)	1 (7,1)		5 (23,8)	2 (9,5)		
3 - 4	5 (35,7)	8 (57,1)		9 (42,9)	12 (57,5)		
>4	1 (7,1)	5 (35,7)		4 (19)	6 (28,6)		
Consistência das fezes, n (%)							
25% das evacuações Bristol escala 1 e 2	14 [100]	6 (42,9)	0,005	20 (95,2)	14 (66,7)	0,059	0,110
Critérios ROMA IV, n (%)							
Esforço excessivo em ≥25% dos movimentos intestinais	12 (85,7)	7 (50)	0,059	16 (72,2)	10 (47,6)	0,058	0,778
Fezes endurecidas e / ou secas em ≥25% das fezes	13 (92,9)	9 (64,3)	0,102	18 (85,7)	13 (61,9)	0,059	0,803
Sensação de defecação incompleta em ≥ 25% dos movimentos intestinais	10 (71,4)	9 (64,3)	0,564	15 (71,4)	9 (42,9)	0,034	0,342
Sensação de bloqueio ou obstrução anorretal	7 (50)	4 (28,6)	0,257	9 (42,9)	4 (19)	0,025	0,960
Manobra manual	2 (14,3)	1 (7,5)	0,317	5 (23,8)	2 (9,5)	0,180	0,727
Frequência de evacuação <3 vezes / semana	12 (85,7)	8 (57,1)	0,096	15 (71,5)	15 (71,4)	0,405	0,752
Raramente apresenta fezes líquidas sem auxílio de laxantes	12 (85,7)	11 (78,6)	0,527	20 (85,2)	16 (76,2)	0,046	0,561

T0, linha de base; T30, pós-intervenção * Análise estatística: Teste de Wilcoxon e Análise Estatística: Teste de Mann-Whitney

Sintomas de constipação

Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos de intervenção em relação à frequência de evacuação, consistência das fezes e critérios de Roma IV (Tabela 4). No entanto, houve uma redução significativa no grupo CP apenas na prevalência de indivíduos que apresentaram defecação incompleta (P = 0,034), sensação de bloqueio (P = 0,025) e ocorrência rara de fezes líquidas sem o auxílio de laxantes (P = 0,046).

Discussão

O presente estudo demonstrou que um probiótico multiespécie pode ser eficiente na prevenção de um aumento da porcentagem relativa de abundância de *B. faecis* e *R. torquis* em indivíduos saudáveis com constipação. De forma similar, Ferrario et al. [20] mostraram que a ingestão de probióticos leva a uma redução de bactérias pertencentes ao gênero *Blautia* em adultos saudáveis.

B. faecis e *R. torquis* pertencem ao gênero *Blautia*, família *Lachnospiraceae*, e filo *Firmicutes*. [21] observaram que as bactérias das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* estão aumentadas em indivíduos com constipação e que esse aumento pode ser explicado principalmente pela presença de bactérias do gênero *Blautia*, *Coprococcus* e *Ruminococcus*.

R. torques é um conhecido degradador de mucina [22], que é uma glicoproteína produzida por células caliciformes e contribui para a manutenção da barreira intestinal. A mucosa intestinal é a primeira linha de defesa intestinal contra bactérias comensais patogênicas ou invasivas no lúmen intestinal [23]. Castro-Combs et al. [24] demonstraram que o comprometimento do conteúdo de mucina pode ser um fator que contribui para o desenvolvimento da constipação crônica. Além disso, essas bactérias têm sido associadas à síndrome do intestino irritável em vários estudos [25-29].

Assim, considerando que as mudanças em certas populações bacterianas podem ser potencialmente benéficas em indivíduos saudáveis com constipação, particularmente se essas populações bacterianas estiverem associadas a estados de doença; os resultados aqui mencionados sugerem que o probiótico pode ter um efeito protetor sobre a microbiota intestinal pela modulação da porcentagem de abundância relativa de *B. faecis* e *R. torquis*.

Contrariamente às nossas expectativas, não houve aumento nas populações *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhu et al. [21] e Yu et al. [30]. Por outro lado,

Mezzassalma et al. [31] realizaram um estudo em grupo, randomizado, duplo-cego e paralelo, com três braços, com 150 pacientes com síndrome do intestino irritável associada à constipação, divididos em três grupos (F_1, F_2 e F_3).

Cada grupo recebeu uma administração oral diária de misturas de probióticos (*L. acidophilus* e *L. reuteri* e outro com *L. plantarum* e *L. rhamnosus*) por 60 dias para F_1 ou F_2 ou placebo F_3, respectivamente. Os autores observaram um aumento no *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nas fezes após 60 dias de suplementação, mas não avaliaram a composição completa das fezes e se houve uma redução nas bactérias patogênicas.

Foi amplamente descrito na literatura que as espécies pertencentes a essas famílias são reduzidas em indivíduos com distúrbios da motilidade intestinal e a suplementação seria uma estratégia eficaz para aumentar sua população [32,33]. Entretanto, nem sempre a adesão e a formação das colônias ocorrem, embora os efeitos sobre a microbiota intestinal possam ser devidos a outros mecanismos [34], como atividade antimicrobiana direta, produção de bacteriocinas ou até exclusão competitiva [35]. [36] sugeriram que *L. acidophilus* pode secretar bacteriocina. Da mesma forma, foi demonstrado que substâncias antibacterianas podem ser produzidas pela bactéria *L. acidophilus* e *L. fermentum*, oferecendo uma ampla faixa inibitória, incluindo cepas patogênicas gram-negativas e gram-positivas [37,38].

No presente estudo, não houve diferenças entre os grupos para os índices de diversidade α e β . Variações inter-individuais na microbiota intestinal podem ter alterações ocultas devido à ingestão de probióticos. Por outro lado, apenas dentro do grupo PC, houve uma redução significativa intragrupo na prevalência de indivíduos que tiveram defecação incompleta (P = 0,034), sensação de bloqueio (P = 0,025), e raramente apresentaram fezes líquidas sem o auxílio de laxantes (P = 0,046), mas sem diferenças significativas entre os grupos. Estudos clínicos mostraram que a suplementação com probióticos como *L. casei* [39] e *Bifidobacterium animalis* [40] apresenta efeito modesto ou inexistente nos sintomas de constipação. Em contraste, Eskesen et al [41] observaram que o consumo de *Bifidobacterium animalis* spp *Lactis* BB-12 melhora a saúde gastrointestinal de indivíduos cujos sintomas não são suficientemente graves. Essa variação nos resultados pode ocorrer porque os efeitos dos probióticos são conhecidos por serem dependentes da tensão e variam de acordo com a subespécie e a composição da microbiota intestinal do hospedeiro [5].

Estudos anteriores descobriram uma melhora significativa em outros parâmetros relacionados aos sintomas da constipação com a administração de uma variedade de cepas probióticas para ≤4 semanas, que foi a base para decidir a duração da intervenção neste estudo [5,42].

No entanto, considerando os tipos de probióticos administrados no presente estudo e o perfil da microbiota da população estudada, pode ser que um maior tempo de intervenção tivesse sido necessário para que as mudanças observadas na microbiota intestinal se traduzissem em mudanças mais significativas no movimento intestinal.

Além disso, sabe-se que as condições associadas à gravidade dos sintomas relatados pelo paciente sem correlatos fisiológicos confiáveis, como distúrbios gastrointestinais funcionais, apresentam altas taxas de resposta ao placebo [43], mesmo em estudos de curto prazo [44,45], o que pode ter contribuído para não atingir significância entre os dois grupos de intervenção no presente estudo.

Não foram observadas diferenças significativas na ingestão de energia e macronutrientes e no nível de atividade física durante a intervenção. Portanto, pode-se especular que os efeitos descritos aqui foram provavelmente devido à ingestão de probióticos e não a mudanças no estilo de vida.

Os pontos fortes deste estudo incluíram a avaliação de fatores que poderiam influenciar a composição da microbiota, como nível de atividade física, ingestão de bebidas alcoólicas, ingestão de água e mudanças na dieta, bem como uma análise robusta e eficiente da microbiota fecal. No entanto, algumas limitações do estudo foram as altas taxas de abandono durante o período de randomização e intervenção, o não ajuste do modelo de acordo com os subtipos de constipação e o tempo de intervenção (30 d). Um tempo de tratamento mais longo pode levar a alterações mais proeminentes nas variáveis da constipação intestinal, embora 30 dias de intervenção sejam comumente observados na literatura anterior.

Conclusão

Um probiótico multiespécie em forma de cápsula pode ser eficiente na redução de bactérias comumente aumentadas em pacientes com constipação, contribuindo para o equilíbrio da microbiota e, consequentemente, para o bem-estar do indivíduo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa.

Referências

- [1] Lee KN, Lee OY. Intestinal microbiota in pathophysiology e management of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2014;20:8886–97.
- [2] Zhao Y, Yu Y. Intestinal microbiota and chronic constipation. *Springerplus* 2016;5:1130.
- [3] Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Mirenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotic and prebiotic consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:506–14.
- [4] Komers MJ, Silva Rodrigues RA, Miyajima F, Avala Zavala AA, Ultramari VRLM, Fett WCR, et al. Effects of probiotic use on quality of life and physical activity in constipated female university students: a randomized, double-blind placebo. *J Altern Complement Med* 2019;25:1163–71.
- [5] Dimidi E, Christodoulides S, Fragkos KC, Scott SM, Whelan K. The effect of probiotics on functional constipation in adults: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2014;100:1075–84.
- [6] Wang L, Hu L, Xu Q, Yin B, Fang D, Wang G, et al. Bifidobacterium adolescentis exerts strain-specific effects on constipation induced by loperamide in BALB/c mice. *Int J Mol Sci* 2017;18:E318.
- [7] Nieuwboer VDM, Klomp-Hogeterp A, Verdoorn S, Metsemakers-Brameljeer L, Vriend TM, Claassen E, et al. Improving the bowel habit of elderly residents in a nursing home using probiotic fermented milk drink. *Benef Microbes* 2015;6:397–403.
- [8] Wilms E, Gerritsen J, Smidt H, Besseling-van der Vaart I, Rijkers GT, Garcia Fuentes AR, et al. Effects of supplementation of the Synbiotic Ecologic® 825/FOS P6 on intestinal barrier function in healthy humans: a randomized controlled trial. *PLoS One* 2016;11:e0167775.
- [9] Cudmore S, Doolan A, Lacey S, Shanahan FA. randomised, double-blind, placebo-controlled clinical study: the effects of a synbiotic, Lepicol, in adults with chronic, functional constipation. *Int J Food Sci Nutr* 2017;8:366–77.
- [10] Yeun Y, Lee J. Effect of a double-coated probiotic formulation on functional constipation in the elderly: a randomized, double blind, controlled study. *Arch Pharm Res* 2015;38:1345–50.
- [11] Macfarlane S, Cleary S, Bahrami B, Reynolds N, Macfarlane GT. Synbiotic consumption changes the metabolism and composition of the gut microbiota in older people and modifies inflammatory processes: a randomised, double-blind, placebo-controlled crossover study. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:804–16.
- [12] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- [13] Christoff AP, Cruz GNF, Sereia AFR, Yamanaka LE, Silveira PP, de Oliveira LFV. End-to-end assessment of fecal bacteriome analysis: from sample processing to DNA sequencing and bioinformatics results. *BioRxiv* 2019;22.
- [14] R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- [15] Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 2011;7:539.
- [16] Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree: computing large minimum-evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol* 2009;26:1641–50.
- [17] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Seattle: Department of Genome Sciences, University of Washington; 2005.
- [18] McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 2013;8:e61217.
- [19] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.
- [20] Ferrario C, Taverniti V, Milani C, Fiore W, Laureati M, De Noni I, et al. Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J Nutr* 2014;144: 1787–96.
- [21] Zhu L, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, Bard JE, Quigley EM, et al. Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. *Physiol Genomics* 2014;46:679–86.
- [22] Malinen E, Krogus-Kurikka L, Lyra A, Nikkilä J. Jääskeläinen A, Rinttilä T, et al. Association of symptoms with gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2010;28:4532–40.
- [23] Zeng MY, Inohara N, Núñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol* 2017;10:18–26.
- [24] Castro-Combs J, Garcia CJ, Majewski M, Wallner G, Sarosiek J. Impaired viscosity of gastric secretion and its mucin content as potential contributing factors to the development of chronic constipation. *Dig Dis Sci* 2014;59:2730–4.
- [25] Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, Matto J, Kassinen A, Krogus L, et al. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol* 2005;100:373–82.
- [26] Parkes GC, Rayment NB, Hudspeth BN, Petrovska L, Lomer MC, Brostoff J, et al. Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:31–9.
- [27] Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:3380–9.
- [28] Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141: 1792–801.
- [29] Lyra A, Rinttilä T, Nikkilä J, Krogus-Kurikka L, Kajander K, Malinen E, et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome distinguishable by 16S rRNA gene phylotype quantification. *World J Gastroenterol* 2009;15:5936–45.
- [30] Yu T, Zheng YP, Tan JC, Xiong WJ, Wang Y, Lin L. Effects of prebiotics and synbiotics on functional constipation. *Am J Med Sci* 2017;353:282–92.
- [31] Mezzasalma V, Manfrini E, Ferri E, Sandionigi A, La Ferla B, Schiano I, 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 Res Int* 2016;2016:4740907.
- [32] Miller LE, Zimmermann AK, Ouwehand AC. Contemporary meta-analysis of short-term probiotic consumption on gastrointestinal transit. *World J Gastroenterol* 2016;22:5122.
- [33] Khalif IL, Quigley EM, Konovitch EA, Maximova ID. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Dig Liver Dis* 2005;37:838–49.
- [34] Dimidi E, Christodoulides S, Scott SM, Whelan K. Mechanisms of action of probiotics and the gastrointestinal microbiota on gut motility and constipation. *Adv in Nutr* 2017;8:484–94.
- [35] Corr SC, Hill C, Gahan CG. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv Food Nutr Res* 2009;56:1–15.
- [36] Guo S, Liu D, Zhang B, Li Z, Li Y, Ding B, et al. Two *Lactobacillus* species inhibit the growth and α -toxin production of *Clostridium perfringens* and induced proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Front Microbiol* 2017;8:2081.

- [37] Coconnier MH, Lie'vin V, Bernet-Camard MF, Hudault S, Servin AL. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1046–52.
- [38] Pascual LM, Daniele MB, Giordano W, P'ajaro MC, Barberis IL. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol* 2008;56:397–402.
- [39] Mazlyn MM, Nagarajah LH, Fatimah A, Norimah AK, Goh KL. Effects of a probiotic fermented milk on functional constipation: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:1141–7.
- [40] Moreira TR, Leonhardt D, Conde SR. Influence of drinking a probiotic fermented milk beverage containing *Bifidobacterium animalis* on the symptoms of constipation. *Arq Gastroenterol* 2017;54:206–10.
- [41] Eskesen D, Jespersen L, Michelsen B, Whorwell PJ, Muëller-Lissner S, Morberg CM. Effect of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, on defecation frequency in healthy subjects with low defecation frequency and abdominal discomfort: a randomised, double-blind, placebo- controlled, parallel-group trial. *Br J Nutr* 2015;114:1638–46.
- [42] Miller LE, Ouwehand AC, Ibarra A. Effects of probiotic-containing products on stool frequency and intestinal in constipated adults: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Gastroenterol* 2017;30: 629–39.
- [43] Ballou S, Beath A, Kaptchuk TJ, Hirsch W, Sommers T, Nee J, et al. Factors associated with response to placebo in patients with irritable bowel syndrome and constipation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018;16:1738–44.
- [44] Dorn SD, Kaptchuk TJ, Park JB, Nguyen LT, Canenguez K, Nam BH, et al. A meta-analysis of the placebo response in complementary and alternative medicine trials of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:630–7.
- [45] Ford AC, Moayyedi P. Meta-analysis: factors affecting placebo response rate in the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32: 144–58.