



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Efeito de um probiótico multiestirpes sobre marcadores das respostas redox e inflamatória de adultos com constipação intestinal.

ANANDA DE MESQUITA ARAÚJO

Brasília

2019



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Ananda de Mesquita Araújo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Área de concentração: Alimentos, dietética e bioquímica aplicada à Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Fernandes Arruda

Coorientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Borges Botelho

Brasília

2019

Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Prof^a. Dr^a. Sandra Fernandes Arruda

Presidente - Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr^a. Eliana dos Santos Leandro.

Membro – Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Eliane Said Dutra

Membro – Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Teresa Helena Macedo da Costa

Suplente – Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Brasília

2019

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar onde chegou sem o apoio fundamental de várias pessoas. Dessa forma, desejo expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, permitiram que essa dissertação se concretizasse.

Primeiramente, agradeço aos meus pais que com muito amor sempre me apoiaram de forma incondicional, que mais do que ninguém, apostaram em mim e seguramente são os que mais compartilham da minha felicidade.

Ao meu irmão, meu agradecimento especial. Dividir moradia com você foi uma das melhores opções que fiz no ano passado, pois, a seu modo, você consegue alegrar meus dias, aliviar minhas aflições e me incentivar. Ao meu tio, Clodoaldo, que ao longo dessa jornada contribuiu muito com suas palavras de força, incentivo e otimismo.

À minha orientadora, Prof. Dra. Sandra Arruda, por toda paciência em me inserir no ambiente científico e me ensinar tanto deste meio. Admiro muito sua dedicação e cuidado com o laboratório e seus membros. Obrigada por todas as incansáveis vezes que repetiu que tudo daria certo e por todos os momentos de descontração entre correções e análises.

Agradeço também a minha co-orientadora, Prof. Dra. Patrícia Borges, por ter me aceitado como membro desse projeto, pelo apoio na formação dessa dissertação e pelos fundamentais ensinamentos que contribuíram de forma incomensurável no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao meu amado namorado, Júlio César, por permanecer ao meu lado mesmo não recebendo a atenção devida nesse período. Por sempre me apoiar, aconselhar e incentivar de forma única. Obrigada por ser meu presente diário, pelo seu sorriso e por saber me fazer tão feliz.

Aos meus poucos e queridos amigos, meu obrigada por todo apoio, vocês são muito importantes para mim. Destaco a amizade e lealdade da minha amiga, Vitória, que sempre se faz presente, além de ser uma ótima ouvinte e conselheira.

Aos companheiros do laboratório de bioquímica da Nutrição: Larissa e Marília, que dividiram comigo desde momentos difíceis até deliciosos lanches, grupos motivacionais e risadas. Aos técnicos, por toda disposição: Mário, pelos momentos de descontração, cuidado e preocupação de sempre; Thais, sua organização e boas ideias me motivaram; e ao Luiz Eduardo, que com toda paciência foi meu grande mentor no laboratório, com quem aprendi muito. Aos demais membros, professores Caio e Teresa, alunos Lara N., Lara B., Alessandra e Laís, que deixaram mais leve a rotina do laboratório.

Aos alunos de graduação, Marcus, Caroline e Bianca, por todo auxílio na tabulação infinita dos dados. Por toda ajuda nos ensaios bioquímicos: a Bruna, que ajudou muito e teve um desempenho e visível crescimento no decorrer do processo; a Valesca, que se doou de forma ímpar para as análises, nos apoiando muito nessa reta final, e por último, mas não menos importante, a Samanta, que se dedicou muito durante todo o processo e me acompanhou até os últimos dias, além disso, me ensinou a olhar de forma doce para diversas situações, sem estranheza.

Às professoras do departamento de Nutrição da Universidade de Brasília, em especial a Prof. Dra. Kênia, pelo acolhimento e os sábios conselhos sempre que a procurei para conversar. Aos membros do grupo científico PENSA, por todas as discussões que tiveram papel essencial e contribuíram muito na minha formação durante esses dois anos. Aos colegas de mestrado, pelo convívio e experiências no decorrer dessa trajetória.

À Cifarma, empresa que financiou esse ensaio clínico, e aos seus funcionários, que acompanharam todo o processo de forma ética e prestativa. Agradeço a funcionária Amanda, essencial nessa relação entre empresa e pesquisador, além de trocar experiência da caminhada acadêmica.

Meus respeitosos agradecimentos aos membros da banca examinadora pelas contribuições feitas na qualificação e por aceitarem participar da defesa desta dissertação.

Finalizo, agradecendo a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para não desanimar com as dificuldades ou me deixar ser tomada pela ansiedade.

“Que as coisas são inatingíveis? /

Ora! Isso não é motivo para não querê-las. /

Que tristes seriam os caminhos /

Sem a presença distante das estrelas”

[Mario Quintana]

RESUMO

Introdução: Sugere-se que a disbiose intestinal, caracterizada por um desequilíbrio da microbiota intestinal com predomínio de bactérias patogênicas é um importante mecanismo fisiopatológico da constipação intestinal. Uma estimulação prolongada de possíveis agentes patogênicos na superfície da parede intestinal pode gerar uma liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio e uma subsequente ou paralela, inflamação. Há evidências do efeito benéfico dos probióticos sobre a composição da microbiota intestinal e manutenção da sua homeostase, prevenindo e/ou tratando a disbiose e seus efeitos. O presente estudo propõe-se a avaliar o efeito do consumo de um probiótico multiestirpes sobre as respostas redox e inflamatória em adultos com constipação intestinal.

Metodologia: Ensaio clínico, randomizado, controlado e duplo cego. 48 adultos, entre 19 e 56 anos, ambos os sexos, com constipação intestinal de acordo com a ferramenta Roma IV, que receberam um tratamento por 4 semanas divididos nos seguintes grupos: grupo probiótico multiestirpes em cápsulas, composto por 10^9 UFC de cada uma das seguintes estirpes de *Lactobacillus acidophilus* (NCFM), *Lactobacillus casei* (Lc-11), *Lactococcus lactis* (L1-23), *Bifidobacterium lactis* (HN019) e *Bifidobacterium bifidum* (Bb-06) e o grupo controle com cápsulas contendo aproximadamente 5 g de maltodextrina. O ensaio foi dividido em dois momentos principais, T0 (baseline) e o T30 (final), em ambos os momentos foram coletados os questionários de saúde intestinal, Roma IV, registros alimentares, questionário internacional de atividade física (IPAQ), antropometria e coleta de sangue para dosagem de marcadores de danos oxidativo (MDA e proteína carbonilada), potencial antioxidante (FRAP, SOD, GST E CAT) e marcadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α and MCP-1).

Resultados: O consumo de probióticos com múltiplas estirpes atenuou a redução da atividade das enzimas antioxidantes GPX e GST nos eritrócitos e melhorou de forma marginal o sintoma de sensação de defecação incompleta em pelo menos $\frac{1}{4}$ dos movimentos intestinais, comparado ao grupo placebo. Não foram observadas alterações na capacidade antioxidante total, danos oxidativo e marcadores inflamatórios no soro. Nossos dados sugerem 4 semanas de tratamento com um produto probiótico de múltiplas estirpes foi eficaz na manutenção de uma maior resposta antioxidante enzimática e no alívio dos sintomas da constipação intestinal, levando a uma melhor saúde intestinal.

Palavras-chave: probiótico; constipação intestinal; Roma IV; redox; antioxidantes; inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Suggest that an intestinal disorder, characterized by an imbalance of the intestinal microbiota with a predominance of pathogenic bacteria and an important pathophysiological mechanism of intestinal constipation. Prolonged stimulation of possible pathogens on the surface of the intestinal wall can lead to excessive release of reactive oxygen species and subsequent or parallel inflammation. There are beneficial effects of probiotics on the composition of the intestinal microbiota and maintenance of its homeostasis, preventing and / or treating disorders and their effects. The present study aims to evaluate the effect of probiotic multidrug use on redox and inflammatory responses in adults with constipation. **Methodology:** Randomized, double-blind, controlled clinical trial. 48 adults, between 19 and 56 years old, both sexes, with constipation according to the Roma IV tool, who receive a treatment for 4 weeks divided into the following groups: multi-capsule probiotic group, consisting of 109 CFUs of each the following strains of *Lactobacillus acidophilus* (NCFM), *Lactobacillus casei* (Lc-11), *Lactococcus lactis* (Ll-23), *Bifidobacterium lactis* (HN019) and *Bifidobacterium bifidum* (Bb-06) and capsule control group of approximately 5 g of maltodextrin. The trial was divided into two main moments, T0 (baseline) and T30 (final), at both times were collected from intestinal health questionnaires, Roma IV, food records, international physical activity questionnaire (IPAQ), anthropometry. and blood collection for measurement of oxidative damage markers (MDA and carbonylated protein), antioxidant potential (FRAP, SOD, GST AND CAT) and inflammatory markers (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL - 12, TNF- α and MCP-1). **Results:** Consumption of probiotics with multiple strains attenuates the reduction of antioxidant enzyme activity GPX and GST in erythrocyte cases and better marginal or incomplete defecation deficiency symptoms at least of bowel movements when compared to the placebo group. No changes in total antioxidant capacity, oxidative damage and inflammatory markers in serum were observed. Our data suggested 4 weeks of treatment with a multiple probiotic product, which was effective in maintaining a higher enzymatic antioxidant response and no damage to constipation symptoms, causing better intestinal health.

Keywords: probiotic; intestinal constipation; Rome IV; redox; antioxidant; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Escala de Bristol. Fonte: Adaptada de Chumpitazi B.P., Self M.M., Czyzewski D.I., Cejka S., Swank P.R., Shulman R.J. (2016). Bristol Stool Form Scale reliability and agreement decreases when determining Rome III stool form designations. *Neurogastroenterol. Motil*; 28: 443–8.

CAPÍTULO 2

Figure 1 – Flow chart of volunteers along the study.

Figure 2. Effect of the probiotic consumption on serum oxidative damages: A) Malondialdehyde (MDA); B) Carbonylated Protein. T0: values at baseline. T30: values after 30 days of treatment. * Statistical differences between baseline (T0) and T30 in the same group.

Figure 3. Effect of probiotic consumption on the antioxidant enzyme activities in red blood cells. CAT: catalase; GPX: glutathione peroxidase; GST: glutathione-s-transferase; SOD: superoxide dismutase. T0: values at baseline. T30: values after 30 days of treatment. * Statistical differences between baseline (T0) and T30 within group. & Statistical differences between groups using Δ (T30 – T0) values.

Figure 4 - Effect of probiotic consumption on the serum ferric reducing antioxidant power (FRAP). T0: values at baseline. T30: values after 30 days of treatment.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1 – Critérios diagnóstico para constipação funcional pelo Rome IV. Adaptado de Shin J.E (2017). Understanding the Rome IV: Functional Constipation and Anorectal Disorders. Korean J Med. 2017;92 (4): 372-381. Publication Date (Web): 2017 August 01(In-depth review). doi: <https://doi.org/10.3904/kjm.2017.92.4.372>.

CAPÍTULO 2

Table 1 – Baseline characteristics of volunteers.

Table 2 – Energy, macronutrients and fiber intake and physical activity level of the volunteers at baseline and after 30 days of intervention.

Table 3 - Effect of the probiotic supplementation on ROME IV criteria

Table 4 - Effect of probiotic consumption on the serum cytokines profile of individuals with intestinal constipation.

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES**ANEXOS**

Anexo 1 – Questionário ROMA IV

Anexo 2 – Questionário Internacional de Atividade física (IPAQ)

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

APÊNDICE B – Diário de funcionamento intestinal

APÊNDICE C – Recordatório 24h/registro alimentar

APÊNDICE D – Questionário de saúde intestinal

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ – delta

2- VP – 2-vinylpyridine

Ácido TNB – 5-tio-2-nitrobenzóico

ATP – adenosina trifosfato

BD – baixa dose

BS – Escala de Bristol

CAT – catalase

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

ChAT – colina acetiltransferase

DA – dose alta

DNPH – dinitrofenilhidrazina

DP – desvio-padrão

DTNB – ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico

ELISA – ensaio imunoenzimático

EROs – espécies reativas de oxigênio

FRAP – capacidade redutora do ferro

G6PDH – glucose-6P-desidrogenase

GC – grupo controle

GPX – glutathiona peroxidase

GR – glutathiona redutase

GST – glutathiona-s-transferase

GT – grupo tratamento

H₃PO₄ – ácido fosfórico

HCl – ácido clorídrico

HDAC – histona desacetilase

IL-10 – interleucinas 10

IL-12 – interleucinas 12

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucinas 8

IMC – índice de massa corporal

IPAQ – Questionário Internacional de Atividade Física

LPS – lipopolissacarídeo

MCP1 – proteína quimiotática de monócitos-1

MDA – malondialdeído

MET – equivalente metabólico

MT1 – metalotioneína 1

MT2 – metalotioneína 2

NFkB – fator nuclear kappa B

R24h – Recordatório alimentar de 24 horas

REBEC – Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

SII – Síndrome do Intestino Irritável

SOD – superóxido dismutase

T0 – tempo inicial

T30 – Tempo após 30 dias de intervenção

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBA-MDA – ácido tiobarbitúrico e MDA

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

TEP – 1,1,3,3 tetraetoxipropano

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TPTZ – 2,4,6- tripyridyl-s-triazine

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	15	
CAPÍTULO 1		
1.1.	INTRODUÇÃO	17
1.2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.2.1.	Constipação intestinal: definição e diagnóstico	19
1.2.2.	O papel da microbiota na constipação intestinal	22
1.2.3.	Resposta redox na constipação intestinal	23
1.2.4.	Resposta Inflamatória na constipação intestinal	25
1.2.5.	Probióticos na saúde intestinal	26
1.3.	OBJETIVOS	29
1.3.1.	Objetivo geral	29
1.3.2.	Objetivos específicos	29
1.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
1.4.1.	Aspectos éticos	29
1.4.2.	Viabilidade e cronograma da pesquisa	29
1.4.3.	Tipo de estudo	30
1.4.4.	Caracterização do produto	30
1.4.5.	População estudada	30
1.4.6.	Delineamento experimental do estudo	30
1.4.7.	Análises laboratoriais	33
A	Dano Oxidativo	34

A.1.	Dosagem de malondialdeído (MDA)	34
A.2..	Dosagem da capacidade antioxidante total do soro por potencial antioxidante redutor de ferro	34
A.3.	Dosagem de proteínas carboniladas	35
B	Capacidade antioxidantes	36
B.1.	Determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona-s-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) em hemácias.	36
C.	Marcadores inflamatórios	37
1.4.8.	Análise estatística	38
	Referências	39
CAPÍTULO 2		
2.	Artigo original	45
	ANEXOS	69
	APÊNDICES	71

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada da seguinte forma: **Capítulo 1**, composto pela introdução, revisão bibliográfica, objetivos e materiais e métodos. Em seguida, **Capítulo 2**, com resultados, discussão e conclusão da pesquisa, apresentados em formato de artigo original intitulado “*Effect of a multi-species probiotic on markers of redox and inflammatory responses in adults with intestinal constipation*”.

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO

A constipação intestinal é uma desordem gastrointestinal baseada em um conjunto de sintomas que incluem fezes endurecidas ou ressecadas, esforço excessivo ao evacuar, evacuação infrequente, sensação de evacuação incompleta, distensão e dor abdominal (ZHAO & YU, 2016). Estima-se que a prevalência mundial de constipação intestinal varia de 0,7% a 79% com um valor mediano de 16% em adultos (MUGIE, BENNINGA & LORENZO, 2011). Na população em geral, as mulheres e os idosos parecem ser os estágios de vida mais atingidos (LINDBERG et al, 2011).

As alterações fisiopatológicas na constipação intestinal geram análises sobre se a alteração na composição da microbiota intestinal poderiam ser uma das causas da constipação (BUTTÓ & HALLER, 2016; CARDING et al, 2015; ZENG, INOHARA, & NUÑEZ, 2017). Nesse contexto, alguns autores sugerem que a disbiose intestinal, caracterizada por um desequilíbrio da microbiota intestinal com predomínio de bactérias patogênicas (IEBBA et al., 2016), é um importante mecanismo fisiopatológico da constipação intestinal (BARBARA et al., 2016; SOKOL et al., 2008 e PRYDE et al., 2002). A disbiose afeta vias como a do metabolismo dos ácidos graxos, dos ácidos biliares, a síntese de metano, a manutenção da barreira epitelial e a liberação de espécies reativas de oxigênio (ABRAHAMSSON et al., 2008; PARTHASARATHY et al., 2016).

Acredita-se que uma estimulação prolongada de possíveis agentes patógenos na superfície da parede intestinal pode gerar uma liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) e uma subsequente ou paralela, inflamação. Todo esse quadro causa uma desordem no sistema imunológico, principalmente quando associado com patologias do trato gastrointestinal (CARDING et al, 2015 e ZUO et al, 2017). Jabria e colaboradores (2017), em um modelo animal, caracterizaram uma situação de estresse oxidativo na constipação intestinal, onde o grupo com constipação intestinal induzida de forma farmacêutica quando comparado com o grupo controle não constipado, apresentou aumento significativo do nível de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, e efeitos deletérios sobre a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

Evidências destacam o efeito benéfico de determinados produtos sobre a composição da microbiota intestinal e a manutenção da sua homeostase, prevenindo e/ou tratando a disbiose e seus efeitos (ALTAMIRANO-BARRERA et al., 2018; WHELAN and QUIGLEY, 2013). Tais produtos, os probióticos, são definidos como microorganismos vivos que trazem benefícios ao hospedeiro quando administrados em quantidade adequada (FAO/OMS, 2011). Wang e colaboradores (2016), avaliaram o efeito de um probiótico contendo *Bifidobacterium bifidum* na composição da microbiota intestinal e na atividade antioxidante em ratos com constipação intestinal induzida comparados a um grupo sem constipação. Ao final dos 28 dias de suplementação, foi observada uma alteração

significativa ($p < 0,05$) na composição da microbiota intestinal dos ratos, com aumento da abundância de bactérias benéficas e redução de bactérias nocivas, e uma melhora na capacidade antioxidante, com aumento significativo de algumas enzimas, como por exemplo a superóxido dismutase (SOD) quando comparada ao grupo controle.

A alteração benéfica da microbiota intestinal pelo consumo de probióticos tem sido utilizada como conduta terapêutica para tratamento de doenças que estão relacionadas a perda da homeostase das respostas redox e inflamatória (ALTAMIRANO-BARRERA et al., 2018). No entanto, não existe um consenso na literatura em relação ao efeito do consumo de probióticos sobre as respostas redox e inflamatória em adultos ou animais com constipação intestinal, bem como quais estirpes e doses promoveriam um perfil menos oxidativo e pró-inflamatório nessa doença. Diante disso, a hipótese deste trabalho é que o uso de probióticos melhore alguns sintomas gastrointestinais, a resposta redox e o estado inflamatório de pacientes com constipação intestinal. Portanto o presente estudo visa avaliar o efeito do consumo de probiótico multiestirpes sobre as respostas redox e inflamatória em adultos com constipação intestinal.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Constipação intestinal: definição e diagnóstico

As primeiras definições de constipação intestinal eram baseadas apenas na frequência de evacuações espontâneas por semana (CONNELL et al., 1965). No entanto, a frequência de evacuação isolada não é considerada um indicador confiável de alteração do trânsito tardio do cólon (SAAD et al., 2010). Estudos recentes utilizam os critérios estabelecidos pela *Rome Foundation*, inicialmente destinados a recrutamento de indivíduos para ensaios clínicos de distúrbios gastrointestinais funcionais (SCHMIDT & DE GOUVEIA SANTOS, 2014). Esses critérios são considerados rigorosos e apresentam a constipação intestinal como um conjunto de sintomas (CAMILLETTI et al., 2017). Além disso, acolhem todas as faixas etárias e dividem os distúrbios gastrointestinais funcionais em categorias, sendo a constipação intestinal funcional um dos tópicos da categoria dos “Distúrbios intestinais” (DROSSMAN & HASLER, 2016).

O Roma IV (**Quadro 1**) foi a última versão elaborada pela *Rome Foundation* no ano de 2016. Nessa diretriz, a constipação intestinal do trânsito normal é definida como distúrbio funcional intestinal com predomínio de defecação difícil, infrequente ou incompleta. Os critérios são aplicados na forma de um questionário baseado em três tapas, (DOMINGO, 2017). Na primeira etapa, o indivíduo deve apresentar dois ou mais dos critérios em mais de um quarto das evacuações (25%). A segunda e terceira etapas, respectivamente, avalia se o indivíduo raramente apresenta ou não fezes líquidas sem o uso de laxantes (DROSSMAN, 2016) e a próxima etapa que a pessoa não atenda, obrigatoriamente, aos critérios de Síndrome do Intestino Irritável (SII) do Roma IV. O Roma IV ainda destaca que dor e/ou inchaço abdominal podem estar presentes na constipação funcional mas não devem ser predominantes, diferenciando assim da SII (DOMINGO, 2017). Além disso, o Rome IV apresenta um fator cronológico, onde os sintomas devem ser iniciados 6 meses antes do diagnóstico e estar presente durante os últimos 3 meses (DOMINGO, 2017).

A *Rome Foundation* utiliza como material de apoio para definição da consistência das fezes pelo paciente uma ferramenta validada, denominada Escala de Bristol (**Figura 1**), que apresenta através de imagens os diversos tipos de consistência das fezes. O escore vai do tipo 1, fezes separadas e de aspecto ressecado, ao tipo 7, fezes aquosas. O voluntário é instruído a indicar qual dos escores mais representa a consistência da sua fezes. Essa escala é apresentada ao paciente junto ao critério de fezes irregulares ou duras do Roma IV (O'DONNELL & HEATON, 1988; LEWIS & HEATON, 1997).

Quadro 1 – Critérios diagnóstico para constipação funcional pelo Rome IV

Constipação funcional
1. Deve-se incluir 2 ou mais dos seguintes critérios:
a. Esforçar-se durante mais de um quarto (25%) das defecações
b. Fezes irregulares ou duras (BS 1-2)* mais de um quarto (25%) de defecações
c. Sensação de evacuação incompleta mais de um quarto (25%) das defecações
d. Sensação de obstrução anorectal/bloqueio em mais de um quarto (25%) das defecações
e. Manobras manuais para facilitar mais de um quarto (25%) das defecações
f. Menos de 3 evacuações espontâneas por semana
2. Fezes líquidas raramente presentes sem o uso de laxantes
3. Critérios insuficientes para a síndrome do intestino irritável.

*BS – Escala de Bristol -: 1 fezes em pedaços separados, duros. - 2 fezes – fezes em forma de salsicha, porém segumentadas. Adaptada de SHIN, 2017.

A constipação intestinal não é considerada uma doença, e sim um sintoma. De acordo com a fisiopatologia, a constipação intestinal é classificada em dois tipos: primária e secundária. A constipação intestinal secundária é resultado da associação com diversas patologias, como doenças primárias do cólon, psicológicas/psiquiátricas, distúrbios neurológicos, metabólicos e também causada pelo uso de algumas medicações, como os opióides (LINDBERG et al., 2011). Já a primária pode surgir devido uma desregulação neuromuscular do cólon e/ou ano-reto ou alteração na função colônica e suas consequências no eixo cérebro-intestino (SHARMA & Rao, 2016). A constipação intestinal primária ainda possui subtipos: distúrbio de defecação, trânsito colônico lento (inércia colônica) e trânsito normal (SERRA et al., 2017).

O distúrbio de defecação é uma alteração no mecanismos da função anorretal (evacuação dissinérgica) ou estrutural. A dissinergia é considerada um distúrbio comportamental adquirido provocado por hábitos higiênicos disfuncionais (RAO et al., 2004). Quanto a parte estrutural, os distúrbios podem ser consequência de um enfraquecimento dos músculos do assoalho pélvico devido ao esforço prolongado no ato de evacuar (SCHEY, CROMWELL & RAO, 2012). Ademais, a constipação primária do subtipo trânsito colônico lento é causada por uma alteração de origem neuropática ou miopática da parede do cólon, com a diminuição das células intersticiais de Cajal, e o comprometimento na propulsão do cólon retrógrado (EMMANUEL & KAMM, 2001; NULLENS et al., 2012). Nesse tipo de constipação intestinal primária o tempo de trânsito intestinal total é alterado, enquanto indivíduos com inércia colônica apresentam tempo total do trânsito intestinal superior a 48 horas, podendo alcançar até 96 horas, indivíduos não constipados apresentam em média o tempo total entre 30-40 horas (EMMANUEL et al., 2014; KIM & RHE, 2012).

Tipo 01		Pedaços separados, duros como amendoim
Tipo 02		Forma de salsicha, mas segmentada
Tipo 03		Forma de salsicha, mas com fendas na superfície
Tipo 04		Forma de salsicha ou cobra, lisa e mole
Tipo 05		Pedaços moles, mas contornos nítidos
Tipo 06		Pedaços aerados, contornos esgarçados
Tipo 07		Aquosa, sem peças sólidas

Figura 1. Escala de Bristol. Adaptada de Chumpitazi, 2016.

O último subtipo de constipação intestinal primária, denominada do trânsito normal, possui maior prevalência entre os tipos de constipação primária. Apesar de sua fisiopatologia não ser totalmente conhecida, os indivíduos relatam apresentar fezes endurecidas ou até mesmo uma dificuldade para evacuar, apesar de que não há atraso no trânsito intestinal e, em alguns casos, a frequência de evacuação é vista dentro da normalidade (CASH & CHEY, 2005; Gray, 2011). Acredita-se que alterações no estilo de vida e fatores comportamentais que levem, por exemplo, a alterações no volume de fluido, são algumas entre outras etiologias associadas a esse tipo constipação intestinal (CAMILLERI et al., 2016).

O volume de fluido absorvido em condições normais pelo intestino delgado chega a aproximadamente 9 litros, entre 200 a 400 ml desse volume são excretados nas fezes. Na constipação intestinal esse volume absorvido sofre uma redução, o que favorece maior tempo de permanência das fezes no reto e a excreção de fezes ressecadas, podendo acarretar complicações intestinais, como por exemplo o fecaloma, caracterizado por grande presença de fezes endurecidas no reto (SLEISENGER et al., 2006).

Estudos também sugerem que o desequilíbrio da microbiota intestinal, aumento de bactérias patogênicas e redução de bactérias não patogênicas, caracterizado como disbiose intestinal, pode

constituir uma das causas da constipação intestinal (KHALIF et al., 2005; PRYDE et al., 2002; ZHU et al., 2014).

1.2.2. O papel da microbiota na constipação intestinal

A microbiota é um amplo ecossistema composto de bactérias, fungos e vírus, presente em diferentes concentrações em toda a extensão do trato digestivo, sendo o cólon o local mais povoado com até 10^{14} UFC/ml. Considera-se que a microbiota possui uma quantidade bacteriana 10 vezes maior que o número total de células do corpo humano (COLLINS & BERCIK, 2009; MONTALTO et al., 2009). As bactérias que compõem a microbiota pertencem principalmente ao filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria (ECKBURG et al., 2016).

Alguns fatores como a dieta, uso de antibióticos, disfunções metabólicas, estilo de vida, condições higiênicas, entre outros podem favorecer alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e conseqüentemente contribuir para o desenvolvimento de doenças (KAMADA et al., 2013).

Autores apontam uma diferença na composição da microbiota intestinal entre indivíduos constipados e não constipados (KHALIF et al., 2005; ZHU et al., 2014; ZOPPI et al., 1998). Mancabelli e colaboradores (2017) ao avaliarem a composição da microbiota intestinal de amostras de fezes de indivíduos com constipação funcional e indivíduos saudáveis, observaram que a amostra saudável tinha um perfil de bactérias com predomínio dos gêneros Bacteróides, Roseburia e Coprococcus, associados com melhora da motilidade intestinal e trânsito colônico mais rápido devido ao efeito estimulante do butirato no intestino. Enquanto os indivíduos com constipação funcional possuíam um perfil de bactérias intestinais caracterizado pelo predomínio dos gêneros Faecalibacterium e Ruminococcaceae, associados com a inibição da secreção de mucina no cólon e redução do volume de fezes.

Outros pesquisadores têm observado um aumento das bactérias metanogênicas em pacientes com constipação intestinal. Essa alteração na composição da microbiota intestinal, conseqüentemente aumenta a produção de metano, o que retarda a motilidade intestinal e também favorece os sintomas correlacionados com a constipação intestinal, como flatulência e distensão abdominal em pacientes com constipação intestinal (ATTALURI et al., 2010; VANDEPUTTE et al., 2016).

Observa-se também uma interação da constipação intestinal e a via de sinalização bidirecional entre o cérebro e o intestino. Alterações nesse eixo interferem, principalmente na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (WOODMANSEY, 2007), em destaque o butirato, acetato e propionato, que são produzidos no cólon a partir da fermentação de fibras, amido resistente e oligossacarídeos pelas bactérias (BAXTER et al., 2014). A motilidade intestinal está

relacionada com papel dos AGCC na estimulação de 5-hidroxitriptamina (5HT), principal neurotransmissor do eixo cérebro-intestino secretado pelo enterocromafins. Outro mecanismo envolvido com a motilidade intestinal é a atividade dos AGCC na inibição de histona desacetilase (HDAC), que gera um aumento na expressão da colina acetiltransferase (ChAT) nos neurônios entéricos e como resultado há um efeito procinético na motilidade colônica (PUERTOLLANO, KOLIDA, & YAQOOB, 2014). Shi e colaboradores (2015) demonstraram redução significativa ($p < 0.05$) dos níveis de acetato, propionato e butirato fecais nos voluntários com constipação intestinal refratária comparados a voluntários não constipados, sugerindo que a redução dos níveis de AGCC pode ser resultado de uma disfunção da microbiota colônica.

Em síntese, alterações na composição da microbiota intestinal e nos produtos finais da fermentação podem estar diretamente ligada a constipação intestinal e dos sintomas associados. Essa nova composição da microbiota intestinal está relacionada a alteração do meio metabólico do cólon e sua consequente atividade de sinalização e execução do sistema imunológico (KHALIF et al., 2005).

1.2.3. Resposta redox na constipação intestinal

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado no seu orbital mais externo e buscam estabilidade através da transferência de elétrons com moléculas mais próximas (HALLIWELL, 2006). Gerados constantemente nos processos fisiológicos ou por disfunções patológicas do organismo, os radicais livres atuam em várias reações bioquímicas como mediadores da transferência de elétrons (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Os radicais com maior destaque são os derivados de oxigênio, cujo elétron desemparelhado se encontra centrado nos átomos de oxigênio, denominados espécies reativas de oxigênio (ROS). As espécies reativas podem ser radicalares ou não radicalares e são capazes de reagir com um elevado número de compostos próximos (HALLIWELL, 2006; BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006).

Em proporções adequadas, essas espécies reativas podem auxiliar em diversas funções biológicas, como produção de energia (ATP), fagocitose de agentes patógenos ou na sinalização celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A produção de EROS ocorre principalmente na cadeia de transporte de elétrons, mas podem ser gerados por diversas enzimas intracelulares, enquanto diversos fatores exógenos tais como tabagismo, poluentes e radiação podem aumentar a produção de EROS (BHATTACHARYYA et al., 2014).

Em paralelo com a produção de espécies reativas, o organismo humano possui mecanismos de defesa antioxidante para controle dos possíveis danos causados pela ação dos radicais livres (SIES, 1993). Os antioxidantes são substâncias, que em baixas concentrações, são capazes de retardar ou inibir reações de óxido-redução. São classificados em dois tipos de sistema: o enzimático, com

enzimas produzidas pelo organismo e que atuam de forma direta nas espécies reativas, compreendendo as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPX), glutaciona redutase (GR), glutaciona-s-transferase (GST) e glucose-6P-desidrogenase (G6PDH); e o não enzimático, compreendendo compostos de baixa massa molecular como as vitaminas e os flavonoides que agem de forma indireta (HALLIWELL, 2000; HALLIWELL & WHITEMAN, 2004; BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006, 2006).

A reação de oxidação-redução, definida como redox, envolve a transferência de elétrons de forma simultânea. A desregulação entre oxidantes e antioxidante podem induzir a um desequilíbrio no estado redox em favor da oxidação (BOUAYED & BOHN, 2010; GÖRLACH et al., 2015). Um ensaio clínico randomizado comparou a atividade de SOD e CAT em eritrócitos de crianças com constipação intestinal versus crianças não constipadas. Os autores observaram que os valores de SOD e CAT eram significativamente menores nas crianças constipadas (SOD constipados: $1\,943 \pm 147$ U/g·Hb e não constipados: $2\,206 \pm 171$ U/g·Hb – CAT constipados: 269.3 ± 67.8 K/g·Hb e não constipados: 327.3 ± 82.2 K/g·Hb). Portanto, esse estudo sugere que as alterações nos marcadores bioquímicos estão correlacionados com a constipação crônica e um potencial estresse oxidativo (ZHOU, LOU, ZHOU, & WANG, 2005).

A constipação intestinal vem sendo relacionada com a condição de estresse oxidativo. No entanto, o mecanismo ainda não é conhecido. Wang e colaboradores (2004), observaram que crianças com constipação intestinal crônica apresentavam menores níveis plasmáticos das vitaminas C e E e menor atividade de CAT e SOD nos eritrócitos, sugerindo que a constipação intestinal crônica induz a produção de espécies reativas de oxigênio com consequente danos a biomoléculas. Altas concentrações de amônia no trato intestinal e no sangue podem ser responsáveis pela geração excessiva de espécies reativas com consequente danos as moléculas com ação antioxidante.

Rtibi e colaboradores (2017) observaram em estudo experimental que ratos com constipação induzida por um agente antineoplásico apresentaram uma significativa depleção na atividade específica das enzimas antioxidantes, SOD (30,54% de inibição), CAT (15,93%) e GPx (40,12%). Esses dados indicam que a constipação crônica pode causar a redução da atividade específica de enzimas antioxidantes.

Entende-se que um dos principais papéis do epitélio intestinal é atuar como barreira de defesa (LAUKOETTER, NAVA, & NUSRAT, 2008). Contudo, uma estimulação prolongada da mucosa, causada pela disbiose e o contato do epitélio com agentes patógenos, pode promover uma ativação extensa de neutrófilos e macrófagos e consequentemente uma produção excessiva de EROS e subsequente ou paralela inflamação (ZUO et al., 2017).

1.2.4. Resposta Inflamatória na constipação intestinal

A constipação intestinal crônica é caracterizada por uma inflamação de baixo grau da mucosa intestinal (KHALIF et al., 2005). Há uma correlação entre a alteração da microbiota intestinal e o aumento de marcadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias (BIAGI et al., 2010). No entanto, não se sabe ao certo se a inflamação intestinal é causa ou consequência da disbiose intestinal (BUTTÓ & HALLER, 2016).

A mucosa intestinal é a primeira linha de defesa intestinal contra bactérias patogênicas ou invasoras comensais no lúmen intestinal. A mucina, glicoproteína produzida pelas células caliciformes do intestino, compõe o muco e auxilia na barreira intestinal. No entanto, ela também serve como nutriente para determinados patógenos. Em situação de disbiose, a ausência de mucina MUC2 compromete a integridade da barreira intestinal e consequentemente aumenta a permeabilidade intestinal (ZENG, INOHARA, & NUÑEZ, 2017). Como efeito, há uma resposta desregulada do sistema imune inato com maior síntese de anticorpos, presença de células B, além de aumento dos mediadores inflamatórios, como o lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas inflamatórias (AHLUWALIA et al., 2018).

As citocinas pro-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6), são sintetizadas por macrófagos e células dendríticas. Os macrófagos participam tanto do processo inflamatório e da formação de espécies reativas de oxigênio, quanto da ativação da resposta imune (GORDON, 2003; HUME, 2015). Um fator de transcrição, o fator nuclear kappa B (NFkB), é ativado pelos receptores de células B ou T atuando como sinalizador responsável pela indução da expressão gênica de marcadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6), e recrutamento de células imunes para o local da inflamação (ONG et al., 2010; SALIM & XAVIER, 2014).

Mokhtare e colaboradores (2017) realizaram um estudo caso-controle com idosos iranianos (≥ 65 anos). O objetivo do estudo foi comparar os níveis séricos de interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) entre grupos de idosos com e sem constipação intestinal, sendo os constipados diagnosticados pelo critério Roma III. Os idosos foram ainda subdivididos de acordo com a idade em três grupos: 65-75 anos; 76-85 anos e 86-95 anos. Os autores observaram uma maior concentração de TNF- α , IL-6 e IL-1 nos voluntários com constipação intestinal. Por exemplo, a IL-6 no grupo constipado em comparação com o grupo controle foi de $438,18 \pm 59,57$ pg/mL versus $290,14 \pm 36,39$ pg / mL, com $p < 0,001$. Nesse contexto, os autores destacam que as alterações na microbiota intestinal podem resultar em mudança do ambiente metabólico do cólon alterando assim a concentração de substâncias fisiologicamente ativas. Essas alterações podem ainda interferir na secreção e no funcionamento intestinal dos indivíduos com constipação.

Acredita-se que trato gastrointestinal é uma das principais fontes de EROS e que a formação excessiva de EROS pode contribuir para um desequilíbrio na resposta redox em conjunto com um quadro de inflamação intestinal (CIRCU & AW, 2012). No entanto, há poucos estudos que investigaram a condição de estresse oxidativo em distúrbios funcionais intestinais. Portanto, se faz necessário o estudo desses processos em adultos com constipação intestinal para desenvolvimento de medidas terapêuticas, em destaque aquelas com função antioxidante.

1.2.4.1. Probióticos na saúde intestinal

Alguns produtos têm ganhado destaque devido ao seu efeito benéfico na composição da microbiota intestinal, os probióticos, que são definidos como microrganismos vivos que trazem benefícios ao hospedeiro quando administrados na quantidade adequada (FAO/OMS, 2011). A maior variedade de probióticos comercializados são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Simon, 2005).

Atualmente no meio comercial são utilizadas muitas estirpes com diferentes objetivos, sendo as espécies de lactobacilos e bifidobactérias as mais utilizadas como probióticos (Lee et al., 1999). Algumas espécies como o *Lactobacillus acidophilus* (NCFM) e a *Bifidobacterium bifidum* (Bb-06) são espécies conhecidas e consumidas tanto em leite fermentado quanto em outros produtos. A linhagem NCFM tem como principal característica a resistência a meios ácidos, consequente maior sobrevivência no trato gastro intestinal. Como função probiótica, possui proteínas de adesão à mucosa intestinal e síntese de bacteriocina Lactacina B, apresentando assim atividade contra bactérias patógenas, como a *Escherichia coli* (SANDERS and KLAENHAMMER, 2001; BAREFOOT and KLAENHAMMER, 1983). Além disso, essa estirpe possui ação metabólica no transporte de carboidratos simples e complexos, como a rafinose e o frutooligosacarídeos. Dentre essa característica, a presente estirpe auxilia na digestão da lactose, sendo indicada àqueles com intolerância à lactose (MONTES et al, 1995). De forma semelhante, a linhagem HN019, isolada de uma iogurte desenvolvido na Nova Zelândia, é considerada um probiótico em potencial devido sua capacidade básica de resistência em pH ácido de acordo com testes realizados in vitro e também com consequente maior sobrevivência no trânsito intestinal (PRADAD, 1998; SANDERS, 2006). Estudos relatam que esta linhagem apresenta benefícios na resposta imune, sintomas da constipação intestinal, entre outros benefícios (ARUNACHALAM; GILL; CHANDRA, 2000; MAGRO et al, 2014).

Os mecanismos de ação dos probióticos não são totalmente conhecidos e variam de estirpe para estirpe. No entanto, alguns pontos são comuns como ação conjunta dos probióticos com as proteínas da camada superficial da mucosa intestinal na eliminação de patógenos e a atuação nas

cascatas de sinalização e consequente aumento na produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias e também na produção de imunoglobulinas (SHERMAN, 2009).

Os probióticos também são associados com a melhora da constipação intestinal e, conseqüentemente dos seus sintomas, como na maior frequência de evacuação, redução do tempo de trânsito intestinal, consistência das fezes de aspecto tipo 3 e 4 da escala de Bristol e melhora das dores abdominais (CHOI & CHANG, 2015; MEARIN et al., 2016). Um ensaio clínico randomizado, triplo cego, placebo controlado foi conduzido no estado do Texas/EUA em adultos com constipação intestinal, com movimentos intestinais irregulares e flatulência como sintomas predominantes. O período de intervenção foi de 14 dias com probiótico em cápsula contendo *Bifidobacterium lactis* HN019 em diferentes doses. Os voluntários foram divididos em três grupos: DA - dose alta: $17,2 \times 10^9$ UFC, BD - baixa dose: $1,8 \times 10^9$ UFC e sem probiótico (maltodextrina). A suplementação com *B. lactis* reduziu o tempo de trânsito intestinal de maneira dose-dependente (grupo DA: $49h \pm 30$ para $21h \pm 32$ e grupo BD: $60h \pm 33$ para $41h \pm 39$) e a frequência de sintomas gastrointestinais funcionais em relação ao grupo controle (WALLER et al., 2011).

Similarmente, Magro e colaboradores (2014) apresentam um ensaio clínico randomizado, controlado, duplo cego feito com voluntários com constipação intestinal, o grupo tratamento (GT) recebeu um iogurte contendo uma combinação de polidextrose, *L. acidophilus* NCFM e *B. lactis* HN019 e o grupo controle (GC) recebeu apenas o iogurte. Os autores observaram uma redução significativa do tempo de trânsito intestinal no grupo tratamento comparado ao grupo controle após 2 semanas de intervenção (GT: $35,0h \pm 15,4$ para $24,6h \pm 12,8$ e GC: $37,8h \pm 15,2$ para $33,9h \pm 12,4$).

Alguns estudos que avaliaram a capacidade de uma cepa específica de probiótico (*Lactobacillus casei*) no auxílio do tempo de trânsito intestinal, principalmente em grupos de risco como as mulheres. Uma das justificativas para a melhora no tempo de trânsito intestinal foi o aumento da massa celular bacteriana, consequente aumento do peso das fezes e estímulo do peristaltismo (SPANHAAK, HAVENAAR, & SCHAAFSMA, 1998). Outra explicação dada foi que a síntese de ácidos orgânicos durante a fermentação no cólon, como o butirato, também colabora com a melhora dos movimentos peristálticos (KOEHNICK et al., 2003 e OHASHI et al., 2001). Krammer e colaboradores (2011) em um ensaio clínico randomizado e duplo cego com mulheres com a faixa de idade de 50 anos com constipação intestinal de trânsito lento (>72 horas) observaram que a ingestão da bebida probiótica composta por $6,5 \times 10^9$ UFC de *Lactobacillus casei* auxiliou na redução do tempo do trânsito intestinal nos participantes suplementados em comparação ao grupo que consumiu apenas a bebida láctea (suplementados: $96,6$ h para $76,5$ h e placebo: $95,8$ h para $87,1$ horas, aproximadamente).

Algumas bactérias probióticas são capazes de aumentar a produção de fenólicos a partir da fermentação do ácido láctico, promovendo o aumento da capacidade antioxidante total no intestino

grosso (KAHOULI et al., 2013). Kruszewska et al., 2002 demonstraram que bactérias probióticas foram capazes de produzir compostos antioxidantes em uma quantidade equivalente a 100 mg de vitamina C. Em um modelo de câncer de cólon foi observado um aumento da atividade específica das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione-s-transferase no cólon e plasma de ratos tratados com *Lactobacillus plantarum* AS1. Portanto, os probióticos parecem ser capazes de alterar a capacidade antioxidante intestinal por diferentes mecanismos.

Outro estudo em um modelo animal, teve como objetivo avaliar o efeito da *Bifidobacterium bifidum* na microbiota intestinal de ratos tratados com dosagem de $5,0 \times 10^{10}$ UFC / dia versus o grupo sem probiótico (WANG et al., 2016). Os autores observaram que o probiótico alterou significativamente ($p < 0,05$) a composição da microbiota intestinal dos ratos, aumentando a abundância de bactérias benéficas (*Lactobacillus intestinalis* e *Lactobacillus crispatus*) e reduzindo populações bacterianas nocivas (*Enterobacter*, *Escherichia coli*). Ainda foi observado uma melhora na condição de estresse oxidativo, com aumento significativo da atividade antioxidante na amostra de tecido intestinal analisada pelas expressões da glutathione redutase (GR), metalotioneína 1 e 2 (MT1, MT2), GPx-1, GPx-2 e SOD quando comparada ao grupo controle.

Singh et al. (2017) avaliaram o efeito de duas bebidas contendo probióticos (9,5 a 10 log UFC/mL de *Lactobacillus rhamnosus* NCD17 e 8 a 8,5 log UFC/mL de *L. rhamnosus* GG) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos e observaram um aumento significativo na atividade das enzimas CAT e GPx no sangue dos animais que consumiram os probióticos em comparação ao controle. No fígado, foi possível observar maior atividade da enzima CAT no grupo que recebeu o *L. rhamnosus* NCD17. Diante disso, sugere-se que os probióticos podem apresentar efeito benéfico sobre a homeostase intestinal, uma vez que contribuem para a redução da oxidação e aumento da atividade antioxidante.

Portanto, considerando que a constipação intestinal pode gerar a condição de estresse oxidativo e um quadro paralelo pró-inflamatório, e que o consumo de probióticos pode ter efeitos benéficos sobre essas repostas, a condução de estudos controlados, randomizados que investiguem a ação desses microrganismos sobre esses processos se fazem necessárias uma vez que este efeito é estirpe-dependente e ainda não foi avaliado em adultos com constipação.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Geral

- Avaliar o efeito do consumo de um probiótico multiestirpes sobre os sintomas de constipação intestinal, resposta redox e inflamatória em adultos com constipação intestinal.

1.3.2. Específicos

- Avaliar o efeito do probiótico na saúde intestinal e sintomas de constipação;
- Identificar os danos oxidativos a lipídeos e proteínas séricos;
- Avaliar a atividade específica de enzimas antioxidantes em hemácias;
- Verificar o potencial redutor total do soro;
- Analisar os níveis séricos das interleucinas 1 β , 6, 8, 10 e 12; fator de necrose tumoral (TNF- α) e proteína quimiotática de monócitos-1
- Aplicar para controle o Questionário Internacional de atividade física, o recordatório alimentar 24 horas e dados antropométricos (peso, altura e circunferência da cintura).

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Aspectos éticos

Projeto aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, com o nº do parecer 2.550.573 substanciado CAAE Nº 69990717.5.3001.0030 em 18 de setembro de 2017. O protocolo foi ainda incluído dia 15 de agosto de 2018 e atualizado 04 de junho de 2019 no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (REBEC) – RBR 2qvnq9. A captação dos voluntários para o estudo foi feita mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), com a declaração de ausência de conflitos de interesses na condução, análise e conclusões sobre os resultados, conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

1.4.2 Viabilidade e cronograma da pesquisa

Esse projeto tem apoio financeiro da empresa CIFARMA CIENTIFICA FARMACEUTICA LTDA, respeitando todas as condições éticas por meio de um contrato com assinatura de ambas as

partes, pesquisadora responsável e o representante empresarial, que determina que os dados serão divulgados em eventos científicos e revistas especializadas independentemente dos resultados.

1.4.3 Tipo de estudo

Ensaio clínico randomizado, placebo controlado e duplo cego.

1.4.4 Caracterização do produto

O probiótico apresentado em cápsula era composto por no mínimo 10^9 UFC de cada uma das seguintes estirpes de *Lactobacillus acidophilus* (NCFM), *Lactobacillus casei* (Lc-11), *Lactococcus lactis* (Ll-23), *Bifidobacterium lactis* (HN019) e *Bifidobacterium bifidum* (Bb-06). O grupo controle recebeu cápsulas contendo aproximadamente 5 g de maltodextrina.

1.4.5 População estudada

A amostra foi composta por adultos com idade entre 19 e 56 anos, de ambos os sexos, diagnosticados com constipação intestinal de acordo com os Critérios Roma IV (**Anexo 1**). Foram excluídos os indivíduos que nos últimos 30 dias que antecederam a anamnese: utilizaram alimentos ou produtos contendo probióticos e/ou prebióticos; fizeram uso de suplementos de vitaminas e minerais; consumiram alguns tipos de chás (verde, branco ou de hibisco); utilizaram laxantes e fitoterápicos para melhora do funcionamento intestinal; usaram medicações com atividade anti-inflamatória e antibióticos. Ainda foram excluídos aqueles indivíduos que apresentavam doenças metabólicas, gastrointestinais, disfunções hepáticas, renais, doenças crônicas não-transmissíveis, gestantes ou que não compareceram as reavaliações ou descontinuaram o uso do probiótico fornecido pela pesquisa.

O cálculo amostral foi realizado, a princípio, para teste de comparação de médias de grupos independentes considerando um efeito de delineamento de 0,80, obtido de dados de médias e desvio padrão de frequência de evacuações após intervenção com simbióticos (WILMS et al., 2016); um alfa de 0,05 e poder de teste (1-B) de 80% e obteve-se como resultado o valor 18 participantes por grupo. O cálculo foi realizado pelo programa G*Power 3.1.9.2®.

1.4.6 Delineamento experimental do estudo

A captação dos voluntários foi realizada através da divulgação da pesquisa nas redes sociais, mídias, universidades e clínicas. O material informativo utilizado na divulgação continha os dados básicos da pesquisa realizada em Goiânia e os contatos da pesquisadora responsável. Aqueles

participantes que demonstraram interesse pessoalmente ou que entraram em contato por e-mail ou telefone com a pesquisadora foram instruídos sobre os detalhes da participação.

Os participantes que apresentaram interesse foram direcionados a uma triagem com aplicação de um questionário contendo os critérios de inclusão e exclusão. Os indivíduos que atenderam aos critérios de inclusão receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice A**) para leitura e, caso concordassem, posterior assinatura. Em seguida foi realizado o agendamento da data e horário para a primeira coleta de dados (T0) As despesas com o deslocamento foram ressarcidas. Os indivíduos poderiam desistir de participar da pesquisa em qualquer umas das etapas.

Os voluntários recrutados foram randomizados aleatoriamente (Software R 2.15.33) em dois grupos (A e B), de acordo com o sexo, idade e IMC. Uma pesquisadora externa realizou o sorteio para determinar qual o tratamento cada grupo (A ou B) iria receber, tornando-se assim:

- Grupo controle: ingestão de uma cápsula diária composta por maltodextrina por 30 dias;
- Grupo probiótico: ingestão de uma cápsula diária do probiótico com multi-estirpes por 30 dias.

Tanto os participantes do estudo, quanto os pesquisadores foram cegados, em relação a distribuição das cápsulas placebo e probiótico. As embalagens de probióticos e placebos foram fornecidas pela empresa responsável, idênticas, já lacradas e com o código de randomização, e as cápsulas visivelmente equivalentes. Os códigos de identificação do probiótico só foram revelados aos pesquisadores no momento da análise estatística dos dados.

O tempo inicial (T0) foi considerado como o momento em que os participantes compareceram no dia e horário marcado na Clínica de Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás (FANUT/UFG). O espaço foi dividido em ilhas de atendimento para agilizar a coleta de dados e conseqüentemente possibilitar o menor tempo de espera dos participantes.

Ao chegar à Clínica de Nutrição/FANUT/UFG o voluntário recebeu uma ficha contendo todos os procedimentos a serem realizados e os espaços para serem marcados com um “x” pelo pesquisador após sua execução. Ao final, depois de passar por todas as ilhas de atendimento e portanto com a ficha de acompanhamento dos procedimentos completamente preenchida, foi realizada a entrega do probiótico ou placebo, do diário de funcionamento intestinal e das fichas de registros alimentares. Os voluntários foram instruídos a ingerir a cápsula 30 minutos após a última refeição do dia. Cada embalagem possuía 35 cápsulas, o excedente (05 cápsulas) serviu como controle de adesão para pesquisadores, sendo mais tarde excluídos os voluntários com ingestão <80% dos produtos.

Além disso, foram feitas orientações quanto o preenchimento do Diário do funcionamento intestinal (**Apêndice B**) e também foi realçada a importância da não modificação dos hábitos de vida, incluindo o padrão alimentar e o nível de atividade física, bem como a não consumirem outras fontes de probióticos durante as 4 semanas de intervenção. Depois das orientações foi realizado o agendamento para a fase T30 (30 dias após o consumo do probiótico ou do placebo). Posteriormente, cada voluntário foi encaminhado a um local específico onde realizaram uma refeição gratuita de café da manhã.

Durante o período de intervenção foram realizados contatos com cada participante uma vez por semana, por meio do aplicativo WhatsApp, para avaliar a adesão ao uso da suplementação, eventos adversos ou outras intercorrências.

Após 30 dias, os voluntários retornaram ao mesmo local para a reavaliação (T30) das medidas antropométricas, exames bioquímicos e questionários. Foram recolhidos os 06 registros alimentares, o diário de funcionamento intestinal e as embalagens dos probióticos para conferência da adesão. Ao final dos procedimentos, os pesquisadores deram um retorno aos voluntários quanto aos resultados dos exames bioquímicos básicos e realizaram uma orientação nutricional.

As variáveis à serem analisadas foram:

I. Variáveis controle:

- A. Recordatório alimentar de 24 horas (R24h) e os registros alimentares:** o R24h foi aplicado pelos pesquisadores como modelo de orientação ao voluntário para posterior auxílio no preenchimento dos 06 registros alimentares (**Apêndice C**). Três registros alimentares deveriam ser preenchidos na primeira e outros três na última semana de intervenção. Os voluntários foram orientados a preencher dois registros alimentares em dias intercalados da semana e outro no fim de semana;
- B. Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) – versão curta:** um questionário (**Anexo 2**) por etapa foi aplicado pelos pesquisadores para estimativa do gasto em atividades físicas de intensidade leve, moderada e vigorosa, definidas como tarefas metabólicas equivalentes (MET). Essas tarefas são parte do contexto cotidiano, incluindo o período que o voluntário passa sentado. O gasto energético (Kcal MET/semana) foi calculado considerando os minutos por semana para cada atividade estimado em METs pela fórmula: $MET(\text{minutos}) \text{ total} \times \text{Peso do voluntário} / 60 \text{ minutos}$ (MATSUDO et al., 2001).
- C. Antropometria:** todas as medidas antropométricas foram realizadas por pesquisadores treinados. Foram coletadas as seguintes medidas: peso corporal (kg), a altura (cm), a circunferência da cintura (cm) e realizado o cálculo do índice de massa corporal (IMC) (OMS, 1995).

II. Variáveis desfecho

- A. Questionário ROMA IV:** foi aplicado o questionário no qual contém um grupo de perguntas que avaliou a presença dos seguintes sintomas em pelo menos 25% das defecações: esforço excessivo, fezes ressecadas ou endurecidas (Escala de Bristol), sensação de defecação incompleta, bloqueio ou obstrução anorretal e realização de manobra manual. Após essa primeira etapa foi perguntado a frequência de evacuação semanal e se eventualmente há presença de fezes líquidas. Diferentemente do que foi feito na triagem, nessa etapa o questionário ROMA IV foi utilizado como uma metodologia para avaliação dos sintomas relacionados com constipação intestinal (PALSSON et al., 2016).
- B. Questionário de Saúde intestinal:** aplicado pelos pesquisadores, o questionário (**Apêndice D**) contém três perguntas que avaliam pela escala de Likert a percepção do voluntário quanto a dor, desconforto e inchaço abdominal na última semana comparada ao último mês. Os níveis são determinados da seguinte maneira: 0 (nenhuma), 1 (suave) 2 (moderada), 3 (severa) e 4 (insuportável).
- C. Coleta de sangue para análises laboratoriais:** os pacientes foram previamente instruídos a realizarem jejum de 12 horas e não ingerirem bebidas alcoólicas. A coleta foi feita por uma empresa terceirizada contratada. Foram coletados aproximadamente 10 mL de cada voluntário em tubo de coleta de sangue a vácuo com e sem EDTA;

1.4.7 Análises laboratoriais

As amostras de sangue coletadas em tubos sem anticoagulante foram centrifugadas a 700 x g por 10 min a 4°C para obtenção de soro e aquelas coletadas em tubos com anticoagulante foram centrifugadas a 1.000 x g por 10 min a 4°C para obtenção do plasma. Foi transferido 250 µL das amostras de soro para tubos contendo 2,5 µL de EDTA 1,34 mmol/L e 2,5 µL de GSH 0,65 mmol/L. Após a remoção do plasma para um novo tubo, as camadas buffys do sedimento de células vermelhas foram descartadas e as hemácias foram ressuspensas em água Milli-Q gelada (5x volume) e centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos para sedimentar as membranas dos hemácias.

As amostras de soro, plasma e hemácias foram armazenadas a -80°C para posterior determinação dos marcadores da resposta redox: malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas, capacidade redutora do ferro (FRAP), atividade específica de enzimas antioxidantes e dos marcadores da resposta inflamatória: Fator de Necrose Tumoral α (TNF α), proteína quimiotática de

monócitos-1 (MCP-1) e interleucinas (1 β , 6, 8, 10 e 12). As técnicas utilizadas foram padronizadas e já consagradas pela literatura.

A. Dano oxidativo

A.1 – Dosagem de malondialdeído (MDA).

A dosagem do produto da peroxidação lipídica foi realizada com baseada na metodologia descrita por Candan e Tuzmen (2008) com algumas modificações. O princípio desse método baseia-se na reação entre alguns produtos da peroxidação lipídica, em destaque o MDA, com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Inicialmente, foi realizada a seguinte diluição: 150 μ l de soro em 450 μ l de água milliQ. Em um tubo tipo eppendorf foram pipetados 375 μ l de ácido fosfórico (H₃PO₄) 440 mmol/L, 250 μ l de ácido tiobarbitúrico 42 mmol/L e 50 μ l da amostra de soro diluída. Posteriormente a amostra foi incubada a 99 °C por 1 hora em aparelho termomixer (Thermomix comfort, eppendorf, Alemanha) para formação do complexo ácido tiobarbitúrico e MDA (TBA-MDA). Após o resfriamento dos tubos, 600 μ l dessa amostra foram adicionados a 600 μ l da solução de precipitação (metanol:NaOH na proporção de 91:9). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 900 x g a 4°C por 5 minutos, o sobrenadante retirado e as leituras realizadas em espectrofluorímetro (Spetramax M2, EUA) com excitação a 553 nm e emissão monitorada a 532 nm. A curva padrão foi feita a partir da hidrólise do composto 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP, Sigma, St. Louis, MO, USA) em H₂SO₄ a 1% na faixa de concentração de 0,05 a 2,02 nmol/mL. A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada pelo método de Hartree et al., 1972 e a concentração de MDA expressa em nmol /g de proteína total.

A.2 – Dosagem da capacidade antioxidante total do soro por potencial antioxidante redutor de ferro

O ensaio foi realizado segundo protocolo descrito por Benzie e Stain (1996). Esse método determina a capacidade de redução do ferro em fluidos biológicos, a partir do Potencial Antioxidante Redutor de Ferro (FRAP). O reagente FRAP foi preparado a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato (0,3 mol/L), 2,5 mL de solução de 2,4,6- tripyridyl-s-triazine (TPTZ) 10 mmol/L em ácido clorídrico (HCl) 40 mmol/L e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mmol/L). Após o preparo a solução foi usada imediatamente. Em um tubo de ensaio foram adicionados 30 μ l de soro,

90 µl de água Milli-Q e 900 µl da solução FRAP. As amostras foram homogeneizadas e a leitura da absorbância monitorada por 4 minutos a 593 nm em espectrofotômetro (Spectramax M2, EUA). A determinação da capacidade redutora de ferro foi realizada utilizando a diferença entre a absorbância final, após 4 minutos, (T4min) e inicial (T0min) para cada amostra, sendo expressa em percentual de FRAP relativo a uma solução padrão de FeSO₄. Para tanto, a partir de uma solução padrão de FeSO₄ 2mmol/L foi construída uma curva padrão (100 - 2000 µmol/L, $y = 0,0006x - 0,0014$), e o resultado de FRAP do soro foi expresso em FeSO₄ µmol/L, podendo ser interpretado como a quantidade de Fe reduzido por aquela amostra.

A.3 – Dosagem de proteínas carboniladas.

As análises foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Richert et al. (2002). O princípio desse método é baseado na reação de dinitrofenilhidrazina (DNPH) com o grupo carbonil, produto do dano oxidativo em proteínas, formando a base de Schiff que pode ser quantificada por espectrofotometria. Inicialmente foram homogeneizados 100 µL de soro em 700 µL de Tris HCl 25 mmol/L uréia 6 mol/L pH 9.0, imerso em gelo. Posteriormente esse homogenizado foi dividido em três alíquotas, sendo 200 µL para alíquota da reação branco e mais 200 µl para cada uma das duas alíquotas de dosagem de proteína carbonilada. O homogeneizado remanescente foi utilizado para dosagem de proteína total.

Em seguida, a cada uma das três alíquotas de homogenizado foram acrescentados 200 µL de TCA 20%, os tubos foram invertidos 15 vezes e centrifugados a 10.000 g/5 min/2-8°C (4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de Tris HCl 25 mmol/L ureia 6 mol/L pH 9.0 e depois desintegrado com a ponta de um pincel. À alíquota do branco foram adicionados 700 µL de HCl e às duas alíquotas da amostra 700 µL de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,2% em HCl 2 mol/L. Após serem agitadas em aparelho vortex, as amostras foram incubadas por 15 min/2-8°C, em velocidade alta (1.000x) em aparelho termomixer (Thermomix comfort, eppendorf, Alemanha). Em seguida foram adicionados 700 µL de TCA 20%, e as amostras centrifugadas a 10.000 g/2 min/2-8°C (4°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado três vezes com 1 mL de solução etanol : acetato de etila na proporção de 1:1, a cada lavagem as amostras eram centrifugadas a 10.000 g/2 min/2-8°C (4°C). Após a terceira lavagem, o sobrenadante foi descartado e o precipitado secado a temperatura ambiente. O precipitado foi então ressuspenso em 600 µL de guanidina 6 mol/L em fosfato de potássio 500 mmol/L pH 2,5, os tubos agitados no vortex e incubados por 30 min/2-8°C, em velocidade máxima no aparelho termomixer (Thermomix comfort, eppendorf, Alemanha).

Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 g/5 min/2-8°C (4°C) e as leituras de absorbância realizadas em espectrofotômetro (UV-1800 UVVIS Spectrophotometer, Shimadzu,

Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 376 nm. A concentração de proteína total em cada homogeneizado foi determinada pelo método de Hartree (1972). Os resultados foram expressos em nmol de carbonil / mg de proteína total ($y = 0,0133x + 0,0123$).

B – Capacidade Antioxidante

B.1 - Determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPX), glutaciona-s-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) em hemácias.

B.1.1 – Catalase (CAT): A análise foi realizada por meio do monitoramento do consumo de H_2O_2 a 240 nm. Foi utilizado um sistema com volume final de 1 mL contendo 30 μ L do homogeneizado de hemácias, tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L e H_2O_2 10 mmol/L, concentrações finais (Aebi, 1984). O coeficiente de extinção molar do H_2O_2 de 0,0394 $mM^{-1}cm^{-1}$ a 240 nm foi utilizado para o cálculo da atividade. Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 μ mol de H_2O_2 / min.

B.1.2 – Glutaciona Redutase (GR): o método utilizado foi descrito por Joannis e Storey (1996). Esse método monitora o consumo de NADPH através da leitura da absorbância a 340 nm por 20 segundos. O sistema reacional com volume final de 1 mL continha 50 μ L do homogeneizado de hemácias, tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L, NADPH 0,2 mmol/L e GSSG 1 mmol/L, concentrações finais. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH de 6,22 $mM^{-1}cm^{-1}$ a 340 nm. Uma unidade de glutaciona redutase corresponde a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

B.1.3 – Glutaciona Peroxidase (GPX): análise realizada segundo método descrito por Joannis e Storey (1996), utilizando H_2O_2 como substrato. Nesse método é determinada apenas a atividade da GPX selênio dependente. O ensaio consiste no monitoramento da oxidação do NADPH, através da leitura da absorbância a 340 nm por 20 segundos, catalisada pela glutaciona redutase (GR). O sistema reacional com volume final de 1 mL continha 20 μ L do homogeneizado de hemácias, tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L, NaN_3 2 mmol/L, GR 1,5 u/mL, NADPH 0,15 mmol/L, GSH 5 mmol/L e H_2O_2 0,2 mmol/L, concentrações finais. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH de 6,22 $mM^{-1}cm^{-1}$ a

340 nm. Uma unidade de GPX foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

B.1.4 – Glutathione-S-transferase (GST): De acordo com o método de Habig e Jakoby (1981), a atividade específica da GST será determinada através da reação de conjugação de GSH 1 mmol/L com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 1 mmol/L (CDNB), e consequente formação do complexo S-2,4-dinitrofenil-glutathione, o qual é detectado a 340 nm. O sistema reacional com volume final de 1 mL continha 30µL do homogenizado de hemácias, tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,2), EDTA 0,5 mmol/L, CDNB 1 mmol/L e GSH 1 mmol/L, concentrações finais. A atividade enzimática foi quantificada utilizando o coeficiente de extinção $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ do complexo S-2,4-dinitrofenil-glutathione. Uma unidade de glutathione-s-transferase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de produto/min.

B.1.5 – Superóxido dismutase (SOD): A determinação da atividade de SOD foi realizada segundo protocolo descrito por MCCORD e FRIDOVICH (1969), SUN et al. (1988) e adaptado por MCCORD (2001). O ensaio de SOD consiste na geração de superóxido (O_2^-) a partir da conversão de hipoxantina a xantina, reação catalisada pela enzima xantina oxidase. Posteriormente, o íon superóxido reduz o citocromo c, sendo, então, monitorada a cinética da reação de redução a 550 nm.

O sistema reacional foi composto por tampão fosfato de potássio 50 mmol/L pH 7,8, EDTA 0,5 mmol/L, citocromo c predominantemente oxidado 0,01 mmol/L, hipoxantina 0,05 mmol/L, homogeneizado de tecido e xantina oxidase suficiente para gerar uma taxa de redução do citocromo c de 0,025 abs/min, em um volume final de 500 µL. A estimativa da atividade enzimática foi baseada na premissa que uma unidade (U) de SOD corresponderia a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do citocromo c (IC50), o qual contém 1 mg de proteína. A determinação do IC50 foi realizada através da leitura de cinco pontos crescentes do homogeneizado (10, 25, 50 75 e 100 µL de homogeneizado de hemácias). Uma função logarítmica foi gerada a partir das quantidades de homogeneizado utilizadas e seus respectivos valores percentuais de inibição da redução da redução de citocromo C. A partir desta função foi possível encontrar o valor correspondente a uma unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos como U enzima/mg de proteína.

C. Marcadores inflamatórios

As análises dos marcadores: Fator de Necrose Tumoral α (TNF α), Proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e as interleucinas foram realizados em parceria com o Laboratório de Imunologia e Inflamação do Departamento de Biologia Celular / Instituto de Biologia / Universidade de Brasília.

A concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 no soro dos voluntários foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits comerciais (eBioscience e R&D System). O ensaio foi realizado conforme instruções do fabricante. Resumidamente, microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas diluídos em PBS e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. As placas foram bloqueadas com Soro Fetal Bovino 5% em PBS e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, após um ciclo de três lavagens com solução 0,05% Tween-20 em tampão PBS, foram adicionadas as amostras (50 μ L) e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e após o término deste período, os respectivos anticorpos anti-citocinas conjugados à biotina foram adicionados às placas e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, após um ciclo de três lavagens, foi adicionada estreptoavidina peroxidase do kit e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens, substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina foi adicionado às placas e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 mol/L. A absorbância da reação foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 450nm. Após a leitura, esses dados foram analisados no programa SoftMax e plotados no GraphPrism.

1.4.8 Análise estatística

O teste de normalidade Shapiro-Wilk, foi utilizado para testar a distribuição das variáveis controle e desfecho, sendo os resultados expressos como média, \pm DP (desvio-padrão) ou Δ (T30 - T0). Para os resultados referentes ao dano oxidativo, capacidade antioxidante e marcadores inflamatórios utilizou-se o Teste-t pareado para avaliar a diferença no mesmo grupo e o Teste t para amostra independentes para avaliação entre os grupos. Os Critério Roma IV, o diário de funcionamento intestinal e as variáveis de controle (IPAQ e dados dos registro alimentares) utilizaram o teste de Mann-Whitney que comparou a diferença entre os grupos e o teste Wilcoxon para as análises intra-grupos. Os testes foram fixados com valores de confiança em 95% ($p < 0,05$), sendo considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS (22.0).

REFERÊNCIAS

- Abrahamsson H., Ostlund-Lindqvist A.M., Nilsson R., Simrén M., Gillberg P. G. (2008). Altered bile acid metabolism in patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome and functional constipation. **Scand J Gastroenterol**; 43(12):1483-8. doi: 10.1080/00365520802321212.
- Ahluwalia B., Moraes L., Magnusson M.K., Öhman L. (2018). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. **Scand J Gastroenterol**. Apr;53(4):379-389. doi: 10.1080/00365521.2018.1447597.
- Akerboom T., Sies H. (1981). Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**. 77, 373–382. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77050-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77050-2)
- Altamirano-Barrera A., Uribe M., Chávez-Tapia N.C., Nuño-Lámbardi N. (2018). The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease. **J Nutr Biochem**. Oct;60:1-8. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.03.006.
- Arunachalam, K.; Gill, H. S.; Chandra, R. K. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019. **European Journal of Clinical Nutrition**, England, v. 54, n. 3, p. 263-267, Mar. 2000.
- Attaluri A., Jackson M., Paulson J., and Rao S.C.R.(2010). Methanogenic flora is associated with altered colonic transit but not stool characteristics in constipation without IBS. **Am J Gastroenterol**. Jun; 105(6): doi: 10.1038/ajg.2009.655.
- Barbara G., Feinle-Bisset C., Ghoshal U. C., Quigley E. M., Santos J., Vanner S., Vergnolle N., Zoetendal E.G. (2016). The Intestinal Microenvironment and Functional Gastrointestinal Disorders. **Gastroenterology**. Feb 18. DOI: S0016-5085(16)00219-5.
- Barefoot SF, Klaenhammer TR. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl Environ Microbiol** 1983;45:1808–15
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P (2006). Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.
- Baxter N.T., Zackular J.P., Chen G.Y., Schloss P.D. (2014). Structure of the gut microbiome following colonization with human feces determines colonic tumor burden. **Microbiome**. Jun 17;2:20. doi: 10.1186/2049-2618-2-20.
- Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem**. 239 (1), 70–76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe S.E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases, **Physiol.Rev**. 94 - 329–354. doi:10.1152/physrev.00040.2012.
- Biagi E., Nylund L., Candela M., Ostan R., Bucci L., Pini E., Nikkila J., Monti D., Satokari R., Franceschi C., Brigidi P., De Vos W. (2010). Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians Elena. **PLoS One**. May 17;5(5):e10667. doi: 10.1371/journal.pone.0010667.
- Bouayed J., Bohn T. (2010). Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. **Oxid Med Cell Longev**. Jul-Aug;3(4):228-37. doi: 10.4161/oxim.3.4.12858.
- Buttó L.F., Haller D. (2016). Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. **Int J Med Microbiol**. Aug;306(5):302-309. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.02.010.
- Camilleri M., Ford A.C., Mawe G.M., Dinning P.G., Rao S.S., Chey W.D., Simrén M., Lembo A., Young-Fadok T.M. (2017). Chang L. Chronic constipation. **Nat Rev Dis Primers**. Dec 14;3:17095. doi: 10.1038/nrdp.2017.95

- Candan N. and Tuzmen N (2008). Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **NeuroToxicology**, vol. 29, no. 4, pp. 708–713, 2008. doi:10.1016/j.neuro.2008.04.012.
- Carding S., Verbeke K., Vipond D.T., Corfe B. M. and Owen L.J (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microb Ecol Health Dis**. Feb 2;26:26191. doi: 10.3402/mehd.v26.26191.
- Cash B.D., Chey W.D. (2005). Review article: The role of serotonergic agents in the treatment of patients with primary chronic constipation. **Aliment Pharmacol Ther**;22:1047-60. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2005.02696.x.
- Choi C.H., Chang S. K (2015). Alteration of gut microbiota and efficacy of probiotics in functional constipation. **Journal of neurogastroenterology and motility** 21, 4–7, doi:10.5056/jnm14142.
- Chumpitazi B.P., Self M.M., Czyzewski D.I., Cejka S., Swank P.R., Shulman R.J. (2016). Bristol Stool Form Scale reliability and agreement decreases when determining Rome III stool form designations. **Neurogastroenterol. Motil**; 28: 443–8.
- Circu M. and Aw T. (2012). Intestinal redox biology and oxidative stress. **Semin Cell Dev Biol**. Sep; 23(7): 729–737. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.03.014
- Collins S.M., Bercik P. (2009). The Relationship Between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease. **Gastroenterology**. May;136(6):2003-14. doi: 10.1053/j.gastro.2009.01.075.
- Connell A.M., Hilton C., Irvine G., Lennard-Jones J.E., Misiewicz J.J. (1965). Variation of bowel habit in two population samples. **Br Med J**. Nov 6; 2(5470): 1095–1099. doi: 10.1136/bmj.2.5470.1095.
- Domingo S. (2017). The new Rome criteria (IV) of functional digestive disorders in clinical practice. **Med Clin (Barc)**. May 23;148(10):464-468. doi: 10.1016/j.medcli.2016.12.020.
- Drossman D.A, Hasler W.L (2016). Rome IV-functional GI disorders: Disorders of gut-brain interaction. **Gastroenterology**. 150:1257–61.
- Drossman D.A. (2016). Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV. **Gastroenterology**. 2016; 150(6):1262-1279.
- Emmanuel A., Quigley E., Simre ´n M., Feng Y., Mu ¨ller-Lissner S., Urbain D., Tack J., Bredenoord A., Sabate ´ J., Yiannakou Y., et al. (2013). Factors affecting satisfaction with treatment in European women with chronic constipation: an Internet survey. **United European Gastroenterol J**;1:375–84. doi: 10.1177/2050640613494200.
- Emmanuel A.V., Kamm M. (2001). Response to a behavioural treatment, biofeedback, in constipated patients is associated with improved gut transit and autonomic innervation. **Gut**. Aug; 49(2): 214–219. doi: dx.doi.org/10.1136/gut.49.2.214
- Ferreira A.L.A., Matsubara L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doen¸as relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras**. vol.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997. doi: dx.doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014.
- Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**. Jan;3(1):23-35. doi: 10.1038/nri978
- Grlach A., Dimova E.Y., Petry A., Martınez-Ruiz A., Hernansanz-Agustı ´n P., Rolo A.P., Palmeira C.M., Kietzmann T. (2015). Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? **Redox Biol**. Dec;6:372-85. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.016. Epub 2015 Aug 28.
- Gray J.R. (2011). What is chronic constipation? Definition and diagnosis. **Can J Gastroenterol**. 2011;25:7B-10B. doi: 10.1155/2011/548024
- Habig W. H., JAKOBY W. B (1981). Glutathione S-Transferase (rat and human). **Methods in Enzymology**, [S.l.], v. 77, n. 27, p. 218-239. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77029-0.

- Halliwell B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci*; 31:509-15. doi: 10.1016/j.tibs.2006.07.005
- Halliwell B (2000). The antioxidant paradox. *Lancet* **355** - Apr 1;355(9210):1179-80. Doi: 10.1016/S0140-6736(00)02075-4.
- Hume D.A. (2015). The many alternative faces of macrophage activation. *Front Immunol*. 2015 Jul 22;6:370. doi: 10.3389/fimmu.2015.00370. eCollection.
- Iebba V., Totino V., Gagliardi A., Santangelo F., Cacciotti F., Trancassini M, et al. (2016). Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *N Microbiol*. 39:1–12
- Jabri, M. A., Wannes, D., Hajji, N., Sakly, M., Marzouki, L., & Sebai, H. (2017). Role of laxative and antioxidant properties of *Malva sylvestris* leaves in constipation treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.020>
- Joanisse D. R. and Storey K. B. (1996). Fatty acid content and enzymes of fatty acid metabolism in overwintering cold-hardy gall insects. *Physiol. Zool*. doi: 10.2307/30164247
- Kahouli I., Tomaro-Duchesneau C., Prakash, S. (2013). Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. *Journal of Medical Microbiology*, Aug. Londres, v.62, n.1, p.1107-1123. doi: 10.1099/jmm.0.048975-0
- Kamada N., Seo S. U., Chen G. Y., Núñez G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Rev Immunol*. May;1(5):321-35. doi: 10.1038/nri3430
- Khalif I. L., Quigley E. M. Konovitch EA, Maximova ID (2005). Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Dig Liver Dis*. Nov;37(11):838-49. DOI: 10.1016/j.dld.2005.06.008
- Kim E.R., Rhee P.L. (2012). How to interpret a functional or motility test - colon transit study. *J Neurogastroenterol Motil*;18:94–9. doi: 10.5056/jnm.2012.18.1.94
- Koebnick C., Wagner I., Leitzmann P., Stern U., Zunft H.J. (2003). Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can J Gastroenterol*. 2003 Nov;17(11):655-9.
- Krammer H.J., Seggern H.V., Schaumburg J., Neumer F. (2011). Effect of *Lactobacillus casei* Shirota on colonic transit time in patients with chronic constipation. *Coloproctology* , Volume 33 (2) – Mar 17, 2011.
- Kruszewska D., Lan, J., Lorca G., Yanagisawa N., Marklinder I. and Ljungh Å. (2002). Selection of Lactic Acid Bacteria as probiotic strains by in vitro tests. *Microb. Ecol. Health Dis*. 29;37–49.
- Laukoetter M.G., Nava P., Nusrat A. (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*; 14:401–407. doi: 10.3748/wjg.14.401.
- Lee, Y.K.; Nomoto, K.; Salmine, S.; Gorbach, S.L. Handbook of probiotics. New York: Wiley, 1999. 211p.
- Lewis S.J., Heaton K.W. (1997). Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*. Sep;32(9):920-4. DOI:10.3109/00365529709011203
- Lindberg G., Hamid S. S., Malfertheiner P., Thomsen O. O, Fernandez L. B., Garisch J. et al. (2011). World Gastroenterology Organisation. World Gastroenterology Organisation global guideline: constipation --- a global perspective. *J Clin Gastroenterol*;45:483---7.
- Magro D.O., Oliveira L.M., Bernasconi I., Ruela M.S., Credidio L., Barcelos I.K., Leal R.F., Ayrizono M.L., Fagundes J.J., Teixeira L.B., Ouwehand A.C., Coy C.S. (2014). Effect of yogurt containing polydextrose, *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* HN019: A randomized, double-blind, controlled study in chronic constipation. *Nutr J*. 2014 Jul 24;13:75. doi: 10.1186/1475-2891-13-75.

- Mancabelli L., Milani C., Lugli G.A., Turrón F., Mangifesta M. and Viappiani A. (2017). Unveiling the gut microbiota composition and functionality associated with constipation through metagenomic analyses. **Scientific Reports**, 7: 9879 | DOI:10.1038/s41598-017-10663-w.
- Matsudo S., Araujo T., Matsudo V., Andrade D., Andrade E., Oliveira L.C., Braggion G. (2001). QUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FISICA (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. Centro de Estudos do Laboratório de Aptidão Física de São Caetano do Sul-CLAFISCS & Programa Agita - São Paulo, SP. doi: <https://doi.org/10.12820/rbafs.v.6n2p5-18>.
- McCord JM. (2001). Analysis of superoxide dismutase activity. **Curr Protoc Toxicol Chapter 7**:Unit 7.3. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0703s00>.
- McCord JM., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase and enzymic function for erythrocyte superoxide dismutase (hemocytin). **Journal of Biological Chemistry** 244(22):6049–6055.
- Mearin F., Ciriza C., Mínguez M., et al. (2016). Clinical practice guideline: irritable bowel syndrome with constipation and functional constipation in the adult. **Rev Esp Enferm Dig**. 2016, 108:332-63. doi: 10.17235/reed.2016.4389/2016.
- Mokhtare M., Alimoradzadeh R., Agah S., Mirmiranpour H., Khodabandehloo N. (2017). The Association between Modulating Inflammatory Cytokines and Constipation of Geriatrics in Iran. **Middle East J Dig Dis**. Oct;9(4):228-234. doi: 10.15171/mejdd.2017.78.
- Montalto M., D'Onofrio M., Gallo A., Cazzato A., Gasbarrini G. (2009). Intestinal microbiota and its functions. **Digestive and Liver Disease Supplements** 3; 30–34. doi: [doi.org/10.1016/S1594-5804\(09\)60016-4](https://doi.org/10.1016/S1594-5804(09)60016-4)
- Montes RG, Bayless TM, Saavedra JM, Perman JA. Effect of milks inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. **J Dairy Sci**. 1995;78(8):1657-1664.
- Mugie S. M., Benninga M. A., Di Lorenzo C. (2011). Epidemiology of constipation in children and adults: a systematic review. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 25(1):3-18. doi: 10.1016/j.bpg.2010.12.010.
- Nullens S., Nelsen T., Camilleri M., Burton D., Eckert D., Iturrino J., Vazquez-Roque M., Zinsmeister A.R. (2012). Regional colon transit in patients with dys-synergic defaecation or slow transit in patients with constipation. **Gut**. Aug;61(8):1132-9. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301181.
- O'Donnel, L.D. and Heaton, K. W (198). Recurrence and re-recurrence of gall stones after medical dissolution: a longterm follow up. **Gut**. May; 29(5): 655–658. doi: 10.1136/gut.29.5.655
- Ohashi Y., Inoue R., Tanaka K., Matsuki T., Umesaki Y., Ushida K. (2001). *Lactobacillus casei* strain Shirota-fermented milk stimulates indigenous *Lactobacilli* in the pig intestine. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**. Apr;47(2):172-6.
- Ong Z.Y., Gibson R.J., Bowen J.M., Stringer A.M., Darby J.M., Logan R.M., Yeoh A.S., Keefe D.M. (2010). Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. **Radiat Oncol**. Mar 16;5:22. doi: 10.1186/1748-717X-5-22.
- Parthasarathy G., Chen J., Chen X., Chia N., O'Connor H.M., Wolf P.G., Gaskins H.R., Bharucha A.E. Relationship Between Microbiota of the Colonic Mucosa vs Feces and Symptoms, Colonic Transit, and Methane Production in Female Patients With Chronic Constipation. **Gastroenterology** Feb;150(2):367-79.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.005.
- Palsson O.S., Whitehead W.E., Van Tilburg M.A.L., Chang L., Chey W., Crowell M.D., Keefer L., Yang Y et al. (2016). Development and validation of the Rome IV diagnostic questionnaire for adults. **Gastroenterology**, 150 (6) , pp. 1481-1491. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.014>.
- Pradad, J. et al. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 12, p. 993-1002, 1998.
- Pryde, S., Duncan, S., Hold, G., Stewart, C. and Flint, H. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiol Lett** 217: 133–139. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11467.x

Puertollano E., Kolida S., Yaqoob P. (2014). Biological significance of short-chain fatty acid metabolism by the intestinal microbiome. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. Mar;17(2):139-44. doi: 10.1097/MCO.0000000000000025.

Rtibi K., Grami D., Selmi S., Amri M., Sebai H., and Marzouk L. (2017). Vinblastine, an anticancer drug, causes constipation and oxidative stress as well as others disruptions in intestinal tract in rat. **Toxicol Rep.**; 4: 221–225. May 6. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.04.006.

Saad R.J., Rao S.S., Koch K.L., Kuo B., Parkman H.P., McCallum R.W., Sitrin M.D., Wilding G.E., Semler J.R., Chey W.D. (2010). Do Stool Form and Frequency Correlate With Whole-Gut and Colonic Transit ? Results From a Multicenter Study in Constipated Individuals and Healthy Controls. **Am J Gastroenterol**. Feb;105(2):403-11. doi: 10.1038/ajg.2009.612.

Salim P.H., Xavier R.M. (2014). Influência dos polimorfismos genéticos (IL10/CXCL8/CXCR2/ NFκB) na susceptibilidade das doenças reumatológicas autoimunes. **Rev. Bras. Reumatol**. [online]. 2014, vol.54, n.4, pp.301-310. ISSN 0482-5004. doi: dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2013.10.006.

Sanders, M.E.; Klaenhammer, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.84, p.319-331, 2001.

Sanders, M. Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 40, n. 9, p. 776-83, Oct. 2006.

Schey R., Cromwell J., Rao S.S. (2012). Medical & Surgical Management of Pelvic Floor Disorders Affecting Defecation. **Am J Gastroenterol**. Nov;107(11):1624-33; quiz p.1634. doi: 10.1038/ajg.2012.247.

Schmidt F.M.Q.; Santos, V.L.C.G. (2014). Prevalence of constipation in the general adult population: an integrative review. **J Wound Ostomy Continence Nurs**. 41(1):70-6. doi: 10.1097/01.WON.0000438019.21229.b7.

Serra J., Mascort-Roca J., Marzo-Castillejo M., Delgado Aros S, Ferrándiz Santos J, Rey Diaz Rubio E, Mearin Manrique F. Clinical practice guidelines for the management of constipation in adults. Part 1: Definition, aetiology and clinical manifestations. **Gastroenterol Hepatol**. 2017 Mar;40(3):132-141. doi: 10.1016/j.gastrohep.2016.02.006.

Sharma A., Rao S. (2017). Constipation: Pathophysiology and Current Therapeutic Approaches. **Handb Exp Pharmacol**. 2017;239:59-74. doi: 10.1007/164_2016_111.

Sherman P.M., Ossa J.C., Johnson-Henry K. (2009). Unraveling mechanisms of action of probiotics. **Nutr Clin Pract**; 24:10–14. doi: 10.1177/0884533608329231

Shi Y., Chen Q., Huang Y., Ni .L, Liu J., Jiang J., Li N. (2015). Function and clinical implications of short-chain fatty acids in patients with mixed refractory constipation. **Colorectal Dis**. Aug;18(8):803-10. doi: 10.1111/codi.13314.

Shin J.E (2017). Understanding the Rome IV: Functional Constipation and Anorectal Disorders. **Korean J Med**. 2017;92 (4): 372-381. Publication Date (Web): 2017 August 01 (In-depth review). doi: <https://doi.org/10.3904/kjm.2017.92.4.372>

Simon O., Taras D. and Vahjen W. (2005). Nutritional impact on intestinal bacterial communities of pigs studied by molecular biology techniques. **Journal of Animal and Feed Sciences**. 14. 575-578. 10.22358/jafs/70741/2005.

Singh S., Sharma R.K., Malhotra S., Pothuraju R., Shandilya U.K. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* NCDC17 ameliorates type-2 diabetes by improving gut function, oxidative stress and inflammation in high-fat-diet fed and streptozotocintreated rats. **Benef Microbes**. 2017 Apr 26;8(2):243-255. doi: 10.3920/BM2016.0090.

Sleisenger M.H., Feldman M., Friedman L.S., Brandt L.J. (2006). Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management, 8th edn. Philadelphia: **Saunders** :2127-46.

- Spanhaak S., Havenaar R., Schaafsma G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **Eur J Clin Nutr.** 1998 Dec;52(12):899-907. doi: 10.1038/sj.ejcn.1600663
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an antiinflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 105, 16731–16736. doi: 10.1073/pnas.0804812105.
- Vandeputte D., Falony G., Vieira-Silva S., Tito R.Y., Joossens M. and Raes J. (2016). Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. **Gut** 65, 57–62, doi:10.1136/gutjnl-2015-309618 (2016).
- Waller P.A., Gopal P.K., Leyer G.J., Ouwehand A.C., Reifer C., Stewart M.E., Miller L.E. (2011). Dose-response effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. **Scand J Gastroenterol.** 2011 Sep;46(9):1057-64. doi: 10.3109/00365521.2011.584895.
- Wang B.G., Xu H.B., Xu F., Zeng Z.L., Wei H. (2016). Efficacy of oral *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 on microflora and antioxidant in mice. **Can J Microbiol.** Mar;62(3):249-62. doi: 10.1139/cjm-2015-0685.
- Wang J.Y., Wang Y.L., Zhou S.L., Zhou J.F. (2004). May Chronic Childhood Constipation Cause Oxidative Stress and Potential Free Radical Damage to Children?. **Biomed Environ Sci.** Sep;17(3):266-72.
- Whelan K, Quigley EM (2013) Probiotics in the management of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. **Curr Opin Gastroenterol** 29(2):184–189.
- Woodmansey E.J. (2007). Intestinal bacteria and ageing. **J Appl Microbiol.** May;102 (5):1178-86. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03400.x
- Zeng M.Y., Inohara N. and Nuñez G. (2017). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunol.** January ; 10(1): 18–26. doi:10.1038/mi.2016.75.
- World Gastroenterology Organisation. Practice guideline: probiotics and prebiotics, October 2011.
- World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry - Report of a WHO expert committee. Geneva: WHO, 1995, p. 328.
- Zhao Y., Yu Y. B. (2016). Intestinal microbiota and chronic constipation. **Springerplus** (2016).. Jul 19;5(1):1130. https://doi: 10.1186/s40064-016-2821-1.
- Zhou J.F., Lou J.G., Zhou S.L., and Wang J. (2005). Potential oxidative stress in children with chronic constipation. **World J Gastroenterol.** Jan 21; 11(3): 368–371. doi: 10.3748/wjg.v11.i3.368
- Zhu L., Liu W., Alkhouri R., Baker R.D., Bard J.E., Quigley E.M., Baker S.S. (2014). Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. **Physiol Genomics.** Sep 15;46(18):679-86. doi: 10.1152/physiolgenomics.00082.2014.
- Zoppi G., Cinquetti M., Luciano A., Benini A., Muner A., Bertazzoni M. E. (1998). The intestinal ecosystem in chronic functional constipation. **Acta Paediatr.** Aug;87(8):836-41. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1998.tb01547.x
- Zuo, L., Sybert, D.C., Clark, A.D., Xu, Z., Garrison, D.E., & He, F. (2017). Chapter 2 – Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Gastrointestinal Tract Diseases. In J. Gracia-Sancho, & M.J. Salvadó (Eds.), **Gastrointestinal Tissue** (pp. 21-27). London: Academic Press. doi: doi.org/10.1016/B978-0-12-805377-5.00002-3

CAPÍTULO 2

Artigo Original

Effect of a multi-species probiotic on markers of redox and inflammatory responses in adults with intestinal constipation.

Manuscrito submetido ao periódico Journal of Functional Foods.

Effect of a multi-species probiotic on markers of redox and inflammatory responses in adults with intestinal constipation.

Ananda de M. Araújo^{1*}, Patrícia B. Botelho ², Dalila Juliana S. Ribeiro ³, Kelly G. Magalhães³, Eduardo Y. Nakano⁴ and Sandra F. Arruda².

¹ Postgraduate Program in Human Nutrition, Faculty of Health Sciences; ² Members of the Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences; Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil. ³ Members of the Laboratory of immunology and inflammation, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil. ⁴ Member of the Department of statistic, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

***Corresponding author:** e-mail: nutriananda.araujo@gmail.com

Abstract

Probiotics may have beneficial effects on intestinal dysbiosis, but the effects of probiotics on redox and inflammatory responses in intestinal constipation remain unknown. This study investigated the effect of a multiple-strain probiotic on the redox and inflammatory responses in individuals with intestinal constipation. Analysis included redox response, inflammatory response, and ROME IV criteria for constipation. The consumption of multiple-strain probiotic attenuated the reduction of GPX and GST activity in erythrocytes and marginally improved the symptoms, such as feeling of incomplete defecation in at least ¼ of bowel movements, compared to placebo group. No changes were observed in total antioxidant capacity, oxidative damage, and levels of inflammatory markers in the serum. Our data suggested that a multiple-strain probiotic was effective in maintaining a greater enzymatic antioxidant response and in relieving an intestinal constipation symptom, and thus, contributes to better intestinal health.

Keywords: probiotic; intestinal constipation; Rome IV; redox; antioxidant; inflammation.

1. Introduction

Functional constipation is a disorder characterized by a set of symptoms that include hardened or dry stools, excessive exertion on bowel movements, infrequent bowel movements, incomplete evacuation, distension, and abdominal pain (Zhao & Yu, 2016). The global mean prevalence of functional intestinal constipation is estimated as 16% (Mugie, Benninga & Lorenzo, 2011), with highest prevalence in women and in elderly people (Lindberg et al., 2011).

The pathophysiology of intestinal constipation is multifactorial (Kamada et al., 2013). Changes in intestinal microbiota composition (Barbara et al., 2016; Sokol et al., 2008 e Pryde et al., 2002), oxidative stress condition (Jabri et al., 2017; Wang et al., 2004, Rtibi et al., 2017), and inflammation might be some of the causes of intestinal constipation. The constipation, as well as other disorders of the gastrointestinal tract, can alter the composition of the intestinal microbiota, increasing the intestinal permeability to pathogens and endotoxins and promoting oxidative and inflammatory responses (Bischoff, 2014; Khalif et al., 2005).

Jabri et al. (2017) observed an increase in lipid peroxidation and H₂O₂ production, and a decrease in the activities of antioxidant enzymes in the colon of rats with induced constipation. Similar results were found in children with chronic constipation, in which a

significant increase in oxidative damage and a decrease in antioxidant capacity was observed (Zhou et al., 2005).

With respect to inflammation, few studies have investigated the relationship between inflammatory response and chronic constipation. Some studies have suggested a significant and positive association between serum inflammatory cytokine levels (TNF- α , IL-1, and IL-6) and chronic constipation (Mokhtare et al., 2017; Khalif et al., 2005). Cirali et al. (2014) observed higher levels of IL-6, IL-12, and neopterin, and unaltered levels of IL-1 β and TNF- α , proinflammatory markers of inflammation, in children with intestinal constipation, when compared to healthy controls ($p = 0.001$).

Previous evidence highlights the beneficial effect of probiotics, live microorganisms that provide benefits to the host when administered in adequate quantities (FAO/WHO, 2011), in the treatment of intestinal constipation (Waller et al., 2011; Singh et al., 2017 and Kruszewska et al., 2002). Wang et al. (2016) observed an increase in the abundance of beneficial bacteria (*Lactobacillus intestinalis* and *Lactobacillus crispatus*) and a decrease in harmful bacterial populations (*Enterobacter* and *Escherichia coli*), followed by improvement in the antioxidant capacity, in rats treated with *Bifidobacterium bifidum* probiotic. Miller et al. (2018), in a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in constipated adults, suggested that probiotic products that are composed of *Lactobacillus* or *Bifidobacterium* species increase stool frequency and decrease intestinal transit time; however, the authors observed a significant heterogeneity in outcomes and evidence of publication bias, suggesting that these results must be interpreted with caution.

The previous literature is not consensual regarding the effect of probiotic consumption on redox and inflammatory responses in subjects with intestinal constipation, as well as which strains and doses would promote an antioxidant and anti-inflammatory profile in intestinal constipation. In the present study, we investigated the effect of a mix of different strains of bacteria on the redox and inflammatory responses in individuals with intestinal constipation.

2. Methods

2.1. Probiotic product

The probiotic and placebo capsules were manufactured and supplied by Scientific Cifarma Pharmaceuticals, Goiânia, Goiás - Brazil. The probiotic capsules were composed of a mixture of bacterial strains, containing at least 10⁹ CFU of the following strains:

Lactobacillus acidophilus (NCFM), *Lactobacillus casei* (Lc-11), *Lactococcus lactis* (Ll-23), *Bifidobacterium lactis* (HN019), and *Bifidobacterium bifidum* (Bb-06). The placebo capsule contained 5 g of maltodextrin.

2.2. Subjects

The subjects were recruited through social media and folder delivery at clinics and universities. After the recruitment phase, 55 subjects passed the eligibility criteria of the study. The inclusion criteria included age between 18 and 60 years, both sexes, and diagnosis of intestinal constipation according to Criteria Roma IV (reference). The exclusion criteria included use of probiotic and/or prebiotic foods or products, use of laxatives and phytotherapies that improve intestinal functioning, use of vitamin and mineral supplements, consumption of some types of teas, and use of anti-inflammatory and antibiotics. Volunteers with metabolic, gastrointestinal, hepatic, renal, and other non-transmissible chronic diseases; pregnant women; and those who did not attend the reevaluations or interrupted the probiotic consumption provided during the research were excluded. The sample calculation initially considered a design effect of 0.98 for the comparison of means of independent groups obtained from data of means and standard deviation of evacuation frequency after intervention with symbiotics (WILMS et al., 2016); an alpha of 0.05 and test power (1-B) of 95%, and the result was 29 participants per group, who were accrued 30% for coverage totalling 38 patients per intervention/control group. The calculation was performed by G * Power 3.1.9.2® program.

This study was conducted according to the guidelines established in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects were approved by the Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Goiás (opinion no. 2,550,573). Informed written consent was obtained from all patients. The study was recorded in clinical trials (RBR-2qvnq9).

2.3. Study design

This study was a 30 days-randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. Volunteers who met the inclusion criteria and agreed to participate and signed the informed consent form were randomized into two groups according to gender, age, and BMI (Software R 2.15.3 para Windows). The probiotic group received one capsule containing

minimum 10^9 CFU of each strain strains of probiotic and the control group received the placebo one capsule, during 30 days. Each volunteer was provided with a pot containing 35 capsules, and all capsules (probiotic and placebo) and pots had the same appearance. All volunteers were instructed to consume one capsule per day 30 minutes after the last meal of the day, with water at room temperature, during 30 days of intervention. Adherence to treatment was estimated by counting the number of capsules remaining, with individuals with consumption $<80\%$ excluded. Both volunteers and researchers were blinded in relation to the distribution of capsules and allocation of subjects in the groups. Allocation of volunteers in each group and distribution of capsules were performed by a researcher not involved in the project, using the lottery system.

2.4. Dietary Intake and physical activity level

During the supplementation period, individuals were instructed not to modify their food intake and physical activity. To ensure that these instructions were followed, possible alterations in dietary intake and physical activity level were monitored throughout the 4 weeks. Volunteers were instructed to fill six food records, three of which were records of the first week and three of the last week of intervention.

The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) was applied at the baseline and one at 30 days of intervention. The equivalent metabolic tasks (METs min^{-1}) and the kilocalories were evaluated by the equation $\text{kcal} = \text{METs total minutes} \times \text{body weight (kg)}/60$ (MATSUDO et al., 2001).

2.5. Intestinal constipation symptoms

Two ROME IV questionnaires were applied at the baseline and after 30 days of intervention for the evaluation of symptoms related to intestinal constipation (PALSSON et al., 2016). Stool frequency and consistency was assessed by an intestinal health diary.

2.6. Blood collection and biochemical analyses

Blood samples were collected after a 12-h fast overnight at the baseline and after 30 days of intervention. Ten millilitres of blood were drawn, an aliquot was centrifuged at 700

xg for 10 min at 4 °C to obtain the serum samples and the other aliquot was collected in tubes with anticoagulant and centrifuged at 1000 xg for 10 min at 4 °C to obtain the plasma samples. After removal of the plasma to a new tube, the buffy layers of the red cell pellet were discarded and the red cells were resuspended in ice cold Milli-Q water (5X volume) and centrifuged at 10,000 xg for 10 minutes to pellet the red blood cells. Serum, plasma, and red blood cells were stored at -80 °C for further determination of the redox response and inflammatory markers.

2.7. *Oxidative damage to lipids and proteins*

Serum malondialdehyde (MDA – a product of lipid peroxidation) concentration was determined by the fluorometric detection of the MDA-thiobarbituric acid complex, setting the excitation wavelengths at 532 nm and emission at 553 nm (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular devices, 211 Sunnyvale, California, USA) (Wasowick et al., 1993). A standard curve was obtained using the product of the acid hydrolyses of tetraethoxypropane (TEP; Sigma, St. Louis, MO, USA) in 1% *sulfuric acid*, at a concentration range of 0.0 to 5.05 nmol/mL ($y = 15.813x - 0.156$; $r^2 = 0.9994$). Malondialdehyde (MDA) concentration was expressed as nmol MDA/mg serum protein. Carbonylated protein concentration in the serum was assessed as described by Richert et al. (2002) by monitoring the absorbance of the complex dinitrophenylhydrazine-carbonyl groups at 376 nm (Spectrophotometer, Shimadzu – TCC 240A, Kyoto, Japan). The carbonyl concentration was expressed as nmol carbonyl groups/mg total protein using an extinction coefficient of 22.000 $mM^{-1}cm^{-1}$. Total serum protein concentration was determined by the method described previously by Hartree (1972).

2.8. *Antioxidant capacity*

2.8.1 Ferric reducing antioxidant power (FRAP): Total serum antioxidant capacity was estimated by FRAP assay described by Benzie and Strain (1996), with some modifications. A standard curve was constructed using a $FeSO_4$ standard solution at a concentration range of 0.0 to 2,000 $\mu mol FeSO_4/L$ ($y = 0.0005x - 0.0032$; $r^2 = 0.9994$). The antioxidant capacity of serum was expressed as $\mu mol FeSO_4/L$.

2.8.2 Specific activity of antioxidant enzymes in red blood cells:

Catalase activity (CAT, EC 1.11.1.6) was determined by monitoring the consumption of 10 mmol/L of H₂O₂ at 240 nm (Spectrophotometer, Shimadzu – TCC 240A, Kyoto, Japan), using the extinction coefficient of H₂O₂ as 0.0394 mM⁻¹cm⁻¹ (Aebi H, 1984). One unit of catalase was defined as the amount of enzyme required to decompose 1 mmol of H₂O₂/min.

Glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) activity was assessed using H₂O₂ as a substrate in an assay coupled with the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm (Spectrophotometer, Shimadzu – TCC 240A, Kyoto, Japan) catalysed by glutathione reductase, using the extinction coefficient of NADPH as 6.22 mM⁻¹cm⁻¹ (Joanisse and Storey, 1996). One unit of glutathione peroxidase was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/min.

Glutathione-s-transferase (GST, EC 2.5.1.18) activity was determined by monitoring the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) with GSH (S-2,4-dinitrophenyl glutathione; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 340 nm (Spectrophotometer, Shimadzu – TCC 240A, Kyoto, Japan) (Habig WH, Jakoby, 1981). One unit of GST was determined as the amount of enzyme required to decompose 1 nmol of conjugate/min, using the extinction coefficient of GSDNB as 9.6 mM⁻¹cm⁻¹.

Superoxide dismutase activity (SOD, EC 1.15.1.1) was determined using the method described by McCord (2001). In this assay, xanthine oxidase produces superoxide from the oxidation of hypoxanthine to xanthine, which, in turn, reduces cytochrome c. The kinetics of the cytochrome c reduction was monitored at 550 nm (Spectrophotometer, Shimadzu – TCC 240A, Kyoto, Japan). The addition of red blood homogenate inhibits cytochrome c reduction, as SOD catalyses the dismutation of superoxide into H₂O₂ and O₂. SOD activities were expressed as unit of enzyme/mg of total protein. The total protein content in each homogenate of red blood cells was determined by the method of Hartree (1972).

2.8.3 Proinflammatory Cytokine Serum Levels: The concentration of the IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12 cytokines in serum was determined by enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits (eBioscience and R & D System, United States, U.S.).

2.9 Statistical analysis: The Shapiro-Wilk normality test was used to test the distribution of control and outcome variables, and the results were expressed as mean, \pm SD (standard deviation) or Δ (T30 - T0). For results regarding oxidative damage, antioxidant capacity and inflammatory markers, the paired t-test was used to assess the difference in the same group and the independent sample t-test for evaluation between groups. The Rome IV Criteria, the intestinal functioning diary and the control variables (IPAQ and dietary record data) used the Mann-Whitney test that compared the difference between groups and the Wilcoxon test for intra-group analyzes. The tests were set with 95% confidence values ($p < 0.05$) and were considered significant. Statistical analyzes were performed using the SPSS (22.0) program.

3. Results

3.1. Characteristics of subjects

At the recruitment phase, 141 volunteers were evaluated but 37 were excluded due to instability of the sachet probiotic product, 49 because they did not meet the inclusion criteria and only 55 volunteers passed the eligibility criteria and were randomized after they agreed to participate. At the baseline, 48 volunteers attended the study. At the end of the intervention, three volunteers were excluded: one volunteer for inadequate capsule intake ($< 80\%$) and two volunteers for personal reasons (Figure 1). The demographic and clinical data were recorded for the 45 volunteers enrolled in the study, 25 in the probiotic group and 20 volunteers in control group. All baseline characteristics were similar between groups (Table 1). Approximately 93.3 % of the volunteers were females and the mean age was 28.5 years. Mean capsule intake was 28.4 and 28.6 days for the treatment and control groups, respectively.

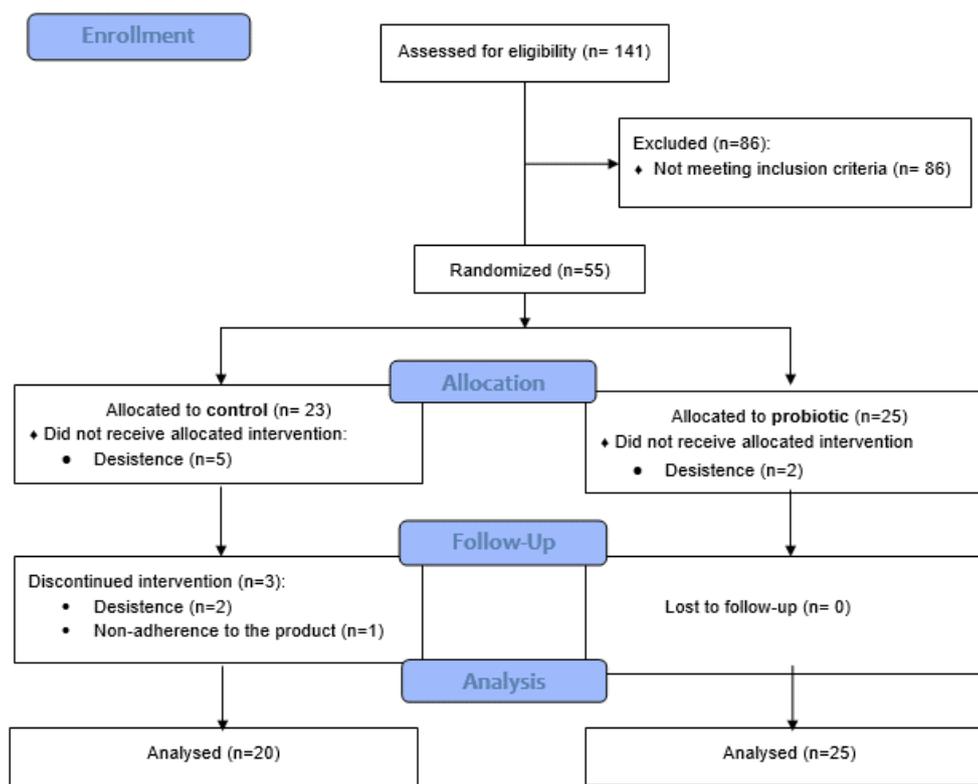


Figure 1 – Flow chart of volunteers along the study.

3.2. *Dietary intake and physical activity of subjects at baseline and after 30 days of intervention.*

No significant differences were observed in energy, macronutrients and fibre intake, and in physical activity level, both in the intra-group and inter-groups analyses (Table 2).

3.3. *Intestinal health and Rome IV Criteria*

According to the intestinal health diary, both control and probiotic groups showed an increment in evacuation frequency and stool consistency after 30 days of treatment ($p = 0.007$ and 0.003 , respectively). No difference was observed in these variables between the groups (Table 3).

Following ROME IV criteria, the probiotic group showed an increment in five of the seven criteria, while in the control group an increment was observed in four criteria (Table 3). After 30 days of intervention, no significant difference was observed in any of the Rome IV criteria between the probiotic and control groups (Table 3). However, for the criteria feeling of incomplete defecation in at least $\frac{1}{4}$ of bowel movements, nine individuals did not

present this symptom after treatment in probiotic group ($p = 0.012$) and only two exhibited the same behaviour in control group over 30 days ($p = 0.625$), resulting in a difference in frequency of 34%, and thus, approaching significance ($p = 0.088$).

3.4. *Oxidative damage markers in serum of subjects at baseline and after 30 days of intervention*

With respect to oxidative damages in serum, both control and probiotic groups exhibited a decrease in MDA and an increase in carbonyl levels, after 30 days of treatment ($p < 0.0001$ and $p = 0.003$ for MDA, respectively; $p < 0.0001$ for carbonyl for both groups). There was no significant difference in MDA and carbonyl serum levels between the control and probiotic groups (Figure 2).

3.5. *Antioxidant capacity markers in the red blood cells and serum of subjects at baseline and after 30 days of intervention*

The antioxidant activity of GPX, GST, and SOD in the red blood cells decreased in control and probiotic groups ($p < 0.01$ for all enzymes) after 30 days of intervention. However, the probiotic group showed higher GPX and GST activities than the control group ($p = 0.041$ and < 0.0001 , respectively) (Figure 3), as the probiotic attenuated the reduction in activity of these enzymes ($\Delta_{\text{GPX probiotic}} = -9.41$, 25% of reduction; $\Delta_{\text{GST probiotic}} = -3.28$, 28% of reduction) compared to the control group ($\Delta_{\text{GPX control}} = -19.60$, 31% of reduction; $\Delta_{\text{GST control}} = -12.08$, 57% of reduction).

With respect to total serum antioxidant capacity, measured as FRAP value, no difference was observed after 30 days of treatment within groups, as well as between control and probiotic groups (Figure 4).

Table 1 – Baseline characteristics of volunteers.

Values expressed as mean \pm standard deviation or percentage. BMI: Body mass index. p: statistical differences between Δ (T30 – T0) values of the control and treatment groups.

3.6. Serum cytokine level of subjects at baseline and after 30 days of intervention

After 30 days of treatment, the serum levels of IL-8 and TNF- α increased in the control ($p = 0.006$ and 0.010 , respectively) and probiotic groups ($p < 0.0001$ for both). No difference was obtained in serum cytokine levels between groups.

Variables	Control (n = 23)	Probiotic (n = 25)	p
Sex			
Female n (%)	20 (90.9)	22 (88)	0.747
Male n (%)	3 (9.1)	3 (12)	
Age (years)	30.45 \pm 10.73	26.40 \pm 8.47	0.114
BMI (kg/m ²)	24.11 \pm 4.56	23.35 \pm 3.49	0.890
Income (R\$)	9,132.86 \pm 24,994.89	3,832.29 \pm 3,265.13	0.766
Years of study			
Up to 11 years n (%)	5 (22.7)	4 (16)	0.559
12 years and over n (%)	17 (77.3)	21 (84)	
Alcoholic beverage intake			
Yes n (%)	11 (50)	12 (48)	0.773
No n (%)	11 (50)	13 (52)	
Alcohol frequency			
Do not drink n (%)	11 (50)	13 (52)	0.102
Less than 1 time per week n (%)	10 (45.5)	6 (24)	
At least once a week n (%)	1 (4.5)	6 (24)	
Water intake			
Up to 1L n (%)	11 (50)	10 (40)	0.549
1-2 L n (%)	9 (40.9)	10 (40)	
More than 2L n (%)	2 (9.1)	5 (20)	

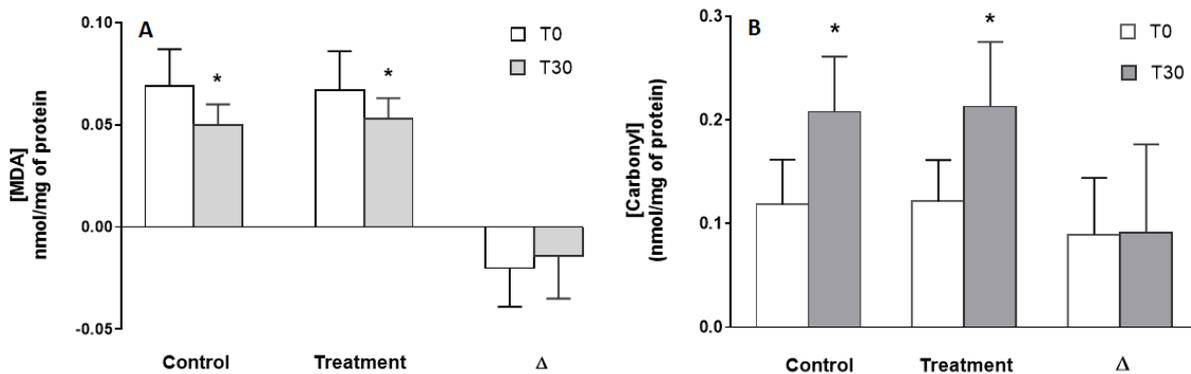


Figure 2. Effect of the probiotic consumption on serum oxidative damages: A) Malondialdehyde (MDA); B) Carbonylated Protein. T0: values at baseline. T30: values after 30 days of treatment. * Statistical differences between baseline (T0) and T30 in the same group.

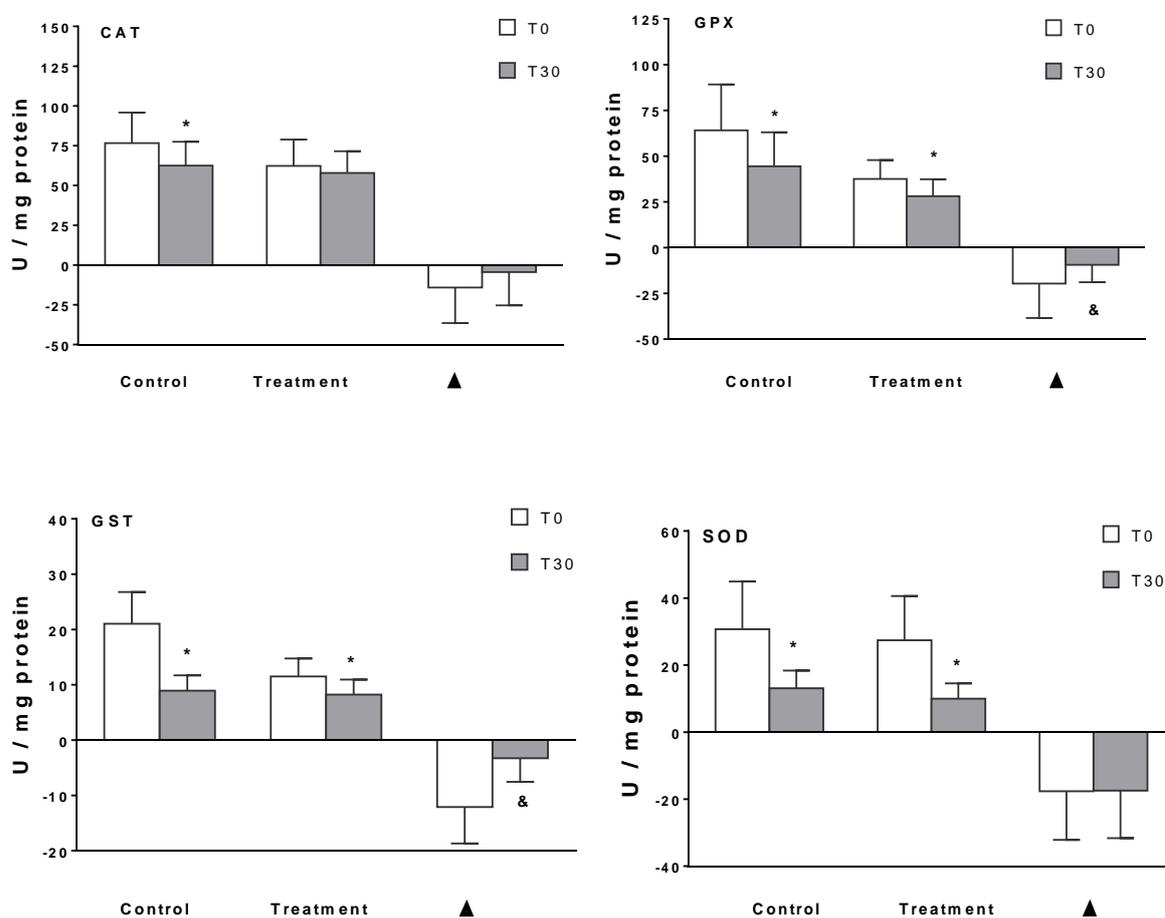


Figure 3. Effect of probiotic consumption on the antioxidant enzyme activities in red blood cells. CAT: catalase; GPX: glutathione peroxidase; GST: glutathione-s-transferase; SOD: superoxide dismutase. T0: values at baseline. T30: values after 30 days of treatment. * Statistical differences between baseline (T0) and T30 within group. & Statistical differences between groups using Δ (T30 – T0) values.

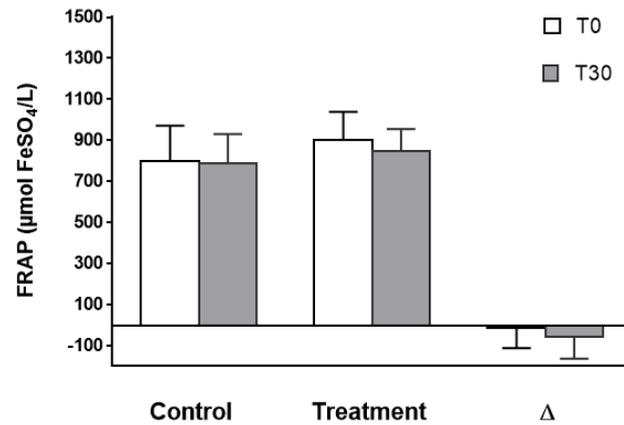


Figure 4 - Effect of probiotic consumption on the serum ferric reducing antioxidant power (FRAP). T0: values at baseline. T30: values after 30 days of treatment.

Table 2 – Energy, macronutrients and fiber intake and physical activity level of the volunteers at baseline and after 30 days of intervention.

Variables	Control (n = 20)			Probiotic (n = 25)			
	Baseline	T30	p ¹	Baseline	T30	p ¹	p ²
Energy (Kcal)	1,520.9 ± 561.2	1,572.9 ± 555.8	0.463	1,637.0 ± 534.9	1,696.1 ± 692.9	0.668	0.853
Carbohydrate (g)	178.9 ± 72.5	184.7 ± 75.8	0.653	198.8 ± 59.8	202.4 ± 83.9	0.797	0.916
Protein (g)	65.9 ± 23.2	69.2 ± 26.0	0.723	70.7 ± 30.5	72.8 ± 32.8	0.732	0.672
Lipids (g)	60.1 ± 24.5	61.9 ± 24.5	0.381	62.1 ± 29.3	66.2 ± 29.4	0.819	0.691
Fibers (g)	12.9 ± 6.2	11.1 ± 4.8	0.177	15.3 ± 5.8	13.4 ± 6.0	0.072	0.634
Total MET (min)	2,292.8 ± 3,504.6	1,842.8 ± 1,698.3	0.881	1,120.3 ± 1,054.5	1,146.2 ± 1,641.7	0.131	0.260

MET (Kcal)	2,737.4 ± 4,282.20	2,119.5 ± 1,948.9	0.970	1,189.7 ± 1,349.8	1,253.4 ± 1,922.3	0.093	0.431
------------	-----------------------	----------------------	-------	-------------------	----------------------	-------	-------

p^1 : statistical differences between baseline and T30 in the same group; p^2 : statistical differences between Δ (T30 – T0) values of the control and treatment groups; Kcal / D (VET): Kcal per day (total energy value); Total metabolic equivalents (MET): sum of MET-minutes of walking + moderate activity + vigorous activity; MET kcal: MET-minutes total x weight of individual/60 minutes. T30: after 30 days of intervention.

Table 3 - Effect of the probiotic supplementation on ROME IV criteria

ROME IV Criteria	Control (GC) (n = 20)		p^1	Probiotic (GF5) (n = 25)		p^1	p^2
	Baseline	T30		Baseline	T30		
Evacuation frequency - n (%)			0.007			0.003	0.346
1 time per week	3 (13.6%)	0		4 (16%)	0		
Less than 3 times a week	11 (50%)	2 (9.1%)		5 (20%)	2		
3 to 4 times a week	6 (27.3%)	10 (45.5%)		12 (48%)	14		
More than 4 times a week	2 (9.1%)	7 (31.8%)		4 (16%)	8		
Stool consistency - n (%)							
¼ of evacuations bristol scale 1 and 2	22 (100%)	8 (36.4%)	0.001	24 (96%)	17 (68%)	0.034	0.082
ROME IV Criteria							

Excessive exertion in at least ¼ of bowel movements- n (%)	18 (81.8)	11 (50)	0.020	19 (76)	11 (44)	0.021	0.908
Hardened and / or dry stools in at least ¼ of the stools- n (%)	19 (86.4)	11 (50)	0.011	22(88)	13(52)	0.007	0.785
Feeling of incomplete defecation in at least ¼ of bowel movements- n (%)	15 (68.1)	13 (59.1)	0.625	19 (76)	10 (40)	0.012	0.088
Blockage sensation or anorectal obstruction (%)	13 (59.0)	7 (31.8)	0.058	11 (44)	5 (20)	0.034	0.634
Manual maneuver- n (%)	6 (27.3)	2 (9.1)	0.046	6 (24)	3 (12)	0.257	0.626
Evacuation frequency less than 3 times per week- n (%)	19 (86.4)	12 (54.6)	0.008	17 (68)	16 (54)	0.197	0.286
Rarely presents liquid stools without the aid of laxatives- n (%)	18 (81.8)	17 (77.2)	0.477	23 (92)	18 (72)	0.020	0.120

P¹ statistical differences between baseline and T30 in the same group, non-parametric test. P² statistical differences between Δ (T30 – T0) values of the control and treatment groups, non-parametric test.

Table 4 - Effect of probiotic consumption on the serum cytokines profile of individuals with intestinal constipation.

Cytokine	Control				Probiotic				
	T0	T30	Δ	p ¹	T0	T30	p ¹	Δ	p ²
IL-1 β (pg/mL)	3.7 \pm 7.3	2.2 \pm 2.7	-1.5 \pm 5.9	0.433	1.7 \pm 1.7	1.8 \pm 2.0	0.889	0.1 \pm 2.5	0.263
IL-6 (pg/mL)	7.4 \pm 6.1	5.0 \pm .5	-2.4 \pm 5.9	0.097	6.6 \pm 4.3	5.0 \pm 0.7	0.106	-1.59 \pm 3.8	0.595
IL-8 (pg/mL)	23.2 \pm 29.3	88.1 \pm 64.9	64.9 \pm 70.6	0.006	22.9 \pm 26.9	63.4 \pm 52.4	0.010	40.48 \pm 48.1	0.316
IL-12 (pg/mL)	881.1 \pm 449.5	952.0 \pm 490.7	70.9 \pm 341.9	0.645	917.4 \pm 486.0	1,003.7 \pm 462.0	0.410	116.3 \pm 379.9	0.689
TNF- α (pg/mL)	6.1 \pm 4.0	14.8 \pm 6.3	8.6 \pm 7.3	< 0.001	7.1 \pm 5.3	17.4 \pm 10.1	< 0.001	10.3 \pm 9.7	0.557
MCP-1 (pg/mL)	315.6 \pm 130.6	284.6 \pm 185.4	-31.0 \pm 176.4	0.555	241.4 \pm 133.8	259.8 \pm 177.9	0.680	18.4 \pm 118.2	0.272
IL-10 (pg/mL)	5.9 \pm 2.0	6.2 \pm 1.1	0.3 \pm 2.7	0.574	6.2 \pm 1.6	6.1 \pm 1.6	0.762	-0.2 \pm 2.3	0.560

Data correspond to average \pm standard deviation. T0: values at baseline. T30: values after 30 days of treatment. p¹ Statistical differences comparing baseline versus T30 in the same group. p² statistical differences between Δ (T30 – T0) values of the control and treatment groups

4. Discussion

This study showed that the consumption of a multiple-strain probiotic product (5×10^9 UFC) *Lactobacillus acidophilus* (NCFM), *Lactobacillus casei* (Lc-11), *Lactococcus lactis* (Li-23), *Bifidobacterium lactis* (HN019), and *Bifidobacterium bifidum* (Bb-06) by individuals with intestinal constipation, for 4 weeks, attenuated the reduction of GPX and GST activity in red blood cells and marginally improved the symptoms, such as feeling of incomplete defecation in at least $\frac{1}{4}$ of bowel movements, compared to placebo group. No changes were observed in erythrocyte CAT activity, total antioxidant capacity, oxidative damage, and levels of inflammatory markers in the serum. To our knowledge, this is the first study to examine the effect of a multiple-strain probiotic on the biomarkers of oxidative stress and inflammation in adults with intestinal constipation.

Some studies have suggested that probiotic products might modulate the antioxidant/oxidant response. In a group of overweight and obese women, the consumption of a probiotic mixture (*Lactobacillus acidophilus* LA-14, *Lactobacillus casei* LC-11, *Lactococcus lactis* LL-23, *Bifidobacterium bifidum* BB-06, and *Bifidobacterium lactis* BL-4) with a dose of 1×10^9 CFU of each of the probiotic strains for 8 weeks promoted an increase in GPX activity in the serum, while no effect was observed in MDA concentration (Gomes et al., 2017). Vaghef-Mehrabany et al. (2016) did not observe any effect on SOD, CAT, and GPX activities, MDA concentration, and total antioxidant capacity, after 8 weeks of treatment with *L. casei* in patients with Rheumatoid arthritis. In the present study, it was observed that probiotic group had a lower decrease in GPX and GST activities in the erythrocytes compared to control group, suggesting that the probiotic product strengthened the antioxidant capacity in individuals with intestinal constipation.

Some cell-surface components of probiotic bacteria, such as proteins and polysaccharides, contribute to the antioxidant activity of some bacterial strains, especially lactic acid bacteria (Li et al., 2018; Li et al., 2012; Li et al., 2019; Rahbar Saadat, Yari Khosroushahi, Pourghassem Gargari, 2019). Purified fractions of an exopolysaccharide produced by *L. helveticus* KLDS1.8701 significantly increased hepatic SOD and GPX activities and reduced MDA both *in vitro* and *in vivo* (Li et al., 2019). SOD and GPX play important role in enzymatic defence against reactive oxygen species (ROS), protecting cellular membranes and biomolecules from oxidative damage (Halliwell and Gutteridge, 2015). Therefore, preserving the SOD and GPX antioxidant activity in the probiotic group

might improve cell membrane and biomolecule integrity, relieving intestinal constipation symptom (Wang et al., 2004; Zhou et al., 2005).

Although, the probiotic group showed an improvement in the enzymatic antioxidant defence, no difference was observed in non-enzymatic antioxidant defence, measured as FRAP value. Heshmati et al., (2018), in their systematic review and meta-analysis, evaluated the effect of the probiotic or symbiotics on oxidative stress and showed that studies administering probiotics or symbiotics for more than 6 weeks observed a significant increase in total antioxidant capacity, while studies with intervention lower than 6 weeks had no effect in this parameter. In our study, the probiotic was administrated for 4 weeks and total antioxidant capacity was similar between control and probiotic groups, supporting the hypothesis that a longer duration of probiotic supplementation is essential to alter this antioxidant marker.

The probiotic supplementation has been suggested as a therapeutic approach for intestinal constipation. These microorganisms modify the intestinal microbiota, increase short-chain fatty acids production, and consequently, decrease the pH in the colon, enhancing intestinal peristalsis (Bekkali et al., 2007; Valerio et al., 2010; Cummings et al., 1987). Riezzo et al. (2012) observed an improvement in the incomplete stool sensation in constipated patients treated for 15 days with artichokes enriched with *Lactobacillus paracasei* IMPC 2.1 (LMGP22043) compared to ordinary artichokes. On the other hand, Ding et al. (2016) evaluated the effect of a mixture of probiotics (Bifico capsules containing *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Enterococcus faecalis*) associated with pectin in patients with chronic constipation for 12 weeks, and after 4 weeks of intervention, no improvement was observed in incomplete stool sensation. However, after 12 weeks, this parameter was significantly improved in the treatment group compared to the non-probiotic group. Our 4-week intervention study showed a marginal improvement in the feeling of incomplete defecation in at least ¼ of bowel movement in the probiotic group compared to the placebo group. Since no difference was observed in the lifestyle variables, such as energy and macronutrients intake and physical activity level during the intervention period, the beneficial effect described could be attributed to the probiotic. Therefore, it can be speculated that multi-strain probiotic product could be more effective in relieving the intestinal constipation symptoms if administered for a longer period.

In the present study, the multi-strain probiotic product administered for 4 weeks did not affect serum anti-inflammatory and proinflammatory cytokine profiles. Although the immune system seems to play a role in gut motility, where IL-1 β decreases smooth muscle contractility, these effects are described mainly in inflammatory bowel diseases, such as colitis and irritable bowel syndrome (Akiho et al, 2011, Dimidi et al, 2017). Shadnousha et al. (2013) observed a significant reduction in the levels of IL-1 β and TNF- α and an increase in the levels of IL-6 and IL-10 in patients with inflammatory bowel disease in remission treated with probiotic yogurt compared to the control group treated with plain yogurt, for 8 weeks. We could not find any studies that investigated the effect of probiotics on constipation and immune response in humans, which limited our data comparison with literature.

In this study, we analysed a broad spectrum of redox response biomarkers and the experimental design was robust. However, some limitations of the study included the non-adjustment of the model according to the subtypes of constipation and the intervention time (4 weeks). A longer treatment time may lead to more prominent changes in the intestinal constipation variables and in redox and inflammatory responses by the probiotic product, although 4 weeks of intervention period is commonly observed to be used in previous literature.

5. Conclusion

In conclusion, we found that 4 weeks of treatment with a multiple-strain probiotic product was effective in maintaining a greater enzymatic antioxidant response and in relieving intestinal constipation symptoms, leading to better intestinal health.

Acknowledgments

This study was funded by the pharmaceutical company Cifarma Científica Farmacêutica, Goiânia, Goiás. We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship.

Author Contributions: Conceived and designed the experiments: Patrícia Borges Botelho, Ananda de Mesquita Araújo and Sandra Fernandes Arruda and. Performed the experiments: Ananda de Mesquita Araújo. Analyzed the data: Ananda de Mesquita Araújo, Patrícia Borges Botelho and Sandra Fernandes Arruda. Contributed

reagents/materials/analysis tools: Patrícia Borges Botelho and Sandra Fernandes Arruda. Wrote the paper: Ananda de Mesquita Araújo, Patrícia Borges Botelho and Sandra Fernandes Arruda. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

Aebi H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105 (C) , pp. 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

Akerboom T., Sies H. (1981). Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol.** 77, 373–382. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77050-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77050-2)

Akiho H., Ihara E., Motomura Y., Nakamura K. (2011). Cytokine-induced alterations of gastrointestinal motility in gastrointestinal disorders. *World J Gastrointest Pathophysiol.* Oct 15;2(5):72-81. doi: 10.4291/wjgp.v2.i5.7.

Barbara G., Feinle-Bisset C., Ghoshal U. C., Quigley E. M., Santos J., Vanner S., Vergnolle N., Zoetendal E.G. (2016). The Intestinal Microenvironment and Functional Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology.* Feb 18. pii: S0016-5085(16)00219-5. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.028. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.02.028.

Bekkali N.L., Bongers M.E., Van den Berg M.M., et al. (2007). The role of a probiotics mixture in the treatment of childhood constipation:a pilot study. *Nutr J.* 6:17–22. doi: 10.1186/1475-2891-6-17.

Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239 (1), 70–76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.

Bischoff S.C., Barbara G., Buurman W., et al.. (2014). Intestinal permeability: a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*;14:189. <https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>; PMID: 25407511.

Çıralı C., Ulusoy E., Kume T., Arslan N. (2018). Elevated serum neopterin levels in children with functional constipation: association with systemic proinflammatory cytokines (2018). *World Journal of Pediatrics* <https://doi.org/10.1007/s12519-018-0144-8>.

Cummings J.H., Pomare E.W., Branch W.J., et al. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* 1987;28:1221–1227. doi: 10.1136/gut.28.10.1221.

Dimidi E., Christodoulides S., Scott S.M., Whelan K. (2017). Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation. *Adv Nutr.* 2017 May 15;8(3):484-494. doi: 10.3945/an.116.014407.

Ding C., Ge X., Zhang X., et al. (2016). Efficacy of synbiotics in patients with slow transit constipation: a prospective randomized trial. *Nutrients*;8. pii: E605. DOI: 10.3390/nu8100605.

Eckburg PB, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005; 308:1635–1638. doi:1110591 [pii]10.1126/science.1110591. [PubMed: 15831718]

Gomes A.C., de Sousa R.G., Botelho P.B., et al. (2017). The additional effects of a probiotic mix on abdominal adiposity and antioxidant Status: A double-blind, randomized trial. *Obesity*;25:30–8.doi: 10.1002/oby.21671.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fifth Edition. Oxford University Press. Oxford, United Kingdom. 2015. ISBN 978-0-19-102699-7.

Hartree E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.*; 48(2):422-7. doi: 10.1016/0003-2697(72)90094-2

Heshmatia J., Farsib F., Shokrid F., Rezaeinejade M., Almasi-Hashianif A., Vesalif S., Sepidarkishf M. (2018). A systematic review and meta-analysis of the probiotics and synbiotics effects on oxidative stress. *Journal of Functional Foods* 46; 66–84. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.049>.

Jabri, M. A., Wannas, D., Hajji, N., Sakly, M., Marzouki, L., & Sebai, H. (2017). Role of laxative and antioxidant properties of *Malva sylvestris* leaves in constipation treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.020>.

Joanisse D. R. and Storey K. B. (1996). Fatty acid content and enzymes of fatty acid metabolism in overwintering cold-hardy gall insects. *Physiol. Zool.* doi: 10.2307/30164247

Habig W. H., JAKOBY W. B (1981). Glutathione S-Transferase (rat and human). *Methods in Enzymology*, [S.I.], v. 77, n. 27, p. 218-239. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77029-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77029-0).

Hartree E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.*; 48(2):422-7. doi: 10.1016/0003-2697(72)90094-2

Kamada N., Seo S. U., Chen G.Y., Núñez G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Rev Immunol.* May;1(5):321-35. doi: 10.1038/nri3430

Khalif I. L., Quigley E. M. Konovitch EA, Maximova ID (2005). Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Dig Liver Dis.* Nov;37(11):838-49. DOI: 10.1016/j.dld.2005.06.008

Kruszewska D., Lan, J., Lorca G., Yanagisawa N., Marklinder I. and Ljungh Å. (2002). Selection of Lactic Acid Bacteria as probiotic strains by in vitro tests. *Microb. Ecol. Health Dis.* 29;37–49.

Li B., Du P., Smith E.E., Wang S., Jiao Y., Guo L., Huo G., Liu F. (2019). In vitro and in vivo evaluation of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* KLDS1.8701 for the alleviative effect on oxidative stress. *Food Funct.* Mar 20;10(3):1707-1717. doi: 10.1039/c8fo01920g.

Li B., Evivie S.E., Lu J., Jiao Y., Wang C., Li Z., Liu F., Huo G. (2018). *Lactobacillus helveticus* KLDS1.8701 alleviates d-galactose-induced aging by regulating Nrf-2 and gut microbiota in mice. *Food Funct.* Dec 13;9(12):6586-6598. doi: 10.1039/c8fo01768a.

Li S., Zhao Y., Zhang L., Zhang X., Huang L., Li D., Niu C., Yang Z., Wang Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chem.* Dec 1;135(3):1914-9. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.048. Epub 2012 Jun 29. *Food Funct.* Mar 20;10(3):1707-1717. doi: 10.1039/c8fo01920g.

Lindberg G., Hamid S. S., Malfertheiner P., Thomsen O. O, Fernandez L. B., Garisch J. et al. (2011). World Gastroenterology Organisation. World Gastroenterology Organisation global guideline: constipation a global perspective. *J Clin Gastroenterol*;45:4837. doi: 10.1097/MCG.0b013e31820fb914..

Matsudo S., Araujo T., Matsudo V., Andrade D., Andrade E., Oliveira L.C., Braggion G. (2001). QUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FISICA (I PAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. Centro de Estudos do Laboratório de Aptidão Física de São Caetano do Sul- CLAFISCS & Programa Agita - São Paulo, SP. doi: <https://doi.org/10.12820/rbafs.v.6n2p5-18>.

- Miller L.E., Ouwehand A.C., Ibarra A. (2017). Effects of probiotic-containing products on stool frequency and intestinal transit in constipated adults: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Gastroenterol.* 30(6):629-639. doi: 10.20524/aog.2017.0192. Epub 2017 Sep 21.
- Mokhtare M., Alimoradzadeh R., Agah S., Mirmiranpour H., Khodabandehloo N. (2017). The Association between Modulating Inflammatory Cytokines and Constipation of Geriatrics in Iran. *Middle East J Dig Dis.* Oct;9(4):228-234. doi: 10.15171/mejdd.78.
- Mugie S. M., Benninga M. A., Di Lorenzo C. (2011). Epidemiology of constipation in children and adults: a systematic review. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25(1):3-18. doi: 10.1016/j.bpg.2010.12.010.
- Pryde, S., Duncan, S., Hold, G., Stewart, C. and Flint, H. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 217: 133–139. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11467.x.
- Saadat R.Y., Khosroushahi A. Y., Pourghassem G. B (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydr Polym.* Aug 1;217:79-89. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.025. Epub 2019 Apr 20.
- Riezzo G., Orlando A., D'Attoma B., Guerra V., Valerio F., Lavermicocca P., et al (2012). Randomised clinical trial: efficacy of *Lactobacillus paracasei*-enriched artichokes in the treatment of patients with functional constipation—a doubleblind, controlled, crossover study. *Aliment Pharmacol Ther.* 35:441–50. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04970.x.
- Rtibi K., Grami D., Selmi S., Amri M., Sebai H., and Marzouk L. (2017). Vinblastine, an anticancer drug, causes constipation and oxidative stress as well as others disruptions in intestinal tract in rat. *Toxicol Rep.*; 4: 221–225. May 6. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.04.006.
- Shadnoush M., Shaker Hosseini R., Mehrabi Y., Delpisheh A., Alipour E., Faghfoori Z., et al. (2013). Probiotic yogurt affects pro-inflammatory and anti-inflammatory factors inpatients with inflammatory bowel diseases. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4), 929-36.
- Singh S., Sharma R.K., Malhotra S., Pothuraju R., Shandilya U.K. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* NCDC17 ameliorates type-2 diabetes by improving gut function, oxidative stress and inflammation in high-fat-diet fed and streptozotocintreated rats. *Benef Microbes.* 2017 Apr 26;8(2):243-255. doi: 10.3920/BM2016.0090.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an antiinflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 16731–16736. doi: 10.1073/pnas.0804812105.
- Vaghef-Mehrabany E., Homayouni-Rad A., Alipour B., Sharif S.K., Vaghef-Mehrabany L. and Alipour-Ajiry S. (2015). Effects of probiotic supplementation on oxidative stress indices in women with rheumatoid arthritis: a randomized double-blind clinical trial. *Journal of the American College of Nutrition*, 2016. doi: 10.1080/07315724.2014.959208.
- Valerio F., Russo F., de Candia S., Riezzo G., Orlando A., Lonigro S.L., Lavermicocca P. (2010). Effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* enriched artichokes on constipated patients: a pilot study. *J Clin Gastroenterol.* Sep;44 Suppl 1:S49-53. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181d2dca4.
- Zhao Y., Yu Y. B. (2016). Intestinal microbiota and chronic constipation. *Springerplus* (2016).. Jul 19;5(1):1130. https://doi: 10.1186/s40064-016-2821-1.
- Zhou J.F., Lou J.G., Zhou S.L., and Wang J. (2005). Potential oxidative stress in children with chronic constipation. *World J Gastroenterol.* Jan 21; 11(3): 368–371. doi: 10.3748/wjg.v11.i3.368.

Waller P.A., Gopal P.K., Leyer G.J., Ouwehand A.C., Reifer C., Stewart M.E., Miller L.E. (2011). Dose-response effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. *Scand J Gastroenterol.* 2011 Sep;46(9):1057-64. doi: 10.3109/00365521.2011.584895.

Wang B.G., Xu H.B., Xu F., Zeng Z.L., Wei H. (2016). Efficacy of oral *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 on microflora and antioxidant in mice. *Can J Microbiol.* Mar;62(3):249-62. doi: 10.1139/cjm-2015-0685.

Wang J.Y., Wang Y.L., Zhou S.L., Zhou J.F. (2004). May Chronic Childhood Constipation Cause Oxidative Stress and Potential Free Radical Damage to Children?. *Biomed Environ Sci.* Sep;17(3):266-72.

World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry - Report of a WHO expert committee. Geneva: WHO, 1995, p. 328.

ANEXOS

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO – CRITÉRIO ROMA IV

Nome _____ Ordem: _____
 Dia: ___ / ___ / ___

CRITÉRIOS DE ROME IV

Responda a essas perguntas sobre como funciona o seu intestino nos últimos seis meses, sem o auxílio de medicamentos ou fitoterápicos.

- 1) Realiza esforço excessivo para fazer cocô em pelo menos uma de cada quatro vezes que você faz?

Sim () Não ()

- 2) Em pelo menos uma de cada quatro vezes que você faz cocô apresenta fezes endurecidas ou ressecadas (Tipos 1 e 2 Bristol)?

Sim () Não ()

- 3) Apresenta sensação de defecação incompleta em pelo menos uma de cada quatro vezes que você faz cocô?

Sim () Não ()

- 4) Sensação de bloqueio ou obstrução anorretal pelo menos em uma a cada quatro vezes que você faz cocô?

Sim () Não ()

- 5) Realiza manobra manual em pelo menos uma de cada quatro vezes que você faz cocô?

Sim () Não ()

- 6) Com que frequência você faz cocô? (menos de 3 vezes por semana)

Menos de uma vez por semana () Uma vez por semana ()

Menos que três vezes por semana? () Mais que quatro vezes por semana ()

- 7) Você eventualmente apresenta fezes líquidas sem o auxílio de laxantes?

Sim () Não () Raramente ()

ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – IPAQ

QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA

Nome: _____

Data: ____/____/____ Sexo: M() F()

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

Dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nesses dias, que você me disse, quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**? horas: _____ Minutos: _____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dia: _____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nesses dias, que você me disse, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**? horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo: correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

3b Nesses dias, que você me disse, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**? horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**? _____ horas _____ minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**? _____ horas _____ minutos

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa. Meu nome é Patrícia Borges Botelho, sou nutricionista e Professora na Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás. Após ler com atenção este documento você será esclarecido (a) sobre as informações a seguir. No caso de aceitar fazer parte do estudo, assine todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias. Este documento também será assinado por mim. Uma das vias é sua e a outra é minha. Em caso de recusa ou de desistência, você não será penalizado (a) de forma alguma.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato a cobrar comigo: Patrícia Borges Botelho (62) 3209-6270 (ramal 222), Endereço: Rua 227 Qd. 68 s/nº - Setor Leste Universitário - Goiânia - Goiás - Brasil - CEP: 74.605-08. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás, situado no Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

Título do projeto: Efeito dos probióticos sobre a saúde intestinal em adultos e idosos saudáveis: influência do tipo de cepa, dose e forma de administração.

Probióticos são produtos contendo micróbios considerados benéficos para o seu organismo, pois ajudam a proteger o nosso corpo de outras bactérias, vírus e fungos que causam diarreia e outras infecções.

O objetivo desse estudo será avaliar o efeito do uso do probiótico sobre a saúde intestinal e escolher qual o tipo de probiótico mais indicado para isso entre 6 opções.

Você será informado de cada passo do estudo, que são:

- 1 – Consulta inicial: Neste momento, você será informado de todas as etapas do estudo e em caso de aceitar participar do estudo dará o seu livre

consentimento. Durante o estudo você não poderá consumir suplementos, leite fermentado e iogurtes;

2 Segunda consulta: Coleta de dados socioeconômicos e estilo de vida: Entrevista que ocorrerá na Clínica escola da FANUT-UFG, por aproximadamente 20 minutos. São informações sobre dados pessoais, renda da família, histórias de doenças na família e outras perguntas sobre estilo de vida. Você tem direito de não responder as perguntas que possam trazer constrangimentos de qualquer natureza.

- Avaliação do consumo alimentar: Será realizado também o recordatório de 24h em que você relatará todos os alimentos consumidos durante o dia anterior, bem como as quantidades e horários das refeições. Com isso, poderemos conhecer um pouco mais sobre sua alimentação.

- Questionário sobre saúde intestinal e entrega de um caderno que será seu diário, onde você anotarà tudo o que sentiu durante o tratamento, a frequência e a consistência de suas fezes.

- Coleta de sangue e de fezes: Você deverá ficar em jejum por 12h e serão coletados cerca de 10 mL de sangue.

- Neste momento, você deve entregar também o frasco contendo as fezes. A coleta é feita evacuando sobre plástico limpo e seco, evitando o contato com água ou urina. Transferir uma parte do material para o frasco de coleta. É importante que esta coleta das fezes seja realizada no dia da entrega ou na noite anterior. Nesse caso o frasco pode ser guardado na geladeira para ser entregue na manhã seguinte.

Após todos os procedimentos, será servido um lanche.

- Entrega dos saches: Você receberá 30 sachês contendo o probiótico ou placebo os quais deverá ingerir diariamente durante os 30 dias, em jejum pela manhã com 100ml de água. Durante este período, pedimos que mantenha os hábitos alimentares apresentados no início do estudo.

- Serão entregues 3 formulários de Registro Alimentar os quais você deverá preencher 3 dias antes da sua cirurgia, conforme for orientado pelos pesquisadores.

3 - Terceira consulta: Após 30 dias, você deverá retornar a Clínica Escola FANUT/UFG e serão realizados os mesmos procedimentos da segunda consulta.

4- Quarta consulta- Ao final do estudo será agendado uma última consulta em que você receberá os resultados dos seus exames e orientações nutricionais.

DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa serão divulgados das seguintes maneiras:

- Retorno dos resultados dos exames de sangue e da avaliação nutricional aos pacientes por meio de consultas individuais.
- Publicação em artigos científicos de revistas internacionais e nacionais;
- Divulgação da dissertação de mestrado no site do Mestrado em Nutrição e Saúde da UFG. No entanto, todas as informações coletadas nesse estudo são confidenciais e somente os pesquisadores terão acesso aos dados e os mesmos serão divulgados de forma conjunta, sem citar nomes dos participantes.

APÊNDICE B – DIÁRIO DE FUNCIONAMENTO INTESTINAL

Tipo 01		Pedaços separados, duros como amendoim
Tipo 02		Forma de salsicha, mas segmentada
Tipo 03		Forma de salsicha, mas com fendas na superfície
Tipo 04		Forma de salsicha ou cobra, lisa e mole
Tipo 05		Pedaços moles, mas contornos nítidos
Tipo 06		Pedaços aerados, contornos esgarçados
Tipo 07		Aquosa, sem peças sólidas

Olá! Vamos começar o nosso acompanhamento?! Marque um X no dia da semana em que você evacuar. No quadrado abaixo coloque o número correspondente à consistência das fezes naquele dia, de acordo com a imagem ao lado. *Exemplo:*

		Novembro 2017						
		Dom.	Seg.	Ter.	Qua.	Qui.	Sex.	Sab.
		12	✖	14	✖	16	17	18
Tipo:			4		3			

Lembre-se de anotar todos os dias que você conseguir evacuar!



APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO DE SAÚDE INTESTINAL**Questionário de Avaliação da Saúde Intestinal**

Nome: _____

Data: ____/____/____ Ordem: _____

1) Como você considera seu desconforto abdominal nos últimos 7 dias comparado a um mês antes de iniciar o uso do produto?

- Um pouco aliviado
- Sem mudanças
- Piorou um pouco
- Piorou consideravelmente

2) Como você avalia a sua dor abdominal nos últimos 7 dias comparado a um mês antes de iniciar o uso do produto?

- Nenhuma
- Suave
- Moderada
- Severa
- Insuportável

3) Como você avalia o inchaço abdominal nos últimos 7 dias comparado a um mês antes de iniciar o uso do produto?

- Nenhuma
- Suave
- Moderada
- Severa
- Insuportável