Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Puericultura e Pediatria

Priscilla Rezende de Abreu Ferreira

Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e
intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo

Ribeirão Preto
2018

Priscilla Rezende de Abreu Ferreira

Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de mestre

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof. Dra. Regina Sawamura

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ferreira, Priscilla Rezende de Abreu

Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em espinha bífida: estudo comparativo, 2018

121 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientadora: Sawamura, Regina

1. Microbiota intestinal. 2. Constipação intestinal funcional 3. Espinha Bífida

FICHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ferreira, Priscilla Rezende de Abreu

Título: Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de mestre

Aprovado em 11 de setembro de 2018

Banca Examinadora

Prof. Dr Fábio Carmona

Julgamento:_____

Instituição: USP-FMRP

Assinatura:_____

Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves

Julgamento:_____

Instituição: USP-SP

Assinatura:_____

Profa. Dra Vera Lúcia Sdepanian

Julgamento:_____

Instituição: UNIFESP

Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãs e sobrinhos, por permitirem que eu conquistasse meus sonhos graças ao carinho, amor, apoio e dedicação que sempre tiveram por mim.

Ao meu namorado, que esteve sempre comigo, nos bons e maus momentos e cuidando sempre.

Agradeço a todos vocês pela paciência e compreensão com minha ausência durante esta longa jornada.

Amo vocês!

AGRADECIMENTO

À Profa. Dra. Regina Sawamura, agradeço pela oportunidade recebida, orientação e contribuição em meu aprimoramento profissional.

Ao amigo Ramon e à Ana Júlia Marchry , pela colaboração, apoio e ajuda nas etapas laboratoriais deste trabalho.

À Dra. Ana Gabriela, pela amizade e por estar presente nos momentos de ansiedade me tranquilizando.

À Profa. Dra. Carla pela enorme ajuda e apoio para conclusão desse projeto.

Ao meu querido Vinícius, pela paciência, incentivo e compreensão. E por estar sempre ao meu lado.

À minha família, meus pais, minhas irmãs e meus sobrinhos por todo apoio, amor, dedicação e por tudo que representam em minha vida.

Ao Departamento de Pediatria da FMRP-USP e à FAEPA, pelo apoio financeiro

RESUMO

FERREIRA, Priscilla Rezende Abreu. Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo. (Tese de mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto universidade de São Paulo

A microbiota gastrointestinal humana normal é um ecossistema complexo constituído por microrganismos anaeróbios que desempenham papel fundamental na manutenção da saúde e de funções fisiológicas do hospedeiro. O presente estudo objetivou caracterizar a microbiota intestinal de pacientes portadores de constipação funcional e de pacientes com espinha bífida e intestino neurogênico e compará-las com pacientes saudáveis. Estudo transversal inclui 25 crianças com constipação funcional, 25 pacientes saudáveis e 14 pacientes com intestino neurogênico e espinha bífida. A metodologia molecular foi utilizada para determinação do perfil da microbiota intestinal. O DNA total das amostras de fezes foi extraído com o kit QIAamp DNA Stool®-QIAGEN e realizado sequenciamento do gene 16S rRNA (MiSeq (Illumina)). As sequências obtidas foram processados no QUIIME. A análise dos dados obtidos foi realizada por meio de estatística descritiva. A diversidade e riqueza da microbiota intestinal foi avaliada pelos índices Shannon, Simpson e Chao e a contribuição de outras variáveis (sexo, tempo de amamentação exclusiva, uso de medicação nos pacientes constipados, tipo de parto e presença de sintomas no momento da coleta da amostra de fezes) foi obtida por análises multivariada. Firmicutes foi o filo mais predominante seguido do filo Bacteroidetes nos três grupos de estudo. Bifidobacterium foi mais abundante nos constipados funcionais do que nos saudáveis. O filo Tenericutes foi mais abundante em pacientes que nasceram por parto cesárea se comparados com parto vaginal independente do grupo de estudo. Participantes sintomáticos no momento da coleta, apresentaram maior abundância do gênero Ruminoclostridium em relação aos indivíduos assintomático, independente do grupo de estudo. No grupo dos pacientes saudáveis, os participantes sintomáticos no momento da coleta possuíam nível maior do gênero Phascolarctobacterium. Quanto ao sexo, tempo de amamentação exclusiva e medicações utilizadas para tratamento da doença, não foram encontradas nenhuma diferença na microbiota entre os grupos. Concluimos, portanto, que pacientes com constipação intestinal funcional apresentaram maior abundância de Bifidobacterium, em relação ao grupo controle, tal achado não foi observado no grupo de intestino neurogênico.

Palavras chaves: microbiota intestinal, constipação intestinal funcional, espinha bífida

ABSTRACT

FERREIRA, Priscilla Rezende Abreu. Intestinal microbiota of pediatric patients with functional constipation and patients with neurogenic bowel in spina bifida: A comparative study. (Tese de mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto universidade de São Paulo

The human gastrointestinal microbiota is a complex ecosystem consisting of anaerobic microorganisms that play a key role in maintaining the health and physiological functions of the host. The present study aimed to characterize the intestinal microbiota of patients with functional constipation and patients with spina bifida and neurogenic gut and to compare them with healthy patients. A cross-sectional study included 25 children with functional constipation, 25 healthy patients and 14 patients with neurogenic gut and spina bifida. The molecular methodology was used to determine the profile of the intestinal microbiota. Total DNA from the faeces samples was extracted with the QIAamp DNA Stool®-QIAGEN kit and sequenced the 16S rRNA gene (MiSeq (Illumina)). The sequences obtained were processed in QUIIME. Data analysis was performed using descriptive statistics. The diversity and richness of the intestinal microbiota was evaluated by the Shannon, Simpson and Chao indices and the contribution of other variables (sex, exclusive breastfeeding time, use of medication to treat constipation, type of delivery and presence of symptoms in the sampling time) was obtained by multivariate analysis. Firmicutes was the most predominant phylum followed by the phylum Bacteroidetes in the three study groups. Bifidobacterium was more abundant in patients with functional constipation than in healthy ones. The phylum Tenericutes was more abundant in patients who were born by cesarean section compared to vaginal delivery independent of the study group. Symptomatic participants at the time of collection had greater abundance of the genus Ruminoclostridium in relation to the asymptomatic individuals, independent of the study group. In the group of healthy patients, the symptomatic participants at the time of collection had a higher level of the genus Phascolarctobacterium. Regarding sex, exclusive breastfeeding time and medications used to treat the disease, no difference was found in the microbiota between the groups. We conclude, therefore, that patients with functional intestinal constipation had a greater abundance of Bifidobacterium, in relation to the control group, such finding was not observed in the group of neurogenic intestine.

Key words: intestinal microbiota, functional constipation, spina bifida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho do gene 16S rRNA com base na sequência de <i>E.coli</i> (BROSIUS, 1981)....	15
Figura 2 - Caracterização da coleta de dados.....	32
Figura 3 - Índice de Shannon para diversidade entre grupos analisando os principais filos.....	37
Figura 4 - Taxa da abundância relativa dos principais filos encontrados entre os grupos.....	38
Figura 5 - Abundância relativa dos filos em cada indivíduo estudado.....	41
Figura 6 - Taxa da abundância relativa dos principais gêneros encontrados entre os grupos....	44
Figura 7 - Abundância relativa dos gêneros em cada indivíduo estudado.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização da população de estudo.....	33
Tabela 2 -	Dados clínicos da população de estudo.....	34
Tabela 3 -	Caracterização da população de estudo: tempo de amamentação, via de parto...	35
Tabela 4 -	Número sequências de 16S RNA encontradas por paciente.....	36
Tabela 5 -	Índices de alfa diversidade observados nos grupos de estudo.....	37
Tabela 6 -	Teste de efeito entre os grupos de participante x filos encontrados.....	38
Tabela 7 -	Teste de efeito entre o tempo de amamentação exclusiva x filos encontrados (independente do grupo).....	39
Tabela 8 -	Teste de efeito entre o sexo dos participantes x filos encontrados (independente do grupo).....	40
Tabela 9 -	Teste de efeito entre sintomas atuais x filos encontrados (independente do grupo).	40
Tabela 10 -	Teste de efeito entre uso de medicação x filos bacterianos encontrados (independente do grupo).....	40
Tabela 11 -	Teste de efeito entre tipo de parto x filos bacterianos encontrados (independente do grupo)	42
Tabela 12 -	Teste de efeito entre grupo * sexo/filos.....	42
Tabela 13 -	Teste de efeito entre grupo * tempo de amamentação exclusiva/filos.....	42
Tabela 14 -	Teste de efeito entre grupo * sintomas atuais/filos.....	43
Tabela 15 -	Teste de efeito entre grupo * uso de medicação/filos.....	43
Tabela 16 -	Teste de efeito entre os grupos de estudo x gêneros.....	46
Tabela 17 -	Teste de efeito entre o sexo dos participantes x gêneros (independentes do grupo).....	47
Tabela 18 -	Teste de efeito entre sexo dos participantes x gêneros, de acordo com os grupos de estudo.....	47
Tabela 19 -	Teste de efeito entre o tempo de amamentação exclusiva dos participantes x gênero (independente do grupo).....	49
Tabela 20 -	Teste de efeito entre o tempo de amamentação exclusiva dos participantes x gêneros, de acordo com os grupos de estudo.....	49
Tabela 21 -	Teste de efeito entre os sintomas atuais dos participantes x gêneros (independente do grupo).....	51
Tabela 22 -	Teste de efeito entre os sintomas atuais dos participantes x gêneros, de acordo com os grupos de estudo.....	52

Tabela 23- Teste de efeito entre o uso de medicação atual dos participantes x gêneros (independente do grupo).....	53
Tabela 24 - Teste de efeito entre o uso de medicação atual dos participantes x gêneros, de acordo com grupo de estudo.....	54
Tabela 25 - Teste de efeito entre o tipo de parto x gêneros (independente do grupo).....	55
Tabela 26 - Teste de efeito entre o tipo de parto dos participantes x gêneros, de acordo com os grupos de estudo.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AME	Aleitamento materno exclusivo
FAEPA	Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
LI	Lavagem intestinal
Mg	Leite de Magnésia
NaCl	Cloreto de sódio
OM	Óleo mineral
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico
UFC.g ⁻¹	Unidade formadora de colônia por grama
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 HIPÓTESE	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo primário	21
3.2 Objetivos secundários	21
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
4.1 Desenho do estudo	22
4.3 Critérios de inclusão	23
4.4 Critérios de não inclusão	23
4.5 Critérios de exclusão	23
4.6 Coleta de dados	24
4.7 Delineamento experimental	24
4.8 Determinação da microbiota intestinal	24
4.8.1 Extração de DNA genômico fecal	25
4.8.2 Quantificação do DNA	26
4.8.3 Sequenciamento de DNA nova geração	26
4.8.3.1. Amplificação de sequências-alvo	26
4.8.3.2. Purificação dos produtos da PCR	27
4.8.3.3. Reação de PCR para anexo dos adaptadores	27
4.8.3.4. Purificação da biblioteca final	28
4.8.3.5. Preparo do pool equimolar das bibliotecas amplificadas	28
4.8.3.6. Processamento das sequências obtidas por bioinformática	29
4.9 Análise Resultados	30
4.9.1 Alfa diversidade	30
4.9.2 Análise estatística	31
4.10 Tamanho amostral	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Caracterização da população de estudo	33
5.2 Análise da microbiota intestinal	36
5.2.1 Alfa diversidade	36
5.2.3 Abundância relativa dos gêneros encontrados	44
6 DISCUSSÃO	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹	62
8 ANEXOS	68
ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO	68
ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO POPULAÇÃO SAUDÁVEL	71

ANEXO 3: TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO	74
ANEXO 4: QUESTIONÁRIO CLÍNICO SÓCIO DEMOGRÁFICO	76
ANEXO 5: ESCALA FECAL DE BRISTOL (MARTINEZ, A.P; AZEVEDO, G.R., 2012).	78
ANEXO 6: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	79
ANEXO 7: Pós teste do efeito entre o sexo dos participantes x filos encontrados (independente do grupo)	80
ANEXO 8: Pós teste do efeito entre sintomas atuais x filos encontrados (independente do grupo)	81
ANEXO 9 - Pós teste de efeito entre uso de medicação x filos bacterianos encontrados (independente do grupo)	82
ANEXO 10: Pós teste do efeito entre tipo de parto x filos bacterianos encontrados (independente do grupo)	83
ANEXO 11: Pós teste do efeito grupo*medicação/filo	85
ANEXO 12: Pós teste do efeito entre grupos de estudo e gênero	88
ANEXO 13: Pós teste Sexo x Gêneros (Independente do Grupo)	92
ANEXO 14: Pós teste Sexo x Gêneros, de acordo com os grupos de estudo	94
ANEXO 15: Pós teste Sintomas Atuais x Gêneros (Independente do Grupo)	98
ANEXO 16: Pós teste Sintomas Atuais x Gêneros, de acordo com os grupos de estudo	100
ANEXO 17: Pós teste Tipo de parto x Gêneros (Independente do Grupo)	104
ANEXO 18: Pós teste Tipo de parto x Gêneros, de acordo com os grupos de estudo	108

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal humana representa um ecossistema complexo constituído por diversas espécies de microrganismos, cujas bactérias anaeróbias constituem o grupo com maior diversidade e abundância e desempenham papel fundamental na manutenção da saúde e de funções fisiológicas do hospedeiro (BENGMARK, 1998; MACHADO et al., 2015). O termo microbioma descreve o genoma de todos os simbiontes microbianos que colonizam o corpo humano (TURNBAUGH et al., 2007).

As bactérias presentes no trato gastrointestinal podem ser autóctones ou alóctones. Linhagens autóctones convivem harmonicamente com o hospedeiro, tornando-se patogênicas somente quando há um desequilíbrio do ecossistema. Esta população de bactérias, uma vez estabelecida, tende a ser estável em tamanho e ao longo do tempo. Bactérias alóctones são organismos provenientes do meio ambiente, principalmente dos alimentos ingeridos, são detectáveis por períodos limitados e não colonizam o intestino, exceto em circunstâncias adversas (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999; LEY; PETERSON; GORDON, 2006).

A microbiota intestinal tem papel fundamental na proteção do hospedeiro contra patógenos. Este fenômeno é conhecido como “resistência à colonização” ou “efeito barreira”. A produção de substratos que inibem o crescimento das bactérias patogênicas, competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão são mecanismos usados pelas bactérias autóctones (GARRETT et al., 2010; VRIEZE et al., 2010).

A mucosa intestinal é a principal interface entre o sistema imunológico e o ambiente externo. A microbiota intestinal é importante para o desenvolvimento e modulação do sistema imunológico. Estudos compararam animais em condição *germ free* e animais colonizados por bactérias no trato gastrointestinal e observaram que a microbiota intestinal estimulou a proliferação e a diferenciação de células B e subgrupos de células T mucosas. Animais *germ free* exibiram células imunológicas anormais, déficits em estruturas linfoides, placas de Peyer pequenas, pouco numerosas e sem centro germinativos, níveis reduzidos de imunoglobulinas circulantes, redução de plasmócitos secretores de IgA, irregularidades na produção de citocinas, além de deficiência na geração de tolerância oral (MACPHERSON; UHR, 2004; CHUNG et al., 2012).

Além disso, a microbiota intestinal, a partir do metabolismo de substratos alimentares e endógenos, confere outros benefícios ao hospedeiro, principalmente no que se refere a recuperação de energia da dieta, produção de carboidratos digeríveis, ácidos orgânicos, vitaminas K e B₁₂ e

aminoácidos e biotransformação de ácidos biliares (NICOLLI; LEITE, 2013; CHASSARD et al., 2012; HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 2002).

Os carboidratos ingeridos pelo hospedeiro que não foram completamente digeridos no intestino delgado podem ser fermentados por bactérias sacarolíticas produzindo quantidades significativas de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). A fermentação dos carboidratos ocorre sobretudo no cólon proximal e é energeticamente mais favorável que a fermentação de proteínas (MACFARLANE ; GIBSON; CUMMINGS, 1992). Os principais AGCC produzidos são acetato, propionato e butirato. O butirato é a fonte de energia preferencial dos colonócitos e ainda, apresenta propriedades anticarcinogênica e anti-inflamatória, atua no transportador de NaCl e modula a motilidade intestinal (PRYDE et al, 2002; GUILLOTEAU et al., 2010)

O processo de colonização e estabelecimento de simbiose pode influenciar profundamente no processo saúde-doença ao longo da vida. O desenvolvimento da microbiota intestinal é um processo dinâmico nos primeiros anos de vida, período considerado crítico por se tratar também do desenvolvimento do sistema imunológico, metabólico e neurológico (MAYNARD et al., 2012). As bactérias pioneiras que colonizam o trato gastrointestinal do lactente e a diversidade gradual para um ecossistema estável desempenham papel crucial no estabelecimento da simbiose ideal. (MARTIN et al., 2010).

Ao longo do trato gastrointestinal existem diferentes ambientes que variam em pH, potencial de oxirredução, disponibilidade de nutrientes e velocidade de fluxo. O cólon é a região do trato gastrointestinal que apresenta maior diversidade microbiana, podendo alcançar 10^{11} a 10^{12} UFC.g⁻¹, o que corresponde a 60% da massa fecal. O fluxo do conteúdo alimentar mais lento, pH neutro e a abundância relativa de nutrientes, como carboidratos não digeríveis e outros componentes que escapam da digestão, tornam o cólon um ambiente propício para proliferação microbiana (ECKBURG et al., 2005)

Outros fatores podem afetar a composição da microbiota intestinal, incluindo a carga microbiana do ambiente, os hábitos alimentares, tempo de aleitamento materno, a composição da microbiota materna, a forma de nascimento (parto cesárea ou vaginal), a idade, bem como as interações entre bactérias (ZOPPI et al., 1998).

Acreditava-se que o início da colonização do trato gastrointetinal ocorria logo após o nascimento, porém estudos mais recentes têm demonstrado que a exposição à microbiota já inicia

durante a gestação, pois foi visto que o líquido amniótico não é estéril (JIMENEZ et al., 2008; SATOKARI et al., 2009; DI GIULIO et al., 2008; DIGIULIO, D.B, 2012).

Os primeiros microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal do recém-nascido são provenientes da mãe e do meio ambiente. As primeiras bactérias isoladas nas fezes de recém-nascidos são frequentemente anaeróbias facultativas, tais como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter spp.*, que por sua vez criam um ambiente anaeróbico estrito e promovem sucessivamente o crescimento de bactérias anaeróbias obrigatórias, tais como *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Eubacterium spp.*, os quais predominam após uma ou duas semanas de vida (OUWEHAND; ISOLAURI; SALMINEN, 2002).

Desta forma, um fator determinante da microbiota intestinal é a forma de nascimento. Crianças nascidas de parto vaginal são colonizadas inicialmente por bactérias provenientes da mãe e nascidas por parto cesárea por microorganismo do ambiente hospitalar. Estudos demonstram diferenças significativas nas populações bacterianas entre os diferentes tipos de parto, sendo que crianças nascidas de parto cesárea apresentam menor quantidade de *Bifidobacterium* e *Bacteroides* e menor diversidade bacteriana (JAKOBSSON et al., 2013).

Nos primeiros anos de vida a microbiota é instável e variável. A idade exata do estabelecimento de uma microbiota estável e semelhante à do adulto não está definida, mas acredita-se ser por volta dos três anos de idade (KOENIG et al., 2011; YATSUNENKO et al., 2012).

O leite humano satisfaz as necessidades nutricionais do lactente e confere proteção contra patógenos por meio da transmissão de anticorpos maternos (IgA) e outros fatores anti-microbianos (PALMER et al 2011, DONOVAN et al. 2012, ROGIER et al, 2014). Além disso, estudos têm comparado a microbiota intestinal de crianças em aleitamento materno e em uso de fórmulas infantis e mostrado que microrganismos são passados da mãe para bebê, juntamente com os oligossacarídeos não digeríveis, os prebióticos, os quais promovem a proliferação de bactérias específicas no intestino (FERNANDEZ et al, 2013). A transferência bacteriana materna se dá pela pele e atualmente, apoia-se na hipótese da via êntero-mamária, onde as bactérias do intestino materno podem atingir as glândulas mamárias por meio de células dendríticas maternas e macrófagos (JOST et al., 2014).

Crianças em aleitamento materno tendem a apresentar microbiota intestinal mais estável e com predominância de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, enquanto, pacientes em uso de fórmulas

infantis exibem maiores proporções de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus* e *Veillonella spp* (BEZIRTZOGLU; TSIOTSIAS; WELLING, 2011).

Em condições saudáveis, existe um equilíbrio entre todos os microorganismos presentes no intestino e entre esses e o hospedeiro. Tal estado é definido como eubiose. Entretanto, pode ocorrer desequilíbrio na microbiota intestinal caracterizando como disbiose, em que há predomínio de bactérias patogênicas, alterações qualitativas e quantitativas na microbiota, alterações nas atividades metabólicas e na distribuição das bactérias ao longo do intestino (HAWRELAK, MYERS, 2004)..

Os métodos de microbiologia clássica, incluindo isolamento e cultivo de espécies bacterianas associadas ao trato gastrointestinal possibilita avaliar apenas uma pequena fração da diversidade microbiana (1% ou menos) (AMANN R.I.; LUDWIG W.; SCHLEIFER K.H., 1995).

Mais recentemente, técnicas metagenômicas, utilizando tecnologia *high-throughput*, têm sido utilizadas para caracterizar a composição e os efeitos fisiológicos potenciais das comunidades microbianas. As técnicas metagenômicas envolvem extração direta do DNA, construção de biblioteca e análise de todo o microbioma de uma amostra, possibilitando acesso a comunidades bacterianas cultiváveis e não cultiváveis (TURNBAUGH et al., 2007; MACHADO et al, 2015).

Diversos genes são utilizados nos estudos de filogenia molecular dos microorganismos. Para análise da microbiota intestinal as sequências de gene mais utilizadas e úteis são as que codificam o RNA ribossômico (RNAr) 16S, pois este gene é distribuído universalmente em todas as bactérias, é funcionalmente constante e suficientemente conservado, ou seja, modifica-se lentamente e ainda apresenta tamanho adequado de aproximadamente 1500 pares de bases. O gene 16s rRNA possui regiões conservadas intercaladas por regiões variáveis e altamente variáveis (V1-V9) (Figura 1) (BROSIUS, 1981). Existem vários bancos de dados que armazenam sequências de 16S rRNA.

Figura 1: Desenho do gene 16S rRNA com base na sequência de *E.coli* (BROSIUS, 1981)

Verde: regiões conservadas e cinza: regiões variáveis

Algumas doenças do trato gastrointestinal tem sido relacionadas com a alteração do ecossistema microbiano tais como: constipação intestinal, doença inflamatória intestinal,

enterocolite necrotizante, infecção por *Helicobacter pylori*, doença celíaca, diarreia, síndrome do intestino irritável, cirrose e alergias (WEBER; POLANCO, 2012).

A prevalência mundial da constipação infantil na população geral varia de 0,7% a 29,6% (VAN DEN BERG; BENNINGA; DI LORENZO, 2006). A grande maioria dos casos, 90% a 95%, é diagnosticada como constipação intestinal funcional, pois nenhuma causa orgânica é encontrada (RASQUIN et al., 2006). Esta desordem funcional é caracterizada de acordo com critérios de Roma III, pela presença de pelo menos dois dos seis seguintes sinais/sintomas no mínimo de uma vez por semana durante o período mínimo de dois meses para crianças maiores de 4 anos e de pelo menos um mês para menores de 4 anos: duas ou menos evacuações por semana; pelo menos um episódio de incontinência fecal por semana; história de postura retentiva ou retenção voluntária de fezes; história dos movimentos intestinais dolorosos; presença de grande massa fecal no reto; história de fezes de grande diâmetro que podem obstruir o vaso sanitário. Os pacientes podem apresentar irritabilidade, diminuição do apetite e/ou saciedade precoce (RASQUIN et al., 2006; HYMAN et al., 2006).

Na constipação intestinal funcional ocorrem alterações na fisiologia da evacuação dependentes da interação de vários fatores, dentre eles: fatores constitucionais, hereditários, emocionais, episódios de evacuação dolorosa, alteração da motilidade colônica e fatores alimentares, relacionados com aleitamento artificial e dieta pobre em fibras. O comportamento retentivo é a principal causa para o desenvolvimento desta patologia (TABBERS M.M. et al., 2011; CARVALHO E.; SILVA L.R.; FERREIRA C.T., 2012).

Dentre as doenças orgânicas causadoras de constipação intestinal temos: anomalias anorretais, hipotireoidismo, Doença de Hirschsprung e disfunções neurológicas como espinha bífida.

A espinha bífida é uma malformação congênita decorrente de defeito do fechamento do tubo neural, que envolve tecidos sobrejacentes à medula espinhal, arco vertebral, músculos dorsais e pele e representa 75% das malformações do tubo neural. O não fechamento do tubo neural produz defeitos de graus variáveis, podendo afetar todo o comprimento do tubo neural ou limitar-se a uma pequena área. A espinha bífida é classificada em espinha bífida oculta e espinha bífida cística, a última engloba duas formas principais; a meningocele e a mielomeningocele. Os pacientes podem apresentar incapacidades crônicas graves, tais como: hidrocefalia, bexiga neurogênica, intestino

neurogênico, problemas ortopédicos, além de transtornos emocionais, sociais e deficiência cognitiva (MOORE, K.L.; PERSUAD, T.V.N.,2000; GAIVA, M.A.M. et al., 2011).

A maioria dos pacientes com mielomeningocele apresenta lesões na cauda equina e cerca de 80% das crianças com mielomeningocele apresentam constipação intestinal ou incontinência fecal (KROGH; CHRISTENSEN, 2009).

O trânsito intestinal é principalmente controlado pelo sistema nervoso entérico e modulado por inervações extrínsecas. A inervação parassimpática estimulatória, que inerva da boca até flexura esplênica, é derivada dos nervos vagais. Por outro lado, a inervação parassimpática é derivada da segunda a quarta raízes sacrais (S2-S4) e é responsável pela inervação do cólon distal e reto. Além disso, o cólon e reto recebem impulsos simpáticos inibitórios do segmento toracolombar (T9-L2) da coluna vertebral (MACHADO, 2004). Portanto, lesões medulares na cauda equina interrompem o arco reflexo do cólon esquerdo, reto e canal anal para a medula espinal sacral, o que gera inibição do reflexo inibitório anorretal e hipotonia e hiporreflexia do cólon esquerdo e reto e o como resultado clínico tem-se a dificuldade de esvaziamento retal, gerando distensão desta porção e incontinência fecal. Lesões medulares acima da cauda equina, nível acima de L2, observa-se perda do controle supra espinhal inibitório gerando hipertonia e hiper-reflexia do cólon esquerdo e reto e aumento na amplitude do reflexo inibitório. A hiper-reatividade do reto pode facilitar a estimulação digital ou o efeito de supositórios e mini enema. (KROGH; MOSDAL; GREGERSEN, 2002).

O tratamento da constipação intestinal crônica consiste em desimpactação, administração de laxantes, dieta rica em fibras, treinamento esfíncteriano e mudança comportamental para conseguir um hábito intestinal normal. Entretanto, uma minoria dos pacientes com mielomeningocele necessitarão de tratamentos adicionais como irrigação transretal com água (MATTSSON; GLADH, 2006; AUSILI et al, 2010) irrigação colônica anterógrada (MALONE; RANSLEY; KIELY, 1990) ou estimulação elétrica do nervo sacral.

Mesmo com o tratamento tradicional bem estabelecido e seguro, muitos pacientes não obtêm resultados satisfatórios, e por isso o interesse em outras estratégias terapêuticas. Estudos estão sendo realizados para a utilização de probióticos e transplante de microbiota fecal como tratamentos alternativos na constipação intestinal funcional (GUERRA et al., 2011, TIAN et al., 2016).

A etiologia e fisiopatologia da constipação crônica continuam mal compreendidas e o mais provável é o caráter multifatorial. Além disso, o manejo clínico de constipação crônica permanece desafiador. Evidências recentes indicam que alterações da microbiota intestinal podem contribuir para a constipação intestinal e seus sintomas relacionados. Por isso, o crescente interesse entre os pesquisadores no estudo do microbioma intestinal nos últimos anos.

Os probióticos, definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro (MORAIS; JACOB, 2006) e estão cada vez mais sendo usados no tratamento de algumas doenças, inclusive de constipação intestinal. Os probióticos reduzem o pH no cólon, devido a produção de ácidos graxos de cadeia curta (ácido butírico, ácido propiônico e ácido láctico) pelas bactérias (bifidobactéria e lactobacilos) e este pH confere melhora no peristaltismo e consequentemente redução do tempo trânsito colônico (CHMIELEWSKA; SZAJEWSK, 2010).

Em revisão sistemática publicada em 2016 com objetivo de investigar a eficácia e a segurança do uso de probióticos, simbióticos e prébióticos no tratamento de crianças com constipação intestinal funcional foram eleitos 13 ensaios clínicos randomizados e controlados e observaram não ter evidências suficientes para recomendação destes no tratamento da constipação intestinal, pois é necessário uma melhor compreensão da microbiota intestinal de crianças saudáveis e crianças com constipação intestinal. Além disso, são necessários ensaios clínicos randomizados e controlados de melhor qualidade pra justificar tal uso (KOPPEN; BENNINGA; TABBERS, 2016)

Tian et al., em um estudo piloto para avaliar a eficácia do transplante de microbiota fecal como opção terapêutica em adultos com constipação intestinal funcional não responsivos ao tratamento convencional, observaram que dos 24 pacientes submetidos ao transplante de microbiota fecal houve melhora clínica de 66,7% na semana 4 e 50% na semana 12 e a remissão clínica obtida em 62,5% na semana 4 e 37,5% na semana 12 (TIAN et al., 2016). Posteriormente, o mesmo grupo propôs uma terapia combinada, ou seja, transplante de microbiota fecal associada à administração de fibra solúvel e demonstrou maior eficácia, visto que foi alcançada remissão clínica em 42,9% pacientes e melhora clínica em 66,7% na semana 12 (GE et al., 2016).

Na literatura investigada, não detectamos estudos científicos que avaliam o microbioma em pacientes pediátricos com intestino neurogênico secundário a espinha bífida.

Portanto, a presença de disbiose intestinal pode desempenhar um papel essencial na patogênese da constipação intestinal crônica. O mecanismo pelo qual a microbiota intestinal regula as funções sensoriais e motoras do intestino ainda é obscuro. Pesquisas futuras para identificar a participação e a interação da microbiota intestinal na fisiologia intestinal poderão permitir o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas (ZHAO; YU, 2016).

2 HIPÓTESE

Pacientes pediátricos com constipação intestinal funcional e com intestino neurogênico em espinha bífida apresentam disbiose intestinal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

Caracterizar a microbiota intestinal de pacientes portadores de constipação funcional e de pacientes com espinha bífida e intestino neurogênico e compará-las com grupo controle, constituído de pacientes saudáveis.

3.2 Objetivos secundários

Avaliar a associação entre a microbiota intestinal encontrada nos pacientes dos grupos de estudo com variáveis coletadas como: idade, sexo, tempo de amamentação exclusiva, tipo de parto, medicações utilizadas para tratamento da doença de base e sintomas atuais.

Avaliar a associação entre a microbiota intestinal encontrada no grupo controle e variáveis coletadas como: idade, sexo, tempo de amamentação exclusiva, tipo de parto.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo analítico, observacional e transversal.

4.2 Participantes

Foram selecionados para o estudo, crianças e adolescentes entre 3 a 18 anos de idade, com o diagnóstico de constipação intestinal funcional (Grupo Constipação Funcional) e espinha bífida com intestino neurogênico (Grupo Intestino Neurogênico) acompanhados na UBS Dra. Teresinha Garcia José Gradim - PAM II e no Ambulatório de Urologia e Nefrologia Pediátrica (URNEP) do Hospital Clínicas de Ribeirão Preto, respectivamente. O grupo controle foi constituído por crianças e adolescentes saudáveis que realizavam puericultura na Unidade de Saúde Vila Lobato, Ribeirão Preto-SP. Foi feita revisão de todos os prontuários antes do convite para a participação do estudo e analisado histórico clínico, exame físico e uso de medicação. Foi considerado criança saudável aquela com ausência de doença crônica ou aguda no momento da coleta.

Aos pais ou responsáveis das crianças e aos adolescentes foi feito um convite para participarem do estudo, após a consulta ambulatorial. Posteriormente a um consentimento livre e esclarecido por escrito do responsável, foi realizada uma breve entrevista e preenchimento de questionário a fim de se obter informações demográficas e dados clínicos.

A constipação intestinal funcional foi caracterizada de acordo com critérios de Roma III. (RASQUIN et al., 2006, HYMAN et al., 2006).

O material a ser estudado, amostra fecal, foi coletado em ambiente domiciliar pelo responsável da criança, entregue à pesquisadora no ambulatório de acompanhamento e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia e Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP, sob o parecer número 3551/2015 (Anexo 6).

Os responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Termo para guarda de materiais biológicos e todos os pacientes aptos assinaram o Termo de Assentimento para

participação no projeto, conforme resolução 196/96 e uma via do mesmo foi arquivada (Anexos 1, 2 e 3).

Foi aprovada a criação de um biorrepositório denominado: “Biorrepositório ligado ao projeto de pesquisa intitulado Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo” de acordo com a resolução 441/2011, sob o processo HCRP número 11565/2015 (Anexo 6).

4.3 Critérios de inclusão

Foram incluídas crianças e adolescentes entre 3 a 18 anos de idade, de ambos os sexos, com o diagnóstico de constipação intestinal funcional segundo critérios de Roma III e espinha bífida com intestino neurogênico, que aceitaram participar do estudo.

Foram selecionados pacientes com Z score para IMC entre -2 e +1 (eutróficos).

4.4 Critérios de não inclusão

Não foram incluídos pacientes que não consentirem em participar da pesquisa e aqueles com diagnóstico de doença intestinal orgânica (exceto: espinha bífida), submetidos à cirurgia do trato gastrointestinal, alergia alimentar, intolerância a lactose, história de incontinência fecal não retentiva e portadores de doenças metabólicas (inclusive obesidade e sobrepeso) e hormonais. Não foram incluídos pacientes com Z score para IMC entre +1 e +2 (sobrepeso), acima de +2 (obesidade) e abaixo de -2 (desnutrição). Não foram incluídos pacientes com espinha bífida com diagnóstico de alergia ao látex e com puberdade precoce.

Não foram incluídos pacientes que fizeram uso de corticosteroides (oral e inalatório) nos últimos seis meses, antibióticos nos últimos dois meses, produtos lácteos fermentados ou probióticos nas últimas duas semanas.

4.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes que fizeram uso de corticosteroides (oral e inalatório), antibióticos, produtos lácteos fermentados ou probióticos entre o período da entrevista e o dia da entrega da amostra de fezes.

4.6 Coleta de dados

- Dados demográficos: idade, sexo
- Dados clínicos: peso, estatura, IMC (o Z score para IMC foi calculado pelo software WHO Anthro nos menores de 5 anos e WHO Anthro Plus para crianças de 5 a 19 anos (WHO,2011), diagnóstico clínico, data do diagnóstico, registro da frequência evacuatória atual, consistência das fezes (caracterizada pela escala fecal de Bristol - Anexo 3), sintomas atuais (presença de escape fecal, dor e/ou distensão abdominal, dor anal durante a evacuação, sangramento, tratamento realizado (lavagem intestinal, drogas) , tempo de aleitamento materno exclusivo, tipo de parto, presença de outras doenças associadas, história de uso de antibiótico no último ano, uso de probióticos e hábito de ingestão de produtos lácteos fermentados. Crianças com espinha bífida e com dificuldade na extensão de membros inferiores para medir a altura, foi realizado o cálculo da medida de altura estimada a partir do comprimento do joelho ao calcanhar (CJ) utilizando a seguinte fórmula (Altura (cm) = $(2,69 \times CJ) + 24,2$, com desvio padrão de $\pm 1,1$) (STEVENSON, 1995).

4.7 Delineamento experimental

O estudo é constituído por 3 grupos de pesquisa: sendo 2 grupos de estudo (Grupo Constipação Funcional e Grupo Intestino Neurogênico) e 1 grupo controle (crianças saudáveis). Foram realizados entrevista e preenchimento de questionário com os pais/responsáveis/pacientes e coleta de uma amostra fecal de cada participante para análise da microbiota intestinal.

4.8 Determinação da microbiota intestinal

A metodologia molecular foi utilizada para determinação do perfil da microbiota intestinal bacteriana: sequenciamento de bibliotecas 16S rRNA.

Os pais/responsáveis foram esclarecidos quanto ao método de coleta estéril. Foi orientado evacuar diretamente no coletor plástico oferecido ou com ajuda de material de suporte fornecido

previamente (par de luvas descartável, espátula de ayres estéril embalada individualmente e placa estéril para ser utilizada como intermediário e facilitador na coleta das fezes).

Após a coleta, o material foi acondicionado em freezer domiciliar (- 4°C) por no máximo 24 horas e após, colocado em caixa térmica resfriada com gelo (fornecida ao paciente) e transportado ao Laboratório de Microbiologia da FMRP-USP onde foi fracionado em alíquotas de 180 a 220mg em criotubos com rosca externa de 2ml e imediatamente armazenado em freezer a - 80°C no Laboratório de Pediatria FMRP-USP.

Financiamento concedido pelo Departamento de Pediatria da FMRP-USP e FAEPA.

4.8.1 Extração de DNA genômico fecal

O DNA total das amostras coletadas foi extraído com o kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN de acordo com o protocolo de instruções do fabricante do produto. O kit é composto por: mini colunas, tubos coletores, tabletes de InhibitEX®, tampão ASL, tampão AL, tampão AW1, tampão AW2 e tampão AE.

Foi utilizado 180 a 220 mg de fezes congeladas, as quais estavam armazenadas em criotubos com anel de vedação externa de 2 ml e foi adicionado 1,4 ml de tampão ASL para cada amostra de fezes. Após a homogeneização em vortex, as amostras foram incubadas a temperatura de 90 ° C durante 10 minutos e posteriormente centrifugadas em velocidade máxima (14.000 rpm) por 1 minuto para sedimentar as partículas. Após centrifugação, 1,2 ml do sobrenadante foi transferido para um novo micro tubo eppendorf de 2 ml e adicionado um tablete de Inhibitex para cada amostra, que foi homogeneizada até completa dissolução. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos para sedimentar os inibidores ligados à matriz do Inhibitex. Foram pipetados 200 µl do sobrenadante e adicionado 15 µl proteinase K, 200 µl de tampão AL e homogeneizado. Tal procedimento foi realizado em duplicata para aumentar o rendimento. As amostras foram incubadas a 70 ° C durante 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de etanol 100% e homogeneizado em vortex. O conteúdo obtido foi colocado em uma mini coluna acoplada com tubo coletor e centrifugado por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e adicionado 500 µl de tampão AW1 e as amostras foram centrifugadas por 1 minuto. Foi descartado o filtrado e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e adicionado 500 µl de tampão AW2 e as amostras foram centrifugadas por 3 minutos. Foi descartado o filtrado e a coluna foi acoplada a um novo tubo coletor para nova centrifugação e eliminação de todo resíduo de tampão AW2. E

por fim, a coluna foi transferida para novo tubo coletor e adicionada 100 µl de água MilliQ estéril, que após centrifugação por 5 minutos obteve-se todo o DNA eluído. O material genético foi armazenado a -20°C para conservação até o momento da próxima etapa.

Esta etapa foi realizada no Centro de Medicina Genômica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.8.2 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído das amostras foi feita pelo NanoDrop (Thermo Scientific) e pelo Qubit assay kit (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY) e a qualidade do material genético foi avaliada pelo gel de agarose a 1%.

4.8.3 Sequenciamento de DNA nova geração

Para análise global da composição de bactérias das fezes dos pacientes foram utilizadas as reações de sequenciamento, com metodologia de sequenciamento por high- throughput MiSeq (Illumina), como descrito por Caporaso et al., em 2011. Foi amplificada a região V4 do gene 16S rDNA.

O comprimento total de sequências iniciadoras, utilizando a nomenclatura de nucleotídeos IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) padrão, para seguir o protocolo para esta região são:

- 16S Forward Primer (5' – TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG
ACAGCCTACGGGNGGCWGCAG.

- 16S Reverse Primer (5' – GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGA
GACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC.

Todos os procedimentos foram feitos seguindo o protocolo do fabricante (Illumina - 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation) (ILLUMINA).

4.8.3.1. Amplificação de sequências-alvo

Para a amplificação das sequências – alvo, foram utilizados 2,5µl de DNA microbiano (5ng/µl), 5µl de Amplicon PCR Forward Primer (1µM), 5µl de Amplicon PCR Reverse Primer (1µM) e 12,5µl de 2x KAPA HiFi Hot Start Ready Mix, obtendo um volume total de 25µl. A reação foi realizada nas seguintes condições: ativação da enzima 95°C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos de desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento 55°C por 30 segundos, extensão 72°C por 30 segundos, 72°C por 5 minutos e mantidos a 4°C.

Para verificar se o PCR amplificou o tamanho esperado após utilizar os pares de primer V4 no protocolo (~ 412 pares de base), foi utilizado 1µl do produto em gel de eletroforese em gel de agarose à 1%.

4.8.3.2. Purificação dos produtos da PCR

Esta etapa utiliza esferas AMPure XP para purificar o produto da amplificação da região 16S rRNA V4 de primers e outros artefatos de PCR (primer dimers), utilizando sistema AMPure XP (Beckman Coulter Agencourt Beads). Com um pipeta multicanal, foi adicionado 20µl das esferas AMPure XP em cada poço da placa de PCR, e então a placa foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, e colocada em uma estante magnética por 2 minutos, ou até que o sobrenadante estivesse limpo.

Com a placa na estante magnética, o sobrenadante foi removido e descartado. Em seguida, foi adicionado em cada poço 200µl de etanol 80% para lavar as esferas; após, a placa permaneceu incubada no suporte magnético por 30 segundos, e então o sobrenadante foi removido cuidadosamente. A lavagem com etanol foi repetida posteriormente. Com a placa ainda no suporte magnético, as esferas ficaram secando ao ar por 10 minutos.

Em seguida, a placa foi retirada do suporte magnético, e, com uma pipeta multicanal, adicionou-se 52,5µl de Tris 10mM pH 8,5 em cada poço da placa. Após ressuspender, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 2 minutos, e então colocada novamente na estante magnética por mais 2 minutos, ou até que o sobrenadante estivesse limpo. Finalmente, transferiu-se cuidadosamente 50µl do sobrenadante para uma nova placa de PCR.

4.8.3.3. Reação de PCR para anexo dos adaptadores

Para anexar dois índices e adaptadores de sequenciamento (Illumina Nextera XT Index), foram utilizados 5µl de cada poço da placa obtida na etapa anterior, e transferidos para uma nova placa de PCR. Nessa nova placa, foi adicionado 5µl do Index Primer 1, 5µl do Index Primer 2, 25µl de 2x KAPA HiFi Hot Start Ready Mix e 10µl de água para PCR. A reação foi realizada nas seguintes condições: ativação da enzima 95°C por 3 minutos, seguidos de 8 ciclos de desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento 55°C por 30 segundos, extensão 72°C por 30 segundos, 72°C por 5 minutos e mantidos a 4°C.

4.8.3.4. Purificação da biblioteca final

Esta etapa utiliza esferas AMPure XP para purificar a biblioteca final antes da quantificação, utilizando sistema AMPure XP (Beckman Coulter Agencourt Beads).

Com um pipeta multicanal, foi adicionado 56µl das esferas AMPure XP na placa de PCR proveniente da etapa anterior. Após homogeneização, a placa foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Então, a placa foi colocada em uma estante magnética por 2 minutos, ou até que o sobrenadante estivesse limpo.

Com a placa no suporte magnético, o sobrenadante foi removido e descartado. Foi então adicionado em cada poço 200µl de etanol 80% para lavar as esferas; após, a placa permaneceu incubada no suporte magnético por 30 segundos, e então o sobrenadante foi removido cuidadosamente. A lavagem com etanol foi repetida posteriormente. Com a placa ainda no suporte magnético, as esferas ficaram secando ao ar por 10 minutos.

Em seguida, a placa foi retirada da estante magnética, e foi adicionado 27,5µl de Tris 10mM pH 8,5 em cada poço da placa. Após ressuspender, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 2 minutos, e então colocada novamente na estante magnética por 2 minutos, ou até que o sobrenadante estivesse limpo. Finalmente, transferiu-se cuidadosamente 25µl do sobrenadante para uma nova placa de PCR.

4.8.3.5. Preparo do pool equimolar das bibliotecas amplificadas

O agrupamento das amostras em quantidade equimolares permite a total cobertura das regiões - alvo. A quantificação das amostras foi realizada no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer

(Thermo Fisher Scientific), que funciona com base na detecção da fluorescência específica do alvo. Em seguida, calculou-se a concentração de DNA em nM, e diluiu-se a biblioteca final concentrada usando Tris 10mM pH 8,5 para a concentração de 4nM. Então aliquotou-se 5µl do DNA diluído de cada biblioteca e misturou-se as aliquotas para criar um “pool” de bibliotecas com índices únicos.

Após criar um “pool” com as bibliotecas de todas as amostras, as bibliotecas agrupadas foram desnaturadas com hidróxido de sódio, diluídas com tampão de hibridização a uma concentração final de 15pM, e então desnaturadas com calor antes do sequenciamento MiSeq. A corrida incluiu 20% de PhiX para servir como um controle interno para essas bibliotecas de baixa diversidade.

Posteriormente, o “pool” das bibliotecas foi encaminhado para sequenciamento no equipamento Illumina® Miseq utilizando o kit MiSeq Reagent Kit v2 (500 ciclos).

4.8.3.6. Processamento das sequências obtidas por bioinformática

Para explorar os resultados das bibliotecas 16S rRNA obtidas por sequenciamento, as sequências obtidas foram decodificadas e avaliadas através do software QIIME v.1.9.1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (78). QIIME é uma ferramenta de bioinformática, em código aberto, utilizada para análise de metagenômica. No presente estudo, diferentes abordagens foram aplicadas: o método baseado em OTU (Unidades Operacionais Taxonômicas) e teste de hipóteses.

O software QIIME foi utilizado para remover as sequências de barcodes e do primer, retirar artefatos quiméricos, efetuar o alinhamento das sequências, a construção da matriz de distância, o agrupamento das (OTUs) e a construção da árvore filogenética, assim como para calcular os índices de diversidade e os testes de hipóteses. Primeiramente, foi feita a remoção dos barcodes e do primer, e então a filtragem das sequências, onde as leituras menores do que aproximadamente 400 pb foram descartadas. Após, foi feita a checagem de quimeras, e as sequências identificadas como quiméricas foram excluídas. As sequências das bibliotecas remanescentes foram agrupadas em OTUs, baseando-se em similaridade de 97%, contra o banco de dados Silva versão 128, que possui em volta de 370.000 sequências de bactérias e Archaea pré-alinhadas. Os índices de alfa

diversidade foram calculados para cada biblioteca, e sua análise refere-se à diversidade e riqueza de espécies em uma comunidade.

O preparo de toda a biblioteca, com exceção da etapa de extração de DNA, foi realizado no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Foi utilizado o equipamento do Núcleo Genial do CEFAP-USP para o sequenciamento da biblioteca final.

4.9 Análise dos Resultados

4.9.1 Alfa diversidade

Alfa (α) diversidade refere-se à composição das espécies em unidades de amostragem, geralmente em escala local. Os diversos sítios do corpo humano abrigam comunidades microbianas bem definidas, como o trato gastrointestinal, em que a diversidade pode ser estimada para fins de comparação. Sendo assim, a análise de alfa diversidade determinou quais espécies estão presentes e quantos tipos diferentes de espécies estão presentes no ambiente intestinal das participantes do estudo.

Para mensuração da diversidade foram utilizados os índices de Shannon e Simpson e para análise da riqueza foi utilizado índice de Chao1.

O índice de diversidade e equidade de Shannon mensura o grau de incerteza em prever a soma da proporção de cada espécie em relação ao número total de espécies na comunidade em análise e, portanto, explica a abundância e a uniformidade.

O índice de Simpson reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Varia de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade.

O índice de riqueza Chao1 estima o número total de espécies presentes em uma comunidade.

Os índices Shannon, Simpson e Chao1 foram calculados pelo pacote “vegan” do software R.

4.9.2 Análise estatística

A análise das variáveis demográficas e clínicas foram realizadas por estatística descritiva (frequência, médias, valores máximo e mínimos).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SPSS versão 22 para Windows.

Para verificar se a distribuição dos resíduos seguia uma distribuição normal, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk; para verificar se as variâncias observadas eram homogêneas, foi realizado o teste de Levene. Em ambos os testes, para considerar os dados com distribuição normal e homogênea, o resultado deveria ser maior ou igual a 0,05. Os dados em questão não apresentaram distribuição normal e homogênea, e foram então transformados em z-score.

Foi utilizado o teste GLM (General Linear Model – Modelo Linear Geral) multivariado. Foram inseridas as variáveis independentes (sexo, tempo de amamentação, tipo de parto, uso de medicações no momento da coleta e sintomas atuais) e as variáveis dependentes (filos e gêneros bacterianos). A idade dos participantes foi inserida como covariante, devido à ampla idade dos participantes como critério de inclusão (3 – 18 anos).

Após a realização das análises foi feito teste *post hoc*, pós teste de Shidak.

4.10 Tamanho amostral

Foi utilizada uma amostragem por conveniência, pois até o momento da coleta de dados não existiam estudos prévios que permitissem calcular o tamanho amostral recomendado para esta investigação. Este estudo servirá de base para futuras investigações.

5 RESULTADOS

A coleta de dados foi realizada no período de janeiro a setembro de 2016. Após a adequação dos critérios de inclusão e de não inclusão, foram convidados 135 pacientes, e dentre eles, houveram perda de 60 pacientes pela não coleta do material solicitado.

Foram coletadas amostras de 26 pacientes do grupo de constipação intestinal funcional, porém foi excluído um paciente devido à falta de material para última etapa do sequenciamento.

No grupo dos pacientes com intestino neurogênico foram coletadas 20 amostras, sendo necessário a exclusão de 3 pacientes que fizeram uso de antibiótico entre o período da entrevista e da coleta, um paciente que em revisão de prontuário foi visto realização de cirurgia de ampliação vesical, um paciente que fez coleta erroneamente e um paciente devido à falta de material para última etapa do sequenciamento.

No grupo dos pacientes saudáveis foram coletadas 29 amostras e desses foram excluídos dois pacientes por apresentarem amostra com fezes de classificação Bristol 1, um que recebeu diagnóstico de asma após a coleta e um paciente devido à falta de material para última etapa do sequenciamento. Portanto, 64 amostras de fezes foram analisadas (Figura 2).

Figura 2- Caracterização da coleta de dados

5.1 Caracterização da população de estudo

Foi encontrada uma média de idade de 9,6 anos no grupo funcional, 5,85 anos no grupo neurogênico e 9,64 anos em pacientes saudáveis. Quanto ao sexo, foi observado que 40% do grupo funcional, 28,5% do grupo neurogênico e 60% do grupo controle eram do sexo masculino (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização da população de estudo

Variáveis	grupo funcional n= 25	grupo neurogênico n= 14	grupo controle n= 25
Idade (anos)			
média (mín-máx)	9,6 (3-15)	5,85 (4-11)	9,64 (4-17)
Sexo			
masculino n(%)	10 (40%)	4(28,5%)	15 (60%)

Observamos que em relação à frequência evacuatória, 48% dos pacientes constipados funcionais apresentavam evacuações diárias, assim como 85,7% do grupo neurogênico e 92% dos pacientes saudáveis (Tabela 2).

A maioria dos pacientes com constipação intestinal funcional e intestino neurogênico, 68% e 57,1% respectivamente, mesmo em tratamento apresentavam fezes caracterizadas como Bristol 1 ou 2. Todos os pacientes saudáveis apresentavam fezes de consistência normal, ou seja, Bristol 3, 4 ou 5 (Tabela 2).

Todos os pacientes estudados estavam em acompanhamento médico e em tratamento medicamentoso e/ou não medicamentoso. O esquema de tratamento de ambos os grupo era variado, dependia do grau de constipação intestinal, da aceitação e palatabilidade de determinados fármacos e do nível socioeconômico para aquisição dos mesmos.

Observou-se que 7 pacientes com constipação funcional não estavam em uso de medicação, destes, um paciente foi abordado na primeira consulta e não tinha sido tratado previamente; 5 pacientes estavam sem medicação tentando tratamento não medicamentoso após longo tempo de uso de laxantes, porém todos estavam sintomáticos no momento da consulta e 1 paciente tinha parado o uso de óleo mineral 40 dias antes da coleta e estava assintomático. Todos os pacientes com constipação neurogênica que estavam sem medicação no momento da coleta já haviam

recebido medicação previamente e 3 pacientes estavam sintomáticos no momento da coleta (Tabela 2).

Mesmo com o tratamento a maioria dos pacientes com intestino neurogênico apresentam escape fecal e 52% dos pacientes com constipação intestinal funcional apresentam dor ao evacuar. Somente um paciente com espinha bífida referiu ter sensibilidade preservada em região anal e portanto, somente este relatou ter dor ao evacuar (Tabela 2).

No grupo controle, dois pacientes referiram dor abdominal recente, caracterizada como esporádica, sem sinais de alarme e não apresentava critérios de Roma III para dor abdominal funcional (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados clínicos da população de estudo

Variáveis	grupo funcional n= 25 n(%)	grupo neurogênico n= 14 n(%)	grupo controle n= 25 n(%)
Frequência evacuatória atual			
diária	12 (48%)	12(85,7%)	23 (92%)
dias alternados	5 (20%)	2(14,3%)	1 (4%)
< 3x/semana	8 (32%)	0	1 (4%)
Escala de Bristol			
1 e 2	17 (68%)	8(57,1%)	0
3, 4 e 5	8 (32%)	6(42,9%)	25 (100%)
6 e 7	0	0	0
Medicação atual			
OM	8 (32%)	1 (7,1%)	0
lactulona	0	1 (7,1%)	0
PEG	0	3(21,4%)	0
naturetti	2 (8%)	0	0
gutralax	1 (4%)	0	0
supositorio glicerina	0	1 (7,1%)	0
PEG+Mg	1 (4%)	1 (7,1%)	0
OM+ Mg	5 (20%)	0	0
lactulona +Mg	1 (4%)	0	0
LI + Mg	0	1 (7,1%)	0
LI	0	1 (7,1%)	0
sem medicação	7 (28%)	5(35,7%)	25 (100%)
Sintomas atuais			
escape fecal	9 (35%)	8(57,1%)	0
dor abdominal	12(48%)	7(50%)	2 (8%)
dor ao evacuar	13 (52%)	1 (7,1%)	0
distensão abdominal	11 (44%)	4 (28,6%)	0
sangramento	7 (28%)	0	0

OM: óleo mineral, PEG: polietilenoglicol 3350 ou 4000, Mg: leite de magnésia, LI: lavagem intestinal.

Com relação ao tempo de aleitamento materno exclusivo, foi observado que 40% dos pacientes com constipação funcional, 42,9% dos pacientes com constipação neurogênica e 28% dos pacientes do grupo controle amamentaram exclusivamente ao seio materno por 6 meses ou mais. Os dois pacientes do grupo funcional que relataram não lembrar do tempo de exclusividade de aleitamento materno foram amamentados por mais de um ano. O acompanhante do indivíduo saudável não soube relatar sobre hábitos alimentares prévios. Com relação aos pacientes amamentados exclusivamente por período menor de 6 meses de vida foi observado que 2 pacientes do grupo saudável e 4 pacientes constipados funcionais receberam aleitamento materno, porém não exclusivamente, e 4 pacientes do grupo neurogênico e 1 paciente do grupo funcional não foram amamentados ao seio materno. Portanto, o do grupo de pacientes em AME menor de 6 meses foi heterogêneo sendo constituído por pacientes que não foram amamentados por suas mães, pacientes amamentados ao seio porém não exclusivamente e pacientes amamentados ao seio materno exclusivamente por período menor de 6 meses (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização da população de estudo: tempo de amamentação, via de parto

Variáveis	grupo funcional n= 25 n(%)	grupo neurogênico n= 14 n(%)	grupo controle n= 25 n(%)
Tempo AME			
< 6 meses	13 (52%)	8(57,1%)	17 (68 %)
≥ 6 meses	10 (40%)	6(42,9%)	7 (28 %)
não lembra	2 (8%)	0	1 (4%)
Parto			
Cesárea	13 (52%)	13(92,9%)	10 (40%)
Vaginal	11 (44%)	1 (7,1%)	14 (56%)
não sabe	1 (4%)	0	1 (4%)

AME: aleitamento materno exclusivo

A via de parto foi variável entre os três grupos. Nascimentos por parto vaginal ocorreram em 44% dos pacientes com constipação funcional, 7,1% dos pacientes com espinha bífida e 56% dos saudáveis (Tabela 3).

5.2 Análise da microbiota intestinal

No presente estudo foram observadas uma média semelhante em torno de 130.000 sequências de 16S rRNA por paciente nos três grupos de estudo (Tabela 4).

Tabela 4 - Número sequências de 16S rRNA encontradas por paciente

nº de reads	Saudável	Funcional	Neurogênico
media	132.886	130.360	130.830
máximo	242.737	305.685	488.400
mínimo	63.176	21.129	17.334

5.2.1 Alfa diversidade

Os índice de Simpson e Shannon foram utilizados para avaliar a diversidade e a uniformidade das amostras. O índice de Chao1 foi usado para estimar a riqueza de espécies. O índice de Simpson de crianças saudáveis, com constipação funcional e neurogênica não foi significativamente diferente ($0,72 \pm 0,07$ vs $0,73 \pm 0,06$ vs $0,73 \pm 0,09$, respectivamente; $p = 0,70$). Com relação ao índice de Shannon também não houve diferença entres os grupos ($2,18 \pm 0,21$ vs $2,29 \pm 0,19$ vs $2,25 \pm 0,32$, respectivamente, $p = 0,25$), demonstrando uma diversidade semelhante entre os grupos de estudo (Tabela 5).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada no índice de Chao1 entre os três grupos ($401,05 \pm 53,52$ vs $412,37 \pm 80,64$ vs $381,83 \pm 84,23$, respectivamente, $p = 0,45$), indicando que a riqueza das comunidades de indivíduos constipados e saudáveis foi semelhante (Tabela 5).

O índice de Shannon não apresentou diferença significativa entre os grupos quando analisados os principais filos separadamente. Para o filo Bacteroidetes (grupo de constipação funcional: $1,26 \pm 0,39$, neurogênico $1,19 \pm 0,38$ e saudáveis $1,2 \pm 0,41$, $p = 0,82$), Firmicutes (grupo de constipação funcional: $2,86 \pm 0,31$, neurogênico $2,89 \pm 0,20$ e saudáveis $2,86 \pm 0,23$, $p = 0,95$), Proteobacteria (grupo de constipação funcional: $1,04 \pm 0,30$, neurogênico $1,11 \pm 0,42$ e

saudáveis $0,98 \pm 0,38$, $p = 0,52$) e para filo Verrcomicrobia (grupo de constipação funcional: $0,08 \pm 0,16$, neurogênica $0,07 \pm 0,17$ e saudáveis $0,03 \pm 0,13$, $p = 0,41$) (Figura 3).

Tabela 5 - Índices de alfa diversidade observados nos grupos de estudo

Índice	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor-p*
Shannon	Saudável	25	2,18	0,21	1,72	2,21	2,48	0,25
	Funcional	25	2,29	0,19	1,66	2,31	2,57	
	Neurogênico	14	2,25	0,32	1,71	2,18	2,67	
Simpson	Saudável	25	0,72	0,07	0,53	0,71	0,84	0,70
	Funcional	25	0,73	0,06	0,50	0,75	0,81	
	Neurogênico	14	0,73	0,09	0,56	0,72	0,86	
Chao1	Saudável	25	401,05	53,52	305,33	398,70	500,92	0,45
	Funcional	25	412,37	80,64	290,28	420,78	574,14	
	Neurogênico	14	381,83	84,23	270,37	364,25	605,23	

*ANOVA

Figura 3 - Índice de Shannon para diversidade entre grupos analisando os principais filos

5.2.2 Abundância relativa dos filos encontrados

De acordo com os resultados taxonômicos, Firmicutes foi o filo mais predominante, representando 54,6%, 53% e 48,6% da microbiota intestinal em pacientes saudáveis, com constipação funcional e neurogênica, respectivamente ($p = 0,31$). Bacteroidetes foi o segundo filo mais encontrado nos grupos de estudo, com frequência de 34,3% nos pacientes saudáveis, 33,7 %

no grupo de pacientes com constipação funcional e 36,3% nos pacientes com espinha bífida. O filo Verrucomicrobia foi terceiro filo mais abundante nos pacientes constipados funcional e neurogênico (4,5% e 6,6%, respectivamente; $p = 0,90$), enquanto que no grupo controle o terceiro filo mais abundante foi o Proteobacteria (2,5%,) (Figura 4, Tabela 6).

Tabela 6- Teste de efeito entre os grupos de participante x filios encontrados

Variável independente	Variável dependente ^a	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^b
Grupos	Actinobacteria	1,645	,205	,071	,328
	Bacteroidetes	,723	,491	,033	,164
	Firmicutes	1,179	,317	,052	,245
	Proteobacteria	1,788	,180	,077	,353
	Tenericutes	2,307	,112	,097	,443
	Verrucomicrobia	,099	,906	,005	,064
	Outros	1,483	,238	,065	,299

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

A abundância relativa quanto ao filo em cada indivíduo analisado está ilustrado na Figura 5.

Figura 4 - Taxa da abundância relativa dos principais filios encontrados entre os grupos

O modelo Linear Geral (GLM- General Linear Model) foi utilizado para ver associações entre as variáveis coletadas, os grupos estudados e filos e gêneros encontrados.

Não foi encontrada associação significativa entre o tempo de amamentação exclusiva e filos (Tabela 7).

Tabela 7 - Teste de efeito entre o tempo de amamentação exclusiva x filos encontrados (independente do grupo)

Variável independente	Variável dependente ^a	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^b
Tempo de amamentação exclusiva	Actinobacteria	,017	,983	,001	,052
	Bacteroidetes	1,257	,295	,055	,259
	Firmicutes	,210	,811	,010	,081
	Proteobacteria	,160	,853	,007	,073
	Tenericutes	,208	,813	,010	,080
	Verrucomicrobia	1,029	,366	,046	,218
	Outros	,623	,541	,028	,147

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

Quando analisado associação entre sexo e filo independente do grupo foi encontrado resultados significativos com relação aos filos Bacteroidetes e Firmicutes (Tabela 8). Porém, no pós teste Sidak não foi confirmada esta associação (Anexo 7). Com relação aos sintomas atuais e uso de medicação foi observada associação com filo Bacteroidetes (Tabela 9 e 10). No pós teste a associação não foi encontrada em ambas variáveis (Anexo 8 e 9). A análise da variável, uso de medicação, foi realizada em dois subgrupos, pacientes com ou sem medicação, devido a heterogeneidade da variável.

As análises relacionando tipo de parto e filos encontrados observaram associação em relação aos filos Actinobacteria e Tenericutes. Os participantes nascidos de parto natural apresentaram maior abundância relativa do filo Tenericutes em comparação com os participantes nascidos de parto cesárea (p=0,019) (Tabela 11). No pós teste, o filo Actinobacteria não confirmou associação (Anexo 10).

Tabela 8 - Teste de efeito entre o sexo dos participantes x filos encontrados (independente do grupo)

Variável independente	Variável dependente ^a	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^b
Sexo	Actinobacteria	,886	,352	,020	,151
	Bacteroidetes	4,337	,043	,092	,530
	Firmicutes	4,295	,044	,091	,526
	Proteobacteria	,001	,981	,000	,050
	Tenericutes	,161	,690	,004	,068
	Verrucomicrobia	,191	,665	,004	,071
	Outros	,284	,597	,007	,082

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

Tabela 9 - Teste de efeito entre sintomas atuais x filos encontrados (independente do grupo)

Variável independente	Variável dependente ^a	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^b
Sintomas Atuais	Actinobacteria	,536	,468	,012	,110
	Bacteroidetes	4,513	,039	,095	,547
	Firmicutes	3,562	,066	,077	,454
	Proteobacteria	,185	,669	,004	,070
	Tenericutes	,000	,987	,000	,050
	Verrucomicrobia	,021	,887	,000	,052
	Outros	,005	,944	,000	,051

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

Tabela 10 - Teste de efeito entre uso de medicação x filos bacterianos encontrados (independente do grupo)

Variável independente	Variável dependente ^a	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^b
Uso de medicação	Actinobacteria	,081	,778	,002	,059
	Bacteroidetes	5,194	,028	,108	,606
	Firmicutes	2,142	,151	,047	,299
	Proteobacteria	,375	,543	,009	,092
	Tenericutes	,000	,982	,000	,050
	Verrucomicrobia	,417	,522	,010	,097
	Outros	1,106	,299	,025	,177

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

Figura 5 – Abundância relativa dos filos em cada indivíduo estudado

Tabela 11 - Teste de efeito entre tipo de parto x filos bacterianos encontrados (independente do grupo)

Variável independente	Variável dependente ^a	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Tipo de parto	Actinobacteria	3,795	,029	,121	,668
	Bacteroidetes	,309	,736	,011	,097
	Firmicutes	,591	,557	,021	,143
	Proteobacteria	1,578	,216	,054	,320
	Tenericutes	4,046	,023	,128	,698
	Verrucomicrobia	,373	,690	,013	,107
	Outros	1,598	,212	,055	,324

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

As análises realizadas buscando associação simultânea entre grupo de estudo, filos encontrados e variáveis coletadas não apresentaram diferenças significativas para variáveis como sexo (Tabela 12), tempo de amamentação (Tabela 13), sintomas atuais (Tabela 14). Quanto à variável, uso de medicação, foi encontrada associação simultânea entre grupo e filo Actinobacteria (Tabela 15), dado não confirmado no pós teste (Anexo 11).

Tabela 12 - Teste de efeito entre grupo * sexo/filos

Origem	Variável dependente ^a	Quadrado Médio	F	Sig.	η_p^2	Potência observada ^b
Grupo * Sexo	Actinobacteria	,225	,273	,762	,013	,090
	Bacteroidetes	1,802	1,987	,150	,085	,388
	Firmicutes	1,222	1,198	,312	,053	,248
	Proteobacteria	1,039	1,090	,345	,048	,229
	Tenericutes	,829	,832	,442	,037	,183
	Verrucomicrobia	,273	,234	,792	,011	,084
	Outros	,267	,257	,774	,012	,088

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

Tabela 13 - Teste de efeito entre grupo * tempo de amamentação exclusiva/filos

Origem	Variável dependente ^a	Quadrado Médio	F	Sig.	η_p^2	Potência observada ^b
Grupo * Amamentação	Actinobacteria	1,578	1,918	,159	,082	,376
	Bacteroidetes	,489	,540	,587	,024	,133
	Firmicutes	,229	,225	,800	,010	,083
	Proteobacteria	1,320	1,385	,261	,061	,282
	Tenericutes	,775	,777	,466	,035	,174
	Verrucomicrobia	1,386	1,191	,314	,052	,247
	Outros	1,723	1,659	,202	,072	,331

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

Tabela 14 - Teste de efeito entre grupo * sintomas atuais/filos

Origem	Variável dependente ^a	Quadrado Médio	F	Sig.	η_p^2	Potência observada ^b
Grupo * Sintomas Atuais	Actinobacteria	,137	,167	,847	,008	,074
	Bacteroidetes	,438	,483	,620	,022	,124
	Firmicutes	,442	,434	,651	,020	,116
	Proteobacteria	2,122	2,226	,120	,094	,429
	Tenericutes	,460	,461	,634	,021	,120
	Verrucomicrobia	,456	,392	,678	,018	,109
	Outros	,211	,203	,817	,009	,080

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

Tabela 15 - Teste de efeito entre grupo * uso de medicação/filos

Origem	Variável dependente ^a	Quadrado Médio	F	Sig.	η_p^2	Potência observada ^b
Grupo * Medicação	Actinobacteria	3,677	4,470	,040	,094	,543
	Bacteroidetes	,514	,567	,456	,013	,114
	Firmicutes	,011	,010	,919	,000	,051
	Proteobacteria	,688	,722	,400	,017	,132
	Tenericutes	,338	,339	,563	,008	,088
	Verrucomicrobia	,212	,182	,672	,004	,070
	Outros	,113	,109	,743	,003	,062

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado

5.2.3 Abundância relativa dos gêneros encontrados

Foram analisados gêneros bacterianos que estavam presentes em uma abundância relativa maior a 1%.

A análise dos gênero das bactérias nos grupos de estudo observou que a composição microbiana diferiu significativamente somente em relação ao *Bifidobacterium*, sendo mais abundantes na constipação funcional do que no grupo saudável (0,87% vs 0,82%, $p = 0,031$) (Figura 6, 7 e Tabela 16). O gênero *Ruminoclostridium* não apresentou diferença significativa no pós teste (Anexo 12).

A abundância relativa quanto ao gêneros encontrados em cada indivíduo está relatado na Figura 9.

Ao analisar sexo dos participantes e gêneros encontrados independente dos grupos de estudo observou-se que o nível de *Bacteroides*, *Anaerotruncus* e *[Eubacterium] coprostanoligenes* foi maior entre os meninos com valores de $p = 0,028$, $p = 0,022$ e $p = 0,017$, respectivamente (valores de p obtidos no pós teste) (Tabela 17 e Anexo 13).

Figura 6 – Taxa da abundância relativa dos principais gêneros encontrados entre os grupos

Figura 7 – Abundância relativa dos gêneros em cada indivíduo estudado

Tabela 16 - Teste de efeito entre os grupos de estudo x gêneros

Variável independente	Variável dependente	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Grupos	<i>Bifidobacterium</i>	4,087	,024	,160	,695
	<i>Bacteroides</i>	1,216	,307	,054	,251
	<i>Parabacteroides</i>	,223	,801	,010	,083
	<i>Prevotella</i>	,065	,937	,003	,059
	<i>Alistipes</i>	,280	,757	,013	,091
	<i>Christensenellaceae</i>	1,565	,221	,068	,314
	<i>Lachnoclostridium</i>	,812	,451	,036	,180
	<i>Lachnospiraceae</i>	,274	,761	,013	,091
	<i>Roseburia</i>	,463	,632	,021	,121
	<i>Eubacterium</i>	,663	,520	,030	,154
	<i>Ruminococcus</i>	,966	,389	,043	,207
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,300	,742	,014	,095
	<i>Anaerotruncus</i>	,856	,432	,038	,187
	<i>Faecalibacterium</i>	,469	,629	,021	,122
	<i>Ruminoclostridium</i>	4,970	,011	,188	,783
	<i>Ruminococcaceae</i>	2,318	,111	,097	,445
	<i>Subdoligranulum</i>	1,630	,208	,070	,325
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	,384	,683	,018	,108
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	1,909	,161	,082	,375
	<i>Phascolarctobacterium</i>	,581	,564	,026	,140
	<i>Dialister</i>	,066	,936	,003	,059
	<i>Akkermansia</i>	,099	,906	,005	,064
	Outros	1,917	,159	,082	,376

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

Ao analisar o sexo dos participantes e gêneros encontrados em cada grupo observou-se que no grupo dos pacientes com constipação neurogênica, os meninos apresentaram maior nível de *Bacteroides* se comparado com as meninas, com valor de p: 0,012 (Tabela 18 e Anexo 14). O nível de *Dialister* não foi significativo no pós-teste.

O tempo de amamentação exclusiva não apresentou diferença em relação aos gêneros encontrados quando observados isoladamente e quando considerados os grupos de estudo (Tabela 19 e 20).

Tabela 17 - Teste de efeito entre o sexo dos participantes x gêneros (independentes do grupo)

Variável independente	Variável dependente	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Sexo	<i>Bifidobacterium</i>	1,410	,242	,032	,213
	<i>Bacteroides</i>	5,096	,029	,106	,597
	<i>Parabacteroides</i>	,914	,345	,021	,154
	<i>Prevotella</i>	,032	,860	,001	,053
	<i>Alistipes</i>	,291	,593	,007	,082
	<i>Christensenellaceae</i>	2,266	,140	,050	,313
	<i>Lachnoclostridium</i>	,359	,552	,008	,090
	<i>Lachnospiraceae</i>	,035	,853	,001	,054
	<i>Roseburia</i>	,332	,567	,008	,087
	<i>Eubacterium</i>	,863	,358	,020	,149
	<i>Ruminococcus</i>	,161	,690	,004	,068
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,025	,875	,001	,053
	<i>Anaerotruncus</i>	4,071	,050	,086	,505
	<i>Faecalibacterium</i>	,000	,987	,000	,050
	<i>Ruminoclostridium</i>	,458	,502	,011	,101
	<i>Ruminococcaceae</i>	1,607	,212	,036	,236
	<i>Subdoligranulum</i>	1,329	,255	,030	,204
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	6,249	,016	,127	,686
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	,077	,783	,002	,058
	<i>Phascolarctobacterium</i>	1,609	,211	,036	,237
	<i>Dialister</i>	,321	,574	,007	,086
	<i>Akkermansia</i>	,224	,639	,005	,075
	Outros	,468	,498	,011	,103

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

Tabela 18 - Teste de efeito entre sexo dos participantes x gêneros, de acordo com os grupos de estudo

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Grupo * Sexo	<i>Bifidobacterium</i>	,490	,616	,022	,125
	<i>Bacteroides</i>	4,458	,017	,172	,735
	<i>Parabacteroides</i>	2,635	,083	,109	,496
	<i>Prevotella</i>	1,698	,195	,073	,338
	<i>Alistipes</i>	,049	,953	,002	,057
	<i>Christensenellaceae</i>	,244	,785	,011	,086
	<i>Lachnoclostridium</i>	,204	,817	,009	,080
	<i>Lachnospiraceae</i>	,992	,379	,044	,211
	<i>Roseburia</i>	1,563	,221	,068	,313
	<i>Eubacterium</i>	1,564	,221	,068	,314
	<i>Ruminococcus</i>	1,654	,203	,071	,330
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,398	,674	,018	,110
	<i>Anaerotruncus</i>	,342	,712	,016	,101
	<i>Faecalibacterium</i>	,390	,679	,018	,109
	<i>Ruminoclostridium</i>	,295	,746	,014	,094
	<i>Ruminococcaceae</i>	,557	,577	,025	,136
	<i>Subdoligranulum</i>	1,724	,190	,074	,342
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	,477	,624	,022	,123
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	1,841	,171	,079	,363
	<i>Phascolarctobacterium</i>	1,037	,363	,046	,219
	<i>Dialister</i>	3,418	,042	,137	,612
	<i>Akkermansia</i>	,253	,778	,012	,087
	Outros	,797	,457	,036	,177

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

Se comparados os participantes que apresentavam sintomas no momento da coleta, em relação aos que não apresentavam, independente do grupo, o nível de *Ruminoclostridium* foi maior nos pacientes sintomáticos (p= 0,003) (Tabela 21 e Anexo 15).

No grupo dos pacientes saudáveis, os participantes sintomáticos no momento da coleta possuíam o gênero *Phascolarctobacterium* mais abundante se comparados com os assintomáticos saudáveis (p= 0,001) (Tabela 22 e Anexo 16).

O uso de medicação não associou com os gêneros encontrados. No pós teste o nível de *Ruminococcaceae uncultured* não se manteve estatisticamente significativo (Tabela 23). Esta variável também não se associou simultaneamente com o grupo de estudo e gênero de bactérias (Tabela 24).

Tabela 19 - Teste de efeito entre o tempo de amamentação exclusiva dos participantes x gênero (independente do grupo)

Variável independente	Variável dependente	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Tempo de amamentação exclusiva	<i>Bifidobacterium</i>	,365	,696	,017	,105
	<i>Bacteroides</i>	,642	,531	,029	,151
	<i>Parabacteroides</i>	1,122	,335	,050	,234
	<i>Prevotella</i>	,285	,753	,013	,092
	<i>Alistipes</i>	1,169	,320	,052	,243
	<i>Christensenellaceae</i>	,436	,649	,020	,116
	<i>Lachnoclostridium</i>	,182	,834	,008	,077
	<i>Lachnospiraceae</i>	,985	,382	,044	,210
	<i>Roseburia</i>	,650	,527	,029	,152
	<i>Eubacterium</i>	,035	,966	,002	,055
	<i>Ruminococcus</i>	2,404	,102	,101	,459
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	1,298	,284	,057	,266
	<i>Anaerotruncus</i>	,224	,800	,010	,083
	<i>Faecalibacterium</i>	,003	,997	,000	,050
	<i>Ruminoclostridium</i>	1,255	,295	,055	,258
	<i>Ruminococcaceae</i>	2,051	,141	,087	,399
	<i>Subdoligranulum</i>	,615	,545	,028	,146
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	,128	,880	,006	,068
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	1,171	,320	,052	,243
	<i>Phascolarctobacterium</i>	1,996	,148	,085	,390
	<i>Dialister</i>	,459	,635	,021	,120
	<i>Akkermansia</i>	,975	,385	,043	,208
	Outros	,069	,933	,003	,060

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

Tabela 20 - Teste de efeito entre o tempo de amamentação exclusiva dos participantes x gêneros, de acordo com os grupos de estudo

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Grupo * Amamentação	<i>Bifidobacterium</i>	2,559	,089	,106	,484
	<i>Bacteroides</i>	,751	,478	,034	,169
	<i>Parabacteroides</i>	1,682	,198	,073	,335
	<i>Prevotella</i>	,064	,938	,003	,059
	<i>Alistipes</i>	,885	,420	,040	,193
	<i>Christensenellaceae</i>	1,067	,353	,047	,225
	<i>Lachnoclostridium</i>	,033	,967	,002	,055
	<i>Lachnospiraceae</i>	,196	,823	,009	,079
	<i>Roseburia</i>	,156	,856	,007	,073
	<i>Eubacterium</i>	,176	,840	,008	,075
	<i>Ruminococcus</i>	,128	,880	,006	,068
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,434	,651	,020	,116
	<i>Anaerotruncus</i>	2,328	,110	,098	,446
	<i>Faecalibacterium</i>	1,153	,325	,051	,240
	<i>Ruminoclostridium</i>	,996	,378	,044	,212
	<i>Ruminococcaceae</i>	,748	,479	,034	,169
	<i>Subdoligranulum</i>	,564	,573	,026	,137
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	,072	,931	,003	,060
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	,517	,600	,023	,130
	<i>Phascolarctobacterium</i>	,744	,481	,033	,168
	<i>Dialister</i>	,110	,896	,005	,066
	<i>Akkermansia</i>	1,244	,298	,055	,256
	Outros	2,195	,124	,093	,424

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

O nível de *Christensenellaceae*, *Anaerotruncus* e *Ruminococcaceae* entre os participantes que nasceram por parto natural, independente do grupo, foi maior e estatisticamente significativo, com valores de p= 0,043, p= 0,009 e p=0,030, respectivamente. O nível de *Bifidobacterium* não apresentou diferença estatística no pós teste (Tabela 25 e Anexo 17).

No grupo dos pacientes saudáveis, os participantes nascidos por parto natural apresentaram *Anaerotruncus* mais abundantes que os nascidos por parto cesárea. (p= 0,019). No pós teste o nível de *Bifidobacterium* não apresentou significância estatística (Tabela 26 e Anexo 18).

Tabela 21: Teste de efeito entre os sintomas atuais dos participantes x gêneros (independente do grupo)

Variável independente	Variável dependente	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Sintomas atuais	<i>Bifidobacterium</i>	,247	,622	,006	,077
	<i>Bacteroides</i>	1,076	,305	,024	,174
	<i>Parabacteroides</i>	1,259	,268	,028	,195
	<i>Prevotella</i>	2,017	,163	,045	,284
	<i>Alistipes</i>	,514	,477	,012	,108
	<i>Christensenellaceae</i>	,001	,976	,000	,050
	<i>Lachnoclostridium</i>	,051	,823	,001	,056
	<i>Lachnospiraceae</i>	1,463	,233	,033	,219
	<i>Roseburia</i>	,000	,992	,000	,050
	<i>Eubacterium</i>	,237	,629	,005	,076
	<i>Ruminococcus</i>	,797	,377	,018	,141
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,523	,474	,012	,109
	<i>Anaerotruncus</i>	,981	,327	,022	,162
	<i>Faecalibacterium</i>	2,437	,126	,054	,333
	<i>Ruminoclostridium</i>	8,746	,005	,169	,824
	<i>Ruminococcaceae</i>	,190	,665	,004	,071
	<i>Subdoligranulum</i>	1,135	,293	,026	,181
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	,577	,452	,013	,115
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	,904	,347	,021	,153
	<i>Phascolarctobacterium</i>	1,001	,323	,023	,165
	<i>Dialister</i>	,282	,598	,007	,081
	<i>Akkermansia</i>	,031	,862	,001	,053
	Outros	1,476	,231	,033	,221

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

Tabela 22 - Teste de efeito entre os sintomas atuais dos participantes x gêneros, de acordo com os grupos de estudo

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Grupo * Sintomas Atuais	<i>Bifidobacterium</i>	1,565	,221	,068	,314
	<i>Bacteroides</i>	,272	,763	,013	,090
	<i>Parabacteroides</i>	,169	,845	,008	,075
	<i>Prevotella</i>	,069	,934	,003	,060
	<i>Alistipes</i>	,119	,888	,006	,067
	<i>Christensenellaceae</i>	,359	,701	,016	,104
	<i>Lachnoclostridium</i>	,718	,493	,032	,164
	<i>Lachnospiraceae</i>	,045	,957	,002	,056
	<i>Roseburia</i>	1,582	,217	,069	,317
	<i>Eubacterium</i>	,605	,551	,027	,144
	<i>Ruminococcus</i>	,610	,548	,028	,145
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,209	,812	,010	,081
	<i>Anaerotruncus</i>	1,517	,231	,066	,305
	<i>Faecalibacterium</i>	,162	,851	,007	,073
	<i>Ruminoclostridium</i>	1,038	,363	,046	,219
	<i>Ruminococcaceae</i>	,673	,516	,030	,156
	<i>Subdoligranulum</i>	2,344	,108	,098	,449
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	,325	,724	,015	,099
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	,019	,981	,001	,053
	<i>Phascolarctobacterium</i>	7,464	,002	,258	,926
	<i>Dialister</i>	,979	,384	,044	,209
	<i>Akkermansia</i>	,442	,646	,020	,117
	Outros	,858	,431	,038	,188

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

Tabela 23 - Teste de efeito entre o uso de medicação atual dos participantes x gêneros (independente do grupo)

Variável independente	Variável dependente	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Uso de medicação	<i>Bifidobacterium</i>	,710	,404	,016	,131
	<i>Bacteroides</i>	3,119	,084	,068	,408
	<i>Parabacteroides</i>	1,357	,251	,031	,207
	<i>Prevotella</i>	,563	,457	,013	,114
	<i>Alistipes</i>	,012	,912	,000	,051
	<i>Christensenellaceae</i>	1,468	,232	,033	,220
	<i>Lachnoclostridium</i>	3,055	,088	,066	,401
	<i>Lachnospiraceae</i>	,118	,733	,003	,063
	<i>Roseburia</i>	1,098	,301	,025	,176
	<i>Eubacterium</i>	1,693	,200	,038	,246
	<i>Ruminococcus</i>	3,914	,054	,083	,490
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,365	,549	,008	,091
	<i>Anaerotruncus</i>	,367	,548	,008	,091
	<i>Faecalibacterium</i>	1,303	,260	,029	,200
	<i>Ruminoclostridium</i>	2,303	,136	,051	,317
	<i>Ruminococcaceae</i>	,136	,714	,003	,065
	<i>Subdoligranulum</i>	3,028	,089	,066	,398
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	1,664	,204	,037	,243
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	7,259	,010	,144	,750
	<i>Phascolarctobacterium</i>	2,828	,100	,062	,376
	<i>Dialister</i>	,358	,553	,008	,090
	<i>Akkermansia</i>	,391	,535	,009	,094
	Outros	4,330	,043	,091	,530

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

Tabela 24 - Teste de efeito entre o uso de medicação atual dos participantes x gêneros, de acordo Com grupo de estudo

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Grupo * Uso de Medicação	<i>Bifidobacterium</i>	3,295	,076	,071	,427
	<i>Bacteroides</i>	,564	,457	,013	,114
	<i>Parabacteroides</i>	,507	,480	,012	,107
	<i>Prevotella</i>	,048	,828	,001	,055
	<i>Alistipes</i>	,430	,515	,010	,098
	<i>Christensenellaceae</i>	,188	,667	,004	,071
	<i>Lachnoclostridium</i>	,005	,942	,000	,051
	<i>Lachnospiraceae</i>	,189	,666	,004	,071
	<i>Roseburia</i>	2,607	,114	,057	,352
	<i>Eubacterium</i>	,435	,513	,010	,099
	<i>Ruminococcus</i>	,022	,882	,001	,052
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,958	,333	,022	,160
	<i>Anaerotruncus</i>	,271	,605	,006	,080
	<i>Faecalibacterium</i>	1,037	,314	,024	,169
	<i>Ruminoclostridium</i>	,385	,538	,009	,093
	<i>Ruminococcaceae</i>	2,050	,159	,046	,288
	<i>Subdoligranulum</i>	,571	,454	,013	,114
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	,916	,344	,021	,155
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	,000	,990	,000	,050
	<i>Phascolarctobacterium</i>	,401	,530	,009	,095
	<i>Dialister</i>	,376	,543	,009	,092
	<i>Akkermansia</i>	,209	,650	,005	,073
	Outros	,000	,997	,000	,050

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

Tabela 25 - Teste de efeito entre o tipo de parto x gêneros (independente do grupo).

Variável independente	Variável dependente	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Tipo de parto	<i>Bifidobacterium</i>	3,341	,043	,108	,608
	<i>Bacteroides</i>	,600	,552	,021	,145
	<i>Parabacteroides</i>	,876	,422	,031	,193
	<i>Prevotella</i>	,613	,545	,022	,147
	<i>Alistipes</i>	,054	,948	,002	,058
	<i>Christensenellaceae</i>	3,275	,045	,106	,599
	<i>Lachnoclostridium</i>	1,587	,214	,055	,322
	<i>Lachnospiraceae</i>	,108	,898	,004	,066
	<i>Roseburia</i>	,073	,929	,003	,061
	<i>Eubacterium</i>	,050	,951	,002	,057
	<i>Ruminococcus</i>	1,703	,192	,058	,343
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,181	,835	,007	,077
	<i>Anaerotruncus</i>	4,868	,011	,150	,781
	<i>Faecalibacterium</i>	,282	,755	,010	,092
	<i>Ruminoclostridium</i>	,633	,535	,023	,151
	<i>Ruminococcaceae</i>	4,774	,012	,148	,773
	<i>Subdoligranulum</i>	,444	,643	,016	,119
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	,386	,682	,014	,109
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	,305	,738	,011	,096
	<i>Phascolarctobacterium</i>	,699	,501	,025	,162
	<i>Dialister</i>	,084	,920	,003	,062
	<i>Akkermansia</i>	,368	,694	,013	,106
	Outros	,213	,809	,008	,082

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

Tabela 26 - Teste de efeito entre o tipo de parto dos participantes x gêneros, de acordo com os grupos de estudo.

Variáveis independentes	Variáveis dependentes	F	Sig.	η_p^2	Poder observado ^a
Grupo * Tipo de parto	<i>Bifidobacterium</i>	3,758	,016	,170	,783
	<i>Bacteroides</i>	,705	,553	,037	,190
	<i>Parabacteroides</i>	,722	,543	,038	,194
	<i>Prevotella</i>	,472	,703	,025	,139
	<i>Alistipes</i>	,454	,715	,024	,136
	<i>Christensenellaceae</i>	2,311	,086	,112	,552
	<i>Lachnoclostridium</i>	2,313	,086	,112	,552
	<i>Lachnospiraceae</i>	,240	,868	,013	,093
	<i>Roseburia</i>	,527	,666	,028	,151
	<i>Eubacterium</i>	,081	,970	,004	,064
	<i>Ruminococcus</i>	,191	,902	,010	,083
	<i>Lachnospiraceae (Other)</i>	,259	,854	,014	,096
	<i>Anaerotruncus</i>	3,260	,028	,151	,717
	<i>Faecalibacterium</i>	,070	,976	,004	,062
	<i>Ruminoclostridium</i>	,456	,714	,024	,136
	<i>Ruminococcaceae</i>	,436	,728	,023	,132
	<i>Subdoligranulum</i>	,064	,979	,003	,061
	<i>[Eubacterium] coprostanoligenes</i>	,649	,587	,034	,177
	<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	,041	,989	,002	,057
	<i>Phascolarctobacterium</i>	,195	,899	,011	,084
	<i>Dialister</i>	,812	,493	,042	,214
	<i>Akkermansia</i>	,265	,851	,014	,097
	Outros	,753	,525	,039	,201

^a Calculado utilizando alfa = 0,05; η_p^2 = Eta parcial quadrado; *Dados convertidos em z-score

6 DISCUSSÃO

De acordo com resultados taxonômicos foi observado que o filo mais abundante nos três grupos de estudo foi Firmicutes seguido pelo Bacteroidetes. Estudos prévios mostraram que o filo Bacteroidetes era o mais abundante tanto em pacientes adultos saudáveis quanto em adultos constipados funcionais (PARTHASARATHY, 2016; HUANG, 2018). Zhu et al. avaliaram crianças obesas saudáveis e crianças obesas com constipação funcional e encontrou que nos pacientes constipados o filo Firmicutes era mais abundante (ZHU, 2014).

Quanto ao gênero das bactérias, a composição microbiana diferiu significativamente somente em relação ao *Bifidobacterium*, sendo mais abundantes na constipação funcional do que no grupo saudável.

Primeiro estudo que avaliou microbiota intestinal de crianças com constipação intestinal crônica foi realizado por Zoppi et al. e investigou a composição do ecossistema intestinal por método microbiológico padrão e ensaio bioquímico, antes e após o tratamento com policarbofil de cálcio, polímero sintético, não absorvível nem digerível que regula a consistência das fezes na constipação. Antes do tratamento, observou-se um aumento significativo de *clostridium* e bifidobactérias nas fezes de crianças com constipação intestinal em comparação com indivíduos saudáveis e não observou supercrescimento bacteriano nos pacientes constipados. O tratamento durante um mês não induziu alterações significativas na microbiota dessas crianças, sendo observadas mudanças qualitativas discretas, como: redução do número de espécies de enterobactérias isoladas e redução da frequência de bifidobactérias e lactobacilos. O número total de *clostridium* manteve-se praticamente inalterado antes e após o tratamento, porém foi visto que o *C. perfringens* e *C. ramosum* que estavam presentes antes do tratamento, não foram isolados nas amostras pós-tratamento. A redução de *C. perfringens*, um potencial microrganismo patogênico e produtor de enterotoxinas, é considerada um efeito positivo (ZOPPI et al., 1998).

Estudos prévios mostraram resultados diferentes. Khalif et al. relataram que os níveis de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* foram significativamente diminuídos em pacientes adultos com constipação.

Moraes et al. analisaram a microbiota fecal de pacientes pediátricos constipados funcionais e não constipados com idades entre 6 meses e 3 anos utilizando como técnica molecular o PCR em tempo real com primers gênero específico para *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Observaram que

crianças constipadas apresentaram quantidade significativamente menor de lactobacilos por miligrama de fezes e quantidades semelhantes de bifidobactérias quando comparadas com crianças não constipadas. Além disso, mostraram que crianças constipadas tiveram menor tempo de amamentação, maior consumo de produtos lácteos e história materna positiva de constipação intestinal (MORAES et al., 2016).

Huang et al., analisaram a composição da microbiota intestinal de pacientes adultos constipados e saudáveis e observaram que nos pacientes constipados as bactérias dos gêneros *Parabacteroides* e *Erisipelotricaceae_UCG-003* estavam mais abundantes se comparados ao grupo de saudáveis, enquanto *Prevotella_9*, *Megamonas*, *Enterobacteriaceae* não classificado e *Klebsiella* foram menos abundantes no grupo constipação do que no grupo saudável. Após análise linear discriminante, os gêneros *Parabacteroides* e *Faecalibacterium* foram os principais tipos de bactérias que contribuem para a disbiose em pacientes com constipação funcional (HUANG, 2018).

Parthasarathy et al. analisaram a microbiota fecal, a microbiota da mucosa colônica, o tempo de trânsito intestinal e a produção de metano de 25 mulheres saudáveis e 25 mulheres com constipação crônica (constipação funcional, síndrome intestino irritável com predomínio de constipação) e observaram que o gênero *Faecalibacterium* foi mais abundante nos constipados. A produção de metano foi associada com a composição da microbiota tecidual, mas não com a constipação intestinal ou tempo de trânsito colônico (PARTHASARATHY et al, 2016).

Meij et al., em estudo com 76 crianças com constipação funcional em comparação com 61 criança saudáveis, não observaram diferença significativa entre os dois grupos ao analisar o índice de Shannon e beta diversidade para os filos. Entretanto, ao utilizarem modelo de regressão os grupos foram discriminados com 82% de acurácia. Observaram aumento das espécies *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bifidobacterium longum*, *Parabacteroides* e diminuição *Alistipes finegoldii* no grupo dos pacientes com constipação funcional (MEIJ, 2016).

Zhu et al. avaliaram a microbiota intestinal de 8 pacientes pediátricos obesos e constipados funcionais e compararam com 14 pacientes obesos e não constipados, por meio da técnica de pirosequenciamento 16S rRNA e observaram, nos pacientes constipados, diminuição na abundância de bactérias do gênero *Prevotella* (família *Prevotellaceae*) e aumento da representação de várias famílias e gêneros do filo Firmicutes (ZHU et al., 2014).

Foi observado neste estudo que participantes sintomáticos no momento da coleta, apresentaram maior abundância do gênero *Ruminoclostridium* em relação aos indivíduos

assintomático, independente do grupo de estudo. No grupo dos pacientes saudáveis, os participantes sintomáticos no momento da coleta possuíam nível maior do gênero *Phascolarctobacterium*. O sintoma relatado nos indivíduos saudáveis foi dor abdominal. Nenhum dos estudos relatados acima que avaliaram a microbiota intestinal de pacientes constipados objetivou associar a disbiose com sintomas clínicos.

O tratamento medicamentoso foi muito variável e portanto, subgrupos de pacientes muito heterogêneo. Estudos prévios relatam alteração da microbiota intestinal com o uso do polietilenoglicol, porém tal associação não foi observada nos 5 pacientes estudados que estavam em uso desta medicação.

Estudo realizado em camundongos tratados com PEG 4000 por 2 semanas e controles. Observaram que o tratamento com PEG aumentou o pool de ácidos biliares, reduziu a excreção fecal de ácido biliar secundário e diminuiu a atividade citolítica da água fecal. Além disso, os camundongos tratados com PEG apresentaram aumento da abundância de bactérias do filo Verrucomicrobia e de bactérias do gênero *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Ruminococcus* e concomitante diminuição da abundância relativa de Clostridia (WULP et al, 2013).

Estudo realizado para avaliar o efeito da lactulose na microbiota intestinal e na produção de AGCC observou redução da produção de butirato quando oferecido lactulose em modelos in vitro, porém em amostras fecais de 10 voluntários não houve alteração no pH fecal e na relação AGCC. Após o uso de lactulose, houve um aumento significativo na contagem de *Bifidobacterium* observado em amostras de fezes, e aumento nas espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus* observado em modelos in vitro (VENEMA et al., 2003).

O filo Tenericutes foi mais abundante em pacientes que nasceram por parto cesárea se comparados com parto vaginal independente do grupo de estudo. Não há relatos na literatura de observação semelhante, talvez pela pouca abundância de espécies deste filo. Com relação a análise de gêneros bacterianos foi visto que o nível de *Christensenellaceae*, *Anaerotruncus* e *Ruminococcaceae* foi maior entre os participantes que nasceram por parto natural, independente do grupo. No grupo dos pacientes saudáveis, os participantes nascidos por parto natural também apresentaram *Anaerotruncus* mais abundantes que os nascidos por parto cesárea.

Na literatura não há estudos que avaliam a microbiota intestinal de pacientes com espinha bífida. Estudos com dados indiretos como tempo de trânsito colônico e supercrescimento bacteriano sugerem disbiose intestinal neste grupo.

Estudo realizado com 18 crianças com mielomeningocele para avaliação de supercrescimento bacteriano e tempo de trânsito orocecal por meio do teste hidrogênio/metano expirado após ingestão de lactulose observou que 40% dos pacientes apresentaram supercrescimento bacteriano e que 60% tiveram atraso no tempo de trânsito orocecal. Observaram também que metade das crianças cuja microbiota intestinal era metanogênica tinha o trânsito intestinal mais lento e maior prevalência de infecções urinárias (OJETTI et al., 2014).

Pigeon et al, avaliaram a motilidade colônica, através do tempo de trânsito intestinal com marcadores radiopacos, em 22 pacientes com mielomeningocele e compararam com 22 pacientes saudáveis pareados por idade e sexo. Observaram que o tempo de trânsito colônico foi significativamente maior em pacientes com mielomeningocele e não houve associação entre o tempo de trânsito colônico e o nível da lesão medular ou grau de mobilidade do paciente (PIGEON et al, 1997).

Este estudo apresentou algumas limitações como amostra pequena de pacientes incluídos, a continuidade do uso de laxantes durante a coleta de amostras e a não avaliação da dieta nos grupos de estudo, aumentando a probabilidade de erro tipo I, embora a população tenha sido de uma área geográfica restrita. Além disso, Parthasarathy e colaboradores compararam a microbiota de mucosa intestinal e de fezes e concluíram que a microbiota da mucosa está ligada à constipação intestinal, independentemente do tempo de trânsito intestinal, enquanto a microbiota fecal está ligada ao tempo de trânsito e produção de metano no ar expirado. Porém, a colonoscopia não é realizada rotineiramente em crianças com constipação funcional e neurogênica e a coleta em grande escala de amostras de mucosa não é facilmente empregado nesta população (PARTHASARATHY et al, 2016).

Concluímos, portanto, que no presente estudo foi possível caracterizar presença de disbiose nos pacientes com constipação intestinal funcional, cuja composição microbiana foi significativamente mais abundante em bactérias do gênero *Bifidobacterium*, em relação ao grupo controle, tal achado não foi observado no grupo de intestino neurogênico.

Em relação ao tipo de parto, foi possível detectar algumas diferenças na microbiota, sendo o filo *Tenericutes* mais abundante em pacientes nascidos de parto vaginal em relação ao parto cesárea, independente do grupo de estudo. Com relação à análise de gêneros bacterianos foi visto que o nível de *Christensenellaceae*, *Anaerotruncus* e *Ruminococcaceae* foi maior entre os participantes de parto natural, independente do grupo. No grupo dos pacientes saudáveis, os

nascidos por parto natural também apresentaram *Anaerotruncus* mais abundantes do que aqueles de parto cesárea.

Foi observado neste estudo que participantes sintomáticos apresentaram maior abundância do gênero *Ruminoclostridium* em relação aos indivíduos assintomático, independente do grupo de estudo.

Quanto ao sexo, tempo de amamentação exclusiva e medicações utilizadas para tratamento da doença, não foram encontradas nenhuma diferença na microbiota entre os grupos. O tratamento medicamentoso foi muito variável e, portanto, abrangia subgrupos de pacientes muito heterogêneos.

Futuros estudos são necessários, multicêntricos ou com maior amostragem, para validar os achados do presente estudo, comprovando assim a presença de disbiose em pacientes com constipação funcional.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN R.I.; LUDWIG W.; SCHLEIFER K.H. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*, v.59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- AUSILI, E. et al. Transanal irrigation in myelomeningocele children: an alternative, safe and valid approach for neurogenic constipation. *Spinal Cord*, v. 48, 560–565, 2010
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* v. 42, p. 2 –7, 1998.
- BEZIRTZOGLU, E.,TSIOTSIAS A.,WELLING G.W. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed new borns by using fluorescence in situ hybridization (fish). *Anaerobe*, v.17, p.478–82, 2011.
- BROSIUS, J. et al.,Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli*. *Plasmid*., v. 6, n. 1, p.112-8, july 1981.
- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS*. v. 108, suppl.1, p. 4516–4522, 2011.
- CARVALHO E.; SILVA L.R.; FERREIRA C.T. *Gastroenterologia e Nutrição em Pediatria*. 1ª edição, 2012, p.471.
- CHASSARD, C. et al. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v.35, p. 828-838, 2012.
- CHMIELEWSKA, A.; SZAJEWSKA, H. Systematic review of randomised controlled trials:probiotics for functional constipation. *World Journal of Gastroenterology*, v. 16, n. 1, p. 69-75, January, 2010.
- CHUNG, H. et al. Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a HostSpecific Microbiota. *Cell*, v. 149, n.7, p. 1578–1593, june 2012.
- DIGIULIO, D. B. et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PloSOne*, v. 3, n. 8, p. 1-10, august, 2008.
- DIGIULIO, D.B. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*,v. 17, p.2–11, 2012.
- DONOVAN, S.M.et al. .Host- microbe interactions in the neonatal intestine : Role of Human Milk Oligosaccharides. *AdvNutr*, v. 3, p. 450S–5S, 2012.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, june 2005

FERNANDEZ, L. Et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, p.1–10, 2013.

GAIVA, M.A.M. et al. Perfil clínico-epidemiológico de crianças e adolescentes que vivem e convivem com espinha bífida. *Revista Brasileira Crescimento e Desenvolvimento Humano*. v.21, n.1, p. 99-110, 2011.

GARRETT, W. S., GORDON, J.I, GLIMCHER, L.H. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*, v. 140, n.6, p. 859-70, march 2010.

GE, X. et al. Fecal Microbiota Transplantation in Combination with Soluble Dietary Fiber for Treatment of Slow. Transit Constipation: A Pilot Study. *Archives of Medical Research*, v. 47, 236-242, 2016.

GE, X. et al. Potential role of fecal microbiota from patients with slow transit constipation in the regulation of gastrointestinal motility. *Scientif Reports*. 7:441, p. 1-11, march 2017.

GUERRA, P.V.P. et al. Pediatric functional constipation treatment with Bifidobacterium-containing yogurt:A crossover, double-blind, controlled trial. *World Journal of Gastroenterology*, v.17, n.34, p.3916-3921, september, 2011.

GUILLOTEAU, P. et al. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev*. v. 23, n. 2, p. 366-84, december 2010.

HAWRELAK J.A, MYERS S.P. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev*, v.9, n.2, p.180-197, 2004.

HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.*, v. 22, p. 283-307, april 2002.

HUANG, L.S. et al. Analysis of fecal microbiota in patients with functional constipation undergoing treatment with synbiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, jan. 2018.

HYMAN, P. E. et al. Childhood Functional Gastrointestinal Disorders:Neonate/ Toddler. *Gastroenterology*, v.130, p.1519–1526, 2006.

ILLUMINA. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation.disponível em:
https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

JAKOBSSON, H.E. et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed bacteroidetes colonisation and reduced th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, p. 1-8, 2013.

JIMENEZ, E. Et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, v. 159, n.3, p. 187–93, april 2008.

JOST, T.et al. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental Microbiology*, v.16, n.9, p.2891–904, september, 2014.

KOENIG, J.E. et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *ProcNatl Acad Sci USA*, v. 108, suppl.1, p. 4578–85,march 2011.

KOPPEN, I.J.N., BENNINGA, M.A, TABBERS, M.M. Is There A Role for Pre-, Pro- and Synbiotics in the Treatment of Functional Constipation in Children? A Systematic Review. *JPGN*, v.63, supplement 1, P. s27-s35, july 2016.

KROGH, K.; CHRISTENSEN, P. Neurogenic colorectal and pelvic floor dysfunction. *Practice & Research Clinical Gastroenterology*, n. 23, p. 531–543, 2009.

KROGH, K. et al. Rectal wall properties in patients with acute and chronic spinal cord lesions. *Diseases of the Colon and Rectum*, v. 45, p.641–9, 2002.

LEY R. E.; PETERSON D. A.; GORDON J.I. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 837–848, february 2006.

MACFARLANE, G.T.; GIBSON, G. R.; CUMMINGS, J. H. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol*. v. 72, n. 1, p.57-64, 1992.

MACHADO, A. *Neuroanatomia Funcional*. Atheneu, 2004

MACHADO, A. B. F. et. al. *Microbiota Intestinal. Evidências de sua influência na saúde e na doença*. Ed. Rubio Ltda,Rio de Janeiro, 2015.

MACKIE R. I.; SGHIR A.; GASKINS H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 69, n. 5, p. 1035s-1045S, may 1999.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*, n. 4, p. 478–485, 2004.

MACPHERSON, A. J.; UHR, T. Compartmentalization of the Mucosal Immune Responses to Commensal Intestinal Bacteria. *Annals of the New York academy os sciences*, v. 1029, p. 36-4, december, 2004.

MALONE, P.S.; RANSLEY, P.G.; KIELY, E.M. Preliminary report: the antegrade continence enema. *Lancet*, v.336, p.1217–8, 1990.

MARTIN, R. et al. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Beneficial Microbes*, v.4, n. 1, p. 367–82, 2010.

MARTINEZ, A.P; AZEVEDO, G.R.Tradução, adaptação cultural e validação da Bristol Stool Form Scale para a população brasileira. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, v. 20, n. 3, 2012.

MATTSSON, S; GLADH G. Tap-water enema for children with myelomeningocele and neurogenic bowel dysfunction. *Acta Paediatrica*, v. 95, p. 369-374, 2006.

MAYNARD, C.L. et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, v. 489, n.7415, p. 231–41, sep. 2012.

MEIJ, T.G.J. et al. Characterization of Microbiota in Children with Chronic Functional Constipation. *PloSOne*, p. 1-13, october, 2016.

MOORE, K.L.; PERSUAD, T.V.N. *Embriologia clinica*. 6ª Edição, 2000, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

MORAES, J. G. et al. Fecal Microbiota and Diet of Children with Chronic Constipation. *International Journal of Pediatrics*, v.2016, p. 1-8, 2016.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Jornal de Pediatria*. V. 82, n.5, (suplemento), 2006.

NICOLLI, J.R.;LEITE,J.I.A. *Nutrição e Microbiota Gastrointestinal*. *Terapia Nutricional nas Doenças do Aparelho Digestivo na Infância e Adolescência*. 3ª edição, 2013, Editora: medbook, Rio de Janeiro, capítulo 1, p. 1-13.

OJETTI, V. et al. The prevalence of small intestinal bacterial overgrowth and methane production in patients with myelomeningocele and constipation. *Spinal Cord*, v.52, p. 61–64, 2014.

OUWEHAND, A.;ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur J Nutr*, v. 41, Supplement 1, p. I/32-I/37, 2002.

PALMER, A.C..Nutritionally mediated programming of the developing immune system. *AdvNutr*, v.2, p. 377–95, 2011.

PALMER, C.et al. Development of the human intestinal microbiota. *PLoS Biol*. n. 5, v. 7, p. 1556-72, 2007.

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

PRYDE, S. E. et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, v. 217, n. 2, p. 133-139, december 2002.

RASQUIN, A. et al. Childhood Functional Gastrointestinal Disorders: Child/Adolescent. *Gastroenterology*, n.130, p.1527–1537, 2006.

RENDELI, C. et al. Polyethylene glycol 4000 vs. lactulose for the treatment of neurogenic constipation in myelomeningocele children: a randomized-controlled clinical trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 23, p. 1259-65, april 2006

ROGIER, E.W.e tal. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *ProcNatl Acad Sci U SA*, v.111, n.8, p. 3074–9, february 2014.

SATOKARI, R. et al. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Letters in Applied Microbiology*, v. 48, p. 8, 2008.

STEVENSON, R. D. Use of segmental measures to estimate stature in children with cerebral palsy. *Arch Pediatr Adolesc Med*, v. 149, p. 658–662, 1995

TABBERS M.M. et al. Fermented Milk Containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 in Childhood Constipation: A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. *Pediatrics*, v.125, n.6, p. e1392-e1399, May, 2011.

TIAN,H. et al. Treatment of Slow Transit Constipation With Fecal Microbiota Transplantation A Pilot Study *J Clin Gastroenterol*, v.0, n.0, 2016

TURNBAUGH P.J. et al. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*. n. 449, v. 7164, p. 804–810, 2007.

VAN DEN BERG, M.M.; BENNINGA, M.A.; DI LORENZO, C.. Epidemiology of childhood constipation: a systematic review. *American Journal of Gastroenterology*, v.101, p. 2401-2409, 2006.

VENEMA, K. et al. The Effect of Lactulose on the Composition of the Intestinal Microbiota and Short-chain Fatty Acid Production in Human Volunteers and a Computer controlled Model of the Proximal Large Intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*, v.15, p. 94-105, 2003.

VRIEZE, A. et al.,The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia.*, v. 53, n.4, p. 606-13, april, 2010.

WEBER, T.K.; POLANCO.I. Gastrointestinal Microbiota and Some Children Diseases: A Review. *Gastroenterology Research and Practice*, july , 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Child growth Standards. WHO Anthro disponível em: <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Child growth Standards. WHO Anthro plus disponível em: <http://www.who.int/growthref/tools/en/>.

WULP, M.Y.M.V.D et al. Laxative treatment with polyethylene glycol decreases microbial primary bile salt dehydroxylation and lipid metabolism in the intestine of rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 305, n.7, p. G474–G482, 2013.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, v. 486, n. 7402, p. 222-7, may 2012.

ZHAO, Y.; YU, Y. Intestinal microbiota and chronic constipation. *SpringerPlus*, v.5, n. 1130, p.1-8, 2016.

ZHU, L. et al. Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. *Physiol Genomics*, v.46, p. 679–686, 2014.

ZOPPI G. et al. The intestinal ecosystem in chronic functional constipation. *Acta Paediatrica*. v.87, p. 836- 841, 1998.

¹ De acordo com ABNT, São Paulo 2016

8 ANEXOS

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Puericultura e Pediatria

TERMO DE CONSENTIMENTO

Projeto de Pesquisa: “Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo”

Caros Pais ou Responsáveis,

Estamos lhes escrevendo em nome de um grupo de pesquisadores para convidá-los a participar de um projeto de pesquisa com o objetivo de determinar a microbiota, que é a população de bactérias intestinal, dos pacientes estudados. Um grande número de crianças neste país sofre de constipação intestinal, caracterizada pela dificuldade de evacuar ou “intestino preso”.

Todas as informações fornecidas serão confidenciais e o seu filho (a) será identificado apenas por um código de letras e números. Somente os investigadores terão acesso a esses dados, que serão mantidos de forma estritamente confidencial, garantindo o sigilo e privacidade do paciente. A recusa em participar do estudo não prejudicará, em nada, o acompanhamento ou o tratamento que a criança já recebe nesse Hospital. **Os senhores (as) terão pleno acesso aos resultados obtidos concernentes ao paciente e a pesquisa não interferirá no tratamento, evolução e conduta médica.**

Pedimos que leia com atenção a folha contendo as informações detalhadas sobre a pesquisa e se estiver de acordo em participar nos dê o seu consentimento para a participação, assinando esta folha após a leitura das informações.

- a criança colherá uma amostra de fezes
- os pais ou responsáveis deverão responder um questionário com duração aproximada de 30 minutos.
- não haverá gastos para a família para a participação nesse estudo
- a autorização para a participação é voluntária, podendo os pais ou responsáveis livremente retirá-la do estudo a qualquer momento, se assim o desejar, o que não ocasionará qualquer penalidade
- Não haverá benefício direto ao participante. O objetivo da sua participação é contribuir para determinação da microbiota intestinal de pacientes com constipação crônica, e por isso a sua participação será de grande importância para saber se a flora bacteriana intestinal de crianças ou adolescentes com constipação intestinal é diferente de quem tem intestino normal. O resultado deste estudo pode auxiliar no futuro, na melhor escolha de um probiótico (medicação) para o tratamento da constipação intestinal.
- Haverá ressarcimento no valor de R\$ 25,00 (vinte e cinco reais) referente aos gastos com alimentação e transporte.

Se o senhor concordar, armazenaremos amostras de fezes de seu filho (a) que constituirão o biorrepositório desse estudo. Para a autorização do armazenamento dessas amostras será apresentado ao senhor (a) um termo de consentimento de guarda de material, o qual deve ser assinado em duas vias.

Em qualquer etapa do estudo, o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. Se houver alguma dúvida ou consideração sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP no telefone (16) 3602-2228.

Após o término do estudo estas amostras de fezes continuarão sendo guardadas em nosso Laboratório para pesquisas futuras e não serão desprezadas. Você pode optar por ser avisado a cada novo estudo ou liberar deste aviso, para tanto assinale abaixo.

- () desejo ser avisado a cada novo estudo
() não desejo ser avisado

Nome do responsável pelo paciente – letra de forma

_____/_____/_____
(Assinatura do responsável pelo paciente) dia mês ano

Local: _____

Nome do Pesquisador

_____/_____/_____
(Assinatura do Pesquisador) dia mês ano

Local: _____

Responsáveis pela pesquisa:

Orientadora: Dra Regina Sawamura – Professora Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP

Pesquisadora responsável: Dra Priscilla Rezende de Abreu Ferreira – Mestranda do programa Saúde Criança e Adolescente da FMRP-USP. Telefone de contato: (016) 98152-8718.

Universidade de São Paulo- Hospital de Clínicas Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP – Departamento de Pediatria

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre

CEP: 14049-900 Ribeirão Preto/SP Telefone: (16) 3602- 2672

TERMO DE ASSENTIMENTO

Projeto de Pesquisa: “Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo”

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa que tem como objetivo caracterizar as bactérias presentes nas fezes de crianças/adolescentes, com 3 a 18 anos de idade, saudáveis e que apresentam dificuldade ao evacuar.

O único procedimento que você terá de fazer será colher uma amostra de fezes (cocô).

Você pode escolher se quer participar ou não. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação no seu tratamento. Você pode dizer "sim" agora, e mudar de opinião depois, sem nenhum problema. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira.

Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não forneceremos informação suas a ninguém que não trabalhe na pesquisa. As informações sobre você serão coletadas na pesquisa e ninguém, exceto os investigadores poderão ter acesso a elas.

Este estudo não apresenta risco à sua saúde. Os resultados estarão à sua disposição quando finalizados.

Nome do Paciente – letra de forma

_____ ____ / ____ / ____
 (Assinatura do Paciente) dia mês ano

Local: _____

Nome do Pesquisador

_____ ____ / ____ / ____
 (Assinatura do Pesquisador) dia mês ano

Local: _____

Responsáveis pela pesquisa:

Orientadora: Dra Regina Sawamura – Professora Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP

Pesquisadora responsável: Dra Priscilla Rezende de Abreu Ferreira – Mestranda do programa Saúde Criança e Adolescente da FMRP-USP. Telefone de contato: (016) 98152-8718.

Universidade de São Paulo- Hospital de Clínicas Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP – Departamento de Pediatria
 Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre

CEP: 14049-900 Ribeirão Preto/SP Telefone: (16) 3602- 2672

ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO POPULAÇÃO SAUDÁVEL

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Puericultura e Pediatria

TERMO DE CONSENTIMENTO

Projeto de Pesquisa: “Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo”

Caros Pais ou Responsáveis,

Estamos lhes escrevendo em nome de um grupo de pesquisadores para convidá-los a participar de um projeto de pesquisa com o objetivo de determinar a microbiota, que é a população de bactérias intestinal, dos pacientes estudados. Um grande número de crianças neste país sofre de constipação intestinal, caracterizada pela dificuldade de evacuar ou “intestino preso”.

Seu filho foi convidado por não ter nenhuma doença e constituirá o controle do estudo como representante da população normal.

Todas as informações fornecidas serão confidenciais e o seu filho (a) será identificado apenas por um código de letras e números. Somente os investigadores terão acesso a esses dados, que serão mantidos de forma estritamente confidencial, garantindo o sigilo e privacidade do paciente. A recusa em participar do estudo não prejudicará, em nada, o acompanhamento ou o tratamento que a criança já recebe nesse Hospital. **Os senhores (as) terão pleno acesso aos resultados obtidos concernentes ao paciente e a pesquisa não interferirá no tratamento, evolução e conduta médica.**

Pedimos que leia com atenção a folha contendo as informações detalhadas sobre a pesquisa e se estiver de acordo em participar nos dê o seu consentimento para a participação, assinando esta folha após a leitura das informações.

- a criança colherá uma amostra de fezes
- os pais ou responsáveis deverão responder um questionário com duração aproximada de 30 minutos.
- não haverá gastos para a família para a participação nesse estudo
- a autorização para a participação é voluntária, podendo os pais ou responsáveis livremente retirá-la do estudo a qualquer momento, se assim o desejar, o que não ocasionará qualquer penalidade
- Não haverá benefício direto ao participante. O objetivo da sua participação é contribuir para determinação da microbiota intestinal de pacientes com constipação crônica, e por isso a sua participação será de grande importância para saber se a flora bacteriana intestinal de crianças ou adolescentes com constipação intestinal é diferente de quem tem intestino normal. O resultado deste estudo pode auxiliar no futuro, na melhor escolha de um probiótico (medicação) para o tratamento da constipação intestinal.
- Haverá ressarcimento no valor de R\$ 25,00 (vinte e cinco reais) referente aos gastos com alimentação e transporte.

Se o senhor concordar, armazenaremos amostras de fezes de seu filho (a) que constituirão o biorrepositório desse estudo. Para a autorização do armazenamento dessas amostras será apresentado ao senhor (a) um termo de consentimento de guarda de material, o qual deve ser assinado em duas vias.

Em qualquer etapa do estudo, o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. Se houver alguma dúvida ou consideração sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP no telefone (16) 3602-2228.

Após o término do estudo estas amostras de fezes continuarão sendo guardadas em nosso Laboratório para pesquisas futuras e não serão desprezadas. Você pode optar por ser avisado a cada novo estudo ou liberar deste aviso, para tanto assinale abaixo.

- () desejo ser avisado a cada novo estudo
() não desejo ser avisado

Nome dos Pais ou Responsáveis – letra de forma

_____/_____/_____
(Assinatura dos Pais ou Responsáveis) dia mês ano

Local: _____

Nome do Pesquisador

_____/_____/_____
(Assinatura do Pesquisador) dia mês ano

Local: _____

Responsáveis pela pesquisa:

Orientadora: Dra Regina Sawamura – Professora Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP
Pesquisadora responsável: Dra Priscilla Rezende de Abreu Ferreira – Mestranda do programa Saúde Criança e Adolescente da FMRP-USP. Telefone de contato: (016) 98152-8718.
Universidade de São Paulo- Hospital de Clínicas Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP – Departamento de Pediatria
Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre
CEP: 14049-900 Ribeirão Preto/SP Telefone: (16) 3602- 2672

TERMO DE ASSENTIMENTO

Projeto de Pesquisa: “Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo”

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa que tem como objetivo caracterizar as bactérias presentes nas fezes de crianças/adolescentes, com 3 a 18 anos de idade, saudáveis e que apresentam dificuldade ao evacuar. Você foi convidado pelo fato de não ter nenhuma doença.

O único procedimento que você terá de fazer será colher uma amostra de fezes (cocô).

Você pode escolher se quer participar ou não. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação no seu tratamento. Você pode dizer "sim" agora, e mudar

de opinião depois, sem nenhum problema. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira.

Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não compartilharemos informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa. As informações sobre você serão coletadas na pesquisa e ninguém, exceto os investigadores poderão ter acesso a elas.

Este estudo não apresenta risco à sua saúde. Os resultados estarão à sua disposição quando finalizados.

Nome do Paciente – letra de forma

_____/_____/_____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

Local: _____

Nome do Pesquisador

_____/_____/_____
(Assinatura do Pesquisador) dia mês ano

Local: _____

Responsáveis pela pesquisa:

Orientadora: Dra Regina Sawamura – Professora Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP

Pesquisadora responsável: Dra Priscilla Rezende de Abreu Ferreira – Mestranda do programa Saúde Criança e Adolescente da FMRP-USP. Telefone de contato: (016) 98152-8718.

Universidade de São Paulo- Hospital de Clínicas Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP – Departamento de Pediatria

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre

CEP: 14049-900 Ribeirão Preto/SP Telefone: (16) 3602- 2672

ANEXO 3: TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Puericultura e Pediatria

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Responsável pelo Biorrepositório referente ao projeto de pesquisa intitulado “Microbiota intestinal de pacientes pediátricos portadores de constipação intestinal funcional e intestino neurogênico em Espinha Bífida: Estudo comparativo”: Prof. Dra. Regina Sawamura

O senhor (a) está sendo convidado a autorizar a guarda de amostras de fezes para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, desse modo, tem a liberdade de aceitar ou não que amostra de seu filho (a) seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O senhor (a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

As amostras serão guardadas no Laboratório de Pediatria do HCFMRP-USP.

A equipe de pesquisa se compromete com a identificação das amostras e dos dados coletados de modo que possam ser garantidos o sigilo e a confidencialidade dos doadores. As amostras serão identificadas por números.

O senhor (a) deve fornecer todos os dados para que possa ser localizado pelos pesquisadores. Tem o direito de solicitar as informações de seu interesse relacionadas à pesquisa.

Caso o senhor (a) concorde com a armazenagem das amostras, após os esclarecimentos, 2 vias do termo serão assinadas pelo senhor(a) e pelo pesquisador e todas as páginas serão rubricadas. O senhor (a) ficará com uma via e a outra será arquivada nesse centro de pesquisa.

Após o término do estudo estas amostras de fezes continuarão sendo guardadas em nosso Laboratório para pesquisas futuras e não serão desprezadas. Você pode optar por ser avisado a cada novo estudo ou liberar deste aviso, para tanto assinale abaixo.

() desejo ser avisado a cada novo estudo

() não desejo ser avisado

 Nome do responsável pelo paciente – letra de forma

_____/_____/_____
 (Assinatura do responsável pelo paciente) dia mês ano

Local: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Nome do Pesquisador

____ / ____ / ____

(Assinatura do Pesquisador)

dia mês ano

Local: _____

Responsáveis pela pesquisa:

Orientadora: Dra Regina Sawamura – Professora Doutora do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP

Pesquisadora responsável: Dra Priscilla Rezende de Abreu Ferreira – Mestranda do programa Saúde Criança e Adolescente da FMRP-USP. Telefone de contato: (016) 98152-8718.

Universidade de São Paulo- Hospital de Clínicas Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP – Departamento de Pediatria

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre

CEP: 14049-900 Ribeirão Preto/SP Telefone: (16) 3602- 2672

ANEXO 4: QUESTIONÁRIO CLÍNICO SÓCIO DEMOGRÁFICO

Questionário Sócio Demográfico

Iniciais da criança/adolescente:
 Informante:.....
 Endereço:.....Telefone:.....
 Peso: Estatura:..... IMC:..... Z-score.....

A) Criança/adolescente:

- Data de nascimento: Idade: Prontuário:
- Sexo: () F () M Cor:..... natural:
- Escolaridade da criança/adolescente: Série:.....
 () pré escola () fundamental incompleto () fundamental completo
 () médio incompleto () médio completo () superior incompleto

B) Pais

a) pai

data de nascimento:..... idade:..... cor:.....
 profissão:..... emprego:
 Escolaridade: quantos anos de estudo:
 () analfabetizado () fundamental incompleto () fundamental completo
 () médio incompleto () médio completo () superior incompleto
 () superior completo

b) mãe

data de nascimento:..... idade:..... cor:.....
 profissão:..... emprego:
 Escolaridade: quantos anos de estudo:
 () analfabetizada () fundamental incompleto () fundamental completo
 () médio incompleto () médio completo () superior incompleto
 () superior completo

C) DADOS GERAIS:

1. Renda familiar em salários mínimos:.....
2. número de Irmãos:.....
3. Estado civil dos pais: () casados entre si () divorciados
 () casados com outros cônjuges () solteiro
4. Responsável: () pai () mãe () outro

Tabagismo na gestação? : () sim () não

Fumantes em ambiente domiciliar?: () sim () não tempo de exposição?.....

Questionário Clínico

Iniciais do paciente:

Características clínicas:

1. Diagnóstico:.....
2. Data do diagnóstico:.....
3. Idade do primeiro sintoma:.....
4. Medicamentos já utilizadas:.....

-
5. Medicações em uso:.....
6. Caracterização das evacuações/sintomas ao diagnóstico:
- duas ou menos evacuações por semana: ()sim ()não () não lembra
 pelo menos um episódio de incontinência fecal por semana: ()sim ()não () não lembra
 postura retentiva ou retenção voluntária de fezes: ()sim ()não () não lembra
 movimentos intestinais dolorosos: ()sim ()não () não lembra
 fezes de grande diâmetro que podem obstruir o vaso sanitário: ()sim ()não () não lembra
7. Frequência evacuatória atual:
 () diária () semanal.....
8. Classificação das fezes quanto a escala de Bristol:
 () tipo 1 () tipo 2 () tipo 3 () tipo 4 () tipo 5 () tipo 6 () tipo 7
9. Necessidade de lavagem intestinal: ()sim () não
 Frequência: () diária () semanal () mensal () esporádica
10. Uso de antibiótico no último ano:
 () 0 () 1-5 () 6-10 () > 10 vezes
11. Término do último ciclo de antibiótico: qual?.....qto tempo?.....
12. Uso de probióticos: () sim () não
 Qual?:.....
 Frequência: () diária () semanal () mensal () esporádica
 Último uso:.....
13. Número de internações no último ano:
 () 0 () 1-5 () 6-10 () > 10 vezes
14. Presença de sintomas atuais:
- Escape fecal: ()sim ()não
 Dor abdominal: ()sim ()não
 Dor ao evacuar: ()sim ()não
 Distensão abdominal: ()sim ()não
 Sangramento retal: ()sim ()não
15. Presença de outras doenças associadas.....
16. Tempo de aleitamento materno: exclusivo:
 Complementado:.....
17. Tipo de parto: () cesárea () vaginal RN Termo: () sim () não
18. Alergia ao látex ()sim ()não VDVP ()sim () não
19. Localização da lesão:..... grau de mobilidade:.....

ANEXO 5: ESCALA FECAL DE BRISTOL (MARTINEZ, A.P; AZEVEDO, G.R., 2012)

A ESCALA FECAL DE BRISTOL		
TIPO 1		Caroços duros e separados, como nozes (difíceis de passar)
TIPO 2		Salsicha-moldada, mas granuloso
TIPO 3		Como uma salsicha, mas com fissuras em sua superfície
TIPO 4		Como uma salsicha ou serpente, suave e macio
TIPO 5		Bolhas Suaves com bordas nítidas (que passa facilmente)
TIPO 6		Pedaços fofos com bordas em pedaços, um cocô sem consistência
TIPO 7		Aquoso, Sem partes sólidas. Inteiramente líquido

Tipo 1: bolinhas separadas e duras, como amendoim (difíceis de passar).

Tipo 2: forma de salsicha, mas segmentada.

Tipo 3: forma de salsicha, mas com fendas na superfície.

Tipo 4: forma de salsicha ou cobra, lisa e macia.

Tipo 5: pedaços moles, contornos nítidos e fáceis de passar.

Tipo 6: pedaços aerados, contornos esgarçados.

Tipo 7: aquosa, sem peças sólidas.

ANEXO 6: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 08 de outubro de 2015

Ofício nº 3551/2015
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“MICROBIOTA INTESTINAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS PORTADORES DE CONSTIPAÇÃO INTESTINAL FUNCIONAL E INTESTINO NEUROGÊNIO EM ESPINHA BÍFIDA: ESTUDO COMPARATIVO”**, foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como a **Criação do Biorrepositório, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o Termo de Assentimento e o Termo para a Guarda de Material Biológico**, de acordo com o Processo HCRP nº 11565/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^{CA}. MARCIA GUTMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

PRISCILLA REZENDE DE ABREU FERREIRA
PROF^{CA}. DR^{CA}. REGINA SAWAMURA (Orientadora)
Depto. de Puericultura e Pediatria

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO 7: Pós teste do efeito entre o sexo dos participantes x filos encontrados (independente do grupo)

Variável dependente ^a	(A) sexo	(B) sexo	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^b
Actinobacteria	Masculino	Feminino	,179	,274	,517
	Feminino	Masculino	-,179	,274	,517
Bacteroidetes	Masculino	Feminino	,485	,287	,099
	Feminino	Masculino	-,485	,287	,099
Firmicutes	Masculino	Feminino	-,512	,305	,100
	Feminino	Masculino	,512	,305	,100
Proteobacteria	Masculino	Feminino	,035	,295	,905
	Feminino	Masculino	-,035	,295	,905
Tenericutes	Masculino	Feminino	-,108	,301	,723
	Feminino	Masculino	,108	,301	,723
Verrucomicrobia	Masculino	Feminino	-,206	,326	,530
	Feminino	Masculino	,206	,326	,530
Outros	Masculino	Feminino	,268	,308	,389
	Feminino	Masculino	-,268	,308	,389

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Ajuste para diversas comparações: Sidak.

ANEXO 8: Pós teste do efeito entre sintomas atuais x filos encontrados (independente do grupo)

Variável dependente ^a	(A) Sintomas Atuais	(B) Sintomas Atuais	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^b
Actinobacteria	Não	Sim	-,304	,370	,417
	Sim	Não	,304	,370	,417
Bacteroidetes	Não	Sim	,690	,389	,083
	Sim	Não	-,690	,389	,083
Firmicutes	Não	Sim	-,759	,412	,072
	Sim	Não	,759	,412	,072
Proteobacteria	Não	Sim	,500	,399	,216
	Sim	Não	-,500	,399	,216
Tenericutes	Não	Sim	-,052	,408	,899
	Sim	Não	,052	,408	,899
Verrucomicrobia	Não	Sim	-,060	,440	,892
	Sim	Não	,060	,440	,892
Outros	Não	Sim	,002	,416	,996
	Sim	Não	-,002	,416	,996

^a Dados convertidos em Z-score; ^b Ajuste para diversas comparações: Sidak

ANEXO 9 - Pós teste de efeito entre uso de medicação x filos bacterianos encontrados (independente do grupo)

Variável dependente ^a	(A) Medicação	(B) Medicação	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^b
Actinobacteria	Sem medicação	Com medicação	,232	,403	,569
	Com medicação	Sem medicação	-,232	,403	,569
Bacteroidetes	Sem medicação	Com medicação	,575	,423	,182
	Com medicação	Sem medicação	-,575	,423	,182
Firmicutes	Sem medicação	Com medicação	-,328	,449	,469
	Com medicação	Sem medicação	,328	,449	,469
Proteobacteria	Sem medicação	Com medicação	-,642	,434	,147
	Com medicação	Sem medicação	,642	,434	,147
Tenericutes	Sem medicação	Com medicação	,086	,444	,848
	Com medicação	Sem medicação	-,086	,444	,848
Verrucomicrobia	Sem medicação	Com medicação	-,265	,480	,583
	Com medicação	Sem medicação	,265	,480	,583
Outros	Sem medicação	Com medicação	-,517	,453	,260
	Com medicação	Sem medicação	,517	,453	,260

**ANEXO 10: Pós teste do efeito entre tipo de parto x filos bacterianos encontrados
(independente do grupo)**

Variável dependente ^a	(I) Tipo_parto	(J) Tipo_parto	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig ^b
Actinobacteria	Cesária	Natural	,461	,371	,523
		Não sabe	-1,551 ^a	,680	,078
	Natural	Cesária	-,461	,371	,523
		Não sabe	-2,012 ^{a,*}	,741	,026
	Não sabe	Cesária	1,551 ^c	,680	,078
		Natural	2,012 ^{*,c}	,741	,026
Bacteroidetes	Cesária	Natural	,305	,411	,844
		Não sabe	-,173 ^a	,754	,994
	Natural	Cesária	-,305	,411	,844
		Não sabe	-,477 ^a	,821	,917
	Não sabe	Cesária	,173 ^c	,754	,994
		Natural	,477 ^c	,821	,917
Firmicutes	Cesária	Natural	-,424	,409	,664
		Não sabe	,198 ^a	,751	,991
	Natural	Cesária	,424	,409	,664
		Não sabe	,623 ^a	,818	,833
	Não sabe	Cesária	-,198 ^c	,751	,991
		Natural	-,623 ^c	,818	,833
Proteobacteria	Cesária	Natural	,654	,386	,262
		Não sabe	,469 ^a	,709	,883
	Natural	Cesária	-,654	,386	,262
		Não sabe	-,185 ^a	,772	,993
	Não sabe	Cesária	-,469 ^c	,709	,883
		Natural	,185 ^c	,772	,993
Tenericutes	Cesária	Natural	-1,048 [*]	,370	,019
		Não sabe	-,312 ^a	,679	,956
	Natural	Cesária	1,048 [*]	,370	,019
		Não sabe	,736 ^a	,739	,690
	Não sabe	Cesária	,312 ^c	,679	,956
		Natural	-,736 ^c	,739	,690
Verrucomicrobia	Cesária	Natural	-,013	,411	1,000
		Não sabe	,570 ^a	,755	,837

Outros	Natural	Cesária	,013	,411	1,000
		Não sabe	,583 ^a	,821	,860
	Não sabe	Cesária	-,570 ^c	,755	,837
		Natural	-,583 ^c	,821	,860
	Cesária	Natural	-,674	,386	,238
		Não sabe	,326 ^a	,709	,956
	Natural	Cesária	,674	,386	,238
		Não sabe	1,000 ^a	,772	,489
	Não sabe	Cesária	-,326 ^c	,709	,956
		Natural	-1,000 ^c	,772	,489

ANEXO 11: Pós teste do efeito grupo*medicação/filo

Variável dependente	Medicação	(A) Grupo	(B) Grupo	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig.d
Actinobacteria	Sem medicação	Saudável	Funcional	-,304	,424	,856
			Neurogênico	,883	,540	,290
		Funcional	Saudável	,304	,424	,856
			Neurogênico	1,187	,637	,189
		Neurogênico	Saudável	-,883	,540	,290
			Funcional	-1,187	,637	,189
	Com medicação	Saudável	Funcional	.a	.	.
			Neurogênico	.a	.	.
		Funcional	Saudável	.b	.	.
			Neurogênico	-,420	,405	,304
		Neurogênico	Saudável	.b	.	.
			Funcional	,420	,405	,304
Bacteroidetes	Sem medicação	Saudável	Funcional	-,293	,426	,871
			Neurogênico	-,513	,543	,724
		Funcional	Saudável	,293	,426	,871
			Neurogênico	-,220	,640	,981
		Neurogênico	Saudável	,513	,543	,724
			Funcional	,220	,640	,981
	Com medicação	Saudável	Funcional	.a	.	.
			Neurogênico	.a	.	.
		Funcional	Saudável	.b	.	.
			Neurogênico	,316	,408	,441
		Neurogênico	Saudável	.b	.	.
			Funcional	-,316	,408	,441
Firmicutes	Sem medicação	Saudável	Funcional	,273	,434	,897
			Neurogênico	,135	,554	,993
		Funcional	Saudável	-,273	,434	,897
			Neurogênico	-,139	,653	,995
		Neurogênico	Saudável	-,135	,554	,993
			Funcional	,139	,653	,995
	Com medicação	Saudável	Funcional	.a	.	.
			Neurogênico	.a	.	.
		Funcional	Saudável	.b	.	.

Proteobacteria	Sem medicação	Neurogênico	Neurogênico	-,159	,415	,702
			Saudável	.b	.	.
		Saudável	Funcional	,159	,415	,702
			Neurogênico	,342	,427	,811
		Funcional	Saudável	,323	,544	,912
			Neurogênico	-,342	,427	,811
		Neurogênico	Saudável	-,019	,642	1,000
			Funcional	-,323	,544	,912
		Saudável	Saudável	,019	,642	1,000
			Neurogênico	.a	.	.
		Funcional	Saudável	.a	.	.
			Neurogênico	.b	.	.
	Com medicação	Neurogênico	Saudável	,282	,408	,493
			Neurogênico	.b	.	.
		Saudável	Saudável	-,282	,408	,493
			Neurogênico	.b	.	.
		Funcional	Saudável	-,260	,426	,905
			Neurogênico	-,402	,543	,845
Tenericutes	Sem medicação	Saudável	Saudável	,260	,426	,905
			Neurogênico	-,142	,640	,995
		Funcional	Saudável	,402	,543	,845
			Neurogênico	,142	,640	,995
		Neurogênico	Saudável	.a	.	.
			Neurogênico	.a	.	.
		Saudável	Saudável	.b	.	.
			Neurogênico	-,261	,407	,525
		Funcional	Saudável	.b	.	.
			Neurogênico	,261	,407	,525
	Com medicação	Saudável	Saudável	,035	,439	1,000
			Neurogênico	,382	,560	,874
		Funcional	Saudável	-,035	,439	1,000
			Neurogênico	,347	,660	,937
		Neurogênico	Saudável	-,382	,560	,874
			Neurogênico	-,347	,660	,937
Verrucomicrobia	Sem medicação	Saudável	Saudável	.a	.	.
			Neurogênico	.a	.	.
		Funcional	Saudável	.b	.	.
			Neurogênico	-,095	,420	,822
		Neurogênico	Saudável	.b	.	.
			Neurogênico	.b	.	.
	Com medicação	Saudável	Saudável	.b	.	.
			Neurogênico	-,095	,420	,822
		Funcional	Saudável	.b	.	.
			Neurogênico	-,095	,420	,822

Outros	Sem medicação	Saudável	Funcional	,095	,420	,822
			Funcional	,223	,425	,936
		Funcional	Neurogênico	-,658	,542	,543
			Saudável	-,223	,425	,936
		Neurogênico	Neurogênico	-,882	,639	,434
			Saudável	,658	,542	,543
	Com medicação	Saudável	Funcional	.a	.	.
			Neurogênico	.a	.	.
		Funcional	Saudável	.b	.	.
			Neurogênico	,014	,406	,973
		Neurogênico	Saudável	.b	.	.
			Funcional	-,014	,406	,973

Baseado em médias marginais estimadas

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

a. Uma estimativa da média marginal da população modificada (A).

b. Uma estimativa da média marginal da população modificada (B).

d. Ajuste para diversas comparações: Sidak.

*Dados convertidos em z-score

ANEXO 12: Pós teste do efeito entre grupos de estudo e gênero

Variável dependente	(A) grupo	(B) grupo	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^d
Bifidobacterium	Saudável	Funcional	-1,659 ^{*,b}	,620	,031
		Neurogênico	,110 ^{b,c}	,716	,998
	Funcional	Saudável	1,659 ^{*,c}	,620	,031
		Neurogênico	1,769 ^c	,731	,059
	Neurogênico	Saudável	-,110 ^{b,c}	,716	,998
		Funcional	-1,769 ^b	,731	,059
Bacteroides	Saudável	Funcional	-,731 ^b	,686	,646
		Neurogênico	-,375 ^{b,c}	,792	,953
	Funcional	Saudável	,731 ^c	,686	,646
		Neurogênico	,356 ^c	,809	,961
	Neurogênico	Saudável	,375 ^{b,c}	,792	,953
		Funcional	-,356 ^b	,809	,961
Parabacteroides	Saudável	Funcional	,088 ^b	,692	,999
		Neurogênico	,254 ^{b,c}	,799	,985
	Funcional	Saudável	-,088 ^c	,692	,999
		Neurogênico	,166 ^c	,816	,996
	Neurogênico	Saudável	-,254 ^{b,c}	,799	,985
		Funcional	-,166 ^b	,816	,996
Prevotella	Saudável	Funcional	,045 ^b	,762	1,000
		Neurogênico	,064 ^{b,c}	,880	1,000
	Funcional	Saudável	-,045 ^c	,762	1,000
		Neurogênico	,019 ^c	,899	1,000
	Neurogênico	Saudável	-,064 ^{b,c}	,880	1,000
		Funcional	-,019 ^b	,899	1,000
Alistipes	Saudável	Funcional	-,415 ^b	,773	,933
		Neurogênico	-,157 ^{b,c}	,892	,997
	Funcional	Saudável	,415 ^c	,773	,933
		Neurogênico	,258 ^c	,912	,989
	Neurogênico	Saudável	,157 ^{b,c}	,892	,997
		Funcional	-,258 ^b	,912	,989
Christensenellaceae	Saudável	Funcional	,268 ^b	,690	,973
		Neurogênico	-1,312 ^{b,c}	,797	,288
	Funcional	Saudável	-,268 ^c	,690	,973

	Neurogênico	Neurogênico	-1,580 ^c	,814	,166
		Saudável	1,312 ^{b,c}	,797	,288
		Funcional	1,580 ^b	,814	,166
Lachnoclostridium	Saudável	Funcional	,224 ^b	,735	,987
		Neurogênico	-,978 ^{b,c}	,849	,587
	Funcional	Saudável	-,224 ^c	,735	,987
		Neurogênico	-1,202 ^c	,867	,434
	Neurogênico	Saudável	,978 ^{b,c}	,849	,587
		Funcional	1,202 ^b	,867	,434
Lachnospiraceae	Saudável	Funcional	,373 ^b	,770	,950
		Neurogênico	,354 ^{b,c}	,889	,971
	Funcional	Saudável	-,373 ^c	,770	,950
		Neurogênico	-,019 ^c	,908	1,000
	Neurogênico	Saudável	-,354 ^{b,c}	,889	,971
		Funcional	,019 ^b	,908	1,000
Roseburia	Saudável	Funcional	-,141 ^b	,746	,997
		Neurogênico	,614 ^{b,c}	,862	,859
	Funcional	Saudável	,141 ^c	,746	,997
		Neurogênico	,755 ^c	,880	,779
	Neurogênico	Saudável	-,614 ^{b,c}	,862	,859
		Funcional	-,755 ^b	,880	,779
Eubacterium	Saudável	Funcional	-,582 ^b	,768	,837
		Neurogênico	,194 ^{b,c}	,887	,995
	Funcional	Saudável	,582 ^c	,768	,837
		Neurogênico	,776 ^c	,907	,781
	Neurogênico	Saudável	-,194 ^{b,c}	,887	,995
		Funcional	-,776 ^b	,907	,781
Ruminococcus	Saudável	Funcional	,535 ^b	,681	,821
		Neurogênico	,060 ^{b,c}	,786	1,000
	Funcional	Saudável	-,535 ^c	,681	,821
		Neurogênico	-,475 ^c	,803	,913
	Neurogênico	Saudável	-,060 ^{b,c}	,786	1,000
		Funcional	,475 ^b	,803	,913
Lachnospiraceae (Other)	Saudável	Funcional	-,177 ^b	,751	,994
		Neurogênico	,783 ^{b,c}	,868	,752
	Funcional	Saudável	,177 ^c	,751	,994
		Neurogênico	,960 ^c	,887	,634
	Neurogênico	Saudável	-,783 ^{b,c}	,868	,752

		Funcional	-,960 ^b	,887	,634
	Saudável	Funcional	,779 ^b	,644	,548
		Neurogênico	-,306 ^{b,c}	,743	,968
Anaerotruncus	Funcional	Saudável	-,779 ^c	,644	,548
		Neurogênico	-1,086 ^c	,759	,407
	Neurogênico	Saudável	,306 ^{b,c}	,743	,968
		Funcional	1,086 ^b	,759	,407
Faecalibacterium	Saudável	Funcional	-,320 ^b	,754	,965
		Neurogênico	-,574 ^{b,c}	,871	,885
	Funcional	Saudável	,320 ^c	,754	,965
		Neurogênico	-,253 ^c	,890	,989
	Neurogênico	Saudável	,574 ^{b,c}	,871	,885
		Funcional	,253 ^b	,890	,989
Ruminoclostridium	Saudável	Funcional	1,614 ^b	,671	,060
		Neurogênico	1,319 ^{b,c}	,775	,261
	Funcional	Saudável	-1,614 ^c	,671	,060
		Neurogênico	-,295 ^c	,791	,976
	Neurogênico	Saudável	-1,319 ^{b,c}	,775	,261
		Funcional	,295 ^b	,791	,976
Ruminococcaceae	Saudável	Funcional	-,843 ^b	,650	,491
		Neurogênico	-1,050 ^{b,c}	,751	,426
	Funcional	Saudável	,843 ^c	,650	,491
		Neurogênico	-,207 ^c	,767	,991
	Neurogênico	Saudável	1,050 ^{b,c}	,751	,426
		Funcional	,207 ^b	,767	,991
Subdoligranulum	Saudável	Funcional	-,723 ^b	,681	,649
		Neurogênico	-,854 ^{b,c}	,786	,632
	Funcional	Saudável	,723 ^c	,681	,649
		Neurogênico	-,131 ^c	,803	,998
	Neurogênico	Saudável	,854 ^{b,c}	,786	,632
		Funcional	,131 ^b	,803	,998
[Eubacterium] coprostanoligenes group	Saudável	Funcional	,362 ^b	,727	,946
		Neurogênico	,114 ^{b,c}	,840	,999
	Funcional	Saudável	-,362 ^c	,727	,946
		Neurogênico	-,248 ^c	,858	,988
	Neurogênico	Saudável	-,114 ^{b,c}	,840	,999
		Funcional	,248 ^b	,858	,988
	Saudável	Funcional	,750 ^b	,707	,649

Ruminococcaceae uncultured	Funcional	Neurogênico	,104 ^{b,c}	,816	,999
		Saudável	-,750 ^c	,707	,649
	Neurogênico	Neurogênico	-,646 ^c	,834	,827
		Saudável	-,104 ^{b,c}	,816	,999
Phascolarctobacterium	Funcional	Funcional	,868 ^b	,641	,454
		Neurogênico	,962 ^{b,c}	,740	,490
	Neurogênico	Saudável	-,868 ^c	,641	,454
		Neurogênico	,093 ^c	,756	,999
	Neurogênico	Saudável	-,962 ^{b,c}	,740	,490
		Funcional	-,093 ^b	,756	,999
Dialister	Saudável	Funcional	,077 ^b	,744	,999
		Neurogênico	-,165 ^{b,c}	,859	,996
	Funcional	Saudável	-,077 ^c	,744	,999
		Neurogênico	-,243 ^c	,877	,990
	Neurogênico	Saudável	,165 ^{b,c}	,859	,996
		Funcional	,243 ^b	,877	,990
Akkermansia	Saudável	Funcional	-,274 ^b	,764	,978
		Neurogênico	,024 ^{b,c}	,883	1,000
	Funcional	Saudável	,274 ^c	,764	,978
		Neurogênico	,299 ^c	,901	,983
	Neurogênico	Saudável	-,024 ^{b,c}	,883	1,000
		Funcional	-,299 ^b	,901	,983
Outros	Saudável	Funcional	,908 ^b	,707	,499
		Neurogênico	-,021 ^{b,c}	,816	1,000
	Funcional	Saudável	-,908 ^c	,707	,499
		Neurogênico	-,929 ^c	,834	,613
	Neurogênico	Saudável	,021 ^{b,c}	,816	1,000
		Funcional	,929 ^b	,834	,613

Baseado em médias marginais estimadas

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

a. Uma estimativa da média marginal da população modificada (A).

b. Uma estimativa da média marginal da população modificada (B).

d. Ajuste para diversas comparações: Sidak.

*Dados convertidos em z-score

ANEXO 13: Pós teste Sexo x Gêneros (Independente do Grupo)

Variável dependente	(A) sexo	(B) sexo	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^d
Bifidobacterium	Masculino	Feminino	,271 ^{a,b}	,265	,312
	Feminino	Masculino	-,271 ^{a,b}	,265	,312
Bacteroides	Masculino	Feminino	,668 ^{a,b,*}	,293	,028
	Feminino	Masculino	-,668 ^{a,b,*}	,293	,028
Parabacteroides	Masculino	Feminino	,319 ^{a,b}	,296	,287
	Feminino	Masculino	-,319 ^{a,b}	,296	,287
Prevotella	Masculino	Feminino	-,194 ^{a,b}	,326	,554
	Feminino	Masculino	,194 ^{a,b}	,326	,554
Alistipes	Masculino	Feminino	-,185 ^{a,b}	,330	,579
	Feminino	Masculino	,185 ^{a,b}	,330	,579
Christensenellaceae	Masculino	Feminino	-,478 ^{a,b}	,295	,113
	Feminino	Masculino	,478 ^{a,b}	,295	,113
Lachnoclostridium	Masculino	Feminino	,195 ^{a,b}	,314	,537
	Feminino	Masculino	-,195 ^{a,b}	,314	,537
Lachnospiraceae	Masculino	Feminino	,239 ^{a,b}	,329	,472
	Feminino	Masculino	-,239 ^{a,b}	,329	,472
Roseburia	Masculino	Feminino	-,194 ^{a,b}	,319	,546
	Feminino	Masculino	,194 ^{a,b}	,319	,546
Eubacterium	Masculino	Feminino	-,103 ^{a,b}	,329	,756
	Feminino	Masculino	,103 ^{a,b}	,329	,756
Ruminococcus	Masculino	Feminino	,137 ^{a,b}	,291	,639
	Feminino	Masculino	-,137 ^{a,b}	,291	,639
Lachnospiraceae (Other)	Masculino	Feminino	,103 ^{a,b}	,321	,750
	Feminino	Masculino	-,103 ^{a,b}	,321	,750
Anaerotruncus	Masculino	Feminino	-,656 ^{a,b,*}	,275	,022
	Feminino	Masculino	,656 ^{a,b,*}	,275	,022
Faecalibacterium	Masculino	Feminino	-,111 ^{a,b}	,323	,733
	Feminino	Masculino	,111 ^{a,b}	,323	,733
Ruminoclostridium	Masculino	Feminino	-,121 ^{a,b}	,287	,677
	Feminino	Masculino	,121 ^{a,b}	,287	,677
Ruminococcaceae	Masculino	Feminino	-,369 ^{a,b}	,278	,191
	Feminino	Masculino	,369 ^{a,b}	,278	,191
Subdoligranulum	Masculino	Feminino	,389 ^{a,b}	,291	,189

	Feminino	Masculino	-,389 ^{a,b}	,291	,189
[Eubacterium]	Masculino	Feminino	-,772 ^{a,b,*}	,311	,017
coprostanoligenes group	Feminino	Masculino	,772 ^{a,b,*}	,311	,017
Ruminococcaceae	Masculino	Feminino	,022 ^{a,b}	,302	,942
uncultured	Feminino	Masculino	-,022 ^{a,b}	,302	,942
Phascolarctobacterium	Masculino	Feminino	,355 ^{a,b}	,274	,202
	Feminino	Masculino	-,355 ^{a,b}	,274	,202
Dialister	Masculino	Feminino	-,274 ^{a,b}	,318	,393
	Feminino	Masculino	,274 ^{a,b}	,318	,393
Akkermansia	Masculino	Feminino	-,214 ^{a,b}	,327	,517
	Feminino	Masculino	,214 ^{a,b}	,327	,517
Outros	Masculino	Feminino	-,067 ^{a,b}	,302	,825
	Feminino	Masculino	,067 ^{a,b}	,302	,825

Baseado em médias marginais estimadas

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

a. Uma estimativa da média marginal da população modificada (A).

b. Uma estimativa da média marginal da população modificada (B).

d. Ajuste para diversas comparações: Sidak.

*Dados convertidos em z-score

ANEXO 14: Pós teste Sexo x Gêneros, de acordo com os grupos de estudo

Variável dependente	Grupo	(A) sexo	(B) sexo	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^d
Bifidobacterium	Saudável	Masculino	Feminino	,058 ^{a,b}	,387	,881
		Feminino	Masculino	-,058 ^{a,b}	,387	,881
	Funcional	Masculino	Feminino	,160	,398	,689
		Feminino	Masculino	-,160	,398	,689
	Neurogênico	Masculino	Feminino	,760 ^{a,b}	,615	,223
		Feminino	Masculino	-,760 ^{a,b}	,615	,223
Bacteroides	Saudável	Masculino	Feminino	-,467 ^{a,b}	,429	,282
		Feminino	Masculino	,467 ^{a,b}	,429	,282
	Funcional	Masculino	Feminino	,736	,440	,102
		Feminino	Masculino	-,736	,440	,102
	Neurogênico	Masculino	Feminino	1,791 ^{a,b,*}	,680	,012
		Feminino	Masculino	-1,791 ^{a,b,*}	,680	,012
Parabacteroides	Saudável	Masculino	Feminino	-,616 ^{a,b}	,432	,161
		Feminino	Masculino	,616 ^{a,b}	,432	,161
	Funcional	Masculino	Feminino	,474	,444	,291
		Feminino	Masculino	-,474	,444	,291
	Neurogênico	Masculino	Feminino	1,021 ^{a,b}	,686	,144
		Feminino	Masculino	-1,021 ^{a,b}	,686	,144
Prevotella	Saudável	Masculino	Feminino	,650 ^{a,b}	,476	,180
		Feminino	Masculino	-,650 ^{a,b}	,476	,180
	Funcional	Masculino	Feminino	-,602	,489	,226
		Feminino	Masculino	,602	,489	,226
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,228 ^{a,b}	,756	,764
		Feminino	Masculino	,228 ^{a,b}	,756	,764
Alistipes	Saudável	Masculino	Feminino	-,321 ^{a,b}	,483	,509
		Feminino	Masculino	,321 ^{a,b}	,483	,509
	Funcional	Masculino	Feminino	-,171	,496	,731
		Feminino	Masculino	,171	,496	,731
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,061 ^{a,b}	,766	,937
		Feminino	Masculino	,061 ^{a,b}	,766	,937
Christensenellaceae	Saudável	Masculino	Feminino	-,186 ^{a,b}	,431	,669
		Feminino	Masculino	,186 ^{a,b}	,431	,669
	Funcional	Masculino	Feminino	-,548	,443	,222

	Neurogênico	Feminino	Masculino	,548	,443	,222
		Masculino	Feminino	-,647 ^{a,b}	,684	,350
		Feminino	Masculino	,647 ^{a,b}	,684	,350
Lachnoclostridium	Saudável	Masculino	Feminino	-,071 ^{a,b}	,459	,877
		Feminino	Masculino	,071 ^{a,b}	,459	,877
	Funcional	Masculino	Feminino	,223	,472	,639
		Feminino	Masculino	-,223	,472	,639
	Neurogênico	Masculino	Feminino	,434 ^{a,b}	,729	,555
		Feminino	Masculino	-,434 ^{a,b}	,729	,555
Lachnospiraceae	Saudável	Masculino	Feminino	-,139 ^{a,b}	,481	,774
		Feminino	Masculino	,139 ^{a,b}	,481	,774
	Funcional	Masculino	Feminino	,697	,494	,166
		Feminino	Masculino	-,697	,494	,166
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,367 ^{a,b}	,763	,633
		Feminino	Masculino	,367 ^{a,b}	,763	,633
Roseburia	Saudável	Masculino	Feminino	,560 ^{a,b}	,466	,236
		Feminino	Masculino	-,560 ^{a,b}	,466	,236
	Funcional	Masculino	Feminino	-,277	,479	,566
		Feminino	Masculino	,277	,479	,566
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,855 ^{a,b}	,740	,255
		Feminino	Masculino	,855 ^{a,b}	,740	,255
Eubacterium	Saudável	Masculino	Feminino	-,178 ^{a,b}	,480	,712
		Feminino	Masculino	,178 ^{a,b}	,480	,712
	Funcional	Masculino	Feminino	,418	,493	,401
		Feminino	Masculino	-,418	,493	,401
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-1,189 ^{a,b}	,762	,126
		Feminino	Masculino	1,189 ^{a,b}	,762	,126
Ruminococcus	Saudável	Masculino	Feminino	-,587 ^{a,b}	,425	,175
		Feminino	Masculino	,587 ^{a,b}	,425	,175
	Funcional	Masculino	Feminino	,249	,437	,572
		Feminino	Masculino	-,249	,437	,572
	Neurogênico	Masculino	Feminino	,701 ^{a,b}	,675	,305
		Feminino	Masculino	-,701 ^{a,b}	,675	,305
Lachnospiraceae (Other)	Saudável	Masculino	Feminino	,370 ^{a,b}	,469	,435
		Feminino	Masculino	-,370 ^{a,b}	,469	,435
	Funcional	Masculino	Feminino	,196	,482	,686
		Feminino	Masculino	-,196	,482	,686
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,408 ^{a,b}	,745	,587
		Feminino	Masculino			

Anaerotruncus	Saudável	Feminino	Masculino	,408 ^{a,b}	,745	,587
		Masculino	Feminino	-,417 ^{a,b}	,402	,305
		Feminino	Masculino	,417 ^{a,b}	,402	,305
	Funcional	Masculino	Feminino	-,872 [*]	,413	,041
		Feminino	Masculino	,872 [*]	,413	,041
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,437 ^{a,b}	,638	,497
		Feminino	Masculino	,437 ^{a,b}	,638	,497
	Faecalibacterium	Saudável	Masculino	Feminino	,151 ^{a,b}	,471
Feminino			Masculino	-,151 ^{a,b}	,471	,751
Funcional		Masculino	Feminino	-,390	,484	,425
		Feminino	Masculino	,390	,484	,425
Neurogênico		Masculino	Feminino	,222 ^{a,b}	,748	,768
		Feminino	Masculino	-,222 ^{a,b}	,748	,768
Ruminoclostridium	Saudável	Masculino	Feminino	-,145 ^{a,b}	,419	,731
		Feminino	Masculino	,145 ^{a,b}	,419	,731
	Funcional	Masculino	Feminino	,076	,431	,861
		Feminino	Masculino	-,076	,431	,861
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,535 ^{a,b}	,665	,426
		Feminino	Masculino	,535 ^{a,b}	,665	,426
Ruminococcaceae	Saudável	Masculino	Feminino	,026 ^{a,b}	,406	,949
		Feminino	Masculino	-,026 ^{a,b}	,406	,949
	Funcional	Masculino	Feminino	-,418	,417	,322
		Feminino	Masculino	,418	,417	,322
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,704 ^{a,b}	,645	,281
		Feminino	Masculino	,704 ^{a,b}	,645	,281
Subdoligranulum	Saudável	Masculino	Feminino	1,034 ^{a,b,*}	,425	,019
		Feminino	Masculino	-1,034 ^{a,b,*}	,425	,019
	Funcional	Masculino	Feminino	,422	,437	,340
		Feminino	Masculino	-,422	,437	,340
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,412 ^{a,b}	,675	,545
		Feminino	Masculino	,412 ^{a,b}	,675	,545
[Eubacterium] coprostanoligenes group	Saudável	Masculino	Feminino	-,435 ^{a,b}	,454	,343
		Feminino	Masculino	,435 ^{a,b}	,454	,343
	Funcional	Masculino	Feminino	-,723	,467	,129
		Feminino	Masculino	,723	,467	,129
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-1,259 ^{a,b}	,721	,088
		Feminino	Masculino	1,259 ^{a,b}	,721	,088
	Saudável	Masculino	Feminino	-,807 ^{a,b}	,441	,074

Ruminococcaceae uncultured	Funcional	Feminino	Masculino	,807 ^{a,b}	,441	,074
		Masculino	Feminino	,366	,454	,424
		Feminino	Masculino	-,366	,454	,424
	Neurogênico	Masculino	Feminino	,181 ^{a,b}	,701	,798
		Feminino	Masculino	-,181 ^{a,b}	,701	,798
Phascolarctobacterium	Saudável	Masculino	Feminino	-,161 ^{a,b}	,400	,689
		Feminino	Masculino	,161 ^{a,b}	,400	,689
	Funcional	Masculino	Feminino	,395	,412	,342
		Feminino	Masculino	-,395	,412	,342
	Neurogênico	Masculino	Feminino	,847 ^{a,b}	,636	,190
		Feminino	Masculino	-,847 ^{a,b}	,636	,190
	Dialister	Saudável	Masculino	Feminino	,914 ^{a,b}	,465
Feminino			Masculino	-,914 ^{a,b}	,465	,056
Funcional		Masculino	Feminino	-,603	,477	,213
		Feminino	Masculino	,603	,477	,213
Neurogênico		Masculino	Feminino	-,871 ^{a,b}	,738	,244
		Feminino	Masculino	,871 ^{a,b}	,738	,244
Akkermansia	Saudável	Masculino	Feminino	,111 ^{a,b}	,477	,817
		Feminino	Masculino	-,111 ^{a,b}	,477	,817
	Funcional	Masculino	Feminino	-,374	,491	,450
		Feminino	Masculino	,374	,491	,450
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,218 ^{a,b}	,758	,775
		Feminino	Masculino	,218 ^{a,b}	,758	,775
Outros	Saudável	Masculino	Feminino	-,251 ^{a,b}	,442	,573
		Feminino	Masculino	,251 ^{a,b}	,442	,573
	Funcional	Masculino	Feminino	,304	,454	,506
		Feminino	Masculino	-,304	,454	,506
	Neurogênico	Masculino	Feminino	-,696 ^{a,b}	,701	,326
		Feminino	Masculino	,696 ^{a,b}	,701	,326

Baseado em médias marginais estimadas

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

a. Uma estimativa da média marginal da população modificada (A).

b. Uma estimativa da média marginal da população modificada (B).

d. Ajuste para diversas comparações: Sidak.

*Dados convertidos em z-score

ANEXO 15: Pós teste Sintomas Atuais x Gêneros (Independente do Grupo)

Variável dependente	(A) Sintomas Atuais	(B) Sintomas Atuais	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^d
Bifidobacterium	Não	Sim	,066 ^{a,b}	,351	,853
	Sim	Não	-,066 ^{a,b}	,351	,853
Bacteroides	Não	Sim	,313 ^{a,b}	,389	,425
	Sim	Não	-,313 ^{a,b}	,389	,425
Parabacteroides	Não	Sim	-,373 ^{a,b}	,392	,346
	Sim	Não	,373 ^{a,b}	,392	,346
Prevotella	Não	Sim	,599 ^{a,b}	,432	,173
	Sim	Não	-,599 ^{a,b}	,432	,173
Alistipes	Não	Sim	,319 ^{a,b}	,438	,470
	Sim	Não	-,319 ^{a,b}	,438	,470
Christensenellaceae	Não	Sim	,073 ^{a,b}	,391	,852
	Sim	Não	-,073 ^{a,b}	,391	,852
Lachnoclostridium	Não	Sim	,218 ^{a,b}	,416	,603
	Sim	Não	-,218 ^{a,b}	,416	,603
Lachnospiraceae	Não	Sim	-,565 ^{a,b}	,436	,202
	Sim	Não	,565 ^{a,b}	,436	,202
Roseburia	Não	Sim	,255 ^{a,b}	,423	,550
	Sim	Não	-,255 ^{a,b}	,423	,550
Eubacterium	Não	Sim	-,252 ^{a,b}	,435	,565
	Sim	Não	,252 ^{a,b}	,435	,565
Ruminococcus	Não	Sim	-,407 ^{a,b}	,385	,297
	Sim	Não	,407 ^{a,b}	,385	,297
Lachnospiraceae (Other)	Não	Sim	-,218 ^{a,b}	,426	,612
	Sim	Não	,218 ^{a,b}	,426	,612
Anaerotruncus	Não	Sim	-,149 ^{a,b}	,365	,684
	Sim	Não	,149 ^{a,b}	,365	,684
Faecalibacterium	Não	Sim	,691 ^{a,b}	,427	,113
	Sim	Não	-,691 ^{a,b}	,427	,113
Ruminoclostridium	Não	Sim	-1,175 ^{a,b,*}	,380	,003
	Sim	Não	1,175 ^{a,b,*}	,380	,003
Ruminococcaceae	Não	Sim	,110 ^{a,b}	,368	,768
	Sim	Não	-,110 ^{a,b}	,368	,768
Subdoligranulum	Não	Sim	,141 ^{a,b}	,386	,716

	Sim	Não	-,141 ^{a,b}	,386	,716
[Eubacterium]	Não	Sim	-,412 ^{a,b}	,412	,323
coprostanoligenes group	Sim	Não	,412 ^{a,b}	,412	,323
Ruminococcaceae	Não	Sim	-,424 ^{a,b}	,400	,296
uncultured	Sim	Não	,424 ^{a,b}	,400	,296
Phascolarctobacterium	Não	Sim	-,327 ^{a,b}	,363	,373
	Sim	Não	,327 ^{a,b}	,363	,373
Dialister	Não	Sim	,212 ^{a,b}	,421	,618
	Sim	Não	-,212 ^{a,b}	,421	,618
Akkermansia	Não	Sim	-,121 ^{a,b}	,433	,781
	Sim	Não	,121 ^{a,b}	,433	,781
Outros	Não	Sim	-,387 ^{a,b}	,400	,340
	Sim	Não	,387 ^{a,b}	,400	,340

Baseado em médias marginais estimadas

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

a. Uma estimativa da média marginal da população modificada (A).

b. Uma estimativa da média marginal da população modificada (B).

d. Ajuste para diversas comparações: Sidak.

*Dados convertidos em z-score

ANEXO 16: Pós teste Sintomas Atuais x Gêneros, de acordo com os grupos de estudo

Variável dependente	Grupo	(A) Sintomas Atuais	(B) Sintomas Atuais	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^d
Bifidobacterium	Saudável	Não	Sim	1,125 ^{a,b}	,677	,104
		Sim	Não	-1,125 ^{a,b}	,677	,104
	Funcional	Não	Sim	-,321	,518	,539
		Sim	Não	,321	,518	,539
	Neurogênico	Não	Sim	-,257 ^{a,b}	,723	,724
		Sim	Não	,257 ^{a,b}	,723	,724
Bacteroides	Saudável	Não	Sim	,511 ^{a,b}	,750	,499
		Sim	Não	-,511 ^{a,b}	,750	,499
	Funcional	Não	Sim	,032	,573	,956
		Sim	Não	-,032	,573	,956
	Neurogênico	Não	Sim	,722 ^{a,b}	,800	,372
		Sim	Não	-,722 ^{a,b}	,800	,372
Parabacteroides	Saudável	Não	Sim	-,609 ^{a,b}	,756	,425
		Sim	Não	,609 ^{a,b}	,756	,425
	Funcional	Não	Sim	-,142	,578	,807
		Sim	Não	,142	,578	,807
	Neurogênico	Não	Sim	-,629 ^{a,b}	,807	,440
		Sim	Não	,629 ^{a,b}	,807	,440
Prevotella	Saudável	Não	Sim	,865 ^{a,b}	,833	,305
		Sim	Não	-,865 ^{a,b}	,833	,305
	Funcional	Não	Sim	,470	,637	,465
		Sim	Não	-,470	,637	,465
	Neurogênico	Não	Sim	,589 ^{a,b}	,889	,511
		Sim	Não	-,589 ^{a,b}	,889	,511
Alistipes	Saudável	Não	Sim	,650 ^{a,b}	,844	,445
		Sim	Não	-,650 ^{a,b}	,844	,445
	Funcional	Não	Sim	,264	,646	,684
		Sim	Não	-,264	,646	,684
	Neurogênico	Não	Sim	,069 ^{a,b}	,901	,939
		Sim	Não	-,069 ^{a,b}	,901	,939
Christensenellaceae	Saudável	Não	Sim	,357 ^{a,b}	,754	,638
		Sim	Não	-,357 ^{a,b}	,754	,638

	Funcional	Não	Sim	,191	,577	,742
		Sim	Não	-,191	,577	,742
	Neurogênico	Não	Sim	-,511 ^{a,b}	,804	,528
		Sim	Não	,511 ^{a,b}	,804	,528
Lachnoclostridium	Saudável	Não	Sim	-,625 ^{a,b}	,803	,441
		Sim	Não	,625 ^{a,b}	,803	,441
	Funcional	Não	Sim	,591	,614	,342
		Sim	Não	-,591	,614	,342
	Neurogênico	Não	Sim	,328 ^{a,b}	,857	,704
		Sim	Não	-,328 ^{a,b}	,857	,704
Lachnospiraceae	Saudável	Não	Sim	-,716 ^{a,b}	,841	,399
		Sim	Não	,716 ^{a,b}	,841	,399
	Funcional	Não	Sim	-,583	,643	,369
		Sim	Não	,583	,643	,369
	Neurogênico	Não	Sim	-,355 ^{a,b}	,897	,694
		Sim	Não	,355 ^{a,b}	,897	,694
Roseburia	Saudável	Não	Sim	,133 ^{a,b}	,815	,871
		Sim	Não	-,133 ^{a,b}	,815	,871
	Funcional	Não	Sim	,889	,624	,161
		Sim	Não	-,889	,624	,161
	Neurogênico	Não	Sim	-1,035 ^{a,b}	,870	,241
		Sim	Não	1,035 ^{a,b}	,870	,241
Eubacterium	Saudável	Não	Sim	,508 ^{a,b}	,840	,549
		Sim	Não	-,508 ^{a,b}	,840	,549
	Funcional	Não	Sim	-,401	,642	,536
		Sim	Não	,401	,642	,536
	Neurogênico	Não	Sim	-,772 ^{a,b}	,896	,394
		Sim	Não	,772 ^{a,b}	,896	,394
Ruminococcus	Saudável	Não	Sim	-,894 ^{a,b}	,744	,236
		Sim	Não	,894 ^{a,b}	,744	,236
	Funcional	Não	Sim	-,471	,569	,412
		Sim	Não	,471	,569	,412
	Neurogênico	Não	Sim	,286 ^{a,b}	,793	,720
		Sim	Não	-,286 ^{a,b}	,793	,720
Lachnospiraceae (Other)	Saudável	Não	Sim	-,519 ^{a,b}	,821	,531
		Sim	Não	,519 ^{a,b}	,821	,531
	Funcional	Não	Sim	,062	,628	,922
		Sim	Não	-,062	,628	,922

	Neurogênico	Não	Sim	-,508 ^{a,b}	,876	,565
		Sim	Não	,508 ^{a,b}	,876	,565
Anaerotruncus	Saudável	Não	Sim	-,360 ^{a,b}	,703	,611
		Sim	Não	,360 ^{a,b}	,703	,611
	Funcional	Não	Sim	,420	,538	,440
		Sim	Não	-,420	,538	,440
	Neurogênico	Não	Sim	-1,193 ^{a,b}	,750	,119
		Sim	Não	1,193 ^{a,b}	,750	,119
Faecalibacterium	Saudável	Não	Sim	,351 ^{a,b}	,824	,672
		Sim	Não	-,351 ^{a,b}	,824	,672
	Funcional	Não	Sim	,709	,630	,267
		Sim	Não	-,709	,630	,267
	Neurogênico	Não	Sim	1,032 ^{a,b}	,879	,247
		Sim	Não	-1,032 ^{a,b}	,879	,247
Ruminoclostridium	Saudável	Não	Sim	-1,975 ^{a,b,*}	,733	,010
		Sim	Não	1,975 ^{a,b,*}	,733	,010
	Funcional	Não	Sim	-1,096	,561	,057
		Sim	Não	1,096	,561	,057
	Neurogênico	Não	Sim	-,455 ^{a,b}	,782	,564
		Sim	Não	,455 ^{a,b}	,782	,564
Ruminococcaceae	Saudável	Não	Sim	,827 ^{a,b}	,710	,251
		Sim	Não	-,827 ^{a,b}	,710	,251
	Funcional	Não	Sim	-,102	,543	,851
		Sim	Não	,102	,543	,851
	Neurogênico	Não	Sim	-,221 ^{a,b}	,758	,772
		Sim	Não	,221 ^{a,b}	,758	,772
Subdoligranulum	Saudável	Não	Sim	1,328 ^{a,b}	,744	,081
		Sim	Não	-1,328 ^{a,b}	,744	,081
	Funcional	Não	Sim	-,669	,569	,246
		Sim	Não	,669	,569	,246
	Neurogênico	Não	Sim	,631 ^{a,b}	,794	,431
		Sim	Não	-,631 ^{a,b}	,794	,431
[Eubacterium] coprostanoligenes group	Saudável	Não	Sim	-,579 ^{a,b}	,794	,470
		Sim	Não	,579 ^{a,b}	,794	,470
	Funcional	Não	Sim	-,598	,608	,331
		Sim	Não	,598	,608	,331
	Neurogênico	Não	Sim	,195 ^{a,b}	,848	,819
		Sim	Não	-,195 ^{a,b}	,848	,819

Ruminococcaceae uncultured	Saudável	Não	Sim	-,424 ^{a,b}	,772	,586
		Sim	Não	,424 ^{a,b}	,772	,586
	Funcional	Não	Sim	-,486	,591	,416
		Sim	Não	,486	,591	,416
	Neurogênico	Não	Sim	-,284 ^{a,b}	,824	,732
		Sim	Não	,284 ^{a,b}	,824	,732
Phascolarctobacterium	Saudável	Não	Sim	-2,489 ^{a,b,*}	,700	,001
		Sim	Não	2,489 ^{a,b,*}	,700	,001
	Funcional	Não	Sim	,016	,536	,977
		Sim	Não	-,016	,536	,977
	Neurogênico	Não	Sim	1,334 ^{a,b}	,747	,081
		Sim	Não	-1,334 ^{a,b}	,747	,081
Dialister	Saudável	Não	Sim	1,121 ^{a,b}	,813	,175
		Sim	Não	-1,121 ^{a,b}	,813	,175
	Funcional	Não	Sim	,068	,622	,914
		Sim	Não	-,068	,622	,914
	Neurogênico	Não	Sim	-,486 ^{a,b}	,867	,578
		Sim	Não	,486 ^{a,b}	,867	,578
Akkermansia	Saudável	Não	Sim	,548 ^{a,b}	,835	,515
		Sim	Não	-,548 ^{a,b}	,835	,515
	Funcional	Não	Sim	-,288	,639	,654
		Sim	Não	,288	,639	,654
	Neurogênico	Não	Sim	-,498 ^{a,b}	,891	,579
		Sim	Não	,498 ^{a,b}	,891	,579
Outros	Saudável	Não	Sim	-1,275 ^{a,b}	,772	,106
		Sim	Não	1,275 ^{a,b}	,772	,106
	Funcional	Não	Sim	-,005	,591	,994
		Sim	Não	,005	,591	,994
	Neurogênico	Não	Sim	-,246 ^{a,b}	,824	,767
		Sim	Não	,246 ^{a,b}	,824	,767

Baseado em médias marginais estimadas

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

a. Uma estimativa da média marginal da população modificada (A).

b. Uma estimativa da média marginal da população modificada (B).

d. Ajuste para diversas comparações: Sidak.

*Dados convertidos em z-score

ANEXO 17: Pós teste Tipo de parto x Gêneros (Independente do Grupo)

Variável dependente	(A) Tipo de parto	(B) Tipo de parto	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^d
Bifidobacterium	Cesária	Natural	,437	,364	,553
		Não sabe	-1,439 ^a	,669	,104
	Natural	Cesária	-,437	,364	,553
		Não sabe	-1,876 ^{a,*}	,728	,037
	Não sabe	Cesária	1,439 ^c	,669	,104
		Natural	1,876 ^{*,c}	,728	,037
Bacteroides	Cesária	Natural	,188	,401	,954
		Não sabe	,702 ^a	,736	,718
	Natural	Cesária	-,188	,401	,954
		Não sabe	,514 ^a	,801	,892
	Não sabe	Cesária	-,702 ^c	,736	,718
		Natural	-,514 ^c	,801	,892
Parabacteroides	Cesária	Natural	-,438	,400	,624
		Não sabe	,404 ^a	,734	,928
	Natural	Cesária	,438	,400	,624
		Não sabe	,842 ^a	,799	,652
	Não sabe	Cesária	-,404 ^c	,734	,928
		Natural	-,842 ^c	,799	,652
Prevotella	Cesária	Natural	,242	,409	,913
		Não sabe	-,612 ^a	,751	,803
	Natural	Cesária	-,242	,409	,913
		Não sabe	-,855 ^a	,817	,657
	Não sabe	Cesária	,612 ^c	,751	,803
		Natural	,855 ^c	,817	,657
Alistipes	Cesária	Natural	-,064	,407	,998
		Não sabe	,063 ^a	,747	1,000
	Natural	Cesária	,064	,407	,998
		Não sabe	,127 ^a	,813	,998
	Não sabe	Cesária	-,063 ^c	,747	1,000
		Natural	-,127 ^c	,813	,998
Christensenellaceae	Cesária	Natural	-,945 [*]	,375	,043
		Não sabe	,221 ^a	,688	,984
	Natural	Cesária	,945 [*]	,375	,043

Lachnoclostridium	Não sabe	Não sabe	1,166 ^a	,749	,330
		Cesária	-,221 ^c	,688	,984
		Natural	-1,166 ^c	,749	,330
	Cesária	Natural	-,549	,389	,414
		Não sabe	,758 ^a	,713	,645
	Natural	Cesária	,549	,389	,414
		Não sabe	1,307 ^a	,776	,265
	Não sabe	Cesária	-,758 ^c	,713	,645
		Natural	-1,307 ^c	,776	,265
Lachnospiraceae	Cesária	Natural	,081	,411	,996
		Não sabe	,226 ^a	,754	,987
	Natural	Cesária	-,081	,411	,996
		Não sabe	,145 ^a	,820	,997
	Não sabe	Cesária	-,226 ^c	,754	,987
		Natural	-,145 ^c	,820	,997
Roseburia	Cesária	Natural	,154	,411	,975
		Não sabe	-,102 ^a	,755	,999
	Natural	Cesária	-,154	,411	,975
		Não sabe	-,256 ^a	,821	,986
	Não sabe	Cesária	,102 ^c	,755	,999
		Natural	,256 ^c	,821	,986
Eubacterium	Cesária	Natural	-,084	,412	,996
		Não sabe	-,293 ^a	,755	,973
	Natural	Cesária	,084	,412	,996
		Não sabe	-,209 ^a	,822	,992
	Não sabe	Cesária	,293 ^c	,755	,973
		Natural	,209 ^c	,822	,992
Ruminococcus	Cesária	Natural	-,686	,390	,233
		Não sabe	,110 ^a	,717	,998
	Natural	Cesária	,686	,390	,233
		Não sabe	,796 ^a	,780	,674
	Não sabe	Cesária	-,110 ^c	,717	,998
		Natural	-,796 ^c	,780	,674
Lachnospiraceae (Other)	Cesária	Natural	,201	,400	,944
		Não sabe	-,193 ^a	,735	,991
	Natural	Cesária	-,201	,400	,944
		Não sabe	-,395 ^a	,800	,947
	Não sabe	Cesária	,193 ^c	,735	,991

		Natural	,395 ^c	,800	,947
Anaerotruncus	Cesária	Natural	-1,153 [*]	,369	,009
		Não sabe	-,240 ^a	,678	,979
	Natural	Cesária	1,153 [*]	,369	,009
		Não sabe	,912 ^a	,738	,528
	Não sabe	Cesária	,240 ^c	,678	,979
		Natural	-,912 ^c	,738	,528
Faecalibacterium	Cesária	Natural	,175	,413	,965
		Não sabe	,560 ^a	,757	,845
	Natural	Cesária	-,175	,413	,965
		Não sabe	,385 ^a	,824	,954
	Não sabe	Cesária	-,560 ^c	,757	,845
		Natural	-,385 ^c	,824	,954
Ruminoclostridium	Cesária	Natural	,377	,406	,734
		Não sabe	,490 ^a	,745	,884
	Natural	Cesária	-,377	,406	,734
		Não sabe	,114 ^a	,810	,999
	Não sabe	Cesária	-,490 ^c	,745	,884
		Natural	-,114 ^c	,810	,999
Ruminococcaceae	Cesária	Natural	-,986 [*]	,371	,030
		Não sabe	-1,235 ^a	,680	,208
	Natural	Cesária	,986 [*]	,371	,030
		Não sabe	-,249 ^a	,740	,982
	Não sabe	Cesária	1,235 ^c	,680	,208
		Natural	,249 ^c	,740	,982
Subdoligranulum	Cesária	Natural	,312	,411	,835
		Não sabe	,558 ^a	,754	,845
	Natural	Cesária	-,312	,411	,835
		Não sabe	,247 ^a	,821	,987
	Não sabe	Cesária	-,558 ^c	,754	,845
		Natural	-,247 ^c	,821	,987
[Eubacterium] coprostanoligenes group	Cesária	Natural	,296	,404	,848
		Não sabe	-,287 ^a	,741	,973
	Natural	Cesária	-,296	,404	,848
		Não sabe	-,583 ^a	,806	,853
	Não sabe	Cesária	,287 ^c	,741	,973
		Natural	,583 ^c	,806	,853
Ruminococcaceae uncultured	Cesária	Natural	-,063	,415	,998

	Natural	Não sabe	,526 ^a	,762	,870
		Cesária	,063	,415	,998
		Não sabe	,589 ^a	,829	,860
	Não sabe	Cesária	-,526 ^c	,762	,870
		Natural	-,589 ^c	,829	,860
	Phascolarctobacterium	Cesária	Natural	,424	,405
Não sabe			,417 ^a	,744	,924
Natural		Cesária	-,424	,405	,657
		Não sabe	-,007 ^a	,809	1,000
Não sabe		Cesária	-,417 ^c	,744	,924
		Natural	,007 ^c	,809	1,000
Dialister	Cesária	Natural	,154	,405	,975
		Não sabe	,000 ^a	,744	1,000
	Natural	Cesária	-,154	,405	,975
		Não sabe	-,153 ^a	,810	,997
	Não sabe	Cesária	,000 ^c	,744	1,000
		Natural	,153 ^c	,810	,997
Akkermansia	Cesária	Natural	-,006	,411	1,000
		Não sabe	,565 ^a	,755	,840
	Natural	Cesária	,006	,411	1,000
		Não sabe	,571 ^a	,822	,868
	Não sabe	Cesária	-,565 ^c	,755	,840
		Natural	-,571 ^c	,822	,868
Outros	Cesária	Natural	-,224	,405	,927
		Não sabe	-,173 ^a	,742	,994
	Natural	Cesária	,224	,405	,927
		Não sabe	,051 ^a	,808	1,000
	Não sabe	Cesária	,173 ^c	,742	,994
		Natural	-,051 ^c	,808	1,000

ANEXO 18: Pós teste Tipo de parto x Gêneros, de acordo com os grupos de estudo

Variável dependente	Grupo	(A) Tipo de parto	(B) Tipo de parto	Diferença média (A-B)	Erro Padrão	Sig. ^d
Bifidobacterium	Saudável	Cesária	Natural	,244	,379	,891
			Não sabe	,785	,963	,803
		Natural	Cesária	-,244	,379	,891
			Não sabe	,541	,950	,921
		Não sabe	Cesária	-,785	,963	,803
			Natural	-,541	,950	,921
	Funcional	Cesária	Natural	,149	,377	,971
			Não sabe	-3,609*	,956	,001
		Natural	Cesária	-,149	,377	,971
			Não sabe	-3,759*	,959	,001
		Não sabe	Cesária	3,609*	,956	,001
			Natural	3,759*	,959	,001
Bacteroides	Neurogênico	Cesária	Natural	,918	,952	,339
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	-,918	,952	,339
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
	Saudável	Cesária	Natural	,526	,418	,513
			Não sabe	1,522	1,059	,400
		Natural	Cesária	-,526	,418	,513
			Não sabe	,996	1,046	,719
		Não sabe	Cesária	-1,522	1,059	,400
			Natural	-,996	1,046	,719
Bacteroides	Funcional	Cesária	Natural	-,217	,415	,937
			Não sabe	,078	1,052	1,000
		Natural	Cesária	,217	,415	,937
			Não sabe	,295	1,055	,989
		Não sabe	Cesária	-,078	1,052	1,000
			Natural	-,295	1,055	,989
	Neurogênico	Cesária	Natural	,254	1,047	,809
			Não sabe	. ^b	.	.

Parabacteroides		Natural	Cesária Não sabe	-,254 . ^b	1,047 .	,809 .
		Não sabe	Cesária Natural	. ^c . ^c	. .	. .
	Saúdável	Cesária	Natural	-,454	,416	,627
			Não sabe	,600	1,057	,922
		Natural	Cesária	,454	,416	,627
			Não sabe	1,054	1,043	,681
		Não sabe	Cesária	-,600	1,057	,922
			Natural	-1,054	1,043	,681
	Funcional	Cesária	Natural	,202	,414	,949
			Não sabe	,344	1,049	,983
		Natural	Cesária	-,202	,414	,949
			Não sabe	,143	1,053	,999
		Não sabe	Cesária	-,344	1,049	,983
			Natural	-,143	1,053	,999
	Neurogênico	Cesária	Natural	-1,062	1,045	,314
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	1,062	1,045	,314
			Não sabe	. ^b	.	.
Prevotella	Saúdável	Cesária	Natural	-,101	,426	,994
			Não sabe	-1,378	1,081	,503
		Natural	Cesária	,101	,426	,994
			Não sabe	-1,278	1,067	,555
		Não sabe	Cesária	1,378	1,081	,503
			Natural	1,278	1,067	,555
		Cesária	Natural	,381	,423	,753
			Não sabe	,133	1,073	,999
	Funcional	Natural	Cesária	-,381	,423	,753
			Não sabe	-,248	1,077	,994
		Não sabe	Cesária	-,133	1,073	,999
			Natural	,248	1,077	,994
	Neurogênico	Cesária	Natural	,447	1,069	,677
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	-,447	1,069	,677
			Não sabe	. ^b	.	.

Alistipes	Saudável	Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
		Cesária	Natural	-,449	,424	,648
			Não sabe	,559	1,076	,939
		Natural	Cesária	,449	,424	,648
			Não sabe	1,008	1,062	,721
		Não sabe	Cesária	-,559	1,076	,939
			Natural	-1,008	1,062	,721
	Funcional	Cesária	Natural	-,285	,421	,876
			Não sabe	-,503	1,068	,953
		Natural	Cesária	,285	,421	,876
			Não sabe	-,218	1,072	,996
		Não sabe	Cesária	,503	1,068	,953
			Natural	,218	1,072	,996
	Neurogênico	Cesária	Natural	,542	1,063	,612
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	-,542	1,063	,612
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
Christensenellaceae	Saudável	Cesária	Natural	-,812	,390	,122
			Não sabe	-,333	,991	,982
		Natural	Cesária	,812	,390	,122
			Não sabe	,479	,978	,948
		Não sabe	Cesária	,333	,991	,982
			Natural	-,479	,978	,948
	Funcional	Cesária	Natural	,189	,388	,948
			Não sabe	,605	,984	,904
		Natural	Cesária	-,189	,388	,948
			Não sabe	,415	,987	,966
		Não sabe	Cesária	-,605	,984	,904
			Natural	-,415	,987	,966
	Neurogênico	Cesária	Natural	-2,214*	,980	,028
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	2,214*	,980	,028
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.

Lachnoclostridium	Saudável	Cesária	Natural	,579	,405	,403
			Não sabe	1,124	1,026	,624
		Natural	Cesária	-,579	,405	,403
			Não sabe	,545	1,013	,933
		Não sabe	Cesária	-1,124	1,026	,624
			Natural	-,545	1,013	,933
	Funcional	Cesária	Natural	,062	,402	,998
			Não sabe	,717	1,019	,863
		Natural	Cesária	-,062	,402	,998
			Não sabe	,655	1,023	,892
		Não sabe	Cesária	-,717	1,019	,863
			Natural	-,655	1,023	,892
Lachnospiraceae	Neurogênico	Cesária	Natural	-2,288*	1,015	,028
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	2,288*	1,015	,028
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
	Saudável	Cesária	Natural	-,258	,428	,909
			Não sabe	,515	1,085	,952
		Natural	Cesária	,258	,428	,909
			Não sabe	,773	1,071	,854
		Não sabe	Cesária	-,515	1,085	,952
			Natural	-,773	1,071	,854
Lachnospiraceae	Funcional	Cesária	Natural	-,055	,425	,999
			Não sabe	-,041	1,077	1,000
		Natural	Cesária	,055	,425	,999
			Não sabe	,013	1,081	1,000
		Não sabe	Cesária	,041	1,077	1,000
			Natural	-,013	1,081	1,000
	Neurogênico	Cesária	Natural	,555	1,073	,607
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	-,555	1,073	,607
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
Roseburia	Saudável	Cesária	Natural	-,425	,428	,693
			Não sabe	-,142	1,087	,999

		Natural	Cesária	,425	,428	,693
			Não sabe	,283	1,072	,991
		Não sabe	Cesária	,142	1,087	,999
			Natural	-,283	1,072	,991
	Funcional	Cesária	Natural	,174	,426	,969
			Não sabe	-,100	1,079	1,000
		Natural	Cesária	-,174	,426	,969
			Não sabe	-,274	1,083	,992
		Não sabe	Cesária	,100	1,079	1,000
			Natural	,274	1,083	,992
	Neurogênico	Cesária	Natural	,713	1,074	,509
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	-,713	1,074	,509
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
Eubacterium	Saúdável	Cesária	Natural	-,176	,429	,968
			Não sabe	,033	1,088	1,000
		Natural	Cesária	,176	,429	,968
			Não sabe	,209	1,073	,996
		Não sabe	Cesária	-,033	1,088	1,000
			Natural	-,209	1,073	,996
	Funcional	Cesária	Natural	-,200	,426	,954
			Não sabe	-,585	1,080	,931
		Natural	Cesária	,200	,426	,954
			Não sabe	-,385	1,084	,979
		Não sabe	Cesária	,585	1,080	,931
			Natural	,385	1,084	,979
	Neurogênico	Cesária	Natural	,124	1,075	,909
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	-,124	1,075	,909
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
Ruminococcus	Saúdável	Cesária	Natural	-,560	,407	,436
			Não sabe	,209	1,032	,996
		Natural	Cesária	,560	,407	,436
			Não sabe	,769	1,018	,836

Lachnospiraceae (Other)	Funcional	Não sabe	Cesária	-,209	1,032	,996
			Natural	-,769	1,018	,836
		Cesária	Natural	-,969	,404	,059
			Não sabe	-,182	1,024	,997
		Natural	Cesária	,969	,404	,059
			Não sabe	,786	1,028	,831
		Não sabe	Cesária	,182	1,024	,997
			Natural	-,786	1,028	,831
	Neurogênico	Cesária	Natural	-,528	1,020	,607
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	,528	1,020	,607
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
	Saudável	Cesária	Natural	,534	,417	,498
			Não sabe	,410	1,058	,973
		Natural	Cesária	-,534	,417	,498
			Não sabe	-,124	1,044	,999
		Não sabe	Cesária	-,410	1,058	,973
			Natural	,124	1,044	,999
Anaerotruncus	Funcional	Cesária	Natural	,223	,414	,932
			Não sabe	-,509	1,050	,949
		Natural	Cesária	-,223	,414	,932
			Não sabe	-,732	1,054	,868
		Não sabe	Cesária	,509	1,050	,949
			Natural	,732	1,054	,868
	Neurogênico	Cesária	Natural	-,154	1,046	,884
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	,154	1,046	,884
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
Anaerotruncus	Saudável	Cesária	Natural	-1,088*	,385	,019
			Não sabe	-1,285	,976	,475
		Natural	Cesária	1,088*	,385	,019
			Não sabe	-,197	,963	,996
		Não sabe	Cesária	1,285	,976	,475
			Natural	,197	,963	,996

	Funcional	Cesária	Natural	,097	,382	,992
			Não sabe	,742	,969	,831
		Natural	Cesária	-,097	,382	,992
			Não sabe	,646	,972	,882
		Não sabe	Cesária	-,742	,969	,831
			Natural	-,646	,972	,882
	Neurogênico	Cesária	Natural	-2,466*	,965	,013
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	2,466*	,965	,013
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
Faecalibacterium	Saudável	Cesária	Natural	,375	,430	,768
			Não sabe	,581	1,090	,934
		Natural	Cesária	-,375	,430	,768
			Não sabe	,206	1,076	,997
		Não sabe	Cesária	-,581	1,090	,934
			Natural	-,206	1,076	,997
	Funcional	Cesária	Natural	,291	,427	,874
			Não sabe	,684	1,082	,896
		Natural	Cesária	-,291	,427	,874
			Não sabe	,393	1,086	,978
		Não sabe	Cesária	-,684	1,082	,896
			Natural	-,393	1,086	,978
Ruminoclostridium	Neurogênico	Cesária	Natural	-,141	1,078	,896
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	,141	1,078	,896
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
	Saudável	Cesária	Natural	-,131	,422	,986
			Não sabe	,657	1,072	,904
		Natural	Cesária	,131	,422	,986
			Não sabe	,788	1,058	,842
		Não sabe	Cesária	-,657	1,072	,904
			Natural	-,788	1,058	,842
	Funcional	Cesária	Natural	,411	,420	,701
			Não sabe	,428	1,064	,970

Ruminococcaceae	Neurogênico	Natural	Cesária	-,411	,420	,701
			Não sabe	,016	1,068	1,000
		Não sabe	Cesária	-,428	1,064	,970
			Natural	-,016	1,068	1,000
		Cesária	Natural	,850	1,060	,426
			Não sabe	. ^b	.	.
	Saudável	Natural	Cesária	-,850	1,060	,426
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
Subdoligranulum	Neurogênico	Cesária	Natural	-,802	,386	,122
			Não sabe	-1,380	,980	,417
		Natural	Cesária	,802	,386	,122
			Não sabe	-,578	,967	,910
		Não sabe	Cesária	1,380	,980	,417
			Natural	,578	,967	,910
	Funcional	Cesária	Natural	-,504	,384	,477
			Não sabe	-1,411	,973	,391
		Natural	Cesária	,504	,384	,477
			Não sabe	-,907	,976	,734
		Não sabe	Cesária	1,411	,973	,391
			Natural	,907	,976	,734
Subdoligranulum	Neurogênico	Cesária	Natural	-1,652	,968	,094
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	1,652	,968	,094
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
Subdoligranulum	Saudável	Cesária	Natural	,307	,428	,856
			Não sabe	,851	1,086	,821
		Natural	Cesária	-,307	,428	,856
			Não sabe	,544	1,072	,942
		Não sabe	Cesária	-,851	1,086	,821
			Natural	-,544	1,072	,942
Subdoligranulum	Funcional	Cesária	Natural	,420	,425	,696
			Não sabe	,356	1,079	,983
		Natural	Cesária	-,420	,425	,696
			Não sabe	-,064	1,082	1,000

[Eubacterium] coprostanoligenes	Neurogênico	Não sabe	Cesária	-,356	1,079	,983
			Natural	,064	1,082	1,000
		Cesária	Natural	,208	1,074	,847
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	-,208	1,074	,847
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
	Saúdável	Cesária	Natural	,228	,420	,931
			Não sabe	,077	1,067	1,000
		Natural	Cesária	-,228	,420	,931
			Não sabe	-,150	1,053	,999
		Não sabe	Cesária	-,077	1,067	1,000
			Natural	,150	1,053	,999
	Funcional	Cesária	Natural	-,325	,418	,825
			Não sabe	-,831	1,059	,821
		Natural	Cesária	,325	,418	,825
			Não sabe	-,506	1,063	,952
		Não sabe	Cesária	,831	1,059	,821
			Natural	,506	1,063	,952
Ruminococcaceae uncultured	Neurogênico	Cesária	Natural	,985	1,055	,354
			Não sabe	. ^b	.	.
		Natural	Cesária	-,985	1,055	,354
			Não sabe	. ^b	.	.
		Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
			Natural	. ^c	.	.
	Saúdável	Cesária	Natural	-,075	,432	,997
			Não sabe	,470	1,097	,964
		Natural	Cesária	,075	,432	,997
			Não sabe	,546	1,083	,944
		Não sabe	Cesária	-,470	1,097	,964
			Natural	-,546	1,083	,944
	Funcional	Cesária	Natural	-,224	,430	,938
			Não sabe	,535	1,089	,947
		Natural	Cesária	,224	,430	,938
			Não sabe	,759	1,093	,868
		Não sabe	Cesária	-,535	1,089	,947
			Natural	-,759	1,093	,868

Phascolarctobacterium	Neurogênico	Cesária	Natural Não sabe	,110 . ^b	1,085 .	,920 .
		Natural	Cesária Não sabe	-,110 . ^b	1,085 .	,920 .
		Não sabe	Cesária Natural	. ^c . ^c	. .	. .
	Saudável	Cesária	Natural Não sabe	,212 ,732	,422 1,070	,944 ,873
		Natural	Cesária Não sabe	-,212 ,520	,422 1,057	,944 ,947
		Não sabe	Cesária Natural	-,732 -,520	1,070 1,057	,873 ,947
	Funcional	Cesária	Natural Não sabe	,130 ,259	,419 1,063	,986 ,993
		Natural	Cesária Não sabe	-,130 ,129	,419 1,067	,986 ,999
		Não sabe	Cesária Natural	-,259 -,129	1,063 1,067	,993 ,999
	Neurogênico	Cesária	Natural Não sabe	,930 . ^b	1,058 .	,384 .
		Natural	Cesária Não sabe	-,930 . ^b	1,058 .	,384 .
		Não sabe	Cesária Natural	. ^c . ^c	. .	. .
Dialister	Saudável	Cesária	Natural Não sabe	-,034 -,698	,422 1,071	1,000 ,887
		Natural	Cesária Não sabe	,034 -,664	,422 1,057	1,000 ,898
		Não sabe	Cesária Natural	,698 ,664	1,071 1,057	,887 ,898
	Funcional	Cesária	Natural Não sabe	,718 ,816	,420 1,063	,253 ,830
		Natural	Cesária Não sabe	-,718 ,099	,420 1,067	,253 1,000
		Não sabe	Cesária Natural	-,816 -,099	1,063 1,067	,830 1,000
	Neurogênico	Cesária	Natural Não sabe	-,223 . ^b	1,059 .	,834 .

Akkermansia	Saúdável	Natural	Cesária Não sabe	,223 . ^b	1,059 .	,834 .
		Não sabe	Cesária Natural	. ^c . ^c	. .	. .
		Cesária	Natural Não sabe	-,421 ,346	,428 1,087	,699 ,985
		Natural	Cesária Não sabe	,421 ,768	,428 1,073	,699 ,857
		Não sabe	Cesária Natural	-,346 -,768	1,087 1,073	,985 ,857
		Cesária	Natural Não sabe	-,004 ,722	,426 1,079	1,000 ,880
	Funcional	Natural	Cesária Não sabe	,004 ,726	,426 1,083	1,000 ,879
		Não sabe	Cesária Natural	-,722 -,726	1,079 1,083	,880 ,879
		Cesária	Natural Não sabe	,409 . ^b	1,075 .	,705 .
		Natural	Cesária Não sabe	-,409 . ^b	1,075 .	,705 .
		Não sabe	Cesária Natural	. ^c . ^c	. .	. .
Outros	Saúdável	Cesária	Natural Não sabe	,323 -,769	,421 1,069	,830 ,855
		Natural	Cesária Não sabe	-,323 -1,092	,421 1,055	,830 ,664
		Não sabe	Cesária Natural	,769 1,092	1,069 1,055	,855 ,664
		Cesária	Natural Não sabe	-,014 ,412	,419 1,061	1,000 ,973
		Natural	Cesária Não sabe	,014 ,426	,419 1,065	1,000 ,970
		Não sabe	Cesária Natural	-,412 -,426	1,061 1,065	,973 ,970
	Neurogênico	Cesária	Natural Não sabe	-,981 . ^b	1,057 .	,357 .

	Natural	Cesária	,981	1,057	,357
		Não sabe	. ^b	.	.
	Não sabe	Cesária	. ^c	.	.
		Natural	. ^c	.	.

Baseado em médias marginais estimadas

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

a. Uma estimativa da média marginal da população modificada (A).

b. Uma estimativa da média marginal da população modificada (B).

d. Ajuste para diversas comparações: Sidak.

*Dados convertidos em z-score