

Efeito de uma associação de cepas probióticas contendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na modulação da microbiota intestinal em pacientes constipados

Effects of association of probiotic strains containing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on modulation of the intestinal microbiota in constipated patients.

PAULA GONÇALVES DE ARAÚJO¹, CAMILA SIRIEIRO MELO ABREU², LUDMILA DONATO³, JULIANO ALMEIDA⁴, MAURO CRIPPA⁵, ALEXANDRA DUMONT⁶, ERICA CORSI⁷, RONALDO CARNEIRO DOS SANTOS⁸

RESUMO

Introdução: A constipação é uma doença crônica que afeta a população mundial, podendo ser consequência do desequilíbrio da microbiota intestinal, conhecida como disbiose. Nesse contexto, os probióticos vêm sendo utilizados com o objetivo de promover o seu equilíbrio, a fim de mantê-la saudável (eubiose). **Objetivo:** Avaliar, em um estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controlado, se o uso de uma associação de cepas probióticas contendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* por 28 dias pode modular a microbiota intestinal em pacientes constipados. **Método:** A atividade da associação de cepas probióticas foi comparada com placebo (maltodextrina) após a suplementação por 28 dias. Os pacientes foram avaliados por meio da análise de metagenômica e da melhora dos sintomas relacionados à constipação. Os dados do perfil da população de microrganismos presentes no intestino dos pacientes foram correlacionados com os resultados da avaliação dos sintomas abdominais e da percepção de bem-estar geral. O aumento do número de evacuações e a melhora do trânsito intestinal foram avaliados durante o estudo. **Resultados:** As proporções do gênero *Bifidobacterium* no grupo teste e controle foram 0.45% vs 0.24% no final do estudo, respectivamente ($p < 0.05$). Adicionalmente, a diferença entre os grupos que receberam associação de cepas probióticas

contendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e placebo permaneceu também significativamente alta com relação às espécies de *Lactobacillus* (1.21% vs 0.12%) após 28 dias de tratamento ($p < 0.05$). Além disso, os participantes que receberam o probiótico apresentaram uma tendência de melhora sintomática baseada na comparação da sua microbiota e as respostas oriundas da avaliação dos sintomas abdominais e bem-estar geral. Nenhum evento adverso grave foi relatado. **Conclusão:** A formulação probiótica modulou a microbiota intestinal de forma diferente do placebo nos participantes do estudo. O consumo dos probióticos aumentou significativamente as bactérias benéficas e reduziu as potencialmente maléficas, contribuindo para o equilíbrio da microbiota intestinal.

Unitermos: Microbiota Intestinal Humana, Metagenômica, Microbiota, Probióticos, Biomarcadores e Teste Clínico.

SUMMARY

Introduction: Constipation is a chronic disease that affects the world population, being a consequence of the imbalance of the intestinal microbiota, known as dysbiosis. In light of this context, the probiotics have been used to trigger microbiota intestinal balance, in order to

1. Bióloga e Diretora Científica da Gentos Biotecnologia Ltda. 2. Farmacêutica do Departamento Pesquisa Clínica da Farmoquímica (FQM). 3. Farmacêutica do Departamento Pesquisa Clínica FQM. 4. Bióloga da Gentos Biotecnologia Ltda. 5. Médico do Departamento Médico da Allergisa. 6. Bioquímica do Departamento de Pesquisa Clínica da Allergisa. 7. Farmacêutica e Bioquímica do Departamento Pesquisa Clínica da Allergisa. 8. Médico do Departamento Médico-Científico FQM. **Endereço para correspondência:** Camila Abreu – Coordenadora do Departamento de Pesquisa Clínica, FQM – Avenida José Silva de Azevedo Neto, 200, Cond. 02, Edifício Evolution, 1º andar – Barra da Tijuca – Rio de Janeiro – RJ – Brasil – CEP: 22775-056/e-mail: cabreu@fqm.com.br. **Recebido em:** 18/07/2017. **Aprovado em:** 20/09/2017.

keep it healthy (eubiose) **Aim:** To evaluate in a double-blind, randomized, placebo-controlled study whether the use of association of probiotic strains containing *lactobacillus* and *bifidobacterium* for 28 days can modulate the intestinal microbiota of the constipated participants. **Methods:** The activity of association of probiotic strains was compared to placebo (maltodextrin) after 28 days of consumption. The patients were evaluated by using metagenomics analyses and improved constipation symptoms. The dates of microorganisms population profile into patients gut were correlated with results of abdominal symptoms evaluation and well-being perception. The increase in the number of evacuations and the intestinal transit were evaluated during the study. **Results:** The proportions of the genus *Bifidobacterium* in the test groups and the control group were 0.45% vs 0.24% at the end of the study, respectively ($p < 0.05$). Additionally, the difference between the groups that received association of probiotic strains containing *lactobacillus* and *bifidobacterium* and the placebo remained higher for species of the genus *Lactobacillus* (1.21% vs 0.12%) after 28 days of use ($p < 0.05$). Furthermore, the participants who received the probiotic had a tendency to improve symptomatic based on comparisons of their microbiota and the responses provided patients' abdominal symptoms and well-being. There were no reports of serious adverse events during the study. **Conclusion:** The probiotic formulation modulated the intestinal microbiota differently from the placebo in constipated participants included in this study. The use of this probiotic significantly increased beneficial bacteria and decreased potentially harmful microbes, which contributed to the maintenance of a healthy intestinal microbiota.

Keywords: Human Gut Microbiome, Metagenomics, Microbiota, Probiotics, Biomarkers, Clinical Test.

INTRODUÇÃO

A constipação é uma doença crônica que afeta a população mundial, sendo duas a três vezes mais prevalente e sintomática nas mulheres do que nos homens, representando também um fator de risco para os idosos acima de 70 anos.¹

Os pacientes que manifestam quadros de constipação apresentam menos de três evacuações por semana, aumento na consistência das fezes, sensação de evacuação incompleta e dor ao evacuar, sinais e sintomas contemplados nos critérios diagnósticos do ROMA III.¹

Esta doença crônica pode ser desencadeada por diversos fatores, como mudança na dieta e ingestão de fluidos, diminuição da ingestão de produtos contendo fibras, uso de determinados medicamentos, inatividade física, envelhecimento, dentre outros. Além disso, pode ser uma condição secundária à disbiose intestinal, caracterizada pela diminuição das bactérias benéficas e aumento das potencialmente patogênicas, afetando, assim, a motilidade intestinal e a função secretória intestinal.^{2,3}

Com isso, diferentes abordagens, incluindo o uso de nutracêuticos (prebiótico e probiótico), têm sido utilizadas como estratégias para a busca do reequilíbrio da microbiota intestinal, resultante do aumento da proporção das bactérias patogênicas.^{4,5}

O presente estudo avaliou a ação de uma associação de cepas probióticas, contendo *lactobacillus* e *bifidobacterium*, comparado ao placebo na busca do restabelecimento do equilíbrio da microbiota por meio da técnica de metagenômica, e a avaliação dos seus efeitos no trânsito intestinal de pacientes constipados. Assim, os dados deste estudo corroboram com o possível efeito benéfico dos probióticos e sua contribuição para manter a microbiota intestinal saudável em condições de estresse adversos, como na constipação.

MÉTODO

Este estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controlado foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética do Investiga Instituto de Pesquisa (número do parecer: 1.580.466), e seguiu as orientações da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e as Boas Práticas Clínicas. O estudo foi registrado no Clinical Trials.gov sob número NCT03103958. A pesquisa foi conduzida pelo Investiga Instituto de Pesquisa e pelo laboratório Gentros Pesquisa e Desenvolvimento.

Desenho do estudo

Pacientes adultos com idade entre 18-55 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de constipação, segundo os critérios de ROMA III, foram incluídos no estudo entre os períodos de junho a setembro de 2016.

Os critérios de exclusão foram: intolerância ou alergia a qualquer componente da formulação do produto estudado; gravidez ou lactação; história de cirurgia gastrointestinal; doença celíaca ou inflamatória intestinal; pacientes com doenças psiquiátricas, cardíacas, respiratórias, gastrointestinais, renais ou hepáticas, rejeição do paciente em participar do estudo; diagnóstico de diarreia por *Clostridium difficile* dentro de 3 meses antes da inclusão no estudo; doença imunossupressora conhecida; uso de antibiótico 30 dias antes da inclusão no estudo; uso frequente de laxantes ou outra medicação que altera o trânsito intestinal (suspensão de uso antes da inclusão no estudo); uso de probióticos ou simbióticos – incluindo uso de iogurte com probióticos (suspensão de uso uma semana antes de entrar no estudo) e uso regular de antidepressivo, analgésico opioide, antiespasmódico ou anticolinérgico.

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e avaliação dos critérios de inclusão e de exclusão, os pacientes incluídos no estudo foram randomizados em dois grupos: o que recebeu o probiótico (grupo teste) e o que re-

cebeu o placebo (grupo controle). Os primeiros 22 pacientes de cada grupo foram também alocados para avaliação por metagenômica através de coleta das fezes antes e após o período de suplementação.

Adicionalmente ao recebimento dos produtos, os pacientes receberam um diário para avaliar a sua aderência ao tratamento e possíveis eventos adversos, e um questionário para relatar os sintomas gastrointestinais e o seu bem-estar geral, conforme tabela 1.

Tabela 1. Questionário de Avaliação Subjetiva de Sintomas Abdominais e Bem-Estar Geral.

- 1) Quantas vezes por semana você evacua?
- 2) Classifique, na escala abaixo, a intensidade da dor ou desconforto abdominal ao evacuar
Leve-Moderada-Intensa
- 3) Quando vai ao banheiro, você tem a sensação de esvaziamento intestinal incompleto?
- 4) Classifique, na escala abaixo, o desconforto relacionado à flatulência (gases):
Leve-Moderada-Intensa
- 5) Classifique, na escala abaixo, o desconforto relacionado ao inchaço ou distensão abdominal:
Leve-Moderada-Intensa
- 6) De acordo com a escala abaixo, classifique a consistência das suas fezes mais frequentemente apresentada (de 1 a 7)
 1 2 3 4 5 6 7
- 7) Quando vai ao banheiro, você costuma fazer força para evacuar?
- 8) Quando vai ao banheiro, qual é a frequência com que você sente bloqueio ou obstrução no ânus para eliminação das fezes?
- 9) Quando vai ao banheiro, qual é a frequência de uso de manobras manuais para facilitar as defecações (por exemplo, evacuação com ajuda digital, apoio do assoalho pélvico)
- 10) Como você classifica o grau de bem-estar geral?

As perguntas relativas à dor abdominal ao evacuar, sensação de esvaziamento incompleto, flatulência, distensão abdominal e bem-estar geral foram avaliadas por meio do uso da escala analógica de dor de 10 pontos, na qual a numeração de 0-2 significava intensidade leve, 3-7 moderada e 8-10 intensa.

A consistência e a frequência das fezes foram avaliadas por meio da escala de Bristol. As perguntas relativas ao esforço

evacuatório, sensação de obstrução ou bloqueio anal para eliminar as fezes e utilização de manobras manuais para facilitar a defecação foram avaliadas por meio do uso da escala de Linkert de 5 pontos, 100%, 50%-75%, 25%-50%, 0%-25% e 0% dos casos.

As avaliações dos sintomas gastrointestinais também ocorreram no início da pesquisa, após 14 ± 2 dias do uso do produto (contato por telefone) e após 28 ± 2 dias de tratamento. As amostras de fezes foram coletadas pelos próprios pacientes antes do início do tratamento (tempo 0-T0) e após 28 dias (tempo 28-T28). Os mesmos receberam dois kits e instruções de uso no início da pesquisa. Todos os tubos de coleta foram identificados e armazenados a 4 °C no instituto de pesquisa antes da extração do DNA genômico das bactérias.

Tratamento

Probiatop® (Laboratório Farmoquímica S.A) é uma preparação probiótica, contendo em cada sachê 1 g da formulação composta de *Lactobacillus acidophilus* NCFM (10⁹), *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (10⁹), *Lactobacillus paracasei* LPC-37 (10⁹) e *Bifidobacterium lactis* HN019 (10⁹). Os sachês do placebo, composto por maltodextrina, foram preparados de forma idêntica ao sachê do probiótico, não podendo ser distinguido do mesmo. Os pacientes eram “cegos” no estudo e foram instruídos a consumirem 2 sachês ao dia por 28 dias após a diluição do produto em 100 mL de água.

Extração do DNA

Aproximadamente 700 µL de suspensão de amostra fecal preservada a 4 °C foi extraída seguindo as recomendações do fabricante do kit MoBio PowerSoil® DNA Isolation Kit.⁶ O DNA extraído das amostras de fezes coletadas de cada paciente foi testado em uma reação de PCR para verificar integridade e pureza do material genético, dois parâmetros importantes para a qualidade da confecção das bibliotecas de DNA a ser sequenciado.

Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

DNA das amostras foi quantificado com o kit Qubit® dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific). Foi utilizado 1 µL (10 ng / µL) de DNA na reação de PCR em triplicado. As ampliações da região 16S V4 (~ 300 pb) foram purificados com esferas magnéticas usando o kit AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences). Os produtos de PCR purificados foram quantificados por PCR em tempo real com o kit KAPA® Fast Universal kit (Kapa Biosystems). As bibliotecas foram construídas e sequenciadas a 12 pMol na plataforma Illumina Miseq.⁷

Análise de Bioinformática

A técnica de metagenômica é livre de cultivo de microrganismos, pois estes são coletados diretamente das amostras e

seus materiais genéticos sequenciados; portanto, a terminologia para identificação de colônias de bactérias passa a ser leituras, pois cada colônia significa uma sequência de DNA lida. A análise da microbiota foi realizada tanto quantitativamente (abundância) quanto qualitativamente (diversidade), utilizando-se um pacote de *software* de código aberto para análise quantitativa em estudos de ecologia microbiana, o QIIME™.⁸

As leituras da microbiota geradas de cada paciente foram comparadas em bancos de dados públicos existentes para classificação das espécies presentes e o número de vezes que cada uma delas apareceu no microbioma do indivíduo na amostra coletada (abundância). Finalmente, os dados da Bioinformática foram embasados por uma análise estatística como forma de eliminar ruídos da análise.

Análise estatística

As leituras geradas para cada espécie de bactéria encontrada em cada paciente do estudo foram transformadas através da função logarítmica como forma de diminuir a variação dos dados. Após esse tratamento, os dados foram analisados por dois métodos estatísticos não paramétricos: Wilcoxon Signed Rank, quando se comparou as amostras de fezes antes e depois do tratamento para o mesmo indivíduo, e Mann-Whitney, quando se comparou amostras de fezes dos indivíduos tratados com o probiótico e aqueles tratados com placebo.

Desta forma, as populações de microrganismos presentes nas fezes dos indivíduos foram comparadas entre si e apenas as leituras que obtiveram o nível de confiança 95% (5% significância) foram consideradas.

O *software* utilizado foi o XLSTAT 2015 e MINITAB 14. Os dados relacionados à avaliação dos sintomas gastrointestinais e do trânsito intestinal foram realizados por meio do teste t-student para amostras independentes, com hipótese bilateral e teste Z para duas proporções. O *software* XLSTAT2016 e MINITAB 14 foi utilizado para avaliação estatística, considerando o nível de confiança de 95%. A randomização entre os grupos foi efetuada por meio do uso *software* XLSTAT na função “randomização sem reposição”.

Este procedimento foi realizado em duas etapas: 1) os primeiros 44 pacientes foram randomizados de forma a balancear os sexos e idades (15-35 anos e 36-55 anos) para análise metagenômica, e 2) o restante dos pacientes foi randomizado diretamente na função “random.”

RESULTADOS

Dados demográficos

Cento de vinte e um (121) pacientes foram randomizados no estudo. Sete (7) pacientes descontinuaram ou foram excluídos

pelos seguintes motivos: dois (2) por motivos não relacionados ao estudo; quatro (4) excluídos por violação do protocolo e um (1) descontinuado por falha de seleção. Assim, 113 pacientes completaram o estudo, 56 no grupo teste e 57 no grupo controle. Os 22 primeiros pacientes de cada grupo foram incluídos na análise de metagenômica. Todos pertenciam ao sexo feminino. A média de idade foi 36 anos e a média do peso de 73 kg. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 2. Dados Demográficos.

| Variável | Grupo teste (n=56) | Grupo Controle (n=57) | Valor p |
|----------|--------------------|-----------------------|---------|
| Idade | 37 | 36,8 | 0,926 |
| Peso | 73,4 | 73,9 | 0,87 |

teste t para duas amostras independentes / teste two-tailed

Durante o estudo, os hábitos alimentares e físicos foram controlados, não sendo observadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos.

Evento adverso

Quarenta e quatro (44) pacientes reportaram eventos adversos transitórios durante o estudo. Entretanto, nenhum deles foi considerado grave, não havendo diferença significativa entre os grupos.

Composição da microbiota dos participantes

O sequenciamento de DNA das amostras coletadas antes e depois do uso do probiótico e do placebo gerou 27.829.640 milhões de sequências e identificou 2.565 mil espécies diferentes de bactérias entre os participantes do estudo.

Estas espécies estão predominantemente divididas entre os quatro principais filos presentes em todos os seres vivos – *Actinobacterias*, *Bacteriodetes*, *Firmicutes* e *Proteobacterias* –, sendo que a maior prevalência de espécies do intestino pertence aos filos *Bacteriodetes* e *Firmicutes*, como podem ser observados na figura 1.

Apesar da distribuição dos filos parecer muito semelhante entre os grupos teste e controle na amostra em T0 e T28, existe diferença no perfil de distribuição entre os filos dependendo da suplementação realizada, conforme evidenciada pela avaliação estatística, na qual mostrou que a modulação da microbiota intestinal pelo probiótico foi significativamente diferente do placebo.

A análise estatística mostrou que a maior diferença encontrada entre os grupos que utilizaram placebo e probiótico ocorreu nas espécies dos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria*, conforme a figura 1 ($p < 0.05$).

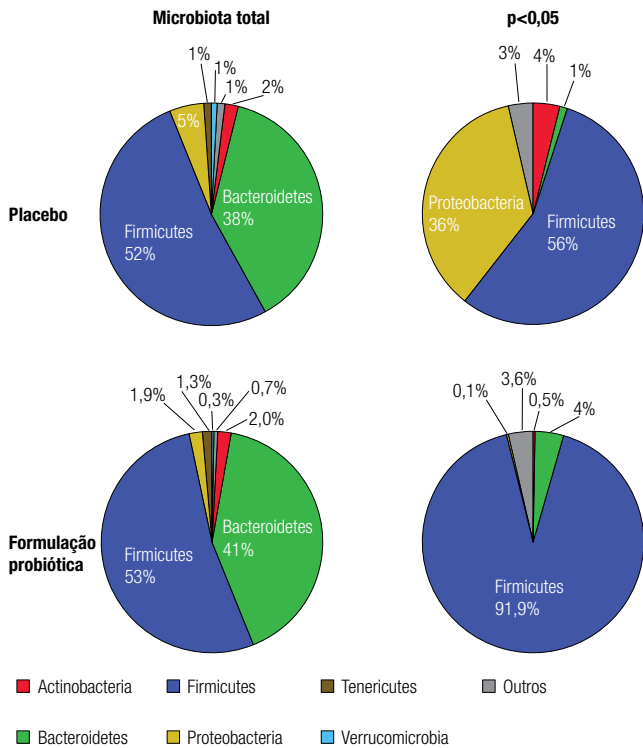


Figura 1. Diferenças na microbiota no nível de filo entre grupos de participantes que usaram placebo dos que usaram a formulação probiótica. Os gráficos representam uma análise comparativa da microbiota dos participantes que usaram placebo daqueles que foram tratados com formulação probiótica por 28 dias. À esquerda estão representados os gráficos da microbiota total presente nos participantes do estudo. À direita estão os gráficos comparativos após a análise estatística. Foram consideradas apenas as espécies que obtiveram um nível de confiança de 95% ($p < 0.05$). Nos gráficos pós-tratamento estatístico, as porcentagens não devem ser interpretadas como aumento ou diminuição nos microrganismos presentes na microbiota dos indivíduos, mas como diferenças que ocorreram entre o grupo que recebeu o placebo do grupo que recebeu a formulação probiótica. As cores de cada filo são as mesmas entre os gráficos e são indicadas pelas legendas.

O filo *Firmicutes* apresentou maior diversidade das espécies no grupo probiótico do que no grupo placebo, contrariamente ao filo *Proteobacteria*, no qual o grupo placebo apresentou 3 vezes mais diversidade de espécies desse filo do que no grupo suplementado com o probiótico, partindo de 86 espécies para 224 diferentes espécies no final do estudo.

Outra diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos foi observada nos filis *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, conforme figura 2, que mediu as diferenças na microbiota dos pacientes no início do estudo e após 28 dias de tratamento.

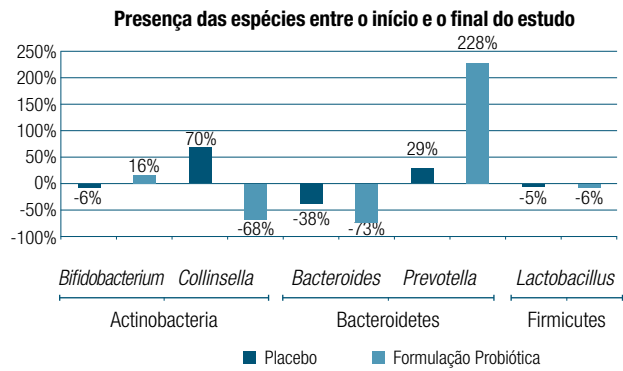


Figura 2. Diferenças na microbiota entre o início e o final do estudo. O gráfico representa uma análise comparativa da microbiota dos participantes que utilizaram placebo e a formulação probiótica no início do estudo e após 28 dias de tratamento. As porcentagens indicam a diferença no número de espécies de cada gênero no início e no final do estudo. Apenas foram consideradas as espécies que obtiveram um nível de confiança de 95% ($p < 0.05$). As cores de cada grupo são indicadas pelas legendas.

Foram consideradas apenas as espécies que obtiveram um nível de confiança de 95% ($p < 0.05$). O gênero *Bifidobacterium* ($p < 0.001$) e as espécies do gênero *Prevotella* ($p < 0.001$) foram favorecidos no grupo do probiótico, enquanto as espécies dos gêneros *Collinsella* ($p < 0.042$) e *Bacteroides* ($p < 0.014$) mostraram uma diminuição com o uso do probiótico.

A diferença de comportamento de algumas espécies no final do estudo em relação ao total de espécies que obtiveram o nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) pode ser observado no gráfico da figura 3.

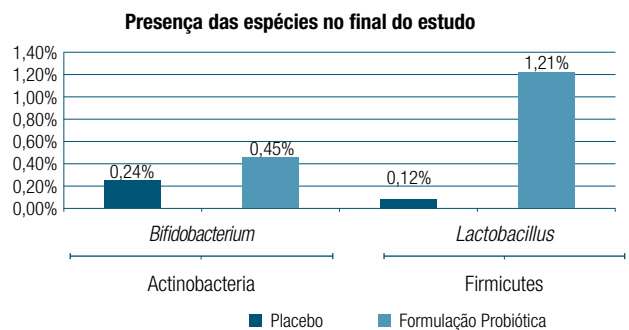


Figura 3. Presença das espécies no final do estudo. O gráfico representa a análise comparativa da microbiota dos participantes que utilizaram o placebo e a formulação probiótica após 28 dias de tratamento. As porcentagens indicam a participação de algumas espécies desses gêneros no final do estudo em relação ao total de espécies que obtiveram o nível de confiança de 95% ($p < 0.05$). As cores de cada grupo são indicadas pelas legendas.

Entre essas espécies, foram destacadas algumas pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, favorecidos com o uso da associação de cepas probióticas em relação ao placebo (0.45% vs. 0.24% e 1.21% vs. 0.12%, respectivamente).

Esses resultados demonstraram que o uso do probiótico conseguiu modificar favoravelmente a microbiota intestinal do grupo que utilizou os probióticos em relação ao grupo que fez uso do placebo.

Microbiota e os sintomas gastrointestinais

Os sintomas gastrointestinais foram analisados nos 113 pacientes do estudo. De acordo com os resultados, ambos os grupos melhoraram a intensidade da dor, desconforto abdominal, esforço evacuatório, sensação de esvaziamento incompleto, consistência das fezes e bem-estar geral dos pacientes. Entretanto, o grupo que usou o probiótico apresentou melhora superior ao grupo placebo com relação aos sintomas

flatulência ($p < 0.045$) e desconforto relacionado à distensão abdominal ($p < 0.039$) ao final da suplementação de 28 dias.

Resultados semelhantes também foram observados no grupo de pacientes que foram submetidos à avaliação metagenômica (22 pacientes em cada grupo), que, ao final do tratamento com o probiótico, apresentaram melhora superior ao grupo placebo com relação aos sintomas de flatulência ($p < 0.042$) e desconforto relacionado à distensão abdominal ($p < 0.022$).

Os dados da análise de metagenômica de cada paciente foram cruzados com os resultados obtidos pelos questionários de sintomas gastrointestinais e de bem-estar geral⁹, para determinar se os sintomas relatados pelos pacientes que fizeram uso do placebo e dos probióticos correlacionaram-se com as modificações ocorridas em seus respectivos padrões de microbiota. Adicionalmente, foi avaliado se os pacientes que foram submetidos ao uso de probióticos passaram a

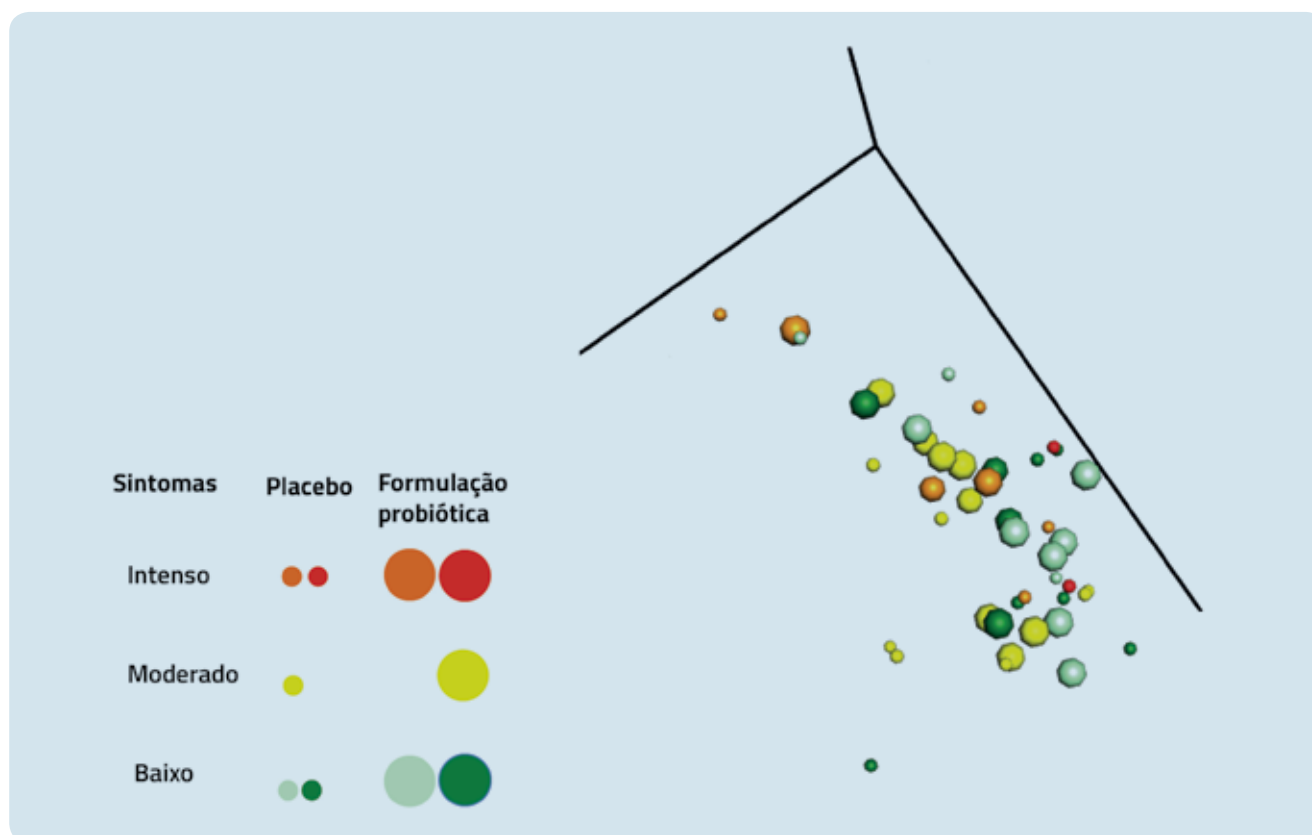


Figura 4. Correlação dos sintomas com a semelhança entre as microbiotas dos participantes. As esferas menores indicam os participantes que receberam placebo e as esferas maiores indicam os participantes que receberam a formulação probiótica após 28 dias de tratamento. A distância entre as esferas indica as semelhanças de microbiota entre espécies, e as cores das esferas indicam os sintomas percebidos pelos participantes a partir das respostas do questionário de avaliação subjetiva de sintomas abdominais e bem-estar geral. As cores verde e amarelo indicam respostas positivas para melhora nos sintomas de constipação, enquanto as cores laranja e vermelho indicam respostas negativas para melhoras nos sintomas de constipação.

apresentar um perfil de microbiota mais semelhante entre si do que os pacientes do grupo placebo.

A figura 4 mostra que as esferas maiores, representadas pelos indivíduos do grupo testado, estão mais próximas entre si e suas colorações indicam melhores respostas, enquanto as esferas menores, apresentadas pelo grupo que recebeu placebo, encontram-se mais dispersas, indicando maiores diferenças entre os padrões de microbiota.

Nesse caso, suas colorações representaram, portanto, piores respostas em termos de sintomas de constipação.

Dessa forma, nota-se que os pacientes que receberam o probiótico apresentaram uma tendência de melhora baseada na

análise dos sintomas gastrointestinais relatados e de seus respectivos perfis de microbiota, que se tornaram mais homogêneas em relação ao grupo controle.

DISCUSSÃO

O uso do probiótico oral pode modular a microbiota intestinal?

Algumas espécies de probióticos são reconhecidas por gerarem impacto positivo no equilíbrio da microbiota intestinal, como as espécies dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, pertencentes aos filos *Actinobacteria* e *Firmicutes*, respectivamente.



Figura 5. HeatMap com as espécies que obtiveram um nível de confiança de 95% entre os participantes que receberam o placebo e a formulação probiótica. Os participantes que receberam o placebo estão representados no lado esquerdo do gráfico, enquanto os participantes que receberam a formulação probiótica estão representados no lado direito do gráfico: são eles: 001.003, 005, 006, 008, 011, 013, 014, 017, 019, 020, 023, 025, 029, 030, 035, 037, 038, 040, 042, 043, 046 e 002, 004, 007, 009, 010, 012, 015, 016, 018, 021, 022, 024, 026, 027, 028, 031, 034, 036, 039, 041, 044 e 045, respectivamente. Os filios correspondentes são separados por colchetes no lado direito do HeatMap seguido dos gêneros encontrados. A cor azul mais intensa indica maior presença daquela espécie. Os gêneros *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis BI-04*) e *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei W56*, *Lactobacillus saniviri* e *Lactobacillus sp. BS1*) estão destacados em amarelo.

Estas espécies inibem o crescimento de bactérias exógenas que podem ser prejudiciais, assim como estimulam a função imune, auxiliando na digestão e absorção de nutrientes e minerais, contribuindo para a síntese de vitaminas.^{10,11}

Análise quantitativa demonstrou que estas espécies aumentaram significativamente no grupo que utilizou o probiótico ($p < 0.05$), comparado ao grupo placebo (figura 5).

Diferentemente, o gênero *Collinsella*, pertencente ao filo *Actinobacteria*, apresentou significativa redução quantitativa neste grupo após 28 dias de suplementação, conforme figura 2. As espécies do gênero *Collinsella* são conhecidas por terem capacidade de fermentar grande parte dos carboidratos e gerar produtos, como o hidrogênio e o etanol, levando, conseqüentemente, ao aumento da produção de gases no sistema digestório.¹²

Os filios *Bacteroidetes* e *Firmicutes* constituem 90% das bactérias presentes no intestino humano.⁵ As espécies pertencentes ao filo *Bacteroidetes* são aeróbicas gram-negativas e não esporuladas.^{13,14} Muitas espécies deste filo são comensais e se alimentam da digestão de alimentos que permanecem no intestino do hospedeiro.

Dessa forma, estas espécies proporcionam o balanço da microbiota intestinal, uma vez que impedem a colonização por bactérias patogênicas.¹³ Pelo fato desse filo ser predominante e muito importante no processo digestivo, sua população não deve variar substancialmente entre os indivíduos, exceto em casos de doenças ou uso de antibióticos ou probióticos.¹³

Neste contexto, a proporção da distribuição dos gêneros deste filo apresentou diferença significativa entre os pacientes do grupo placebo quando comparados ao grupo probióticos. Como exemplo, a proporção do gênero *Prevotella* aumentou significativamente ($p < 0.001$) no grupo que usou probióticos quando comparado ao grupo placebo. Este grupo de bactérias indica uma dieta rica em fibras, e é reconhecida mais prevalente em vegetarianos.¹⁵

Este resultado sugere que o uso do probiótico modulou a microbiota dos indivíduos testados, mimetizando uma dieta rica em fibras e favorecendo a identificação deste tipo de bactérias.

Resultado significativamente diferente foi encontrado nos indivíduos do grupo placebo, nos quais a população de *Bacteroides* ($p < 0.014$) permaneceu praticamente inalterada. Este grupo de bactérias, também pertencentes ao filo dos *Bacteroidetes*, indica uma alimentação essencialmente rica em carboidratos, e são sabidamente encontradas em maior número em pessoas obesas.^{13,14}

Outro dado relevante que pôde ser evidenciado foi o aumento da diversidade e abundância das espécies do filo *Proteobacteria* nos indivíduos do grupo placebo, em comparação com o grupo que fez uso dos probióticos. Este filo é composto por bactérias gram-negativas, cujas espécies são importantes colonizadoras da pele humana.

Na pele, apresentam-se como um ecotipo específico, desempenhando papel em situações de infecções e na preservação da homeostase e, em algumas circunstâncias, algumas espécies podem se tornar oportunistas.¹⁶ Porém, no intestino existem muitas espécies deste filo classificadas como oportunistas que, em situações de estresse, podem se tornar patogênicas.

O grupo placebo apresentou grande aumento da diversidade de espécies deste filo, o que não foi observado com o grupo que fez uso do probiótico, que manteve o padrão habitual de *Proteobacterias*, com discreta variação de composição antes e pós-intervenção.

Mais uma vez, o uso do placebo aumentou a diversidade de bactérias que, isoladamente, não fazem parte dos processos digestórios, mas que, em determinadas situações de estresse, podem vir a se tornarem patogênicas.

Já o probiótico modulou a microbiota intestinal dos indivíduos, incrementando a população de bactérias benéficas que participam dos processos metabólicos intestinais e reduzindo proporcionalmente as espécies que estão relacionadas a eventos desfavoráveis, como a produção de gases intestinais.

Modulação da microbiota e seu impacto clínico

É comprovado que o uso de probióticos alivia os sintomas da constipação.¹⁷ Diversos estudos demonstraram melhora da consistência das fezes em pacientes constipados, segundo a escala de Bristol, assim como auxiliam na redução da dor durante a evacuação e aumentam a frequência evacuatória.^{18,19,20,21}

Entretanto, tais achados não foram observados neste estudo. A maioria dos sintomas gastrointestinais melhorou em ambos os grupos do estudo, não havendo diferença entre eles, com exceção da flatulência e da distensão abdominal, nas quais o grupo que utilizou o probiótico apresentou melhora significativa ao final do estudo.

Entretanto, na análise por metagenômica foi verificada diferença estatisticamente significativa no perfil da microbiota dos pacientes que utilizaram probiótico em relação àqueles que receberam placebo ($p < 0.05$).

Esse resultado pode ser explicado de duas formas: primeiramente, deve-se considerar que os sintomas de constipação intestinal são altamente influenciados por fatores psicológi-

cos em grande parte dos casos²², de tal forma que, pelo simples fato do indivíduo ter ciência de que está sendo ‘tratado para o seu problema’, intuitivamente, possa determinar que o mesmo refira sentir-se melhor, podendo representar desvio nas respostas ao teste clínico.

Ademais, cabe ressaltar que a análise comparativa entre os perfis de microbiota apresentou diferenças significativas entre o grupo que utilizou o placebo e o suplementado com o probiótico.

Uma segunda razão pode explicar tal resultado seria uma possível discrepância entre a percepção dos pacientes e as modificações da microbiota.

Este fato consiste na existência de uma variabilidade individual da microbiota intestinal, que pode justificar porque a suplementação com probióticos pode levar a efeitos mensuráveis em alguns indivíduos, diferentemente de outros.⁸ Em outras palavras, as alterações na microbiota ocorrem, mas não são refletidas na percepção de todos os pacientes de forma homogênea.

Tais fatos justificariam a necessidade de que os resultados devessem ser avaliados associados à análise metagenômica, objetivando determinar os efeitos do uso dos probióticos no trato gastrointestinal a despeito da subjetividade da resposta clínica dos indivíduos experimentados.

É importante ressaltar também que existem diversos estudos na literatura que comprovam os mecanismos de ação dos probióticos e seus efeitos benéficos.

Os resultados deste estudo, que contemplaram o aumento de bactérias benéficas com o uso do probiótico, podem ter sido determinados por meio da competição por nutrientes, área de adesão à mucosa ou receptores com bactérias patogênicas, diminuição do pH luminal ou por produção de substâncias bacteriostáticas ou bactericidas, como bacteriocinas.²³

Deve-se mencionar que o estudo em questão apresentou algumas limitações. A população do estudo foi composta exclusivamente por mulheres, de forma que os efeitos benéficos mencionados anteriormente dizem respeito apenas a este gênero, apesar do critério de inclusão ter contemplado o recrutamento de ambos. Tal fato pode ter ocorrido em virtude de a constipação ser duas a três vezes mais prevalente e sintomática nas mulheres do que nos homens.¹

Outra limitação foi o tempo de suplementação proposto para o grupo testado. Sabe-se que o efeito placebo tende a ocorrer, via de regra, nas fases iniciais dos estudos de intervenção, fato este que pode ter ocorrido no estudo. Ademais, em contextos tais como a constipação intestinal - cenário clínico que reconhecidamente apresenta cronicidade na grande

maioria dos casos -, a proposta de intervenção, em muitos casos, pode ser procedida por períodos mais longos do que 4 semanas.^{24, 25}

Portanto, a despeito da comprovação da eficácia do uso da formulação probiótica na avaliação objetiva da constituição da microbiota intestinal (metagenômica), é razoável imaginar que a continuação da administração deste produto por um período mais prolongado poderia agregar benefícios clínicos adicionais aos já mencionados anteriormente.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que houve modulação da microbiota intestinal nos pacientes constipados que fizeram uso do probiótico diferentemente do grupo placebo, evidenciado pelo incremento das bactérias benéficas e controle das potencialmente patogênicas.

Além disto, os pacientes que fizeram uso do probiótico apresentaram melhora da flatulência e da distensão abdominal, sintomas frequentemente relatados por pacientes constipados.

CONFLITO DE INTERESSES

Este presente estudo foi financiado pela Farmoquímica.

REFERÊNCIAS

1. Leung, L, MBBCChir, FRACGP, FRCGP, Riutta, T, MD, Jyoti Kotecha, MPA, MRSC, and Rosser, W MD, MRCP, FCFP Chronic Constipation: An Evidence-Based Review. *JABFM* 2011; 24: 436-51
2. Saad, SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2006, 42: 1-16.
3. Waitzberg, DL, Logullo, LC, F, AA. Bittencourt, Torrinhas, RS. Effect of synbiotic in constipated adult women e a randomized, double-blind, placebo-controlled study of clinical response. *Clinical Nutrition* 2013, 32: 27-33.
4. Belizário JE, Napolitano M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6: 1050
5. Moraes FP, Colla LM. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2006; 3:109-22
6. The Human Microbiome Project Consortium. Human Microbiome Project - Core Microbiome Sampling Protocol A HMP Protocol # 07-001. Manual of Procedures 2010; 12. Available from: URL: http://hmpdacc.org/doc/HMP_MOP_Version12_0_072910.pdf

7. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 2012; 6:1621-4
8. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; 7:335-6
9. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol.* 1997; 32:920-4
10. Manning TS, Gibson GR. Microbial-gut interactions in health and disease. *Prebiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 18:287-98
11. Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *J Pediatr* 2014; 215: 1-16
12. Kassinen A, Krogius-kurikka L; Paulin L; Corander J; Malinen E; Apajalahti J, Palva A. The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs. *Gastroenterology* 2007; 133: 24-33
13. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473:174-80.
14. Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czekaj M, Michel G. Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology-Cellular and Infection Microbiology* 2011; 2:1-16
15. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:14691-6
16. Cosseua C, Romano-Bertrandb S, Dupland H, Lucasa O, Ingrassiaa I, Pigassea C, et al. Proteobacteria from the human skin microbiota: Species-level diversity and hypotheses. *One Health* 2016; 2:33-41.
17. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-z-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J, Antonin M, Artiguenave F, Blottiere H, Borruel N, Bruls T, Casellas F, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Forte M, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Jamet A, Juste C, Kaci G, Kleerebezem M, Knol J, Kristensen M, Layec S, Le Roux K, Leclerc M, Maguin E, Minardi RM, Oozeer R, Rescigno M, Sanchez N, Tims S, Torrejon T, Varela E, de Vos W, Winogradsky Y, Zoetendal E. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-68
18. Tsutsumi,SH, Viana, RCB; Viana,VS; Cavalcante,RMS. Uso de simbiótico em idosos politraumatizados com obstipação crônica. *Geriatrics & Gerontologia*, 2011; 5(1):8-13.
19. De Paula JA, Carmuega E, Weil R. Effect of the ingestion of a symbiotic yogurt on the bowel habits of women with functional constipation. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2008; 38(1):16-25.
20. Guyonnet D, Chassany O, Ducrotte P, Picard C, Mouret M, Mercier CH, et al. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Alimen Pharmacol Ther.* 2007; 26:475-86.
21. Meance S, Cayuela C, Raimond A, Turchet P, Lucas C, AntoineJM. Recent advances in the use of functional foods: effects of the commercial fermented milk with *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 and yoghurt strains on gut transit time in the elderly. *Microb Ecol Health Dis.* 2003; 15:15-22.
22. Bhattarai Y, Muniz Pedrogo DA1, Kashyap PC. Irritable Bowel Syndrome: A gut microbiota-related disorder? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; 312(1): G52-G62
23. Ciorba, MA. A Gastroenterologist's Guide to Probiotics. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012; 10(9): 960-968.
24. Coccorullo, P. et.al. *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) in infants with functional chronic constipation: a double-blind , placebo- controlled study. *The Journal of Pediatric, Itália*, 2010;157(4): 598-602.
25. Guerra, P. V.P. et.al. Pediatric functional constipation treatment with bifidobacterium-containing yogurt: A crossover, double-blind, controlled trial. *World Journal Gastroenterology, Belo Horizonte*, 2011; 17(34) :30916- 2921.