UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

GEOVANA SILVA FOGAÇA LEITE

Efeito da suplementação de probióticos sobre parâmetros imunológicos e de permeabilidade intestinal em corredores após uma maratona

São Paulo

2021

GEOVANA SILVA FOGAÇA LEITE

Efeito da suplementação de probióticos sobre parâmetros imunológicos e de permeabilidade intestinal em corredores após uma maratona

Versão original

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ugrinowitsch

São Paulo

2021

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

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Leite, Geovana S F

Suplementação de probióticos, parâmetros imunológicos e de permeabilidade intestinal em corredores após uma maratona / Geovana Silva Fogaça Leite; orientador, Carlos Ugrinowitsch. – 2021.

132f

Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biodinâmica do Movimento Humano, Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021
Versão original

1. Probióticos. 2. Permeabilidade Intestinal. 3. Atletas. 4. Sistema Imunológico. 5. Neutrófilos. 6. Exercício prolongado. 7. Endotoxemia. I. Ugrinowitsch, Carlos. II. Título.

LEITE, G. S. F. **Suplementação de probióticos, parâmetros imunológicos e de permeabilidade intestinal em corredores após uma maratona.** Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Antônio Nivaldo Fogaça Leite e Dalva Maria da Silva Fogaça Leite, meus grandes educadores que sempre me apoiaram, exemplos de caráter e luta que me servem de inspiração diária, meus amados progenitores e sempre parceiros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a “**DEUS**” que permitiu que eu chegasse até aqui, sempre iluminando meu caminho, dando força e graça, para que minhas conquistas fossem alcançadas. Obrigada Pai do Céu!

Minha eterna gratidão **A MEUS PAIS, Dalva Maria da Silva F Leite e Antônio Nivaldo Fogaça Leite**, que sempre com confiança e admiração me incentivaram e apoiaram, respeitando minhas escolhas. Talvez eu nunca consiga expressar em atos ou palavras minha ETERNA gratidão a vocês meus amados!

Agradeço as agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e do CNPq (#475074/2011-4) pois sem o apoio financeiro dos mesmos a realização do trabalho não seria possível

A **Professora Hanna Karen Moreira Antunes**, minha orientadora nas Iniciações Científicas e Mestrado, a qual me apresentou o Universo da Ciência, e que acreditando em meu potencial, com muita emoção, me deu a grande oportunidade de trilhar novos caminhos, mudando minha forma de estar no mundo como ser humano e ampliando minha visão e experiência acadêmica. Sempre lembrarei de ti com gratidão Hanna!

Ao Professor, Parceiro e Amigo **Ronaldo Vagner Thomatielli dos Santos**. Professor, Pesquisador e ser humano adorável que fui agraciada em te-lo como meu professor durante a graduação, o qual com sua calma, doçura e paciência sempre esteve disponível me estimulando, confortando, e ensinando quando necessário desde o final de meu mestrado. Minha imensa e eterna Gratidão a você Querido Ronaldo !.

A **Professora Marília Seelaender**, grande exemplo da potência feminina no ambiente acadêmico e Pesquisa Científica, a qual abriu as portas de seu laboratório e me guiou para que eu pudesse encontrar e trilhar o meu caminho na pesquisa. Minha eterna gratidão e admiração a você Professora!

Ao **Professor Antônio Herbert Lancha Junior**, exemplo de educação gentileza, ser humano admirável por sua forma de encarar a vida, que me mostrou uma forma leve, natural e prazerosa de estar no ambiente acadêmico. Serei para sempre grata Professor, pela confiança, pelos momentos de convivência, pelos desafios e por todas as oportunidades humanas e profissionais as quais o Senhor me proporcionou durante estes anos, A você, minha gratidão e admiração!.

A minha Irmã Acadêmica **Ayane de Sá Resende**, parceira de laboratório e grande amiga, grande exemplo de mulher, pesquisadora, Nutricionista, um ser humano admirável o qual tive o imenso prazer de ter como parceira de pesquisa, aprendendo inúmeras coisas, podemos estar fisicamente distantes, mas o que construímos fará parte das nossas histórias de vida Querida Amiga! Minha eterna Gratidão a você amiga!

A meus parceiros de coleta e projeto **Edgar Tavares da Silva, Helena Angélica Pereira Batatinha e Valdir de Aquino Lemos**, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível, Grata por todo o aprendizado e lições humana durante nosso trabalho juntos.

A **meus voluntários de pesquisa**, se prontificaram a participar do trabalho e contribuir com a ciência, sem os quais, esta importantíssima conquista humana e acadêmica não seria possível. Muito Obrigada!

Ao **Vitor Procópio**, técnico do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicado a atividade motora, grande amigo que levarei para vida, um ser humano incrível o qual tive o prazer de estar diariamente durante meu doutorado, meu Muito Obrigada por todo auxílio e apoio durante todos estes anos Vitinho!.

A todos **AMIGOS E COLEGAS** pessoais e profissionais que me acompanharam e apoiaram durante todo o processo, me estimulando e acreditando em minha competência.

A todos os docentes que estivera presentes nesse processo, essenciais para que todo ensinamento e aprendizado fosse possível. Em especial aos **Membros da Banca** que se prontificaram em ajudar fazendo grandes contribuições para a construção de um trabalho científico **Professor Carlos Ugrinowitsch, Professor José Cesar Rosa Neto, Professora Cristina Bogsan, Professor Fabio Lira, Professora Edilamar M de Oliveira, Professor Ricardo Fock**. Meu Muito Obrigada!

E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram ou colaboraram, direta ou indiretamente, de maneira física ou moral para que este trabalho fosse realizado, entendendo o significado do mesmo para mim. Meu sincero, Muito Obrigada!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

“Educar uma pessoa apenas no intelecto, mas não na moral, é criar uma ameaça à sociedade”

“Um espírito nobre engrandece o menor dos homens”.

Theodore Roosevelt

RESUMO

LEITE, G. S. F. **Suplementação de probióticos, parâmetros imunológicos e de permeabilidade intestinal em corredores após uma maratona.** 2020. Tese de Doutorado em Ciências - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Em modalidades esportivas de longa duração como, corrida, ciclismo e triathlon é frequente o aparecimento de sintomas gastrointestinais, aumento da permeabilidade intestinal e endotoxemia além da depressão da atividade do sistema imunológico. Estudos realizados com atletas de *endurance* indicam que a ingestão diária de probióticos pode resultar na diminuição da severidade de sintomas gastrointestinais e infecções do trato respiratório superior, no entanto não existe um consenso sobre quais as espécies, dose e período de utilização necessária para se obter o resultado positivo, os estudos não verificaram a função das células do sistema imunológico ou não acompanharam o que ocorre com os parâmetros avaliados dias após a competição. A partir do exposto o objetivo do presente estudo foi verificar se a suplementação de probióticos altera os parâmetros da resposta imunológica inata e de permeabilidade intestinal após uma maratona. Para isso foi realizado um estudo duplo cego randomizado, no qual foram selecionados 27 atletas amadores de corrida (sexo masculino), com experiência prévia em maratonas. Os sujeitos foram randomizados de forma aleatória em 2 grupos: Placebo (n=13) e suplementação (n=14) o grupo probiótico fez a utilização de sachês (1/dia) contendo 10×10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Lactobacillus acidophilus*, e 10×10^9 (UFC) de *Bifidobacterium lactis* durante 30 dias, enquanto o grupo placebo utilizou sachês contendo 5g de maltodextrina. Foram realizadas coletas de sangue, saliva e fezes no momento basal, após o período de suplementação, logo após a realização de uma corrida de maratona e 5 dias após a prova. Os dados foram analisados com auxílio de um software SAS® comparando os diferentes grupos, utilizando análise de variância Teste-T para amostras independentes ou Modelo Misto GSM (com 'grupo' e 'tempo' como fatores) quando necessário. Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$ e apresentados em média $\pm$ Desvio Padrão (DP). A suplementação com a combinação de Probióticos *Lactobacillus acidophilus* (10×10^9) UFC + *Bifidobacterium lactis* (10×10^9) UFC durante período de 30 dias não causou alterações na atividade de neutrófilos ou sobre o perfil de citocinas plasmáticas, foi capaz de alterar o perfil de alfa-1 anti-tripsina (proteína relacionada a permeabilidade intestinal), diminuir os valores de lipopolissacarídeo após a realização de uma corrida de maratona e induzir modificações específicas na composição da microbiota intestinal de maratonistas.

Palavras Chaves: probióticos, permeabilidade intestinal, imunodepressão, microbiota, atletas

ABSTRACT

LEITE, G. S. F. . **Probiotics Supplementation, immunological and intestinal permeability parameters after a marathon run.** 2021. Phd Tesis. School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo; 2021.

Endurance sports such as running, cycling and triathlon gastrointestinal symptoms, increased permeability, endotoxemia and acute immunodepression as described. Studies carried out with endurance athletes indicate that daily dose of probiotics decrease the severity of gastrointestinal symptoms and upper respiratory tract symptoms, however it is not known which species, dose and period of use necessary to obtain the positive result, studies did not verify immune system function or not follow the athlete's day after the competition. Based on this, the purpose of this study was verified whether the supplementation of probiotics changes the parameters of the innate immune response and intestinal permeability after a marathon run. Participated 27 amateur marathon athletes (male), with previous experience. The subjects were randomized into 2 groups: Placebo (n = 13) or Probiotic (n = 14) the probiotic group used sachets (1 / day) containing 10×10^9 Colony Forming Units (UFC) of *Lactobacillus acidophilus*, and 10×10^9 (UFC) of *Bifidobacterium lactis* during 30 days. The placebo group used sachets containing 5g of maltodextrin during the same period. Were collected blood, saliva and feces at baseline, pré race, after race and 5 days after the race. The Statistical Analysis were done in SAS® software comparing the different groups by T-Test for independents or Mixed Model GSM ('group' and 'time' as factors) when necessary. The level of significance adopted was $p \leq 0.05$. Supplementation Probiotics over a period of 30 days did not cause changes in neutrophil activity or plasma cytokine profile, but was able to change the alpha-1 anti-trypsin (intestinal permeability protein), decrease the values of lipopolysaccharide after a marathon race and induce specific changes in gut microbiota composition.

Keywords: exercise, athletes, immune system, probiotics, microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Possíveis ações dos probióticos no ambiente intestinal.....	29
Figura 2 - Desenho experimental	43
Figura 3 - Valores de α 1-anti-tripsina para os diferentes momentos	65
Figura 4 - Concentrações de Lipopolissacarídeo circulante nos diferentes momentos	66
Figura 5 – Gêneros de bactérias para os diferentes grupos.....	69
Figura 6 - Alfa diversidade e curva de rarefação	71
Figura 7 - Parâmetros de beta diversidade.	74
Figura 8 - Beta diversidade dos grupos.....	75
Figura 9 - Frequência Relativa de <i>Lactobacillus Ruminis</i>	76
Figura 10 - Frequência Relativa de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Parabacteroídes</i> , <i>Parabacteroídes Distasoni</i> , <i>Dorea Longicatena</i> , <i>Ruminocacceae</i> e <i>Eubacterium Biforme</i> para os diferentes grupos	77
Figura 11 - Frequência relativa espécie <i>Faecalibacterium Prausnitzii</i>	78
Figura 12 - Frequência Reativa de gêneros e espécie de acordo com a classificação de IL-6	79
Figura 13 - Produção de TNF- α pelos Neutrófilos.....	84
Figura 14 - Produção de IFN- γ pelos Neutrófilos.....	85
Figura 15 - Produção de IL-4 pelos Neutrófilos	86
Figura 16 - Produção de IL-2 pelos Neutrófilos	87
Figura 17 - Produção de IL-15 pelos Neutrófilos	88
Figura 18 - PRODUÇÃO DE IL-8 PELOS NEUTRÓFILOS	89
Figura 19 - Produção de IL-10 pelos Neutrófilos	90
Figura 20 - Produção de IL1- β pelos Neutrófilos	91
Figura 21 - Produção de IL-6 pelos Neutrófilos	92
Figura 22 - Razão TNF- α e IL-10 para os grupos.....	93
Figura 23 - Valores circulantes de TNF- α	94
Figura 24 - Valores circulantes de IFN- γ circulante	95
Figura 25 - Valores circulantes de IL-1 β	96
Figura 26 - Valores circulante de IL-8.....	97

Figura 27 - Valores circulantes de IL-2.....	98
Figura 28 - Valores circulante de IL-6.....	99
Figura 29 - Valores circulante de IL-4.....	100
Figura 30 - Valores circulante de IL-15.....	101
Figura 31 - Valores circulante de IL- 10.....	102
Figura 32 - Razão valores circulantes de TNF- α / IL -10	103

LISTA DE TABELAS

Nenhuma entrada de índice de ilustrações foi encontrada.

TABELA 1 - Dados descritivos da amostra	57
TABELA 2 - Recordatório de treinos e tempo de prova.....	58
TABELA 3 - Dados descritivos das provas	59
TABELA 4 - Dados referentes ao consumo alimentar dos voluntários	59
TABELA 5 - Dados referentes ao consumo alimentar dos voluntários durante a maratona	60
TABELA 6 - Hemograma para os diferentes momentos.....	62
TABELA 7 - Presença de sintomas gastrintestinais	63
TABELA 8 - Sintomas gastrintestinais referentes ao último treino longo pré e pós período de suplementação	64
TABELA 9 - Severidade dos sintomas gastrintestinais apresentados durante a prova	64
TABELA 10 - Frequência de comunidades bacterianas conforme revelado pela análise de sequenciamento 16s RNA.....	70

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Análise de uniformidade através do índice de <i>pielou evennes</i> S.	72
GRÁFICO 2- Função fagocítica dos neutrófilos.....	81
GRÁFICO 3 - Produção de radicais peróxido pelos neutrófilos.....	82

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Diferentes ações dos probióticos	27
---	----

LISTA DE ABREVIações

Ácido Gama-aminobutírico (GABA)

Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Fatores Indutores de Hipóxia (*FIH*)

Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B)

Fator de necrose Tumoral- alfa (TNF- α)

Frequência Cardíaca Máxima ($FC_{Máx}$)

Gastrintestinal (GI)

Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal (HPA)

Imunoglobulina-A (IgA)

Interferon-gama (IFN- γ)

Interleucina-1- beta (IL-1)

Interleucina-6 (IL-6)

Interleucina 4 (IL-4)

Interleucina 8 (IL-8)

Interleucina 10 (IL-10)

Interleucina-17(IL-17)

Interleucina 22 (IL-22)

Lipopolissacarídeo (LPS)

Myeloid differentiation primary response (MyD88)

Permeabilidade Intestinal (PI)

Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Questionário de Infecções do Trato Respiratório Superior (QITRS)

Receptores de Reconhecimento Padrão (RRP)

Receptores de Reconhecimento Padrão Tipo *Toll Like*- 2 (TLR-2)

Receptores de Reconhecimento Padrão Tipo *Toll Like*- 4 (TLR-4)

Sistema Imunológico (SI)

Sintomas Gastrointestinais (SGI)

Tampão fosfato-salino do inglês “*phosphate buffered saline*” (PBS)

Tecido linfóide associado ao intestino do inglês “*gut associated lymphoid tissue*” (GALT)

Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Velocidade Máxima (V_{Máx})

Volume de Oxigênio Pico (VO_{2 pico})

Sumário

INTRODUÇÃO	19
REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Permeabilidade Intestinal	22
1.2. Elementos Probióticos no Esporte	26
1.3. Sistema Imunológico e Exercício	32
OBJETIVOS	38
3.1. Geral	38
1.4. Específicos	38
HIPÓTESE	39
MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1. Amostra.....	40
5.1.1 Procedimentos Éticos	41
1.5. Desenho Experimental	41
1.6. Caracterização da amostra	44
5.3.1 Composição Corporal.....	44
1.7. Suplementação	45
1.8. Questionários	46
1.9. Coletas Sanguíneas	47
1.10. Dosagens e Análises	47
1.10.1. Células Imunológicas	48
1.10.2. Endotoxemia.....	50
1.11. Coleta de Fezes.....	50
1.11.1. Composição da Microbiota Intestinal.....	51
ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
6.1. Dados Microbiota	55
RESULTADOS	57
7.1. Caracterização da Amostra.....	57

1.12.	Sintomas Gastrintestinais.....	63
1.13.	Permeabilidade Intestinal e Endotoxemia	65
1.14.	Composição da Microbiota Intestinal	67
1.14.1.	Alfa-diversidade.....	70
1.14.2.	Frequência Relativa.....	75
1.15.	Função Imunológica.....	81
1.15.1.	Atividade Dos Neutrófilos	81
1.15.2.	Citocinas plasmáticas relativizadas pela massa magra.....	94
DISCUSSÃO		104
8.1.	Sintomas Gastrintestinais.....	105
1.16.	Permeabilidade Intestinal e Endotoxemia	107
1.17.	Microbiota.....	111
1.18.	Função dos Neutrófilos	116
1.18.1.	Fagocitose e produção de peróxido	116
1.18.2.	Produção de Citocinas.....	117
1.19.	Citocinas Plasmáticas	120
CONCLUSÃO		124
REFERÊNCIAS		125
HOWLEY, E. T. & POWERS, S. K. Fisiologia do Exercício - Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho. 8ª Ed. São Paulo: Manole, 2014		130
ANEXOS		138

INTRODUÇÃO

Durante a realização de um exercício prolongado (ex: corrida, ciclismo, triatlo) é comum o aparecimento de sintomas gastrintestinais, tais como: náusea, flatulência, eructação, diarreias e cólicas (JEUKENDRUP *et al.*, 2000; LAMPRECHT *et al.*, 2012). Isso dá-se, principalmente, pela redistribuição do fluxo sanguíneo que ocorre durante a realização do exercício físico, na qual há uma diminuição do aporte sanguíneo para região gastrintestinal (GI) (JAGER *et al.*, 2019).

Essa alteração do aporte sanguíneo para região GI pode levar ao aumento da Permeabilidade Intestinal (PI) (LAMBERT *et al.*, 2008) favorecendo que endotoxinas (ex: Lipopolissacarídeos (LPS)) presente na membrana de bactérias gram-negativa da microbiota intestinal consigam atingir a circulação sistêmica gerando um quadro de endotoxemia. Trabalhos apontam que ocorre o quadro de endotoxemia induzida pelo exercício após provas de maratona (CAMUS *et al.*, 1997), triátlon de longa duração (JEUKENDRUP *et al.*, 2000) e ultramaratonas (GILL *et al.*, 2015).

Além disso, também é nestas modalidades de *endurance* que ocorre o aparecimento de sintomas de infecções do trato respiratório superior após períodos intensos de treinamento ou competições (WALSH *et al.*, 2011; COLBEY *et al.*, 2018). É bem descrito na literatura que o exercício prolongado gera um quadro sistêmico de imunodepressão transitória (WALSH, 2018), conhecido como período de janela aberta (NIEMAN *et al.*, 2007, no qual a função das células do sistema imunológico (neutrófilos, monócitos, linfócitos) fica prejudicada, facilitando o acometimento por infecções.

Ou seja, a depressão na função das células do sistema imunológico e o aumento da susceptibilidade para infecções do trato respiratório superior ocorre com maior frequência no exercício de longa duração (CAMPBELL; TURNER, 2018), assim como em relação ao aumento da permeabilidade intestinal, onde, os quadros mais pronunciados de endotoxemia são evidenciados em corridas de ultra-endurance 40 pg/mL (GILL *et al.*, 2015) 122 pg/mL (GILL *et al.*, 2015), o que sinaliza uma maior preocupação com o estado de saúde dos praticantes destas modalidades.

Dentre as estratégias nutricionais relacionadas à saúde imunológica dos atletas, sugere-se o consumo diário de elementos probióticos (WALSH, 2018; MAUGHAN, *et al.*, 2018). Embora a ação mais conhecida dos probióticos seja em relação à saúde intestinal, estes elementos agem como coadjuvante da função imunológica (COLBEY, *et al.*, 2018), e os benefícios relacionados ao uso são amplos. Os probióticos podem: reduzir bactérias patogênicas, estimular a produção de substâncias antimicrobianas, estimular a produção de ácidos graxos de cadeia curta, apresentar ação imunomoduladora, estimular a produção de neurotransmissores, alterar o pH da região intestinal, modificar a absorção de nutrientes e melhorar a função barreira (SÁNCHEZ, *et al.*, 2017).

No contexto esportivo, alguns trabalhos com a utilização de elementos probióticos demonstram diminuição da severidade e/ou sintomas de infecção do trato respiratório superior com a utilização de espécies única (COX *et al.*, 2010; WEST *et al.*, 2014; MICHALICKOVA *et al.*, 2016) ou compostos multi-espécies (STRASSER *et al.*, 2016). Outros trabalhos apontam resultados relacionados à diminuição da severidade dos sintomas gastrintestinais (WEST *et al.*, 2011; HAYWOOD, *et al.*, 2014; PUGH *et al.*, 2019) melhora da permeabilidade intestinal (PI) (LAMPRECHT *et al.*, 2012) e diminuição da endotoxemia induzida pelo exercício (SHING, *et al.*, 2014; ROBERTS, *et al.*, 2016).

O número de trabalhos relacionados à utilização destes elementos no contexto esportivo é limitado e os resultados, não são específicos em relação a função das células do sistema imunológico, relação com o perfil da microbiota intestinal, o que dificulta uma melhor compreensão acerca dos efeitos da utilização dos probióticos sobre o funcionamento do sistema imunológico e o ambiente intestinal. Além disso, não podemos deixar de mencionar que os efeitos relacionados à utilização dos probióticos são dependentes da interação com a microbiota intestinal residente (TIMMERMAN *et al.*, 2014), da espécie, período de utilização e dosagem do probiótico (LEITE *et al.*, 2019).

A partir do exposto o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da suplementação de probióticos em relação a atividade do sistema imunológico e parâmetros de permeabilidade intestinal após a realização de uma corrida de maratona.

REVISÃO DE LITERATURA

A corrida é uma modalidade de fácil acesso em que muitos praticantes se engajam buscando os benefícios relacionados à melhora de parâmetros clínicos, capacidade cardiorrespiratória e de saúde mental. As modalidades esportivas de longa duração expõem o organismo à situação de estresse por períodos prolongados e, para que o organismo seja capaz de suportar o desafio imposto no momento da competição, o planejamento do treinamento esportivo que precede a competição normalmente é intenso e apresenta sucessivas sessões de treinamento de longa duração (HOWEY; POWERS, 2014).

Exatamente pela extensão da atividade, pela alta demanda energética e pelas alterações fisiológicas (ex: elevação da temperatura corporal, aumento da atividade simpática, liberação de catecolaminas, aumento de cortisol) que ocorrem durante a realização do exercício físico, problemas associados a desidratação, hipertermia e hiponatremia ocorrem com maior frequência nas modalidades esportivas de longa duração (SAWKA *et al.*, 2014).

O funcionamento do sistema imunológico e gastrointestinal também tem sua atividade alterada durante a realização do exercício (OLIVEIRA; BURINI; JEUKENDRUP, 2014; GLEESON, 2007). Notadamente, o exercício agudo pode provocar um declínio da atividade imunológica (imunodepressão) por dias dependendo da intensidade e da duração da atividade realizada (WALSH *et al.*, 2011). Embora exista uma complexidade em relação ao estabelecimento deste quadro – como as estratégias nutricionais utilizadas durante a todo o período de preparação, realização do esforço e período de recuperação (ex: ingestão de carboidratos e micronutrientes), horas de sono e planejamento adequado do treinamento esportivo – discute-se que o quadro de imunodepressão transitória possa ter relação com o aumento da permeabilidade intestinal ocasionada pelo exercício (LAMPRECHT *et al.*, 2012).

2.1 Permeabilidade Intestinal

Alguns trabalhos sugerem que o aumento da permeabilidade induzida pelo exercício tenha relação com o aparecimento dos sintomas gastrointestinais (SGI) (PETERS *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA; BURINI; JEUKENDRUP, 2014). O aparecimento destes sintomas é comum, principalmente durante a corrida de longa duração (PUGH *et al.*, 2018). Sendo estes, náusea, vômito, eructação, flatulência, necessidade de evacuação, inchaço estomacal, refluxo e diarreia, sendo a frequência e severidade dos sintomas variável (DE OLIVEIRA; BURINI; JEUKENDRUP, 2014).

Um estudo realizado por Pugh *et al.* (2018) com corredores amadores demonstrou que 42% dos sujeitos apresentaram sintomas moderados 7 dias antes de uma competição de maratona e 70% apresentaram sintomas durante a prova, sendo que 27% apresentaram sintomas moderado-severos. No estudo de Pugh *et al.* (2018) os sintomas mais frequentes foram flatulência (durante os treinos) e náusea (durante a realização da prova). Outros estudos relacionados à presença desses sintomas durante uma corrida de maratona apresentaram valores igual ou superior a 52%, o que representa uma parcela significativa de praticantes (REHRER *et al.*, 1989; PETERS *et al.*, 1999).

Fatores como a intensidade e duração do esforço, condições ambientais (temperatura $\geq 33^{\circ}\text{C}$), tipo de alimento ingerido, estado de hidratação (desidratação $\geq 3\%$ de perda de massa corporea após a atividade), estado de ansiedade e genética contribuem para que alguns indivíduos sejam mais susceptíveis (COSTA *et al.*, 2017; JEUKENDRUP *et al.*, 2017; PUGH *et al.*, 2018b). Dentre as causas fisiológicas que podem explicar a ocorrência desses sintomas durante a corrida de longa duração estão: 1- Diminuição do aporte sanguíneo para a região gástrica durante a realização do exercício; 2- Alteração na taxa de esvaziamento gástrico; 3- movimentação mecânica ocasionada pelo corrida.

Diminuição do fluxo sanguíneo: Durante a realização do exercício com o aumento da atividade simpática e produção de calor, ocorre um aumento da vasoconstrição e resistência vascular esplânica com consequente diminuição do aporte sanguíneo para a região GI. O fluxo sanguíneo fica aumentado para o coração, musculatura ativa, pulmões e pele (DE OLIVEIRA; BURINI; JEUKENDRUP, 2014) e, com isso, ocorre uma restrição na

circulação esplânica, sendo esta dependente da intensidade do esforço realizado. De acordo com Rowel, Blackmon e Bruce (1964), de 60 a 70% do fluxo sanguíneo fica restrito para região GI durante exercício realizado a 70% do Consumo de Oxigênio de pico (VO_2 pico) e, num exercício realizado em intensidade máxima, pode ocorrer até 80% de restrição para a região GI (PETER; DE VRIES, 2001). A diminuição do aporte sanguíneo e nutricional ocasionado por este tipo de isquemia pode gerar erosão no epitélio intestinal (a partir da morte celular ocasionada), rompimento das junções de oclusão e aumento da PI. A PI aumentada favorece a passagem de antígenos, bactérias e endotoxinas para a circulação sistêmica (DOKLADNY; ZUHL; MOSELEY, 2016)

Alteração na Taxa de esvaziamento Gástrico: O aparecimento de alguns sintomas GI pode estar relacionado com o consumo de determinados tipos de alimentos contendo fibras, gorduras ou com elevada taxa de carboidratos em momentos próximos à realização do exercício ou durante a realização do mesmo (THOMAS; ERDMAN; BURKE, 2016)

Sabe-se que exercícios realizados em alta intensidade e/ou longa duração (acima de 70% do pico de potência) causam grande diminuição da motilidade gástrica e, conseqüentemente, há um comprometimento da taxa de esvaziamento gástrico. Se o consumo alimentar ocorre durante este período, em que a motilidade gástrica está comprometida, podem aparecer sintomas uma vez que a pressão intra-gástrica fica aumentada. Há também a diminuição da taxa de esvaziamento gástrico, aumento do tempo de trânsito oro-intestinal, diminuição da taxa de absorção intestinal que gera distensão intestinal, alteração da osmolaridade e aumento da possibilidade de fermentação dos carboidratos presentes no lúmen pelas bactérias que habitam o intestino (COSTA *et al.*, 2017).

Estresse mecânico ocasionado pela corrida: A frequência de sintomas é maior durante a corrida quando comparado com outros esportes de *endurance*, tais como, ciclismo e natação (PETER *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2017). A vibração mecânica que ocorre durante a corrida é duas vezes maior quando comparado com a que ocorre durante o ciclismo, e este movimento de *up and down* decorrente da corrida pode facilitar o

aparecimento dos sintomas, podendo comprometer a entrega de nutrientes e o desempenho na atividade (REHRER; MEIER, 1991).

O aparecimento desses sintomas pode estar relacionado ao aumento da PI o que facilita o aparecimento do quadro de endotoxemia induzida pelo exercício. Os dados presentes na literatura apontam que o exercício é capaz de induzir endotoxemia, sendo as alterações mais significantes vistas nos esforços com característica de *endurance* (duração acima de 120 minutos) ou exercício realizado até a exaustão em temperatura elevada ($\geq 33^{\circ}\text{C}$) (COSTA *et al.*, 2017). Considera-se que houve endotoxemia induzida pelo esforço quando são vistos aumentos acima de 5 pg/ml nas concentrações circulantes de LPS após a realização de exercício, associado à redução dos anti-corpos antitoxinas IgG e IgM (JEUKENDRUP *et al.*, 2000). Os estudos com *ultra-endurance* são os que apresentam os maiores valores de endotoxemia induzidas pelo exercício, de 40 pg/mL (GILL *et al.*, 2015a) a 122 pg/mL (GILL, et al., 2015b). O estudo de Camus *et al.* (1997), relacionado à endotoxemia após a realização de uma corrida de maratona, apresentou valores de 5pg/ml a 13 pg/ml com concomitante redução nos valores dos anti-corpos anti-LPS na primeira hora após a realização da prova.

O quadro de endotoxemia é caracterizado pelo aumento da concentração de LPS, o aumento da permeabilidade facilita a passagem de LPS para a circulação sistêmica (ROBERTS *et al.*, 2016). O LPS é uma endotoxina presente na parede celular externa de bactérias gram-negativas que, tanto no ambiente intestinal quanto na circulação sistêmica, é capaz de induzir o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células do sistema imunológico a partir de sua ligação com receptores de reconhecimento padrão (RRP) do tipo Toll- 4 (*TLR-4*) presentes na membrana das células (CLARK; MACH, 2016).

Inicialmente quando há liberação do LPS, após sua ligação com o receptor (Toll-4), ocorre ativação da cascata inflamatória local (ambiente intestinal) mediada pelo aumento da expressão do fator de transcrição Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), o qual irá estimular o aumento da produção de fatores pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α), Interferon – gama (IFN- γ); Interleucina-1 (IL-1), essas, por sua vez, induzem à diminuição das junções de oclusão paracelular, levando ao aumento da PI e facilitação da passagem das endotoxinas para a circulação sistêmica (endotoxemia) (CAPALDO; NUSRAT, 2009).

Pensando na recuperação dessas alterações recorrentes do esforço prolongado, de acordo com o trabalho realizado por Wang *et al.* (2012), a recuperação do epitélio intestinal tem início da reparação 3 horas após o término do período de isquemia, tendo seu reestabelecimento total num período de 24 horas, em relação à microbiota intestinal; após 72 horas de reperfusão, ainda não ocorreu o reestabelecimento total da microbiota residente.

De acordo com Karl *et al.* (2017), a microbiota intestinal e seus metabólitos também fazem parte dos mediadores relacionados a função barreira e permeabilidade intestinal, podendo ser alteradas após o exercício agudo extenuante. Os autores realizaram um estudo com militares e exercício agudo extenuante (51 quilômetros de ski com sobrecarga de 45 kg) em condição extrema (frio) e demonstraram que, em paralelo ao aumento da permeabilidade intestinal, foi observado um aumento na α -diversidade (*Shanon index*), alterações na abundância relativa de determinados filos (↓ bacteroidetes/↑firmicutes, Verrucomicrobia, Tenericutes, Spirochaetes, Lentisphaerae, Fusobacteria, Firmicutes, Euryarchaeota) e gêneros de microrganismos com grande potencial infeccioso (*Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Peptoniphilus*, *Acidaminococcus* e *Fusobacterium*) associado à diminuição de gêneros de microorganismos que atuam sobre o controle da inflamação ou translocação destes (*Bacteroidetes*, *Faecalibacterium*, *Collinsella* e *Roseburia*).

Os autores sugerem que estratégias referentes à microbiota intestinal podem ser utilizadas como novas terapias relacionadas à manutenção da integridade da barreira intestinal em situação de estresse elevado.

1.2. Elementos Probióticos no Esporte

Dentre as estratégias nutricionais utilizadas para atenuação dos sintomas gastrintestinais e manutenção da saúde imunológica de atletas, sugere-se o consumo de elementos probióticos (WALSH, 2018). Estudos controlados em atletas indicam que a ingestão diária de probióticos resulta na diminuição do número de dias e da severidade tanto de sintomas de infecções do trato respiratório superior, quanto de sintomas gastrointestinais em atletas (COX *et al.*, 2010; WEST *et al.*, 2011; MICHALICKOVA *et al.*, 2016; ROBERTS *et al.*, 2016).

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL *et al.*, 2014). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza a utilização de concentrações mínimas diárias de 10^8 e 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC). Esses elementos normalmente são administrados em compostos multi-espécies ou espécie única, comercializados em matriz alimentar (ex: produtos lácteos e leites fermentados), cápsulas ou sachês. Os mais conhecidos e encontrados em matriz alimentar são as espécies *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis* e são conhecidos pela sua ação em relação à melhora da função intestinal (HILL *et al.*, 2014).

Embora a ação e os efeitos sejam dependentes da espécie de probiótico utilizado, as evidências apresentam que o uso pode proteger o intestino de infecções principalmente em situações de maior susceptibilidade. O efeito mais conhecido em relação à utilização dos elementos probióticos é sobre a melhora da função intestinal. Porém, os meios pelos quais esses microrganismos interagem com o ambiente intestinal, apresentando efeito positivo sob o estado da saúde do indivíduo, são amplos (HILL *et al.*, 2014; KANG; IM, 2015; HAJELA *et al.*, 2015).

Os probióticos podem reduzir bactérias patogênicas, melhorar a função barreira, ter ação imunomoduladora, atuar na produção de neurotransmissores, estimular a produção de AGCC, interagir com a microbiota residente, facilitar a absorção de nutrientes (HAJELA

et al., 2015; SANCHEZ *et al.*, 2017) como descrito no quadro abaixo e representado na Figura 1.

QUADRO 1 – DIFERENTES AÇÕES DOS PROBIÓTICOS

Ação	Descrição
Reduzir Bactérias Patogênicas	<p>Tornando o ambiente menos propício para sobrevivência destas espécies, dificultando a internalização destes microrganismos patogênicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Competição por nutriente; • Alteração do pH intestinal; • Aumento da produção dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), o; • Estimulando a produção do muco intestinal; • Estimulando a produção de substâncias antimicrobianas (ex: defencinas e bacteriocinas).
Melhorar a Função Barreira	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da produção de muco; • Aumento de proteínas pertencentes às junções de oclusão • Estímulo para produção de substâncias antimicrobianas. • Estimulo para produção de imunoglobulinas
Imunomodulação	A partir da interação com as células que compõe o Tecido Linfoide Associado ao Trato

	<p>Gastrintestinal (GALT), via comunicação mediada por células dendríticas ou via célula M.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Melhorar a capacidade fagocítica de monócitos; • Melhoram a capacidade das células apresentadoras de antígeno (células dendríticas); • Estimular a produção de IL-10 por células T reguladoras • Estimular a produção de Imunoglobulina-A (IgA) por linfócitos B
Produção de Neurotransmissores	<p>Estimular a síntese de neurotransmissores e ou/ neuropeptídeos no ambiente intestinal que por meio o eixo intestino-cérebro podem ter ação central</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido Gama-aminobutirico (GABA), • Serotonina • Triptofano • GLP1 • PYY
Interagir com a microbiota residente	<p>Os probióticos também podem induzir alterações na atividade ou composição da microbiota residente, tornando o ambiente mais propício para o aumento de determinadas colônias de bactérias comensais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumento da produção dos AGCC • Vitaminas • Polifenóis

Figura 1- Possíveis ações dos probióticos no ambiente intestinal

É importante mencionar que além de ser dependente da espécie utilizada, a efetividade da utilização dos probióticos depende também da dose, do período de utilização e da interação com a microbiota residente (LEITE *et al.*, 2019). No contexto esportivo, o estudo realizado por Gill *et al.* (2016), com a utilização de *Lactobacillus Casei* Shirota 1×10^{11} Unidades Formadoras de Colônia (UFC) durante 7 dias, não demonstrou alterações relacionadas a melhora da PI ou no perfil de citocinas séricas.

Três estudos com período de 30 dias de utilização de probióticos observaram efeitos positivos em relação à incidência de infecções do trato respiratório superior em atletas (COX *et al.*, 2010; HAYWOOD *et al.*, 2014), severidade de sintomas gastrintestinais (HAYWOOD *et al.*, 2014) ou em relação a PI e endotoxemia (SHING *et al.*, 2014).

O estudo de Cox *et al.*, (2010) foi o único estudo realizado com espécie única de probiótico e que encontrou resultados positivos com período de utilização de 30 dias. O estudo foi realizado com corredores e utilizou a espécie *Lactobacillus Fermentum* VRI-003 (PCC) na concentração de 12×10^9 (UFC), demonstrando que após a utilização dos probióticos os atletas apresentaram redução do número de dias com sintomas de infecções do trato respiratório superior e apresentaram moderado aumento nas concentrações de IgA salivar e produção de IFN- γ por linfócitos T circulantes. Porém, o estudo não verificou os sintomas GI, endotoxemia ou parâmetros referentes à PI.

Em relação à permeabilidade intestinal Shing *et al.* (2014), em estudo realizado com corredores encontrou que, após o período de suplementação de 28 dias com um probióticos multi-espécies contendo 45 x UFC composto por *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *B. lactis*, *B. breve*, *B. Bifidum*, *Streptococcus thermophilus* e após a realização do exercício até a exaustão sobre temperaturas elevadas, o grupo probiótico apresentou valor inferior de LPL circulante, pequena diminuição na PI, sendo os valores de IL-10 pós esforço mais elevados.

No trabalho recente publicado por Pugh *et al.* (2019) com corredores recreacionais e suplementação de probióticos, 20 sujeitos divididos em 2 grupos (placebo/ probiótico) utilizaram por 28 dias um mix de probióticos (25×10^9 UFC= *Lactobacillus acidophilus* (CUL60 and CUL21), *Bifidobacterium bifidum* (CUL20), e *Bifidobacterium animalis* subs p. *Lactis* (CUL34)). O experimento demonstrou que ocorre um aumento dos sintomas gastrintestinais no ultimo terço de uma corrida de maratona (> 30 km) e que a suplementação de probiótico foi efetiva em minimizar a severidade destes sintomas. Embora o trabalho não apresente resultados em relação a composição e funcionalidade da microbiota intestinal ou atividade imunológica (atividade dos monócitos, neutrófilos, linfócitos, produção de fatores inflamatórios), os autores demonstram que há uma correlação entre o aumento dos sintomas gastrintestinais e o declínio da performance,

confirmando a importância de encontrar estratégias que consigam minimizar tais ocorrências.

Os demais estudos que demonstram resultados positivos em relação à diminuição de sintomas de infecção do trato respiratório superior (GLEESON *et al.*, 2011; GLEESON, 2016; STRASSER *et al.*, 2016, MICHALICKOVA *et al.* 2016) ou severidade de sintomas gastrintestinais e permeabilidade (WEST *et al.*, 2011; ROBERTS *et al.*, 2016) utilizaram períodos maiores que 11 semanas de utilização do probiótico.

O estudo de Lamprecht *et al.* (2012) com 23 triatletas, ciclistas e corredores, com 14 semanas de utilização de um probiótico multi-espécies (1×10^{10} /UFC) contendo *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *Enterococcus Faecium*, *L. lactis*, *L. casei*, demonstrou que as concentrações de zonulina (proteína relacionada a PI), proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e as concentrações séricas de TNF- α diminuíram significativamente no grupo suplementado.

Sugere-se que a melhora da PI e a diminuição dos sintomas gastrintestinais observados com o uso dos probióticos seja devido à melhora da função barreira (PYNE, *et al.*, 2015; BERMON *et al.*, 2015), porém, nenhum dos trabalhos realizados até o momento demonstra tal ocorrência por meio de mecanismo biológico.

De acordo com Cario, Gerken e Podolsky (2007) e Wells *et al.* (2011) isso ocorre a partir da ativação dos (RRP) do Tipo *Toll Like-2* (TLR-2) presente na superfície das células epiteliais intestinais e que, a partir de sua ativação, via MyD88 (do inglês “*Myeloid differentiation primary response 88*”), é ativada a via de sinalização do fator de transcrição NF-kB e, conseqüentemente, aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios (TNF- α ; IFN- γ , IL-6). A ativação destes mediadores inflamatórios pode causar adaptações positivas na barreira intestinal uma vez que, de maneira controlada, o estímulo inflamatório seria benéfico para preservar a integridade do epitélio intestinal, por estimular a expressão de proteínas da junção de oclusão (LEITE *et al.*, 2019).

1.3. Sistema Imunológico e Exercício

O sistema imunológico é didaticamente dividido em imunidade inata e adaptativa, em que a atividade de ambas está ligada, funcionando de maneira conjunta e simultânea no combate a invasores. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos, apresenta resposta não específica e participa dos processos de reparação e remodelação tecidual (WALSH, *et al.*, 2011; ABBAS, LICHTMAN; PILAI, 2015).

O sistema imunológico (SI) inato inclui neutrófilos, células dendríticas, monócitos e células *natural killer*. Os neutrófilos agem como a primeira linha de defesa contra infecções bacterianas, as células dendríticas atuam na iniciação da resposta imunológica e na apresentação de antígenos aos macrófagos, os monócitos se diferenciam em macrófagos nos tecidos e apresentam função fagocítica, reguladora e de apresentação de antígenos para a imunidade adaptativa e as células *natural killer* atuam nas infecções virais e no combate a células cancerígenas. Interferons e peptídeos antimicrobianos (ex: defensinas) também pertencem a esse sistema. A imunidade inata reconhece classes de patógenos desencadeando padrão de resposta não específico, diferente da imunidade adaptativa (WALSH *et al.*, 2011; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015).

Já foi demonstrado que logo após a realização de uma maratona ocorre a depressão da função imunológica inata (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer*) e adaptativa (células apresentadoras de antígeno, células T, linfócitos, imunoglobulinas), criando um período chamado de “janela aberta”. A Hipótese da Janela aberta ou Janela de Oportunidade escrita por Nieman (2007) aponta que o estresse fisiológico imposto pelo exercício de longa duração leva a depressão da atividade das células do sistema imunológico, sendo os principais responsáveis por tais alterações o estresse fisiológico imposto pelo exercício, como aumento dos hormônios adrenalina, noradrenalina durante a realização do exercício, e o hormônio cortisol, sendo o principal responsável durante o período de recuperação. Esse período pode durar de 3 a 72 horas, dependendo de qual tipo celular nos referimos e ao aporte nutricional dado durante e após a realização do exercício.

Esse período de janela aberta facilita a entrada de vírus, bactérias e outros agentes agressores para o interior do organismo, aumentando o risco para o desenvolvimento de infecções (NIEMAN, 2007; BISHOP; GLEESON, 2009; WALSH *et al.*, 2011).

A atividade das células imunológicas é bioenergéticamente custosa, para que ocorra a proliferação e atividades destas células, a demanda de substrato energético é alta. Isso faz com que o estado nutricional, o volume de exercício e as alterações hormonais afetem diretamente a atividade das células (STRAUB *et al.*, 2010). Batatinha *et al.* (2019) sugerem que, durante o exercício aeróbico de longa duração – no qual há uma alta demanda de substrato energético para o sistema cardíaco e para a musculatura estriada esquelética devido ao processo de contração muscular –, as concentrações circulantes destes substratos (glicose e aminoácidos) ficam diminuídas, com isso, a oferta de substrato para as células do sistema imunológico fica muito baixa, comprometendo a funcionalidade destas células e corroborando para o estado imunodepressão evidenciado após a realização deste tipo de atividade.

Confrontando o modelo clássico representado pela teoria da Janela Aberta de Nieman *et al.* (2006), um trabalho de revisão recente publicado por Campbell e Turner (2018), sugere que não seria correto afirmarmos que ocorre uma imunodepressão após a realização do exercício prolongado, mas sim alterações em relação a quantidade de IgA salivar e a quantidade e funcionalidade dos linfócitos. Os autores sugerem que este período de “janela aberta” ocorre em relação à atividade dos linfócitos devido a um aumento do estado de vigilância e regulação da atividade imunológica pós exercício, e que esta linfopenia observada pode refletir uma redistribuição das células imunológicas para os tecidos periféricos (ex: intestino, pulmões) por conta desse estado aumentado de “vigilância” do sistema em locais nos quais há uma facilitação para entrada de agentes invasores.

De acordo com os estudos, os atletas estão mais susceptíveis a esse declínio na função imunológica, principalmente durante períodos intensos de treinamento realizados no inverno, competições em condições extremas (ex: altitude, temperaturas elevadas ou muito baixas), após viagens longas, quando os atletas apresentam estresse psicológico elevado ou distúrbios de sono (WALSH *et al.*, 2011; EDWARDS, *et al.* 2018; WALSH, 2018).

Neste contexto, podemos perceber que atletas amadores parecem estar mais susceptíveis ao aparecimento desses sintomas de infecções, uma vez que estão mais expostos a alguns dos fatores que podem favorecer o declínio atividade imunológica pós-esforço e consequentemente expondo o organismo ao risco de infecções (WALSH; OLIVER, 2016; EDWARDS *et al.*, 2018).

Malm (2006) sugere um modelo de “curva em S”, ou seja, numa divisão entre indivíduos sedentários, fisicamente ativos, atletas altamente treinados e atletas de elite, os atletas altamente treinados teriam um aumento da susceptibilidade para o acometimento de infecções, enquanto os atletas de elite apresentariam um “estado de arte psicológica”, no qual, mesmo em condições de estresse psicológico e físico elevado, o sistema imunológico desses indivíduos é mais resistente ao acometimento por infecções.

Embora uma das características em relação às células do sistema imunológico no exercício agudo de *endurance* seja a ocorrência de leucocitose e, dentre estas a neutrofilia seja uma das mais evidentes, ocorre o comprometimento da função dos neutrófilos durante e após a realização do exercício (VYVER *et al.*, 2015). De acordo com Ferrer *et al.* (2009), a supressão transitória da atividade imunológica que ocorre após o exercício está associada ao comprometimento da função dos neutrófilos e linfócitos.

Um estudo realizado por Chinda *et al.* (2003) demonstrou que ocorre a diminuição da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e da função fagocítica dos neutrófilos após uma corrida de maratona. Corroborando com tais achados, Santos *et al.* (2013) apontam que ocorre diminuição da capacidade fagocítica dos neutrófilos após corrida de maratona.

Os neutrófilos desempenham papel importante no início da resposta inflamatória contra microrganismos invasores, fagocitando e destruindo-os a partir da liberação de espécies reativas de oxigênio, porém, dependendo da magnitude da produção destas EROs pelos neutrófilos, pode ocorrer a apoptose e morte do tecido (CHINDA *et al.*, 2003; LUO; LOISON, 2008).

Em relação à mucosa intestinal, os neutrófilos exercem papel sobre a resolução da inflamação e do retorno ao estado homeostático. De maneira geral, a ocorrência de uma inflamação leva a uma alteração do metabolismo local, ocorrendo o aumento da presença e do consumo de oxigênio. Em estado de homeostase, o ambiente intestinal se mantém em

situação de hipóxia, deste modo, numa situação de inflamação, os neutrófilos agem a partir de modificações na disponibilidade de oxigênio no microambiente da inflamação, induzindo Fatores Indutores de Hipóxia (FIH) para que o microambiente retorne a seu estado normal de hipóxia (HALL; CAMPBELL; COLGAN, 2017). A expressão de múltiplos genes alvo dos FIH promove a ativação da resolução da inflamação na mucosa a partir da melhora da função barreira (junções de oclusão), mucinas e aumento da produção de substâncias antimicrobianas (HALL; CAMPBELL; COLGAN, 2017).

A resposta imunológica pode ser diretamente influenciada pelo perfil microbiano das mucosas. O tecido linfoide associado ao intestino (GALT do inglês “*gut associated lymphoid tissue*”) possui cerca de 70% das células imunológicas do organismo, as quais são fundamentais na formação da barreira intestinal a fim de barrar a translocação de agentes patogênicos. No entanto, essa defesa se faz também através da interação com bactérias comensais e simbióticas presentes na mucosa intestinal, as quais estimulam a maturação e atividade das células imunológicas, produção de anticorpos por plasmócitos e outras substâncias, contribuindo para a homeostase dinâmica do ambiente intestinal (BERMON et.al., 2015; THAISS *et al.*, 2014).

A comunidade microbiana intestinal (microbiota), que reside no lúmen e na mucosa intestinal, é apontada por estar envolvida em vários processos que ocorrem no organismo humano, promovendo benefícios ao hospedeiro de várias formas, incluindo: digestão de nutrientes, produção de metabólitos benéficos à saúde, proteção contra patógenos e regulação da atividade imunológica (LEY; PETERSON; GORDON, 2006; BACKHED *et al.*, 2005; HILL; ARTIS., 2010).

As bactérias intestinais interagem com as células do sistema imunológico a partir da captação das bactérias no lúmen intestinal pelas células dendríticas ou pela passagem para lâmina própria via células M e, assim, estimulam a produção de substâncias antimicrobianas (ex: defensinas), produção de muco, aumento do número de proteínas que compõe as junções de oclusão e outros peptídeos. Esses microrganismos podem estimular a atividade regulatória, anti-inflamatória, ou desencadear uma resposta inflamatória, sendo isso dependente da espécie de bactéria (WU; WU, 2012).

Espécies de bactérias como *Clostridium* dos grupos IV e XIV e *Bacteroides fragilis*, induzem resposta anti-inflamatória via ativação de células T Helper CD4 (ROUND;

MAZMANIAN *et al.*, 2010; ATARASHI *et al.*, 2011). As espécies *Bacteroides fragilis* e *Clostridium spp.* dos grupos IV e XIV induzem resposta anti-inflamatória através da ativação de células T reguladoras e o aumento da expressão de interleucina 10 (IL-10). Em quadros de disbiose, como visto na síndrome metabólica, ocorre o desbalanço na razão entre os principais filos *Firmicutes/Bacteroides*, há aumento da inflamação local caracterizado pela elevação da produção de IL-1 e IFN- γ . Bactérias segmentadas filamentosas também estimulam a resposta inflamatória via ativação de linfócitos T *helper* 17 (ROUND; MAZMANIAN, *et al.*, 2010; ATARASHI *et al.*, 2011; HOOPER, LITTMAN; MACPHERSON, 2012).

Sabe-se que a prática regular do exercício físico é capaz de alterar a microbiota intestinal, os trabalhos demonstram que o treinamento físico aumenta a produção de ácidos graxos de cadeia curta, aumentam a diversidade da microbiota (BARTON *et al.*, 2018), abundância de bactérias *health promoting bactérias* (ALLEN *et al.*, 2017; CLARKE *et al.*, 2014; ESTAKI *et al.*, 2016). Especificamente em relação à microbiota de atletas de *endurance*, os trabalhos sugerem que há um aumento da colonização por gênero de bactéria *Vellonella*, a qual parece ter influência indireta sobre o desempenho físico, uma vez que esses microrganismos são capazes de utilizar lactato sistêmico como substrato para produção de propionato, sendo este utilizado como um intermediário das vias aeróbias de produção de energia (Succinil-CoA) (SCHEIMAN *et al.*, 2019).

Petersen *et al.*, (2017) realizaram um estudo com ciclistas profissionais e amadores, verificando não haver diferenças em relação a diversidade da microbiota ou predominância de gêneros entre as duas categorias. Porém, os autores encontraram uma correlação positiva entre o volume de treino e a abundância do gênero de bactérias *Prevotella*. Atletas que completavam entre 16 - 20 horas de treino por semana apresentavam predominância do gênero *Prevotella*, como a análise realizada pelo trabalho foi de metagenômica (shotGun), e não somente o sequenciamento da microbiota, os autores também identificaram uma espécie que faz parte do reino *arquea* (*M. smithii* - produtor de gás metano) que estava presente somente nos atletas de elite. De acordo com o trabalho, esse microrganismo quando “*up-regulated*” tem relação positiva com o metabolismo de metano, carboidratos (metabolismo do piruvato, fosforilação oxidativa, ciclo do citrato), produção de

butirato e propionato, o que pode impactar de maneira positiva na eficiência das vias aeróbias de produção de energia.

Embora já tenhamos algumas evidências em relação às possíveis alterações no perfil da microbiota praticantes de *endurance*, não sabemos se a presença dos sintomas intestinais podem ter relação com o perfil da microbiota. Além disso, embora existam estudos com resultados positivos em relação aos sintomas de infecções e sintomas gastrintestinais com a utilização dos elementos probióticos, existem divergências nos resultados devido às diferentes espécies, dosagem e período de utilização dos probióticos. Até o momento não temos evidências em relação aos mecanismos envolvidos com atuação dos probióticos nessa possível diminuição dos sintomas de infecção do trato respiratório superior.

Em relação à microbiota intestinal, apesar de trabalhos demonstrem alterações na microbiota de atletas, após a realização de uma corrida de maratona, não sabemos se utilização de probióticos é capaz de induzir alterações na composição da microbiota de atletas. Além disso, grande parte dos estudos realizados com sintomas intestinais, permeabilidade intestinal, endotoxemia e a utilização de probióticos foram realizados em ambiente de laboratório, o que se distâcia da real situação vivenciada pelo atleta no momento da competição.

OBJETIVOS

3.1. Geral

Verificar se a suplementação de probióticos altera os parâmetros imunológicos da resposta imunológica inata e de permeabilidade intestinal após uma maratona

1.4. Específicos

Verificar a influência da suplementação sobre a função de neutrófilos, permeabilidade intestinal, endotoxemia

HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a suplementação utilizada poderá atuar fortalecendo a barreira intestinal e, assim, reduzindo a permeabilidade intestinal e hiperendotoxemia, resultando em efeito positivo sobre a função de neutrófilos.

MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostra

Foram selecionados 30 sujeitos (a partir de cálculo amostral realizado com auxílio do software MINITAB®) do sexo masculino com idade entre 20 e 45 anos, praticantes de corrida de maratona há pelo menos 2 anos, que treinassem no mínimo 4x na semana, e que participassem de competições a nível nacional. Para participação no estudo os sujeitos deveriam ser considerados saudáveis (ausência de doenças) e passar por avaliação clínica e exame médico complementar (eletrocardiograma de repouso e teste ergométrico). Foram excluídos do estudo sujeitos portadores de doenças crônicas degenerativas (diabetes; dislipidemia; doença inflamatória intestinal; doenças auto imunológicas), portadores de distúrbios psicológicos ou tratamento psiquiátrico, anêmicos, ou que utilizam/utilizaram antifúngico, corticoides e/ou antibióticos nos últimos 6 meses, anti-inflamatórios nos últimos 15 dias ou se fizessem uso de anabolizantes. Os participantes foram orientados a continuarem a utilizar seus suplementos habituais (Carboidratos, complementos vitamínicos, proteínas), os quais foram registrados, não sendo aceita a utilização dos demais tipos de suplementos alimentares.

5.1.1 Procedimentos Éticos

A participação no estudo ocorreu após explicação e detalhamento dos objetivos e procedimentos metodológicos, e para o cumprimento das diretrizes de ética em pesquisa com seres humanos, estabelecidas pela resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012), os sujeitos interessados em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) na primeira visita ao laboratório. Foi garantindo sigilo de todas as informações fornecidas e resultados obtidos, sendo concedido para estes os resultados de seus exames. O material coletado foi utilizado exclusivamente na pesquisa proposta, e os resultados obtidos serão divulgados em publicações científicas, sejam eles favoráveis ou não, sem mencionar nenhum dado pessoal dos sujeitos participantes da pesquisa. O presente trabalho encontra-se atualmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (nº 1.834.894).

1.5. Desenho Experimental

Após assinatura do TCLE, os voluntários preencheram os questionários (descrição no item 4.6). Em seguida, foram realizadas as avaliações relacionadas à caracterização da amostra em relação ao perfil de composição corporal, consumo de oxigênio (item 5.4) e a primeira coleta de sangue e fezes (denominado momento Basal).

Após tais procedimentos os voluntários foram randomizados de forma aleatória (com auxílio do programa MINITAB® por um pesquisador alheio ao estudo), num formato duplo cego em 2 grupos: Placebo (n=12) e Suplementação (n=13) (item 5.7). Nesta primeira vinda, também foi entregue o suplemento e foram passadas as instruções em relação ao uso do suplemento bem como o esclarecimento de eventuais dúvidas.

O suplemento foi utilizado pelos sujeitos durante período de 30 dias, sendo feito contato semanal de forma individual com todos os voluntários. Após o período de

suplementação os grupos foram submetidos a uma nova coleta de sangue e fezes e os voluntários preencheram novamente os questionários (denominado momento pós suplementação).

O período de suplementação foi realizado num período precedente a uma competição específica (Maratona Internacional de São Paulo ou City Marathon® nos anos de 2017 e 2018) então, após o período de suplementação e a realização da coleta pós suplementação, os voluntários participaram de uma prova de Maratona (42,195 km) realizada na cidade de São Paulo. Uma hora após o término da prova foi realizada uma nova coleta (denominado momento prova). Neste momento foram entregues coletores de fezes para que as próximas 3 fezes após a prova fossem coletadas e armazenadas (denominado momento pós prova 1, 2 e 3 respectivamente).

Após cinco dias da realização da prova foi realizada uma nova coleta de sangue e saliva (denominado momento recuperação). A figura 2 ilustra o desenho experimental do estudo.

Desenho experimental

Figura 2 - Desenho experimental – Legenda: A figura ilustra o desenho experimental do estudo com a descrição dos momentos os quais as coletas foram realizadas, e quais parâmetros serão analisados em cada um dos momentos.

1.6. Caracterização da amostra

5.3.1 Composição Corporal

Antropometria

A estatura foi medida com antropômetro de prancha, de acordo com o Programa Biológico Internacional (Tanner *et al.*, 1969).

Plestimografia (BOD POD®)

A medida da composição corporal foi realizada por meio da pletismografia, de corpo inteiro (*air displacement plethysmography*, BOD POD® *body composition system*; Life Measurement Instruments, Concord, CA, USA). (FIELDS; GORAN, 2000; FIELDS; HIGGINS; HUNTER, 2000). Antes das avaliações o aparelho foi calibrado utilizando um cilindro com volume conhecido (50.173 litros) seguindo as orientações do manual. A balança, utilizada para obter o peso corporal, é acoplada ao aparelho e também foi calibrada antes de cada teste utilizando-se um referencial conhecido de 20kg. Após esta calibração, os voluntários foram avaliados usando sunga e touca de natação e não foi permitido o uso de óculos ou objetos metálicos como brincos, anéis, correntes, piercing, e outros adereços. O voluntário fez esse teste em jejum de água e comida de pelo menos 3 horas.

O processo de avaliação segue as instruções do manual. Primeiramente, os dados pessoais do voluntário foram incluídos no *software* do equipamento. Em seguida, é realizado uma pré-calibração exigida pelo equipamento e, logo após, o avaliado foi pesado na própria balança do aparelho que possui sensibilidade de três casas decimais. Em seguida, o voluntário foi orientado a entrar no aparelho, ficar sentado sem se movimentar durante teste e respirando normalmente. Cada mensuração total leva em média dez minutos. O método de avaliação da composição corporal baseia-se nos dados inseridos no

software e no volume ocupado pelo voluntário, observando-se o princípio de Boyle. Assim, foram medidas as variações entre a pressão e o volume para se determinar a densidade corporal do sujeito. A partir desses dados, a composição corporal foi mensurada baseada na equação de Siri (1961).

1.7. Suplementação

O grupo placebo fez a utilização de sachês 5 gramas de maltodextrina incolor e sem sabor com forma, cor, cheiro e quantidade idêntica ao grupo suplementado, por um período de 30 dias ininterruptos.

O grupo suplementação fez a utilização de sachês contendo uma combinação de 2 espécies específicas de bactérias 1×10^{10} UFC, composto por *Lactobacillus acidophilus* 10×10^9 UFC e *Bifidobacterium lactis* 1×10^{10} pelo mesmo período de tempo do grupo placebo. O modelo de suplementação utilizado foi duplo cego.

Ambos os grupos foram orientados a realizarem a ingestão de 1 sachê diluído em 50 ml de água 1 vez ao dia (preferencialmente a noite momentos antes de irem dormir ou em jejum ao acordar pela manhã), objetivando a efetividade da suplementação utilizada pela facilitação do contato com a mucosa do trato gastrointestinal.

Durante o período de suplementação os voluntários foram contactados pelo pesquisador principal a cada dois dias para verificação de possíveis sintomas/efeitos adversos e a utilização diário da suplementação. Após o término do período de suplementação foi testada a vedação do estudo, perguntado aos voluntários se eles sabiam o que estavam tomando.

1.8. Questionários

Questionário de Consumo e Frequência alimentar - A fim de avaliar o consumo energético e de macronutrientes (carboidratos, proteína e lipídeos) foram aplicados o questionário de frequência alimentar ELSA-BRAZIL (MOLINA *et al.*, 2013) e o diário alimentar de três dias. O Questionário de Frequência Alimentar – Foi aplicado no momento basal, a fim de mensurar os hábitos alimentares dos voluntários nos últimos 12 meses. O Diário alimentar foi administrado após a entrevista inicial, e ao final do período de suplementação, na semana que precede a prova. Estes questionários foram aplicados por uma nutricionista treinada e capacitada.

Questionário de Infecções do Trato Respiratório Superior (QITRS) – O monitoramento dos sintomas de infecções do trato respiratório superior foi realizado a partir do questionário Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey – 21 (WURSS – 21), proposto por Barret *et al.* (2002;2005) traduzido por Moreira e Cavazzoni (2009). O questionário contém 21 questões do tipo *survey*, que buscam avaliar informações relacionadas à saúde, que são negativamente afetadas por sintomas de resfriados comuns. Todos os itens são baseados em uma escala do tipo Likert de 0 a 7 pontos.

Sintomas Gastrointestinais – Utilizamos uma lista contendo os sinais e sintomas apresentados por atletas e descritos em estudos anteriores (JEUKENDRUP *et al.*, 2000; PUGH *et al.*, 2018a). Esta lista foi aplicada nos momentos Basal, pós - suplementação e pós prova.

Recordatório de treinos - O Volume de treino dos voluntários serão expressos a partir da média das distâncias percorridas utilizando o logaritmo descrito por (Damasceno *et al.*, 2014). As medidas foram coletadas por meio de um registro de treino preenchido durante todo o período de suplementação.

1.9. Coletas Sanguíneas

Para medida dos parâmetros bioquímicos foi coletado nos diferentes momentos 20 mL de sangue, por um profissional de saúde capacitado, sendo estipulado período de jejum prévio de 4 horas. O sangue coletado foi centrifugado a 4000g, durante 15 minutos a 4 °C sendo a seguir armazenado em micro tubos plásticos e estocado em *freezer* à -80 °C para posterior análise.

1.10. Dosagens e Análises

Interleucinas Séricas (TNF- α /IL-8/ IL-6/ IL-4/ IL-2/ IL1- β / IL-15/ IL-10/ IFN- γ) Foram analisadas com uso de um equipamento Milipor/ Multiplex Thermo Fischer® Lhc 0009. O princípio da técnica se baseia na tecnologia Luminex®, capaz de executar uma variedade de bioensaios, incluindo imunoensaios sobre a superfície de esferas magnéticas codificadas por fluorescência, as microesferas Magplex-C. Luminex® usa técnicas próprias para codificar por coloração as microesferas com dois corantes fluorescentes. Através de precisas concentrações desses corantes, 100 conjuntos distintos de esferas coradas podem ser criados, cada um dos quais revestidos com um anticorpo de captura específico. O analito da amostra teste é capturado pela microesfera revestida pelo anticorpo de captura, e então se introduz um anticorpo de detecção biotinilado. A mistura da reação é incubada com Estreptavidina-Ficoeritrina (Streptavidin – Phycoerythrin), para completar a reação na superfície de cada microesfera. As microesferas são passadas rapidamente através de um laser, que excita os corantes internos que marcam o conjunto de microesferas. Um segundo *laser* excita a ficoeritrina, o corante fluorescente. Por fim, processadores de sinais digitais de alta velocidade identificam cada microesfera e quantificam o resultado do bioensaio, baseado em sinais fluorescentes.

1.10.1. Células Imunológicas

Função de Neutrófilos

Isolamento de Células

A separação das células ocorreu a partir de 5ml de sangue total. Ao sangue coletado foi acrescido 3ml de *Histopack 1077* e 3ml de *Histopaque 1119* que permitiu a sedimentação dos eritrócitos após 30 minutos de centrifugação, com velocidade de 400 g em uma centrífuga sem freio à temperatura ambiente. Assim, formou-se uma nuvem que corresponde a uma parte dos leucócitos e abaixo aos neutrófilos, as quais foram transferidas separadamente para tubos cônicos estéreis e diluídas em tampão fosfato-salino PBS. Para formação do precipitado, os tubos foram centrifugados novamente com velocidade de 400 g em uma centrífuga sem freio à 4°C por 10 minutos. Após, os neutrófilos foram ressuspensos em 1ml de meio de cultura RPMI-1640 enriquecido (preparado com soro do próprio indivíduo) em uma placa de cultura de seis poços, adicionou-se 2 ml de meio de cultura RPMI- 1640 enriquecido e 500 µl de suspensão celular de em dois poços e 1,5 ml de meio de cultura RPMI- 1640 enriquecido e 500 µl de suspensão celular de neutrófilos em um poço e no outro que seria estimulado 1,3ml do meio e 500ul de suspensão **celular** de neutrófilos e incubou-se, por 1 hora, em estufa a 37°C.

Produção de citocinas

Para determinação da produção de citocinas por neutrófilos (1×10^5 células) estes foram incubados em placas de cultura de célula contendo meio RPMI 1640 enriquecido com 2 mM glutamina, 10% soro homólogo e 5 µg/mL LPS por 24 horas, em estufa a 37°C.

A produção de citocinas será avaliada pelo ensaio Multiplex com kits da Millipore. Darmstadt, Alemanha.

Produção de Peróxido de Hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi medida utilizando-se o método descrito por PICK; MIZEL (1981) modificado. As incubações foram realizadas em frascos de vidro previamente siliconizados (silicone a 1% em acetona, v/v) e posteriormente lavados com água destilada. Os neutrófilos foram incubados a 37 °C com agitação, para volume final igual a 1×10^6 células em 1ml de meio de incubação. O meio de incubação foi composto (para volume final): PBS com cálcio, BSA 2% (v/v), glicose 5Mm, glutamina 2 mM, fenol vermelho 0,56 Mm, 10 µl PMA (100 µg/ml PBS) e 100 µl Peroxidase (1mg/2ml PBS). A formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi interrompida após 1 hora de incubação com a adição de 20 µl de NaOH 1N e após 15 minutos o total produzido foi quantificado em espectrofotômetro a 620nm.

Fagocitose

Para a avaliação da capacidade fagocitária, foi utilizado Kit de Ensaio *The Vybrant® Phagocytosis Assay Kit – Molecular Probe's – ThermoFisher – USA*. Utilizado para observar e quantificar o processo de fagocitose em células polinucleares humanas e de camundongos seguindo a internalização de células de E. coli (cepa K-12) mortas que foram marcadas com o corante fluorescente. Além do componente de E. coli BioParticles liofilizado, o kit contém uma solução de trypan blue (para extinguir a fluorescência de partículas que não foram internalizadas). Foram respeitadas as instruções contidas no kit, bem como o passo a passo para realização da leitura no leitor de microplaca de fluorescência.

1.10.2. Endotoxemia

As concentrações de LPS circulante foi analisada no plasma sanguíneo utilizando o teste Lisado de Amebócitos Limulus (LAL), o qual é um teste quantitativo para a endotoxina bacteriana Gram-negativa (Cambrex, Charles City, Iowa, EUA).

1.11. Coleta de Fezes

Para as coletas de fezes foi considerada a primeira defecação realizada após cada momento. Os voluntários receberam as seguintes instruções: 1-) defecar em um plástico fora do vaso sanitário e colocar uma parte dentro do coletor utilizando a colher que foi entregue junto ao coletor de fezes; 2-) Tampar o coletor, colocá-lo dentro de um isopor; 3-) Manter o material em freezer até o momento de entrega no laboratório; 4-) Entregar ao pesquisador responsável.

O tempo máximo estipulado para que as amostras de fezes fossem entregues no laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicado à Atividade Motora da USP foi de 24 horas (PERIS-BONDIA *et al.*, 2011). Após entrega, o material foi identificado, alicotado e armazenado à -80°C para posterior análise. Todo o material para coleta e transporte do material foi fornecido ao voluntário pelo Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicado a Atividade Motora/ EEFE-USP.

1.11.1. Composição da Microbiota Intestinal

Extração do DNA total microbiano

A análise da composição da MI foi realizada a partir de 48 amostras de fezes dos voluntários nos momentos pré e pós-intervenção para ambos os grupos

Primeiramente, o DNA total de cada amostra foi extraído utilizando o mini kit de DNA QIAamp para fezes (Qiagen, Valencia, CA) (WU *et al.*, 2010). Para a extração de DNA foram utilizados entre 190 a 200mg de fezes de cada voluntário, a qual foi pesada ainda no estado congelado. Os passos da extração seguiram as recomendações do fabricante. Após extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop – ND 2000). As alíquotas contendo o DNA total extraído foram transportadas em isopor contendo gelo seco seguindo estritamente as recomendações do laboratório responsável pelo sequenciamento (BPI tecnologia, Botucatu, SP). Ao chegar no laboratório BPI, o DNA total extraído passou por análise de qualidade através de gel de agarose 2% corado com Gel Red (Uniscience), visualizado sob luz ultravioleta.

Sequenciamento 16S rRNA

Após a extração do DNA total microbiano, foi realizado o sequenciamento do RNA ribossomal 16S (16S rRNA), o qual é um marcador filogenético que faz parte da subunidade 30S dos ribossomos procarióticos e é composto por 9 regiões (V). O 16S está presente na grande maioria das bactérias, com baixa taxa de evolução ao longo do tempo e apresenta tamanho suficiente para análises de bioinformática (JANDA; ABBOTT, 2007). Para tal fim, optou-se pelo método de sequenciamento de DNA de nova geração (NGS) em larga escala utilizando a plataforma MiSeq Illumina (Illumina, San Diego, CA). Todos os

As leituras indexadas foram submetidas às etapas de purificação utilizando *bead* magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção de fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de primers. Posteriormente, foi realizada a quantificação pelo método de qPCR em tempo real utilizando termociclador QuantStudio 3 Real Time (Applied Biosystems, Foster City, CA) e Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal), todos de acordo com protocolo do fabricante. Gerou-se um pool equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras a 2nM, para realização do sequenciamento, o qual foi conduzido utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing). As amostras foram sequenciadas a partir de ambas as extremidades das moléculas (*paired-ends*) para um comprimento total de leitura de 300 pares de bases (pb), sendo 150pb de cada extremidade (2 x 150bp).

Bioinformática

A cobertura de sequenciamento foi em torno de 173.096 leituras por amostra. Um total de 4.044.921 de sequências originais no formato *fastq* foram obtidas após o sequenciamento 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq. Estas, por sua vez, foram processadas utilizando o *software* QIIME (do inglês – “Quantitative Insights Into Microbial Ecology”) *pipeline* 2 versão 2018.11. O fluxo de trabalho e passos optados para o tratamento destas sequências foram descritas por Caporaso *et al* (2010) e estiveram de acordo com as ferramentas e recomendações do QIIME2 detalhadas em seu site (<https://docs.qiime2.org>).

Em resumo, o comando *vsearch* foi utilizado para juntar as leituras de cada extremidade (2x150bp), considerando no mínimo de 6 pares de bases (pb) de sobreposição. Em seguida, passaram por filtro de qualidade (>33) e, com o método *Deblur*, foram identificadas as sequências representativas de cada unidade taxonômica operacional (OTUs) (AMIR *et al.*, 2017). Estes passos contribuem para redução de erros e sequências duplicadas provindas do sequenciamento, oferecendo leituras com maior qualidade.

O próximo passo gerou uma árvore filogenética, a qual foi utilizada para posteriores análises taxonômicas e de α - e β -diversidade. Estas diversidades, por sua vez, foram realizadas através do *script qiime diversity core-metrics-phylogenetic*, com o objetivo de gerar os resultados sumarizados de taxonomia, curvas de rarefação, medidas de riqueza de OTUs, tais como índice de Shannon e enriquecimento observado (*observed OTUs*) que, respectivamente, são medidas de forma quantitativa e qualitativa fazendo referencia a variedade e abundância de espécies de uma comunidade (α -diversidade), além de matrizes de distância da β -diversidade quanti (*Bray-Curtis* e *UniFrac weighted*) e qualitativas (*Jaccard* e *UniFrac unweighted*) para construção das análises de coordenadas principais (PCoA). As matrizes de distância UniFrac avaliam a complexidade da MI levando em consideração as relações filogenéticas e abundância relativa dos microrganismos presentes em cada amostra. Também analisou-se a homogeneidade das amostras através do *Pielou evenness*, medida que mostra o quão uniforme está a proporção de OTUs em cada amostra. Todos os artefatos e gráficos gerados por esses procedimentos foram visualizados pela ferramenta QIIME2 *view*.

Em seguida, as sequências foram agrupadas e assinaladas à suas respectivas OTUs, respeitando 97% de similaridade (BOKULICH *et al.*, 2018). Para isto, foram utilizados como limites de corte os valores de 75% para nível taxonômico de filo, 85% para classe, 95% para gênero e 97% para espécie (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Posteriormente, utilizando o comando *taxonomy classifiers*, estas sequências foram contrastadas contra o banco de dados Greengenes região V4 versão 2013/08, considerando o limiar de confiança mínimo de 80% (MCDONALD *et al.*, 2012). O arquivo BIOM gerado foi convertido para gerar a tabela com o consenso taxonômico até o nível de espécies e, a partir desta, foram realizados os procedimentos estatísticos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi verificada a curva de resíduos dos dados para verificação em relação a distribuição dos dados. Após tal procedimento para as medidas realizadas uma única vez para ambos os grupos foi utilizado Teste-T de *Student* para amostras independentes. Para os parâmetro os quase as medidas foram realizadas por vezes consecutivas foi utilizado o Modelo Misto (com 'grupo' e 'tempo' como fatores) sendo utilizado com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$). Para verificação em relação a percentis, foi utilizado o teste de Q quadrado. O tratamento estatístico dos dados foi realizado com auxílio do programa SPSS, versão 25 e GraphPad Prim8 ®.

6.1. Dados Microbiota

Com relação à MI, as diversidades alfa e beta e as diferenças de abundância de OTUs foram realizadas a partir de comandos e *scripts* no *software* QIIME2 e visualizadas pelo site do QIIME (<https://view.qiime2.org/>). O índice de diversidade de Shannon e o enriquecimento observado foram utilizados para avaliar a riqueza de comunidades nos grupos e momentos testados. A β -diversidade foi computada considerando a amostragem de 173.096 sequências por amostra, a qual foi baseada na saturação atingida na curva de rarefação (Figura 5). A partir disto, os algoritmos de matrizes de similaridades de *Bray Curtis*, *Jaccard*, *UniFrac weighted* e *unweighted* foram utilizados para gerar as estruturas do PCoA (Figura 4), as quais foram visualizadas usando o EMPEROR (VAZQUEZ-BAEZA *et al.*, 2013) e analisadas estatisticamente através do teste PERMANOVA (do inglês – “Permutational Multivariate Analysis of Variance”) com 999 permutações aleatórias no QIIME2. Com relação aos dados de taxonomia, todas as análises foram realizadas com o QIIME2 a partir da tabela de OTUS após a rarefação.

Para avaliar o efeito da suplementação de probióticos sobre a abundância de OTUs em seus níveis taxonômicos, especialmente, filo, família, gênero e espécies, avaliando a razão

das chances de cada taxon ocorrer entre os diferentes tratamentos e para os diferentes momentos foi utilizado o modelo de regressão logística por meio do software SAS 9.4.

RESULTADOS

7.1. Caracterização da Amostra

Durante a realização do estudo, 1 participante do grupo probiótico declinou de sua participação no estudo, pois sentiu aumento dos sintomas GI após o uso da suplementação, no dia da prova 1 participante do grupo placebo não realizou a maratona por problemas pessoais e 1 participante do grupo placebo desistiu da prova nos 27 km. Assim finalizaram todas as etapas referentes ao estudo 27 sujeitos (Probiótico n=14; Placebo n=13).

Na TABELA 1 são apresentados os dados descritivos da amostra para os diferentes grupos, para as variáveis, idade ($p=0,09$), altura ($p=0,78$), Massa corporal total ($p=0,11$), não foram encontradas diferenças entre os grupos. Para as variáveis massa gorda ($p=0,01$), massa livre de gordura ($p=0,005$) e densidade corporal ($p=0,02$) foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

TABELA 1- DADOS DESCRITIVOS DA AMOSTRA

Descrição	Placebo (n=12)	Probiótico (n=13)	P
Idade (anos)	40,46 $\pm$ 7,79	35,96 $\pm$ 5,81	0,09
Altura (metros)	1,75 $\pm$ 0,08	1,75 $\pm$ 0,06	0,78
MCT (kg)	74,12 $\pm$ 10,20	77,36 $\pm$ 10,99	0,11
MG (%)	14,10 $\pm$ 4,73	20,55 $\pm$ 5,13*	0,01
MLG (%)	85,90 $\pm$ 4,73	79,45 $\pm$ 4,87*	0,005
DC (kg/l)	1,06 $\pm$ 0,01	1,05 $\pm$ 0,01*	0,02

Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão,. *diferente do placebo. Significância $p<0,05$ Legenda: MCT- Massa Corporal Total; MG – Massa Gorda; MLG- Massa Livre de Gordura; DC- Densidade Corporal. *diferente do placebo. Análise Estatística Modelo Misto com post hoc de Tukey, significância $p<0,05$.

Os dados relacionados ao volume de treino realizado durante a competição e o tempo de prova dos atletas são apresentados na TABELA 2. Para o tempo de prova o grupo probiótico apresentou diferença significativa em relação ao grupo placebo ($p=0,04$) apresentando tempo de prova superior. Em relação ao período de treino precedente a prova, para o tempo gasto por semana e os quilômetros percorridos por semana não foram encontradas diferenças entre os grupos, sugerindo assim que o volume de treinamento realizado entre os grupos foi semelhante.

TABELA 2 - RECORDATÓRIO DE TREINOS E TEMPO DE PROVA

		Placebo (n=12)		Probiótico (n=13)		<i>p</i>		
TEMPO DE PROVA (h)		3,45± 0,36		4,27± 0,23*		0,04		
TEMPO DE TREINO (H)								
	Semana 1	P	Semana 2	P	Semana 3	p	Semana 4	p
PLA	4,03±2,24	0,33	4,28±0,52	0,99	3,33±2,08	0,95	4,11±2,08	>0,99
PRO	6,30±3,33		5,31±2,30		4,28±2,38		4,26±2,52	
QUILÔMETROS PERCORRIDO (KM)								
	Semana 1	P	Semana 2	P	Semana 3	p	Semana 4	p
PLA	44,08±27,70	0,92	54,90±28,58	>0,99	74,48±57,25	0,91	77,48 ±85,61	0,75
PRO	69,21±29,97		62,67±25,49		48,28±24,76		44,10±22,15	

Legenda: KM= Quilômetros; H=Horas ; PLA= Grupo Placebo; PRO= Grupo Probiótico. Análise Estatística: Modelo Misto com post hoc de Tukey, significância $p<0,05$.

Os dados referentes às condições climáticas no início das competições e o número de atletas de cada competição são apresentados na TABELA 3. Podemos perceber que em nenhuma das provas tivemos a associação entre temperatura e humidade relativa do ar elevada, o que facilitaria um quadro de desidratação nos atletas

TABELA 3 - DADOS DESCRITIVOS DAS PROVAS

Prova	Temperatura	URA	Número de Participantes
City Marathon 2017 [®]	19°C	77%	7
Maratona Internacional de São Paulo 2018 [®]	15°C	86%	7
City Marathon 2018 [®]	21°C	55%	13

Legenda: URA- Umidade relativa do ar

Os dados relacionados ao consumo alimentar dos atletas no momento basal e após o período de suplementação (pré-prova) estão apresentados na TABELA 4. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ou entre os momentos para o consumo energético total, macronutrientes e fibras. Os dados referentes ao consumo alimentar dos atletas durante a corrida de maratona estão apresentados na TABELA 5, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

TABELA 4 - DADOS REFERENTES AO CONSUMO ALIMENTAR DOS VOLUNTÁRIOS

	BASAL			PRÉ-PROVA		
	Placebo	Probiótico	P	Placebo	Probiótico	p
Energia (kcal)	2514,91 ± 962,95	2948,63±1105,44	0,80	2282,58±577,50	2617,63±974,21	0,83
Cho (g)⁺	342,78 ±162,03	385,23 ± 197,14	0,91	317,32±142,94	342,86±164,30	0,98
Prot (g)⁺	106,90 ±44,46	136,50±97,96	0,45	88,85 ±21,08	128,17±30,70	0,36
Gord total (g)⁺	104 ±48,50	94,60 ± 40,39	0,52	74,64± 38,28	81,49±34,61	0,91
Gord sat (g)	36,81 ±16,69	29,52±22,40	0,37	24,24±19,42	23,71± 10,51	0,86
Gord mono (g)⁺	21,62 ±14,16	19,26±13,80	0,95	11,31±5,34	14,86±6,96	0,90
Gord poli (g)	8,66 ± 6,15	7,82 ± 3,65	0,37	13,17 ±10,67	6,67 ±4,66	0,98
Colest (mg)⁺	474,41±250,86	469,84 ±384,25	0,91	377,64 ± 363,44	491,13 ±397,00	0,99
Fibras (g)	23,65 ± 10,53	25,63± 15,61	0,98	24,92± 19,15	15,61±15,25	0,74

Legenda: CHO= Carboidratos; PROT= proteínas; GORD TOTAL= gordura total; GORD SAT= gordura saturada; GORD MONO= gordura monossaturada; GORD POLI= Gordura poli saturada; COLEST=colesterol.

TABELA 5 - DADOS REFERENTES AO CONSUMO ALIMENTAR DOS VOLUNTÁRIOS DURANTE A MARATONA

	Placebo	Probiótico	<i>p</i>
Energia (kcal)	526,36±317,97	678,20±172,88	0,56
Cho (g)⁺	109,07± 60,74	137,66±112,66	0,41
Prot (g)⁺	4,60± 8,47	9,49±29,55	0,56
Gord total (g)⁺	7,98 ±16,52	11,41±28,33	0,70
Gord sat (g)	0,79±2,57	2,46±8,44	0,49
Gord mono (g)⁺	0,12±0,38	0,94±3,47	0,65
Gord poli (g)	0,23±0,69	0,44±1,54	0,39
Colest (mg)⁺	0	24,98±93,29	0,33
Fibras (g)	1,58±1,76	2,30±4,20	0,59

Legenda: CHO= Carboidratos; PROT= proteínas; GORD TOTAL= gordura total; GORD SAT= gordura saturada; GORD MONO= gordura monossaturada; GORD POLI= Gordura poliinsaturada; COLEST=colesterol

Os dados referentes aos parâmetros hematológicos dos atletas são apresentados na TABELA 6, foram encontradas alterações significativas em relação ao número total de leucócitos, neutrófilos, monócitos e linfócitos. Para a concentração de hemoglobina corpuscular média a partir do teste estatístico realizado (análise multivariada) foi encontrada uma interação entre os fator para o fator tempo ($p<0.01$), porém após a realização do post hoc (Tukey), não foram encontradas diferenças significantes.

Para o número total de leucócitos, ambos os grupos apresentaram um aumento do número total de leucócitos no momento prova quando comparado com os outros momentos, basal (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$), prova (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$), e recuperação (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$). Em relação ao número de neutrófilos, a amostra apresentou comportamento semelhante, ambos os grupos apresentaram um aumento do número total de neutrófilos no momento prova quando comparado com os outros momentos basal (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$), prova(PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$), e recuperação (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$).

Isso também ocorreu em relação aos monócitos ambos os grupos apresentaram um aumento do número total de monócitos no momento prova quando comparado com os outros momentos basal (PL; $p < 0,0001$; PR; $p < 0,0001$), prova (PL; $p < 0,0001$; PR; $p < 0,0001$), e recuperação (PL; $p < 0,0001$; PR; $p < 0,0001$). Em relação aos linfócitos, para o grupo placebo ocorreu redução no momento pós prova quando comparado com o momento prova (PL= $p < 0,001$). Para o grupo probiótico esta redução que ocorreu no momento prova é estatisticamente diferente de todos os outros momentos basal (PRO= $p < 0,001$), prova (PRO= $p < 0,001$) e recuperação (PRO= $p < 0,001$).

TABELA 6 - HEMOGRAMA PARA OS DIFERENTES MOMENTOS

Parâmetro		Basal	Pré-Prova	Pós prova	Recuperação	p
Leucócitos (x10 ³ /ul)	PLA	5,57±0,99	5,43±1,16	13,1±4,34 ^{abc}	5,55±1,01	≤0,001
	PRO	5,83±1,60	5,59±1,68	13,25±4,54 ^{abc}	6,09±1,1	
Neutrófilos (x10 ³ /ul)	PLA	3,18±1,72	3,35±11,94	11,46±13,19 ^{abc}	4,00±3,19	≤0,001
	PRO	3,21±1,70	3,56±2,20	11,92±4,74 ^{abc}	4,11±2,74	
Monócitos (x10 ³ /ul)	PLA	0,57±0,22	0,47±0,09	0,88±0,30 ^{abc}	0,49±0,14	≤0,001
	PRO	0,53±0,16	0,46±0,15	0,90±0,25 ^{abc}	0,54±0,15	
Linfócitos (x10 ³ /ul)	PLA	1,59±0,37	1,79±0,50	1,07±0,66 ^b	1,66±0,49	≤0,001
	PRO	1,78±0,46	1,70±0,38	1,08±0,30 ^{ab}	1,83±0,55 ^c	
Hemácia (x10 ⁶ /ul)	PLA	5,07± 0,22	5,04±0,27	4,95±0,39	5,03±0,29	0,98
	PRO	5,26±0,41	5,22±0,43	5,32±0,52	5,24±0,49	
Hemoglobina (g/dl)	PLA	15,26±0,84	15,06±0,80	14,01±0,98	15,27±0,76	0,79
	PRO	15,48±0,84	14,92±0,63	15,25±1,06	15,07±0,84	
Hematócrito (%)	PLA	45,2±1,96	45,33±2,14	42,5±2,77	45,17±2,02	0,95
	PRO	44,90±2,09	45,08±1,75	45,57±2,66	44,57±2,37	
VCM (fL)	PLA	89,21±3,47	89,87±2,97	85,9±3,07	88,83±2,48	0,87
	PRO	85,73±6,29	87,12±6,77	86,07±6,93	85,55±7,04	
HCM (pg)	PLA	30,10±1,14	29,86±1,22	28,5±1,27	30,01±0,86	0,78
	PRO	28,98±2,46	28,84±2,55	28,82±2,49	28,96±2,58	
CHC (g/dl)	PLA	33,76±0,81	33,23±0,92	33,2±0,82	33,81±0,79	0,01
	PRO	33,77±0,67	33,06±0,79	33,46±0,95	33,82±0,50	
Plaquetas (x10 ³ /ul)	PLA	221,63±76,82	236,46±32,63	223±42,37	239,25±35,74	0,17
	PRO	234,26±54,80	232±38,74	248,73±36,34	245,57±52,03	

Legenda: PLA=Placebo; PRO= Probiótico; VCM= Volume Corpuscular médio; HCM= Hemoglobina Corpuscular Média; CHC=Concentração de Hemoglobina Corpuscular média; ^a= diferente do basal; ^b=diferente do momento prova; ^c= diferente do momento pós prova;

1.12. Sintomas Gastrointestinais

Em relação a presença de sintomas gastrointestinais 61,9 % dos participantes reportaram já ter apresentado algum sintoma em algum momento, sendo, 38,1 % deles pertencente ao grupo placebo e 23,8% pertencentes ao grupo probiótico (TABELA 7). Os sintomas mais reportados foram, flatulência (PL=60%; PRO=18,2%); Impulso para defecar (PL=40%; PRO=45,5%) e Arrotos (PL=30%; PRO=27,3%). Não havendo diferença entre os grupos (TABELA 7). Após o período de suplementação não foram encontradas alterações significantes em relação aos sintomas gastrointestinais (TABELA 8). E em relação a severidade dos sintomas durante a prova também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, sendo os sintomas reportados, classificados como leves ou moderado (TABELA 9).

TABELA 7 - PRESENÇA DE SINTOMAS GASTROINTESTINAIS

	TOTAL		PLACEBO	PROBIÓTICO
	Sim	Não		
PRESENÇA DE SINTOMAS	61,9%	38,1%	38,1%	23,8%
SINTOMAS	PLACEBO		PROBIÓTICO	
FREQUÊNCIA	AS VEZES	SEMPRE	AS VEZES	SEMPRE
Problemas estomacais	10%	-	27%	-
Náusea	0%	-	0%	-
Tontura	10%	-	9,1%	-
Flatulência	60%	-	18,2%	9,1%
Impulso para defecar	40%	-	45,5%	-
Arrotos	30%	-	27,3%	-
Azia	0%	-	9,1%	-
Inchaço	10%	-	18,2%	-
Dores de estomago	10%	-	18,2%	-
Dores de intestino	0%	-	9,1%	-
Vontade de vomitar	20%	-	18,2%	-
Vômito	0%	-	18,2%	-
Diarreia	0%	-	0%	-

Placebo (n=10) PRO= Probiótico (n=11)

TABELA 8 - SINTOMAS GASTRINTESTINAIS REFERENTES AO ÚLTIMO TREINO LONGO PRÉ E PÓS PERÍODO DE SUPLEMENTAÇÃO

SINTOMAS	PRÉ		PÓS	
	PLA	PRO	PLA	PRO
Náusea	0%	9,1%	0%	9,1%
Tontura	0%	0%	0%	9,1%
Flatulência	20%	18,2%	30%	9,1%
Impulso para defecar	30%	9,1%	10%	9,1%
Arrotos	30%	9,1%	30%	18,2%
Azia	0%	9,1%	10%	9,1%
Inchaço	0%	0%	0%	9,1%
Dores de estomago	0%	0%	10%	0%
Dores de intestino	0%	0%	10%	0%
Vontade de vomitar	0%	9,1%	0%	0%

Legenda: PRÉ= pré-suplementação; PÓS= pós-suplementação; Placebo (n=10) PRO= Probiótico (n=11)

TABELA 9 - SEVERIDADE DOS SINTOMAS GASTRINTESTINAIS APRESENTADOS DURANTE A PROVA

SINTOMAS	Sentiu Pouco		Moderado		Severo	
	PLA	PRO	PLA	PRO	PLA	PRO
Dor abdominal superior	28,8	16,7	14,3	-	-	-
Azia	-	-	14,3	-	-	-
Refluxo	14,3	33,3	-	-	-	-
Fome	-	33,3	-	16,7	-	16,7
Náusea	14,3	-	-	-	-	-
Inchaço	14,3	50	-	-	-	-
Arrotos	42,9	33,3	-	16,7	-	-
Gases/Flatulência	42,9	16,7	14,3	-	-	-
Constipação	14,3	16,7	-	-	-	-
Diarreia	14,3	-	-	-	-	-
Fezes solta	14,3	-	-	-	-	-
Fezes dura	18,6	-	-	-	-	-
Urgência para defecar	14,3	-	-	-	-	-
Evacuação incompleta	14,3	-	-	-	-	-

Placebo (n=7) PRO= Probiótico (n=6)

1.13. Permeabilidade Intestinal e Endotoxemia

Em relação a proteína relacionado ao aumento da permeabilidade intestinal $\alpha 1$ -anti-tripsina não foram encontradas alterações para os diferentes momentos e nem em relação aos grupos, porém somente o grupo placebo apresentou um aumento da quantidade desta proteína nas vezes no primeiro dia após a realização da maratona ($p=0,06$) (FIGURA 3).

Figura 3 - Valores de $\alpha 1$ -anti-tripsina para os diferentes momentos. Legenda: Recuperação 1 = Primeiro dia após a maratona; Recuperação 2 = segundo dia após a maratona; Recuperação 3 = Terceiro dia após a maratona. Análise Estatística Modelo Misto com post hoc de Tukey, significância $p<0,05$. Placebo Recuperação 1 ($p=0,06$) em relação ao Basal do mesmo grupo

Em relação as concentrações de Lipopolissacarídeo, somente o grupo Probiótico apresentou uma diminuição das concentrações plasmáticas quando comparado o momento basal com o momento prova ($p=0,02$) e recuperação ($p=0,03$) (FIGURA 4). Não foram encontradas diferenças significativas em relação aos grupos.

Figura 4 - Concentrações de Lipopolissacarídeo circulante nos diferentes momentos
Legenda: a= diferente do basal ($p < 0,05$)

1.14. Composição da Microbiota Intestinal

Das 48 amostras fecais fornecidas por 24 voluntários do estudo nos momentos pré- e pós-intervenção (PLA=12; PRO=12) foram identificadas um total de 173.096 sequências 16S rRNA, sendo em média, obtidas 3.606 sequências por amostra (mínimo e máximo de sequências observadas por amostra, respectivamente, 1860 e 6677) , com tamanho de 290 pb.

Foram identificadas 2.634 Unidades Taxonomicas (OTUs) distintas, as quais foram observadas nestas 173.096 sequências finais. Estas sequências finais corresponderam a 9 filos, 16 classes, 18 ordens, 28 famílias, 52 gêneros e 45 espécies identificadas.

Os 9 diferentes filos identificados foram: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobactéria, Actinobactéria, Tenericutes, Verrucrobicröbia, Cyanobactéria, Elusimicrobia, Lenthispaerae, sendo que os filos de maior abundância foram Bacteroidetes e Firmicutes, seguido pelo filo Proteobactéria e Actinobactéria. Em relação aos gêneros, foram identificados 52 gêneros distintos, sendo os mais abundantes Prevotella, Bacteroides, Dialistes, Roseburia, Faecalibacterium (FIGURA A e B).

FIGURA 5 - FILOS FREQUÊNCIA RELATIVA 1

B

Figura 5 – Gêneros de bactérias para os diferentes grupos

1.14.1. Alfa-diversidade

A TABELA 10 apresenta a média de sequências finais obtidas após filtração algorítmica, número de OTUs observadas e índices α -diversidade (Índice de Shannon) apresentados nos diferentes momentos pelos grupos. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no momento pré-intervenção ou após o período de suplementação para estes parâmetros.

TABELA 10 - FREQUÊNCIA DE COMUNIDADES BACTERIANAS CONFORME REVELADO PELA ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO 16S RNA.

Grupos	Momento	Nº de sequências finais	Índice de Shannon*	Enriquecimento observado*
Placebo	Basal (n=12)	3837 $\pm$ 1194,99	6,73 $\pm$ 0,71	269,07 $\pm$ 63,21
	Prova (n=12)	3404,23 $\pm$ 797,68	6,56 $\pm$ 0,65	262,86 $\pm$ 60,88
Probiótico	Basal (n=12)	3772,92 $\pm$ 958,65	6,88 $\pm$ 0,57	284,75 $\pm$ 54,54
	Prova (n=12)	3411,09 $\pm$ 835,07	7,05 $\pm$ 0,49	285,18 $\pm$ 53,28

Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. * valores obtidos a partir da análise pelo comando *core-metric-phylogenetic* e baseados em 173.096 sequências por amostra de acordo com a curva de rarefação.

De acordo com essas sequências finais obtidas, as medições de rarefação foram utilizadas para gerar a curva de rarefação, a qual permite avaliar a riqueza de OTUs em cada grupo e nos momentos pré- e pós-intervenção. As curvas de rarefação abaixo mostram que houve saturação com 1.800 sequências 16S rRNA sugerindo, assim, quantidade suficiente de sequências por amostra para posteriores análises de diversidade bacteriana (FIGURA 7).

As curvas de rarefação, em conjunto com os valores da TABELA 10, confirmam que não há diferença entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados (pré- e pós-intervenção) em termos de riqueza de espécies bacterianas (FIGURA 6A e B).

A.

B

Figura 6 - Alfa diversidade e curva de rarefação.

Legenda: PLA: grupo placebo; PRO: grupo probiótico; pré: momento de coleta pré intervenção; pós: momento de coleta pós-intervenção.

A fim de ampliar a compreensão acerca da α -diversidade entre os grupos e momentos, foi aplicado o índice *Pielou evenness* (GRÁFICO 1). Este índice, traz informações referentes a quantidade de bactérias por OTUs em cada grupo, deste modo sugerindo quão uniforme ou homogênea é a distribuição, em termos de abundância, entre os diferentes OTUs em uma amostra. Este índice é representado como um valor calculado a partir do índice de Shannon que varia de 0 a 1. Quanto mais próximo de zero, menor a uniformidade, assim, indicando que possivelmente há dominância de algumas espécies em uma comunidade (HEIP; HERMAN; SOETAERT, 1998). A partir destes resultados, sugere-se que a α -diversidade, em termos de riqueza e uniformidade, não foi afetada pela suplementação de probióticos.

GRÁFICO 1 - ANÁLISE DE UNIFORMIDADE ATRAVÉS DO ÍNDICE DE *PIELOU EVENNESS*.

A fim de analisar a complexidade da composição da MI dos grupos em cada momento estudado em relação a suplementação de Probióticos, foram aplicadas as matrizes de dissimilaridade quantitativas e qualitativas da β -diversidade para gerar o Gráfico de PCoA (FIGURA 6 E 7). Este PCoA demonstra virtualmente como cada voluntário do estudo se dispõe em relação à composição da sua MI em um espaço tridimensional. Os gráficos das matrizes de distância UniFrac *unweighed* e *weighted* também incorporam as relações filogenéticas entre os OTUs observados em cada indivíduo (FIGURA 9).

Para a divisão adotada na FIGURA 6, em que os indivíduos do estudo estão divididos em GRUPOS (Placebo E Probiótico) e MOMENTOS (pré- e pós-intervenção), não foram identificadas diferença estatística em relação à β -diversidade (PERMANOVA; $p=0,96$) (FIGURA 7). Porém quando consideramos somente os grupos, placebo e probiótico (sem considerar a variável tempo) encontramos diferença significativa na Beta-diversidade em relação aos grupos (PERMANOVA; $p=0,005$) (FIGURA 8).

Figura 7 - Parâmetros de beta diversidade. Legenda: PCoAs construídos a partir das matrizes de similaridades de *Bray-Curtis* (A), *Jaccard* (B), e de distância UniFrac *weighted* (C) e *unweighted* (D), os quais se basearam nas sequências microbianas a partir da curva de rarefação

Figura 8 - Beta diversidade dos grupos. Legenda: PCoAs construídos a partir das matrizes de distância UniFrac *weighted* (C)

1.14.2. Frequência Relativa

Após a verificação dos parâmetros de diversidade do perfil da microbiota em relação aos grupos, após a relativização de cada OTU realizamos as análises para verificar se outros fatores (grupo; tempo; tempo de prova; citocinas plasmáticas; endotoxemia) poderiam estar relacionados com alterações na frequência relativa de táxons em específicos, assim foi realizada a análise de PERMANOVA/ANCOM para amostra geral a nível de espécie e gêneros de bactérias.

Na verificação em relação aos grupos (sem a utilização do fator tempo) a análise de PERMANOVA apresentou diferença significativa ($p=0,04$). Considerando a mediana da

amostra o grupo probiótico apresentou aumento significativo na abundância relativa da espécie *Lactobacillus Ruminis* (PLA=1; PRO=11,5) (FIGURA 9).

Figura 9 - Frequência Relativa de *Lactobacillus Ruminis*

Visto que a variação biológica dos dados referentes a microbiota intestinal é elevada, após a verificação desta alteração para o grupo probiótico, calculamos a ocorrência relativa de cada táxon em cada amostra, determinando a proporção do número de ocorrências, após tal procedimento subtraímos as proporções entre dois momentos de avaliação para cada táxon (pré e pós suplementação). Desta forma foram comparadas as diferenças da mediana de cada táxon para os grupos (placebo e probiótico) sendo realizado o teste de Wilcoxon para medidas independentes para verificação de possíveis diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

A diferença entre os valores encontrados para os grupos foi significativa para o gênero *Bifidobacterium* ($p=0,04$), para o gênero *Parabacteroides* ($p=0,04$) para a espécie *Parabacteroides Distasoni* ($p=0,04$), para a espécie *Dorea Longicatena* ($p=0,04$); família Ruminocaceae ($p=0,02$); espécie *Eubacterium Biforme* ($p=0,04$) (FIGURA 10). No gênero *Bifidobacterium* embora a diferença encontrada tenha sido a nível de gênero, a espécie identificada foi a *Bifidobacterium Breve*. Na Família Ruminocaceae embora várias

espécies tenham sido identificadas, a identificado com maior frequência foi a espécie *Faecalibacterium* (FIGURA 11).

Figura 10 - Frequência Relativa de *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, *Parabacteroides Distasoni*, *Dorea Longicatena*, *Ruminocaccaceae* e *Eubacterium Biforme* para os diferentes grupos

Figura 11 - Frequência relativa espécie *Faecalibacterium Prausnitzii*

Outro parâmetro o qual encontramos alterações na taxonomia, foi em relação as concentrações plasmáticas de IL-6. Em baixas concentrações de IL-6 foi verificado um aumento expressivo para a família Lactobacillales, os gêneros *Blautia*, *Dorea*, *Actinomyces*, *Syntrophomonas* e a espécie *Clostridium islandicum*. Nas concentrações médias de IL-6 verificado um aumento na abundância relativa da espécie *Porphyromonas endodontalis*. Em altas concentrações de IL-6 (acima de 15,12 pg/ml) ocorreu um aumento da abundância relativa do gênero *Veillonella* e da família *Pasteurellaceae* (FIGURA 12).

Figura 12 - Frequência Reativa de gêneros e espécie de acordo com a classificação de IL-6

Outro fator que encontramos relação com a alterações na taxonomia foi na razão entre citocinas plasmáticas IL2/ IL-4. Foi encontrado um aumento da abundância relativa do gênero *Clostridium*, nas concentrações médias (7,37 a 14,60 pg/ml) da razão entre as citocinas. Para os outros fatores analisados não foram encontradas alterações significativas na abundância relativa de OTUS.

1.15. Função Imunológica

1.15.1. Atividade Dos Neutrófilos

Em relação a função dos Neutrófilos, para função fagocíticas, o momento basal do grupo placebo foi diferente do momento prova ($p < 0,001$) e pós prova para o mesmo grupo ($p < 0,001$). O grupo Probiótico apresentou alteração quando comparado o momento basal com o momento prova ($p = 0,002$) e pós prova ($p = 0,001$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para o fator grupo (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2- FUNÇÃO FAGOCÍTICA DOS NEUTRÓFILOS

Legenda: a= diferente do basal do grupo placebo ($p < 0,001$); b= diferente do basal do grupo probiótico ($p < 0,05$)

Em relação a produção de radicais peróxido pelos neutrófilos, para ambos os grupos ocorreu uma redução na produção destes radicais quando comparado o momento basal com os outros momentos pré prova (PL; $p<0,003$; PR; $p<0,0004$); prova (PL; $p<0,003$; PR; $p<0,0001$), e recuperação (PL; $p<0,0003$; PR; $p<0,0002$)(GRÁFICO 3)

GRÁFICO 3 - PRODUÇÃO DE RADICAIS PERÓXIDO PELOS NEUTRÓFILOS

Legenda: C= diferente de todos os outros momentos do grupo placebo ($p<0,001$); b= diferente de todos os outros momentos do grupo probiótico ($p<0,05$)

Em relação produção de citocinas pelos neutrófilos, visto que os grupos apresentaram diferença significativa em relação a massa corporal, realizamos a relativização dos valores brutos individuais de cada citocina em relação a massa magra de cada atleta (FIGURAS 12 a 20). Esta relativização também foi realizada par os valores referentes as citocinas plasmáticas (FIGURAS 21 a 30).

Produção de citocinas pelos neutrófilos relativizadas pela massa magra

Foram encontradas diferenças em relação aos diferentes momentos para Interleucina 4 (IL-4); Interleucina 2 (IL-2); Interleucina 15 (IL-15); Interleucina 8 (IL-8); Interferon gama (INF- γ) e Interleucina 10 (IL-10).

Para INF- γ , IL-4, IL-2, IL-15 (FIGURAS 13 A 17 respectivamente) ambos os grupos apresentaram um aumento da produção destas citocinas no momento recuperação, sendo este diferente de todos os outros momento, basal (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$); prova (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$); pós prova (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$). Para IL-8 ambos os grupos apresentaram um aumento no momento prova quando comparado com o pré-prova (PL; $p<0,005$; PR; $p<0,001$) e, somente o grupo placebo apresentou uma redução no momento recuperação quando comparado com o momento prova (PL; $p<0,005$; PR; $p<0,0001$) (FIGURA 18).

Para IL-10 foi verificada alteração somente no grupo placebo, ocorrendo um aumento no momento prova quando comparado com os momentos basal ($P=0,01$) e pré-prova ($P=0,001$) (FIGURA 19)

Figura 13 - Produção de TNF- α pelos Neutrófilos.

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Figura 14 -Produção de IFN- γ pelos Neutrófilos

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Figura 15 - Produção de IL-4 pelos Neutrófilos

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Figura 16 - Produção de IL-2 pelos Neutrófilos

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Figura 17 - Produção de IL-15 pelos Neutrófilos

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Figura 18 - PRODUÇÃO DE IL-8 PELOS NEUTRÓFILOS

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Figura 19 - Produção de IL-10 pelos Neutrófilos

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Figura 20 - Produção de IL1- β pelos Neutrófilos

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Figura 21 - Produção de IL-6 pelos Neutrófilos

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Para verificar a relação do balanço inflamatório realizamos a razão entre as citocinas TNF- α e IL-10 (FIGURA 22) considerando ser estas representantes da ação inflamatória e anti-inflamatória respectivamente. Foram encontradas diferenças significativas somente para o grupo placebo, sendo o momento recuperação, diferente do basal ($p=0,01$).

Figura 22 - Razão TNF- α e IL-10 para os grupos

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação.

1.15.2. Citocinas plasmáticas relativizadas pela massa magra

Em relação as citocinas plasmáticas mensuradas foram encontradas diferenças em relação aos diferentes momentos para Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), Interferon gama (INF- γ); Interleucina 1-beta (IL1- β), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 10 (IL-1-) e Interleucina 15 (IL-15).

Para TNF- α o grupo placebo apresentou uma redução desta citocina quando comparado o momento basal com todos os outros momentos, pré-prova ($p=0,01$), prova ($p=0,001$), recuperação ($p<0,0001$), o grupo probiótico apresentou diminuição quando comparado o momento basal com o momento recuperação (FIGIRA 23).

Figura 23 - Valores circulantes de TNF- α .

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente de todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente de todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Em relação ao IFN- γ somente o grupo placebo apresentou alteração, ocorrendo uma diminuição quando comparado o momento basal com todos os outros momentos pré-prova ($p=0,01$); prova ($p=0,03$); recuperação ($p=0,03$) (FIGURA 24).

Figura 24 - Valores circulantes de IFN- γ circulante

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Para IL1- β no grupo placebo foi verificada uma diminuição nos valores obtidos quando comparado o momento basal com o momento prova ($p=0,0003$) e recuperação ($p<0,0001$); e o momento pré-prova com o momento recuperação ($p=0,02$). O grupo probiótico apresentou um declínio significativo quando comparado o momento basal com o momento recuperação ($p=0,001$) (FIGURA 25).

Figura 25 - Valores circulantes de IL-1 β .

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Para IL-8 o grupo placebo apresentou uma diminuição dos valores obtidos quando comparado o momento recuperação com todos os outros momentos, basal ($p<0,0001$), pré-prova ($p=0,02$), prova ($p=0,04$), e do momento basal em relação ao pré-prova ($p=0,0004$). No grupo placebo foi verificada somente um declínio quando comparado o momento basal com o momento recuperação ($p=0,0007$) (FIGURA 26).

Figura 26 - Valores circulante de IL-8

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Em relação a IL-2 o grupo placebo apresentou declínio dos valores obtidos quando comparado o momento recuperação com os momentos basal ($p=0,03$) e pré-prova ($p=0,03$). Já o grupo probiótico apresentou um declínio dos valores obtidos quando comparado o momento prova e recuperação com os momentos basal ($p=0,0003$; $p=0,02$) e pré-prova ($p=0,0003$; $p=0,02$) respectivamente (FIGURA 27).

Figura 27 - Valores circulantes de IL-2

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do pós-prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Em relação a IL-6 somente o grupo placebo apresentou alterações significativas, sendo verificado um declínio dos valores quando comparado o momento basal com o momento pré-prova ($p=0,06$) e recuperação ($p=0,00008$) (FIGURA 27).

Figura 28 - Valores circulante de IL-6

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do pós-prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação.

Para IL-4 e IL-15 ambos os grupos apresentaram uma diminuição na produção destas citocinas quando comparado o momento basal com todos os outros momento, basal (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$); prova (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$); pós prova (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$) (FIGURA 29 E 30)

Figura 29 - Valores circulante de IL-4.

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do pós-prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

Figura 30 - Valores circulante de IL-15

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do pós-prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação.

Em relação a IL-10 ambos os apresentaram um aumento da produção desta citocina quando comparado o momento prova com todos os outros momento, basal (PL; $p=0,001$; PR; $p=0,0002$); pré-prova (PL; $p=0,0003$; PR; $p<0,0001$); recuperação (PL; $p=0,0002$; PR; $p<0,0001$) (FIGURA 31).

Figura 31 - Valores circulante de IL- 10

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação.

Também foi verificada a relação do balanço inflamatório das citocinas plasmáticas, realizamos o cálculo da razão entre as citocinas TNF- α e IL-10 (FIGURA 32). Foram encontradas diferenças significativas para ambos os grupos. Ambos os grupos apresentaram um aumento da razão no momento recuperação, quando comparado com o momento basal (PL; $p=0,002$; PR; $p=0,003$) e prova (PL; $p=0,006$; PR; $p=0,02$).

Figura 32 - Razão valores circulantes de TNF- α / IL -10

Legenda: a= diferente do basal; b=diferente do momento prova; c= diferente do todos os outros momentos no grupo placebo; d= diferente do todos os outros momentos no grupo probiótico; e= diferente da recuperação

DISCUSSÃO

Levando em consideração a relação entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico, o quadro de imunodepressão associado ao exercício de longa duração, já descrito anteriormente em praticantes de corrida de maratona, e a ocorrência de sintomas gastrintestinais durante realização do exercício físico, foi realizado o presente estudo o qual teve como objetivo verificar a influência da suplementação de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* 10×10^9 UFC e *Bifidobacterium Lactis* 10×10^9) por período de 30 dias, sobre a função de neutrófilos, permeabilidade intestinal e endotoxemia.

Baseado na hipótese de que a suplementação atuaria de maneira positiva sobre a barreira intestinal, reduzindo a permeabilidade intestinal e hiperendotoxemia, tendo efeito positivo sobre a função de neutrófilos, recrutamos 28 homens, praticantes de corrida com experiência prévia de pelo menos 2 anos em corridas de maratona, elegíveis de acordo com os critérios pré-estabelecidos pelo estudo, os quais foram randomizados de maneira aleatória em dois grupos distintos (placebo e probiótico), sendo suplementados por período de 30 dias, passando por todos os procedimentos pertencentes ao estudo (descritos em detalhes anteriormente) estando entre esses a participação em uma competição de corrida de maratona.

De maneira geral, pudemos perceber que a suplementação de probióticos alterou o perfil de alfa-1 anti-tripsina (proteína relacionada a permeabilidade intestinal), diminuiu os valores de lipopolisacarídeo verificados após a realização da maratona, não induziu alterações específicas na atividade dos neutrófilos ou sobre o perfil de citocinas, porém foi capaz de induzir modificações específicas na composição da microbiota intestinal dos maratonistas. A seguir a discussão detalhada dos resultados em tópicos.

8.1. Sintomas Gastrintestinais

Sabe-se que a ocorrência de sintomas GI em praticantes de exercício de longa duração é comum, e pode influenciar de maneira negativa a performance do sujeito. No presente estudo, verificamos que não houveram diferenças significativas entre os grupos (placebo x probiótico) em relação à incidência e/ou severidade destes sintomas após o período de suplementação.

Estudos anteriores encontraram resultados semelhantes aos deste. West *et al.* (2013) que utilizou a mesma combinação de espécies do presente estudo, porém com período de utilização maior (150 dias), sugerem que não foram encontradas diferenças em relação aos sintomas GI, pela baixa presença destes sintomas nos atletas durante o período de utilização dos probióticos.

Uma outra pesquisa realizada por Shing *et al.* (2014), com período de utilização semelhante a desta, porém utilizando um composto multi-espécies 45×10^9 UFC (L. acidophilus + L. rhamnosus + L. casei + L. plantarum + L. fermentum + B. lactis + B. brevis + B. bifidum + S. thermophilus), não encontrou diferença significativa em relação a incidência ou severidade de sintomas gastrintestinais num estudo realizado no calor em ambiente de laboratório. Os autores discutem que a amostra não apresentou alta incidência e severidade dos sintomas gastrintestinais, porém, que parece haver um efeito positivo sobre tais parâmetros com a utilização do probiótico.

Contrapondo os resultados encontrados no presente trabalho, West *et al.* (2011), num estudo realizado com ciclistas e triatletas com a utilização de capsulas contendo 1×10^9 UFC de *Lactobacillus Fermentum* VRI 003 (PCC) tendo como período de utilização 11 semanas, demonstraram que ocorre diminuição da severidade dos sintomas gastrintestinais.

Corroborando com os achados de West *et al.* (2011), Pugh *et al.*, (2019) num estudo realizado com maratonistas recreacionais, demonstraram que os sintomas GI diminuíram nas duas últimas semanas de suplementação nos atletas que utilizaram probiótico quando comparado com as 2 primeiras semanas para o mesmo grupo. Além disso, durante a

prova, a severidade dos sintomas GI apresentados no terço final foi menor no grupo probiótico. Nesse estudo, a combinação de probióticos utilizada foi *Lactobacillus acidophilus* (CUL60, CUL21), *Bifidobacterium bifidum* (CUL20) e *Bifidobacterium animalis* subs p. *Lactis* (CUL34) 2.5×10^9 UFC, sendo a ingestão de água e carboidratos utilizada pelos atletas durante a prova determinada pelos pesquisadores, o que diminui a chance dos sintomas gastrintestinais serem inerentes a um quadro de desidratação ou consumo muito elevado de carboidratos.

Diferente do reportado por Shing *et al.* (2014) e West *et al.* (2013) que tiveram em sua amostra baixa incidência e severidade de sintomas gastrintestinais, Pugh *et al.* (2019) apresentam que 50% da amostra reportou apresentar sintomas gastrintestinais moderados (um ou mais) durante a prova, sendo que, estudos anteriores apontam que em média de 4 a 27% dos atletas apresentam sintomas GI moderados ou severos durante a prova (PUGH *et al.*, 2018).

Comparando com os nossos resultados, podemos sugerir que a baixa incidência e severidade de sintomas gastrintestinais reportados pelos nossos atletas corroboraram com os resultados vistos. Embora nossos atletas reportassem já terem apresentado esses sintomas pelo menos uma vez durante os treinos, não tivemos como fator de inclusão no estudo atletas com alta frequência ou que reportassem grande severidade de sintomas. Comparando com os resultados apresentados por Pugh *et al.*, é possível que, se nossa amostra fosse composta somente por atletas sintomáticos ou sintomáticos graves, o resultado verificado fosse diferente. Além disso, baseado no resultado de West *et al.* (2011), poderíamos sugerir que o período de utilização da suplementação (30 dias) tenha contribuído para o resultado encontrado.

Um estudo de Ringel *et al.* (2011) com suplementação de probióticos em sujeitos com doenças funcionais intestinais utilizando a mesma combinação de espécies deste, porém com dose mais alta (1×10^{11} cada espécie) por 8 semanas, encontrou diminuição de alguns sintomas gastrintestinais (inchaço e distensão abdominal) após 4 semanas de utilização do probiótico. Visto que esses são alguns dos sintomas apresentados pelos atletas, isso nos leva a crer que, com a adequação da dose, a combinação de espécies

utilizada no presente estudo possa ser efetiva em relação a interessante em novos estudos com atletas e sintomas gastrintestinais.

É importante mencionar que fatores como desidratação e a realização da prova em temperaturas elevadas, os quais contribuem para o aparecimento de sintomas GI durante o exercício prolongado, não foram identificados durante as nossas coletas. Embora nós não tenhamos mensurado a temperatura corporal dos atletas após a realização da prova, não verificamos aumento na concentração de hematócrito dos indivíduos, o que nos sugere que os atletas não estavam desidratados após a realização da maratona, além disso, nenhuma prova foi realizada em temperatura acima de 28° graus.

De acordo com o exposto, em relação ao probiótico utilizado e aos sintomas gastrintestinais podemos inferir que: 1-) A efetividade do probiótico esteja relacionado com a incidência e severidade de sintomas apresentados pelos atletas; 2-) As dosagens testadas até o momento não sejam suficientes para se atingir o resultado esperado; 3-) Essa combinação não seja a melhor escolha quando se objetiva a diminuição de sintomas gastrintestinais.

1.16. Permeabilidade Intestinal e Endotoxemia

Em relação às concentrações plasmáticas de lipopolissacarídeo, embora não tenhamos identificado diferença significativa entre os grupos, o grupo probiótico apresentou diminuição nos valores quando comparamos o momento prova e recuperação com o momento basal, sendo que, para o grupo placebo, não foram encontradas alterações semelhantes. Esse resultado parece complementar o resultado verificado para a proteína relacionada a permeabilidade intestinal (alfa-1-anti-tripsina), no qual verificamos um aumento apresentado somente pelo grupo placebo no 1º dia após a realização da maratona ($p=0,06$).

Parece que a utilização do probiótico teve alguma influência em relação aos parâmetros de permeabilidade e concentrações plasmáticas de lipopolissacarídeo, o que

corroborar com achados anteriores dos estudos de Lamprech *et al.* (2012) e Roberts *et al.* (2016).

O estudo de Lamprech *et al.* (2012) – com a utilização de um probiótico multi-espécies por período de 14 semanas na concentração de 1×10^{10} UFC (*Bifidobacterium bifidum* W23, *Bifidobacterium lactis* W51, *Enterococcus faecium* W54, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus brevis* W63, e *Lactococcus Lactis* W58) realizado com atletas de endurance – apontou que, antes do período de suplementação, os atletas apresentavam quantidades de zonulina nas fezes acima dos valores fisiológicos e que após a utilização do probiótico o grupo suplementado apresentou diminuição significativa dos valores encontrados, enquadrando-se dentro dos valores fisiológicos. Esse estudo também verificou a alfa-1-anti-tripsina (proteína mensurada no nosso estudo), porém, para no estudo de Lamprech *et al.* (2012) não foram encontradas alterações na medida inicial ou após o período de suplementação para alfa-1-anti-tripsina, somente para zonulina.

Dentre o conjunto de proteínas utilizadas para verificação do aumento de permeabilidade intestinal está a zonulina, proteína que faz parte das junções de oclusão e tem papel na adesão para-celular, seus valores são encontrados aumentados nas fezes em doenças inflamatórias intestinais e quadros de aumento da permeabilidade intestinal (FASANO *et al.*, 2000), no presente trabalho optamos pela utilização da alfa-1-anti-tripsina, outra proteína utilizada como parâmetro para verificação de aumento de permeabilidade nos estudos.

O estudo de Roberts *et al.* (2016), foi realizado com a utilização do probiótico multi-espécies *Lactobacillus acidophilus* CUL-60 (NCIMB 30157) (3×10^9 UFC), *Lactobacillus acidophilus* CUL-21 (NCIMB 30156) (1×10^9 UFC), *Bifidobacterium bifidum* CUL-20 (NCIMB 30172) ($9,5 \times 10^8$ UFC), *Bifidobacterium animalis subspecies lactis* CUL-34 (NCIMB 30153) (1×10^9 UFC) combinado com 55.8 mg de fructooligosaccharides e 400 mg de ácido lipoico, por um período de 12 semanas. Esse estudo apontou que a endotoxemia do grupo suplementado diminuiu antes da realização da competição de endurance e se manteve menor na avaliação realizada 7 dias após a competição, e que os parâmetros de permeabilidade intestinal aumentaram somente no grupo placebo, sendo o grupo suplementado estável durante o período de suplementação e 7 dias após a competição,

sugerindo que o probiótico conseguiu atenuar o possível aumento da permeabilidade intestinal induzida pelo período de treinamento e competição.

É válido mencionar que o estudo de Roberts *et al.* (2016) foi realizado com atletas de triatlo sem experiência prévia em provas longas da modalidade, ou seja, sujeitos cujos organismos estariam sendo submetido a esse tipo de estresse pela primeira vez, o que pode corroborar com os efeitos positivos verificados com a utilização do probiótico.

Na tentativa de verificar quais são os mecanismos envolvidos nesta possível melhora da permeabilidade intestinal induzida pela utilização dos probióticos, Karczewski, *et al.* (2010) realizaram estudo com humanos e infusão duodenal de 1×10^{12} UFC de *Lactobaccillus Plantarum* e posterior biopsia para avaliação das junções de oclusão (occludinas, claudinas e zonulina-1). O estudo apontou que a espécie de probiótico utilizada foi capaz de induzir o aumento da expressão de occludinas e claudinas e que possivelmente o mecanismo relacionado a esse estímulo para o aumento da expressão destas proteínas seja via Toll Like receptor -2, estando o aumento da expressão de interleucina 8 e NFK β envolvidos nesta sinalização induzida pelo *Lactobaccillus Plantarum*.

Os autores sugerem que esta ativação do TLR-2 induzida pelo *Lactobaccillus Plantarum* ocorre devido à presença do ácido lipoteicóico e de outras lipoproteínas presentes na membrana de bactérias gram-positivas (característica da espécie *Lactobaccillus Plantarum*). Esse apontamento realizado por Karczewski *et al.* (2010) corrobora com a afirmação de Roberts *et al.* (2016), os quais sugerem que a melhora em relação a permeabilidade intestinal possa ter ocorrido devido ao aumento de gêneros de bactérias gram-positivas, diminuindo a possibilidade de ação do LPS a partir de sua liberação por bactérias gram-negativas.

Embora o estudo realizado por Karczewski, *et al.* (2010) traga resultados sólidos sobre a ação benéfica do *Lactobaccillus Plantarum* em relação a permeabilidade intestinal, não podemos deixar de reforçar a afirmação apresentada anteriormente de que a ação do probiótico pode ser dependente da espécie, dose e período de utilização. É possível que a modesta alteração verificada no presente estudo nos valores de LPS e na proteína alfa-1-antitripsina circulantes de alguma forma tenha relação com o mecanismos apresentado por Karczewski, *et al.* (2010) ou com o argumento de Roberts *et al.* (2016), e que resultados

mais expressivos poderiam ser verificados com alterações de fatores dose e/ou período de utilização.

Fortalecendo a hipótese de que a espécie utilizada pode ter efeito sobre a permeabilidade intestinal, o estudo de Wang *et al.* (2018) realizado com suínos (devido a similaridade com o sistema gastrointestinal humano) demonstra que a suplementação por 14 dias com *Lactobacillus Acidóphilos* aumentou a expressão de ocludinas e diminuiu a expressão de IL-1 β e IL-18 possivelmente pela inibição da expressão de Receptor citoplasmáticos do tipo NOD.

Tendo em vista o apontamento realizado por Roberts *et al.* (2016) em relação a uma possível indução do aumento de bactérias gram-positivas a partir da utilização do probiótico, podemos sugerir que, talvez, o perfil da composição da microbiota intestinal dos sujeitos tenha relação com o aumento da permeabilidade e endotoxemia.

Sabemos que o exercício prolongado leva ao aumento das concentrações circulantes de lipopolissacarídeo, e que este por sua vez, é uma substância presente na membrana de bactérias gram-negativas. É possível que em sujeitos os quais a composição da microbiota tenha grande abundância de bactérias gram-negativas aja maior concentração de LPS no ambiente intestinal, facilitando o aumento da permeabilidade intestinal, hiperendotoxemia e sintomas gastrintestinais.

O estudo de Karhu *et al.* (2017) fortalece tal hipótese, pois, nele, os autores discutem que não é o aumento da permeabilidade intestinal induzida pela corrida que leva ao aparecimento dos sintomas gastrintestinais, mas sim os valores basais de LPS. O trabalho demonstra que tanto atletas sintomáticos quanto assintomáticos apresentam aumento da permeabilidade intestinal após a realização de uma corrida com duração de 90 minutos acima de 70% da VO₂ pico, e que ambos os grupos apresentam alterações na endotoxemia após a realização do exercício, no entanto, a diferença entre os grupos se dá nos valores basais de LPS, sendo os valores apresentados pelo grupo sintomático maior que os apresentados pelos atletas assintomáticos.

Desta forma, em relação aos dados de endotoxemia e permeabilidade intestinal, podemos apontar que: 1-) Possivelmente, os mecanismos envolvidos na possível prevenção do aumento da permeabilidade e endotoxemia induzidos pelo exercício com a utilização dos probióticos estejam relacionados com o aumento das proteínas das junções de oclusão (claudinas e ocludinas) e/ou alterações na composição da microbiota intestinal; 2-) A experiência prévia dos atletas com a situação de estresse (corrida de maratona) pode influenciar no resultado; 3-) Talvez a suplementação seja mais efetiva em atletas sintomáticos (sintomas gastrintestinais) ou com valores basais de LPS circulantes elevados.

1.17. Microbiota

De maneira geral, como descrito na literatura científica, os filos mais abundantes na amostra foram Bacteroidetes, Firmicutes, o que corresponde aos descrito nos estudos relacionados a microbiota de humanos saudáveis (FLINT *et al.*, 2012). Na amostra em geral, sem haver diferença entre os grupos, o gênero de maior abundância identificado foi o gênero *Prevotella*, sendo a espécie *Prevotella Copri* a mais abundante.

Em relação a abundância do gênero *Prevotella*, nossos resultados estão em concordância com o estudo realizado por Petersen *et al.*, (2017), com ciclistas de longa distância. Petersen *et al.* (2017) encontraram clusters de predomínio de gêneros, nos atletas, sendo os gêneros de predomínio: *Prevotella* (cluster I), *Bacteroides* (cluster II), *Prevotella*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* e *Akkermansia* (cluster III). Dentro do gênero *Prevotella*, a espécie de maior abundância identificada pelo estudo foi *Prevotella Copri*, igual ao identificado no presente estudo. Os autores deste estudo apontam uma relação com o volume de atividade realizada pelos ciclistas e o predomínio da espécie, o que pode estar em concordância com nossos achados uma vez que ambos os trabalhos foram realizados com atletas de *endurance*. Além disso, trabalhos com *enterotipos* apontam que a predominância do gênero *Prevotella* está relacionado com um perfil alimentar com alto teor de fibras (FILLIPO *et al.* 2010; DAVID *et al.* 2014).

Encontramos em nossos resultados, um aumento da espécie *Lactobacillus Ruminis* no grupo probiótico. Essa espécie de bactéria comensal pertence ao filo Firmicutes e a família dos Lactobacilaceae, sendo uma das espécies de *Lactobacillus* mais abundantes no intestino de mamíferos. É uma bactéria que utiliza alguns tipos específicos de carboidratos como fonte de energia, sendo considerada como potencial probiótico por possuir flagelinas e pilus, suprimir o crescimento de patógenos, melhorar a integridade da função barreira e ter ação anti-microbiana (possível produtor de bacteriocina) (YU *et al.*, 2017). Essa espécie de bactéria é apontada por sua propriedade imunomodulatória (DONNEL *et al.*, 2015), capaz de induzir a diminuição de NF κ B e IL-8 (via TLR-2) (pela presença de flagelinas e lipoproteínas) ou via Toll-like 5, sendo essa ação importante para a tolerância imunológica, equilíbrio dinâmico e homeostase intestinal (Yu *et al.*, 2015).

Nessa mesma linha, o trabalho com animais realizado por Gill e Rutherford (2001) com *Lactobacillus Rhamnosus* HN001 de maneira isolada, aponta que este microrganismo é capaz de melhorar a capacidade fagocítica das células imunológicas peritoniais e circulantes mesmo *post mortem* parecendo ser a magnitude da melhora dependente da concentração (dose) do microorganismo. Miettinen *et al.* (2012) em estudo realizado com *Lactobacillus Rhamnosus* GG e *Lactobacillus Rhamnosus* LC705 aponta que ambas as subespécies induzem resposta imunológica por macrófagos (da mucosa intestinal), induzindo a produção de IL1- β e parecendo ser importante para o equilíbrio dinâmico intestinal.

Além disso, de acordo com a comparação entre as diferenças para os grupos, ocorreu um aumento do gênero *Bifidobacterium* no grupo probiótico. Muito possivelmente esse aumento verificado está relacionado com a combinação de espécies utilizadas no probiótico suplementado (composto de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis*). O gênero *Bifidobacterium* pertencente as bactérias ácido lácticas fazem parte do filo Actinobactéria, e da família dos Bifidobacteraceae. De acordo com Feng *et al.* (2019) a abundância de *Bifidobacterium* aumenta de maneira significativa na presença de *Lactobacillus*, havendo uma interinfluência entre os dois gêneros, sendo a presença de ambos os gêneros de bactérias correlacionados com a presença de espécies de bactérias

produtoras de butirato. Conforme esse trabalho, o aumento da abundância de *bifidobacterium* está relacionado com maior alfa-diversidade da microbiota.

Bifidobacteria ssp. são apontados por apresentar grande efetividade na degradação de amido resistente, algumas espécies na degradação de amido, e outras por estarem envolvidas por “*cross-feeding*” com bactérias produtoras de butirato, a partir da produção de acetato e lactato (FLINT *et al.*, 2012).

No presente estudo, encontramos o aumento de *Lactobacillus* e da diversidade da microbiota como sugerido por Feng *et al.* (2019), em relação as bactérias produtoras de butirato, possivelmente, não encontramos o aumento destas espécies por conta curto período de utilização do probiótico.

Para o grupo placebo encontramos um aumento da família *Ruminococcaceae*, sendo a espécie *Faecalibacterium Prausnitzii* a espécie identificada com maior abundância (na amostra em geral). É possível que essa mudança tenha relação com a substância utilizada como placebo (maltodextrina), que pode ser utilizada como substrato para a produção de energia para alguns tipos de bactérias. O trabalho realizado por Sloan *et al.* (2018) realizado com sujeitos saudáveis e alimentação *Low FODMAP*, com a suplementação de 7 gramas de maltodextrina por período de 7 dias, verificou enriquecimento por *Ruminococcaceae*.

O Grupo placebo também apresentou um aumento da espécie *Dorea Longicatena* quando comparada ao grupo probiótico na comparação entre as medidas. Essa espécie de bactéria *Dorea Longicatena* é uma bactéria gram-positiva, sacarolítica, produtora de acetato (TARAS *et al.*, 2002). Trabalhos com o gênero desta bactéria apontam que o gênero *Dorea* está relacionado com o aumento da permeabilidade intestinal e negativamente associada à manutenção da saúde intestinal (MORTAS; BILICI; KARAKAN, 2020), positivamente associada com marcadores de inflamação (BAILE *et al.*, 2011) e produção de gases em pacientes com síndrome do intestino irritado (ENCK *et al.*, 2016).

Porém, estudos com a espécie específica em quadros de disbiose apontam para a *Dorea Longicatena* como uma possível espécie relacionada ao equilíbrio do ambiente intestinal. Em uma pesquisa realizada com portadores de Doença de Crohn, após cirurgia,

pacientes em remissão apresentam aumento do enriquecimento por *Dorea Longicatena* (MONDOT *et al.*, 2016). Um outro estudo realizado com idosos e insuficiência cardíaca apontou redução da abundância dessa espécie de bactéria e de *Eucaterium Rectalle* nessa população quando comparado com controles com ausência de doenças (KAMO *et al.*, 2017)

O Grupo placebo também apresentou um aumento da espécie *Eubacterium Biforme*, pertencente ao filo *Firmicutes* e à família das *Erysipelotrichaceae*. Embora não tenhamos muitas evidências em relação a essa espécie de bactérias, um estudo com Doença de Parkinson aponta que ocorre a diminuição da abundância desta espécie em idosos portadores da doença (BEDARF *et al.*, 2017). Além disso, essa espécie de bactéria faz parte do gênero *Eubacterium*, considerado de maneira geral o gênero produtor de butirato (KESHAVARZIAN *et al.*, 2015).

Relacionando os dados referentes aos sintomas gastrintestinais, endotoxemia e a composição da microbiota intestinal, podemos sugerir que as substâncias utilizadas (placebo e probiótico) foram capazes de induzir diferentes modificações na microbiota intestinal, durante o período de utilização, parecendo ser ambos aliados ao equilíbrio da saúde intestinal dos atletas. Dessa forma, visto que não verificamos pronunciado enriquecimento de espécies de bactérias gram-negativas, considera-se que isso corrobore com nossos achados referentes aos sintomas gastrintestinais (o qual verificamos pequena presença de sintomas e sendo estes leves) e a endotoxemia, não sendo verificado expressivo aumento de LPS circulante após a corrida de maratona.

Não podemos deixar de mencionar que o grupo probiótico apresentou valores de massa gorda significativamente maior que o grupo placebo, e esse dado pode ter alguma influência sobre a microbiota intestinal. O estudo realizado por Allen *et al.* (2017) demonstra que as alterações positivas verificadas em indivíduos submetidos a um programa de treinamento físico estão diretamente correlacionadas de maneira positiva com a diminuição da massa gorda.

Além dessas modificações, encontramos alterações taxonômicas relacionadas a IL-6 plasmática. Um aumento da frequência relativa dos gêneros *Blautia* e *Dorea* foi encontrado nos indivíduos com baixa concentração de IL-6.

Num estudo realizado em indivíduos obesos, esses gêneros de bactérias foram positivamente relacionados com o peso corporal e parâmetros metabólicos como LDL, triglicérides circulantes (ZENG *et al.*, 2019). Um trabalho realizado com indivíduos portadores de Esclerose Múltipla, dentre as alterações verificadas na composição da microbiota intestinal, aponta que esses indivíduos apresentam aumento na abundância relativa dos gêneros *Blautia* e *Dorea*, quando comparado com controles saudáveis. No entanto, é importante mencionarmos que essas alterações foram verificadas em conjunto com outras, e que possivelmente o conjunto de alterações verificadas é que caracterizam a relação com a fisiopatologia da doença.

Encontramos alterações em outros táxons para concentrações média e alta de IL-6. Um aumento da frequência relativa de Pasteurellacea e Porphyromonas endodontalis foi identificado para concentrações médias de IL-6 e o aumento da frequência relativa de Veillonella, Actinomices, Clostridium Islandium e Syntrophomonas foi identificada para elevadas concentrações de IL-6, no entanto, 97% da amostra estava na classificação baixa. Somente 1 indivíduo da amostra geral se enquadrava na classificação alta, dessa forma, é possível que a relação encontrada entre os táxons e os índices de IL-6 sejam características específicas do ecossistema microbiano deste indivíduo.

Assim, em relação aos dados relacionados à microbiota intestinal, podemos sugerir que: 1-) Ocorreram diferentes alterações na composição da microbiota intestinal para os diferentes grupos e que essas alterações foram possivelmente induzidas pela suplementação utilizada; 2-) As alterações vistas parecem ser positivas em relação a saúde intestinal uma vez que não foram verificadas alterações de bactérias gram-negativas ou que tenham associação com doenças;

1.18. Função dos Neutrófilos

1.18.1. Fagocitose e produção de peróxido

Leucocitose, neutrofilia, redução na função das células imunológicas após a realização de uma corrida de maratona e melhora da resposta 5 dias após realização da corrida de maratona. De maneira geral, os resultados encontrados no presente estudo se assemelham à clássica resposta imunológica vista em relação ao exercício de longa duração (NIEMAN, 1997; CAMPBELL; TURNER, 2018; SUZIKI *et al.*, 2018).

Mais especificamente, em relação a função dos neutrófilos, verificamos diminuição da atividade fagocítica e da produção de radicais peróxido após o período de suplementação (prova) e no momento prova (1 hora após a prova) em ambos os grupos, esses dados parecem estar em concordância com o aumento de IL-10, a qual de acordo com Suzuki *et al.* (2002) e Santos *et al.* (2016), esta citocina pode inibir a produção de espécies reativas por neutrófilos. Segundo Nieman (1997), somente o exercício moderado (<60% VO₂pico) tende a aumentar a produção de espécies reativas pelos neutrófilos logo após a realização da atividade, havendo diferença na resposta apresentada entre indivíduos treinados e não treinados (PYNE *et al.*, 1994)

Possivelmente, nossos resultados estão de acordo com o sugerido por Smith (1990) e confirmados por Tinda *et al.*, (2003), os quais apontam que períodos prolongados de treinamento diminuem a capacidade dos neutrófilos de produzir espécies reativas, prejudicando sua "*killing capacity*". De acordo com o estudo de Chinda *et al.* (2003), ocorre redução da função fagocítica e da produção de radicais livres pelos neutrófilos após a corrida de maratona, de acordo com os autores, há uma relação entre a redução da capacidade fagocítica e a diminuição da expressão de receptores CD16 na membrana dos neutrófilos. Os autores sugerem que o aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL-1-ra e IL-10 podem regular a diminuição da expressão destes receptores CD16, tendo efeito sobre a capacidade fagocítica.

Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem no local da inflamação, assim, sua atividade aumenta a quantidade de substâncias quimioatraentes para recrutar mais neutrófilos para o local da inflamação e as células mononucleares (monócitos) (PYNE, 1994).

Não podemos deixar de mencionar que, como estamos tratando do fenômeno relacionado ao exercício físico, os consecutivos estímulos de contração muscular causam de forma aguda dano muscular e um processo inflamatório, e que o processo de reparação tecidual é iniciado pelos fagócitos (neutrófilos e monócitos) que fagocitam os debris celulares. É possível que fatores liberados pela musculatura esquelética durante a realização do exercício (IL-15; IL-8) modulam a migração dos neutrófilos para que tenham um perfil de reparação ao dano e não para que sua atividade tenha o perfil de proteção contra agentes invasores.

É válido mencionar que os resultados encontrados nos estudos relacionados a atividade dos neutrófilos apresentam resultados divergentes, e isso pode ser explicado pelas diferenças entre os desenhos experimentais dos trabalhos, tipo de exercício (intensidade/duração) e momentos nos quais as coletas são realizadas. Não podemos deixar de apontar que nenhum estudo realizado até o momento apresentou desenho experimental semelhante ao nosso, o que dificulta a comparação quando o assunto em questão é a atividade dos neutrófilos. Apesar dos dados discutidos em relação a capacidade fagocítica ou produção de radicais peróxido dos neutrófilos, no presente estudo, em relação a suplementação de probióticos não foram verificadas alterações em relação a estes parâmetros.

1.18.2. Produção de Citocinas

Os Neutrófilos são células quiescentes e que se tornam ativos a partir de um desafio (chegada que patógeno/corpo estranho); no presente estudo, os neutrófilos passaram por desafio com LPS e a partir daí verificamos o tipo de resposta para os diferentes grupos.

Citocinas são sinalizadores intracelulares que regulam a inflamação e resposta imunológica (HASEGAWA *et al.*, 2016), nessa pesquisa, em relação produção de citocinas pelos neutrófilos, ambos os grupos apresentaram aumento da produção de IL-4, IL-8, IL-2, IL-15 e IFN- γ quando comparado o momento recuperação com todos os outros momentos. Somente para a produção de IL-10, o grupo placebo apresentou aumento significativo quando comparados o momento basal e pré-prova com o momento prova. Esses resultados nos permitem discutir que nos momentos basal, prova e pós prova a produção de citocinas pelos neutrófilos fica diminuída, e que após 5 dias de recuperação essas células melhoram (ou retomam) sua capacidade de resposta frente a um estímulo.

Segundo Subramanian *et al.* (2017), o aumento da produção de IL-4 pelos neutrófilos tem relação com a diminuição da apoptose das células e diminuição da inflamação. As outras citocinas encontradas aumentadas (IL-2, IL-15, IFN- γ) têm atividade pró-inflamatória. IL-15 estimula fagocitose, a produção de quimiocinas (ETHUIN *et al.*, 2004) proliferação e ativação de linfócitos T, recruta outros tipos celulares (monócitos e células NK) para o local da inflamação e a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (MURO *et al.*, 2001). IFN- γ estimula a produção de TNF- α pelos próprios neutrófilos, estimula degranulação e também age como sinalizador para imunidade adaptativa em condição de inflamação (ETHUIN *et al.*, 2004)

De maneira geral, as citocinas IL-2, IL-15, IFN- γ são apontadas por estarem aumentadas em doenças inflamatórias pulmonares (bronquite, tuberculose, sarcoidose, asma) (ETHUIN *et al.*, 2004; MURO *et al.*, 2001). É possível que o perfil de comportamento verificado, quanto à produção de citocinas pelos neutrófilos em comparação as citocinas 5 dias após a prova, seja um reflexo da exposição vivenciada pelos atletas durante a maratona, em relação a patógenos e poluentes, uma vez que, durante a maratona, estes sujeitos passaram um período maior que 3 horas em hiperventilação, broncodilatação e com a perfusão alveolar aumentada.

No que se refere ao pós-exercício (momento prova), ambos os grupos apresentaram aumento da produção de IL-8 uma hora após a realização da corrida de maratona, uma resposta aguda em relação ao exercício esperada e já descrita em estudos anteriores (SANTOS *et al.*, 2016; PYNE, 1994; NIEMAN, 1997)

Nossos achados sugerem que 5 dias após a realização do exercício de longa duração, é possível que as células já estejam reestabelecendo seu padrão funcional. A literatura aponta que após a realização do exercício prolongado extenuante, o atleta fica mais susceptível ao acometimento por infecções por um período de até duas semanas (NIEMAN *et al.*, 1997; CAMPBELL *et al.*, 2018; WALSH *et al.*, 2018), esse nosso resultado nos permite sugerir que, no que tange especificamente a produção de citocinas pelos neutrófilos, dependendo das condições experienciadas pelo atleta, após a realização da competição o reestabelecimento da atividade pode ocorrer num período menor que de 5 dias.

Embora não tenhamos encontrado alterações significativas, no momento de recuperação o grupo probiótico parece diminuir a dispersão em relação aos valores de IFN- γ ; IL-4; IL-2 e IL-15, isso nos sugere que o período de utilização possa ter sido um fator que impossibilitou a verificação de possíveis alterações referentes as citocinas.

É importante lembrarmos que nosso dado em relação ao tempo de prova possa ter influência sobre a função dos neutrófilos, o grupo probiótico apresentou tempo de prova estatisticamente diferente no grupo placebo. Visto que o grupo probiótico realizou a corrida de maratona num período mais longo, e que esse é o principal fator relacionado à imunossupressão induzida pelo exercício (NIEMAN *et al.*, 2006) é possível que esse resultado referente ao tempo de prova tenha mascarado alguma possível interação entre a função das células e a suplementação de probiótico. No entanto, tal assertiva parece não ter grande impacto sobre os resultados, uma vez que realizamos as análises estatísticas fazendo a divisão dos atletas por tempo de prova (dados não apresentados) e não encontramos alterações significantes em relação a função dos neutrófilos para esse formato.

Em relação à função dos neutrófilos podemos sugerir que: 1-) A suplementação de probióticos não alterou a capacidade fagocítica, produção de radicais peróxido ou a produção das citocinas mensuradas (IL-1; IL-2; IL-4; IL-6; IL-8; IL-10; INF- γ ; TNF- α); 2-) O efeito verificado está relacionado com as alterações inerentes ao exercício físico

1.19. Citocinas Plasmáticas

Em relação às citocinas plasmáticas, verificamos um aumento de IL-10 uma hora após a realização da corrida de maratona, para ambos os grupos, sem haver diferença entre eles, o resultado encontrado está de acordo com trabalhos anteriores relacionados a imunologia do exercício (SUZUKI *et al.*, 2002; PEAKE *et al.*, 2004) embora outros estudos com desenho semelhante ao nosso sugiram que ocorra aumento de outras citocinas como IL-6 e IL-8 após a realização de uma corrida de maratona (SANTOS *et al.*, 2016), verificamos somente aumento de IL-10. Possivelmente, esse resultado tenha ocorrido por conta do momento que realizamos a coleta após a realização da maratona (uma hora após o término da prova) o que está de acordo com os resultados apresentados por Peake *et al.*, (2004).

Os estudos que identificam o aumento de IL-6 verificam tal resultado em coletas realizadas imediatamente após a realização do exercício, uma vez que essa é a primeira citocina que apresenta aumento plasmático durante o exercício, e seu o aumento expressivo verificado no pós exercício está principalmente relacionada com o metabolismo energético durante o exercício (Sugama *et al.*, 2013) e com a sinalização para recrutamento de fagócitos para o local da inflamação (musculatura estriada esquelética) (Pyne, 1994).

De acordo com Suzuki *et al.* (2018), o aumento de IL-6 que ocorre após a realização do exercício está relacionado com o aumento da resposta do hormônio do estresse ao calor e possíveis intervenções realizadas imediatamente após o término do exercício para resfriamento corporal, as quais não foram realizadas no presente estudo. O aumento de IL-8 é apontado por estar relacionado com o estímulo para a atividade quimiotática de neutrófilos e a produção da proteína NAP-1 pelos neutrófilos. Sendo o aumento de IL-10 relacionado com a atividade imunossupressora (inibição e citocinas pró-inflamatórias) (SUZUKI *et al.*, 2000) e inibição da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (SUZUKI *et al.*, 2002).

Em relação a TNF- α e IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-15 verificamos valores mais elevados na coleta basal para ambos os grupos em comparação aos outros momentos. É possível que o comportamento verificado seja um reflexo da última sessão de treino realizada pelos atletas antes do momento da coleta nos momentos basal. Os atletas foram instruídos a não se exercitarem por pelo menos 24 horas antes da realização da coleta, porém, é possível que, por terem consciência do período necessário sem a realização do exercício físico, a última sessão realizada por eles tenha sido bastante intensa, o que pode configurar o aumento das citocinas pró inflamatórias verificadas nesse momento. O estudo realizado por Santo *et al.* (2016) em relação ao exercício prolongado aponta que é verificado o aumento de citocinas plasmáticas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12) até 72 horas após a realização do exercício prolongado.

Em relação às citocinas plasmáticas e aos probióticos, o estudo realizado por West *et al.* (2013), com sujeitos fisicamente ativos utilizando a mesma combinação de espécies de probióticos com dosagem menor por período de 150 dias, apontou que comparado com o grupo placebo, o grupo probiótico apresentou 27% de redução do risco para Infecções do trato respiratório superior. Contudo, nesse no estudo de West *et al.* (2013), a atividade celular e os parâmetros sanguíneos não foram mensurados, não sendo apontados possíveis mecanismos pelos quais os probióticos foram capazes de diminuir a susceptibilidade a infecções destes sujeitos.

Em um outro trabalho (WEST *et al.*, 2014), os pesquisadores avaliaram as citocinas plasmáticas e a atividade da imunidade inata, com a utilização da mesma combinação de espécies de probiótico (*Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidum animalis sub. Lactis*- 1×10^{10} /150 dias). O estudo apontou uma diminuição das concentrações plasmáticas de MPP-1 após suplementação, não sendo encontradas diferenças entre o período pré e pós suplementação para a atividade celular (neutrófilo, monócitos e células NK) ou em relação as concentrações das citocinas plasmáticas.

Os autores sugerem que, possivelmente, o probiótico não alterou a produção de citocinas ou a atividade das células, pois o trabalho foi realizado com um grupo de indivíduos que não apresentavam um comprometimento da atividade imunológica, e que o resultado poderia ser diferente se o estudo fosse realizado com idosos, crianças ou atletas

de *endurance*. Porém, em nosso estudo, realizado com atletas (maratonistas), o resultado observado foi semelhante ao apresentado por West *et al.* (2014).

É importante mencionar que, em ambos os trabalhos realizados por West *et al.* (2013; 2014), os ensaios foram realizados sempre em condição de repouso, ou seja, a possível alteração da atividade imunológica relacionada a realização do exercício físico não foi verificada. No desenho experimental do presente estudo, realizamos as análises em condição de repouso, após o período de suplementação e após a realização do exercício prolongado, não verificando ainda assim algum tipo de alteração da atividade celular ou das concentrações plasmáticas das citocinas frente a tais condições com período de 30 dias de utilização de *L acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*.

Um estudo realizado com crianças saudáveis (3 a 5 anos de idade) e a utilização de *L acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bi-07 (1×10^{10} UFC) por 24 semanas (LEYER *et al.*, 2009) encontrou que o uso do probiótico foi eficiente em diminuir a presença e a duração de sintomas de infecção do trato respiratório superior (febre, coriza, tosse) e em relação ao uso de antibióticos. Os autores sugerem que o resultado visto pode ocorrer a partir da modulação da atividade das células imunológicas via *toll like receptors*.

Os estudos mostram que os probióticos são capazes de reduzir a incidência de infecções respiratórias possivelmente por modular a atividade do sistema imunológico, a microbiota intestinal e por meio de competição em relação a microrganismos invasores que colonizam a superfície das mucosas (WEST *et al.*, 2014). Leyer *et al.* (2009) sugerem que essa diminuição dos sintomas de infecção do trato respiratório superior verificada com a utilização do probiótico possa ocorrer pela habilidade do probiótico de estimular função regulatória as células dendríticas, além de sugerir que a presenças de *Bifidubacterium* na boca possa dificultar a aderência de determinados vírus na mucosa respiratória.

Visto que muito se discute em relação à capacidade da microbiota intestinal de influenciar a função de outros órgãos, é possível que haja um *cross talking* entre as mucosas (intestinal e das vias aéreas superiores), principalmente em relação ao microbioma e tecido linfoide associado a mucosa. Talvez a comparação entre os metabólitos obtidos nas fezes dos sujeitos suplementados e parâmetros salivares possa trazer resultados promissores em relação a tal afirmação.

Essa afirmação poderia ser confirmada pelos dados relacionados ao volume de treinamento realizado pelos atletas pelos recordatórios de treino, porém, tivemos uma grande dispersão no volume semanal apresentado pelos atletas durante o período de suplementação o que dificulta tal assertiva. Além disso, embora não tenhamos observado diferenças estatísticas entre os grupos para o volume de treino, visto que o volume de treino possa ter impacto direto sobre a função imunológica (CAMPBELL; TURNER, 2018), é possível que esta dispersão tenha influenciado no resultado observado em relação à suplementação do probiótico.

Em relação as citocinas plasmáticas podemos sugerir que: 1-) A suplementação de probióticos não alterou a capacidade a produção das citocinas mensuradas (IL-1; IL-2; IL-4; IL-6; IL-8; IL-10; INF- γ ; TNF- α); 2-) O efeito verificado está relacionado as alterações inerentes ao exercício físico.

CONCLUSÃO

A suplementação com a combinação de Probióticos *Lactobacillus acidophilus* (10×10^9) UFC + *Bifidobacterium lactis* (10×10^9) UFC durante período de 30 dias não causou alterações na atividade de neutrófilos ou sobre o perfil de citocinas plasmáticas, foi capaz de alterar o perfil de alfa-1 anti-tripsina verificado entre os grupos, diminuir os valores de lipopolisacarídeo verificados após a realização da maratona e induzir modificações específicas na composição da microbiota intestinal de maratonistas.

REFERÊNCIAS

ABBAS A, LICHTMAN, A.; PILAI, S. *Imunologia Celular e Molecular* - 8ª Ed. **Elsevier**. 2015.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Probióticos**. Brasília, 2008. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/resultadodebusca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2864062&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=probioticos&inheritRedirect=true. Acessado em 15 de setembro de 2018.

ALLEN, J.M.; MAILING, L.J.; NIEMIRO, G.M.; *et al.* Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. **Med Sci Sports Exerc**, v. 50, n. 4, 2018, p. 747–757. doi:10.1249/MSS.0000000000001495

ATARASHI K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. **Science**, v. 21, n. 6015, p. 337-41, 2011.

BÄCKHED, F. *et al.* Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, p.1915-20, 2005.

BAILEY, M.T.; DOWD, S.E.; GALLEY, J.D.; HUFNAGLE, A.R.; ALLEN, R.G.; LYTE, M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 3, 2011, p. 397-407. doi:10.1016/j.bbi.2010.10.023

BARRETT, B.; *et al.* The Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey (WURSS): a new research instrument for assessing the common cold. **Journal of Family Practice**, v. 51, p. 265, 2002

BARRETT, B. The Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey is responsive, reliable, and valid. **Journal of Clinical Epidemiology**, v 58, n. 6, p. 609- 617, 2005.

BARTON, W.; PENNEY, N.C.; CRONIN, O.; *et al.* The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. **Gut**, v. 67, n. 4, 2018, p. 625–633. doi:10.1136/gutjnl-2016-313627

BATATINHA, H.A.P.; BIONDO, L.A.; LIRA, F.S.; CASTELL, L.M.; ROSA-NETO, J.C. Nutrients, immune system, and exercise: Where will it take us?. **Nutrition**, v. 61, 2019, p. 151–156. doi:10.1016/j.nut.2018.09.019.

BEDARF, J.R.; HILDEBRAND, F.; COELHO, L.P.; *et al.* Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients [published correction appears in *Genome Med.* 2017 Jun 29;9(1):61]. **Genome Med**, v. 9, n. 1, 2017. doi:10.1186/s13073-017-0428-y.

BISHOP, N.C. GLEESON, M. Acute and chronic effects of exercise on markers of mucosal immunity. **Frontiers in Bioscience**, v.1, n. 14, p. 4444-4456, 2009.

CAMPBELL, J.P.; TURNER, J.E. Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. **Front Immunol**, v. 9, n. 648, 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.00648

CAMUS, G. *et al.* Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. **Clinical Science**, v. 92, n. 4, p. 415-22, 1997.

CAPALDO, C.T.; NUSRAT, A. Cytokine regulation of tight junctions. **Biochimica Biophysica Acta**, n. 4, p. 864-71, 2009.

CARIO, E.; GERKEN, G.; PODOLSKY, D.K. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1359-74, 2007.

CHEN, J.; CHIA, N.; KALARI, K. *et al.* Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. **Sci Rep**, v. 6, n. 28484, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep28484>.

CHINDA, D. *et al.* A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. **Luminescence**, v.18, n. 6, p. 324-329, 2003.

CLANCY, R.L. *et al.* Reversal in fatigued athletes of a defect in interferon gamma secretion after administration of *Lactobacillus acidophilus*. **Brazilian Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 4, p. 351-4, 2006.

CLARK A; MACH N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. **Journal of Internacional Society Sports Nutrition**, v. 24, p. 13- 43, 2016.

COLBEY, C. *et al.* Upper Respiratory Symptoms, Gut Health and Mucosal Immunity in Athletes. **Sports Medicine**, v. 8, Suppl. 1, p. 65-77, 2018.

COSTA, R.J.S. *et al.* Systematic review: exercise-induced gastrointestinal syndrome-implications for health and intestinal disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 4, n. 3, p. 246-265, 2017.

COSTA ROSA, L.F.B.P.; *et al.* Metabolic and functional changes in lymphocytes and macrophages as induced by ageing. **Physiology Behavior**, v. 53; p. 651-656, 1993.

COX, A.J. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. **British Journal of Sports Medicine**, v. 4, n.4, p. 222-226, 2010.

CREELY, S. J. *et al.* Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. **The American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 292, p. E740-747, 2007.

DAMASCENO MV, Effects of resistance training on neuromuscular characteristics and pacing during 10-km running time trial. **European Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 7, p. 1513-22, 2015.

DAVID, L.A.; MAURICE, C.F.; CARMODY, R. N.; GOOTENBERG, D.B.; BUTTON, J.E.; WOLFE, B.E.; *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, 2014, p. 559–63.

DE MOURA, N.R. Inflammatory response and neutrophil functions in players after a futsal match. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 26, n. 9, p. 2507-14, 2012.

DE OLIVEIRA, E.P.; BURINI, R.C.; JEUKENDRUP, A. Gastrointestinal Complaints During Exercise: Prevalence, Etiology, and Nutritional Recommendations. **Sports Medicine**, v. 44, Suppl.1, p.79-85, 2014.

DOKLADNY, K.; ZUHL, M.N.; MOSELEY, P.L. Intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins with heat and exercise. **Journal of Applied Physiology** .V.120; n.6, p.692-701, 2015.

EDWARDS, J.P. Anxiety and perceived psychological stress play an important role in the immune response after exercise. **Exercise Immunology Review**. V.24, p.26-34,2018.

ENCK, P.; AZIZ, Q.; BARBARA, G.; *et al.* Irritable bowel syndrome. **Nat Rev Dis Primers**, 2016. doi:10.1038/nrdp.2016.14

ESTAKI, M.; PITHER, J.; BAUMEISTER, P.; *et al.* Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. **Microbiome**, v. 4, n. 1, 2016. doi:10.1186/s40168-016-0189-7

ETHUIN, F.; GÉRARD, B.; BENNA, J.E.; BOUTTEN, A.; GOUGEREOT-POCIDALO, M.A.; JACOB, L.; CHOLLET-MARTIN, S. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. **Lab Invest**, v. 84, n. 10, 2004. doi: 10.1038/labinvest.3700148.

FASANO, A.; NOT, T.; WANG, W.; *et al.* Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. **Lancet**, v. 355, n. 9214, p. 1518-1519, 2000. doi:10.1016/S0140-6736(00)02169-3

FENG, Y.; DUAN, Y.; XU, Z.; *et al.* An examination of data from the American Gut Project reveals that the dominance of the genus *Bifidobacterium* is associated with the diversity and robustness of the gut microbiota. **Microbiologyopen**, v. 8, n. 12, 2019. doi:10.1002/mbo3.939

FERRER MD, *et al.* Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. **Journal Sports Science**. V.27, n.1, p.49-58, 2009.

FIELDS, D.A.; GORAN, M.I. Body composition techniques and the four-compartment model in children. **Journal of Applied Physiology**. V.89, p.613-20, 2000.

FIELDS, D.A.; HUNTER, G.R.; GORAN, M.I. Validation of the BOD POD with hydrostatic weighing: influence of body clothing. **International Journal of Obesity Related to Metabolism Disorders**. V.24, p. 200-205, 2000.

FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J.B.; MASSART, S.; *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 33, 2010, p. 14691–6.

FLINT, H.J.; SCOTT, K.P.; DUNCAN, S.H.; LOUIS, P.; FORANO, E.. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. **Gut Microbes**, v. 3, n. 4, p. 289-306, 2012

GILL, H.S.; RUTHERFURD, K.J. Viability and dose-response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. **Br J Nutr**, v. 86, n. 2, 2001. doi: 10.1079/bjn2001402.

GILL, S.K. Circulatory endotoxin concentration and cytokine profile in response to exertional-heat stress during a multi-stage ultra-marathon competition. **Exercise Immunology Review**. V.21, p.114-28. 2015

GILL, S.K; HANKEY, J.; WRIGHT, A.; *et al.* The impact of a 24-hour ultramarathon on circulatory endotoxin and cytokine profile. **Int J Sports**, v. 36, n. 8, 2015, p. 688-95. doi: 10.1055/s-0034-1398535.

GILL, S.K. *et al.* Does Short-Term High Dose Probiotic Supplementation Containing *Lactobacillus casei* Attenuate Exertional-Heat Stress Induced Endotoxaemia and Cytokinaemia? **Internacional Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**. V.26, n.3, p.268-75, 2016.

GILL, S.K. *et al.* The Impact of a 24-h Ultra-Marathon on Circulatory Endotoxin and Cytokine Profile. **Internacional Journal of Sports Medicine**. V.36, n.8, p.688-95, 2015.

GILL, S.K.; TEIXEIRA, A.; RAMA, L.; *et al.* Circulatory endotoxin concentration and cytokine profile in response to exertional-heat stress during a multi-stage ultra-marathon competition. **Exerc Immunol Rev.**, v. 21, 2015, p. 114-128.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; STRUSZCZAK, L. Effects of *Lactobacillus casei* Shirota ingestion on common cold infection and herpes virus antibodies in endurance athletes: a placebo-controlled, randomized trial. **European Journal of Applied Physiology**. V.116, n.8, p.1555-1563, 2016.

GLEESON M, *et al.* Daily probiotic's (*Lactobacillus casei* Shirota) reduction of infection incidence in athletes. **Internacional Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism**. V.21, n.1, p.55-64, 2011.

HAJELA, N. *et al.*, Gut microbiome, gut function, and probiotics: Implications for health. **Indian Journal of Gastroenterology**. V.34, n.2, p.93-107, 2015.

HALL, C.H.T.; CAMPBELL, EL.; COLGAN, S.P. Neutrophils as Components of Mucosal Homeostasis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**. V.4, n.3, p.329-337, 2017.

HASEGAWA, H.; MIZOGUCHI, I.; CHIBA, Y.; OHASHI, M.; XU, M.; YOSHIMOTO, T. Expanding diversity in molecular structures and functions of the IL-6/IL-12 heterodimeric cytokine family. **Front. Immunol**, v. 7, n. 479, 2016.

HAYWOOD, B.A. *et al.* Probiotic supplementation reduces the duration and incidence of infections but not severity in elite rugby union players. **Journal of Science and Medicine in Sports**. V.17, n.4, p.356-60, 2014.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **National Review. Gastroenterology & Hepatology**. V.11, p.506–514. 2014.

HILL DA, ARTIS D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. **Annual Review Immunology**. V. 28, p.623-67, 2010.

HOOPER LV, LITTMAN DR, MACPHERSON AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**. V. 336, n. 6086, p.1268-73, 2012.

HOWLEY, E. T.; POWERS, S. K. **Fisiologia do Exercício** - Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho. 8ª Ed. São Paulo: Manole, 2014 .

HUDGINS, L. C. *et al.* A single intravenous dose of endotoxin rapidly alters serum lipoproteins and lipid transfer proteins in normal volunteers. **Journal of Lipid Research**, V. 44, p. 1989-1498, 2003.

HURLEY, J. C. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. **Clinical Microbiology Reviews**, V. 8, p. 268-292, 1995.

JÄGER, R.; MOHR, A.E.; CARPENTER, K.C.; *et al.* International Society of Sports Nutrition Position Stand: Probiotics. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 16, n. 1, 2019. doi:10.1186/s12970-019-0329-0

JEUKENDRUP, A.E. Training the Gut for Athletes. **Sports Med**, v. 47, suppl. 1, 2017, p. 101–110. doi:10.1007/s40279-017-0690-6

JEUKENDRUP, A.E. *et al.* Relationship between gastrointestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. **Clinical Science**, v.98, n.1, p.47–55,2000.

JONES, A.M.; DOUST; J.H. A 1% treadmill grade most accurately reflects the energetic cost of outdoor running. **Journal of Sports Science**. V.14, n.4, p. 321-7, 1996.

KAMO, T.; AKAZAWA, H.; SUDA, W.; *et al.* Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. **PLoS One**, v. 12, n. 3, 2017. doi:10.1371/journal.pone0174099

KANG, H.J., IM, S.H. Probiotics as an Immune Modulator. **Journal of Nutritional Science and vitaminology**. V.61 Suppl: S103-5, 2015.

KARCZEWSKI, J.; TROOST, F.J.; KONINGS, I.; *et al.* Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 298, n. 6, 2010, p. G851-G859. doi:10.1152/ajpgi.00327.2009

KARHU, E.; FORSGÅRD, R.A.; ALANKO, L.; *et al.* Exercise and gastrointestinal symptoms: running-induced changes in intestinal permeability and markers of gastrointestinal function in asymptomatic and symptomatic runners. **Eur J Appl Physiol**, v. 117, p. 2519–2526, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00421-017-3739-1>

KESHAVARZIAN, A.; GREEN, S.J.; ENGEN, P.A.; *et al.* Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 30, n. 10, 2015, p. 351-1360. doi:10.1002/mds.26307

LAMBERT, C.P. *et al.* Fluid restriction during running increases GI permeability. **Internacional Journal of Sports Medicine**. V.29, n.3, p.194-198, 2008

LAMPRECHT, M. *et al.* Probiotic supplementation affects markers of intestinal barrier, oxidation, and inflammation in trained men; a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. v.9, n.45, p. 1-13, 2012.

LEITE, G.S.F. Probiotics and sports: A new magic bullet? **Nutrition**, v. 60, 2019, p. 152–160. doi:10.1016/j.nut.2018.09.023

LEY, R.E.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**. V. 124, p.837-48, 2006.

LEYER, G.J.; LI, S.; MUBASHER, M.E.; REIFER, C.; OUWEHAND, A.C. Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. **Pediatrics**, v. 124, n.2, 2009. doi: 10.1542/peds.2008-2666.

LIRA, F. S. *et al.* Endotoxin levels correlate positively with a sedentary lifestyle and negatively with highly trained subjects. **Lipids in health and disease**, v. 9, p. 82, 2010.

LUO, H.R.; LOISON, F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. **American Journal of Hematology**. V. 83, p. 288–295, 2008.

MACARDLE, W.D. *Fisiologia do Exercício - Nutrição, Energia e Desempenho Humano*. 7ª Edição. São Paulo:Guanabara Koogan, 2011.

MALM, C. Susceptibility to infections in elite athletes:the S curve. **Scand J Med Sci Sports**, v. 16, n. 1, 2006, p. 4-6. doi: 10.1111/j.1600-0838.2005.00499.x.

MAUGHAN, R.J. *et al.* IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. **British Journal of Sports Medicine**. V. 52, n.7, p.439-455, 2018.

MICHALICKOVA, D. *et al.* Lactobacillus helveticus Lafti L10 supplementation reduces respiratory infection duration in a cohort of elite athletes: a randomized, double-blind,

placebo-controlled trial. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**. V.41 n.7, p.782-789, 2016.

MIETTINEN, M.; PIETILÄ, T.E.; KEKKONEN, R.A.; KANKAINEN, M.; LATVALA, S.; PIRHONEN, J.; ÖSTERLUND, P.; KORPELA, R.; JULKUNEN, I. Nonpathogenic *Lactobacillus rhamnosus* activates the inflammasome and antiviral responses in human macrophages. **Gut Microbes**, v. 3, n. 6, 2012, p. 510-22. doi: 10.4161/gmic.21736.

MOLINA, M. D. C. B. *et al.* Diet assessment in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): Development of a food frequency questionnaire. **Revista de Nutrição**. V. 26, n.2, p. 167-176, 2013

MONDOT, S.; LEPAGE, P.; SEKSIK, P.; *et al.* Structural robustness of the gut mucosal microbiota is associated with Crohn's disease remission after surgery. **Gut**, v. 65, n. 6, 2016, p. 954-962. doi:10.1136/gutjnl-2015-309184

MOREIRA A.; CAVAZZONI, P. B. Monitorando o treinamento através do wisconsin upper respiratory symptom survey -21 e daily analysis of life demands in athletes nas versões em língua portuguesa. **Revista da Educação Física**. V. 20, n.1, p. 109-119, 2009.

MURO, S.; TAHA, R.; TSICOPOULOS, A.; OLIVENSTEIN, R.; TONNEL, AB.; CHRISTODOULOPOULOS, P. ; WALLAERT, B.; HAMID, Q. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**, v. 108, n. 6, 2001.

NIEMAN, D.C. Marathon Training And Immune Functioning. **Journal Sports Medicine**. V.37, n.4-5, P.412-415, 2007.

NIEMAN, D.C. Exercise, infection, and immunity. **Int J Sports Med**, v. 15, suppl. 3, 1994, p. S131–S141. doi:10.1055/s-2007-1021128

O' DONNELL, M.M.; HARRIS, H.M.; LYNCH, D.B.; ROSS, R.P.; O'TOOLE, P.W. *Lactobacillus ruminis* strains cluster according to their mammalian gut source. **BMC Microbiol**, v. 15, n. 80, 2015. doi:10.1186/s12866-015-0403-y

OHKUBO, T. *et al.* Impaired superoxide production in peripheral blood neutrophils of germ-free rats. **Scandinavian Journal of Immunology**. V.32, p.727-729, 1990

OHKUBO, T. *et al.* Peripheral blood neutrophils of germfree rats modified by in vivo granulocyte-colonystimulating factor and exposure to natural environment. **Scandinavian Journal of Immunology**. V. 49, p.73-7, 1999.

PETERS, H.P. *et al.* Gastrointestinal symptoms in long-distance runners, cyclists, and triathletes: prevalence, medication, and etiology. **American Journal of Gastroenterology**. V. 94, n.6, p.1570-1581, 1999.

PETERS, H.P. *et al.* Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. **Gut**. V.48, n.3, p.435-439, 2001.

PETERSEN, L.M.; BAUTISTA, E.J.; NGUYEN, H.; HANSON, B.H.; CHEN L.; LEK, S.H.; SODERGREN, E.; WEINSTOCK, G.M. Community characteristics of the gut microbiomes of competitive cyclists, **Microbiome**, v. 5, n. 98, 2017.

PICK E; MIZEL D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunology Methods**. V.46, n.2, p. 211-226, 1981.

PUGH, J.N. *et al.* Gastrointestinal symptoms in elite athletes: time to recognise the problem? **British Journal of Sports Medicine**. V.52, n.8, p.487-488, 2018a.

PUGH, J.N. *et al.* Severity and Potential Nutritional Causes of Gastrointestinal Symptoms during a Marathon in Recreational Runners. **Nutrients**. V.10, n.7, pii:E811. 2018b

PUGH, J.N.; KIRK, B.; FEARN, R.; MORTON, J.P.; CLOSE, G.L. Prevalence, severity and potential nutritional causes of gastrointestinal symptoms during a marathon in recreational runners. **Nutrients**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10070811>

PUGH, J.N.; SPARKS, A.S.; DORAN, D.A.; *et al.* Four weeks of probiotic supplementation reduces GI symptoms during a marathon race. **Eur J Appl Physiol**, v. 119, n. 7, 2019, p. 1491–1501. doi:10.1007/s00421-019-04136-3

PYNE, D.B. *et al.* Probiotics supplementation for athletes - clinical and physiological effects. **European Journal of Sport Science**. V.15, n.1, p.63-72, 2015.

REHRER, N.J. *et al.* Effect of exercise on portal vein blood flow in man. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. V.33, n.9, p.1533-7, 2001.

REHRER, N.J.; MEIJER, G.A. Biomechanical vibration of the abdominal region during running and bicycling. *The journal of Sports Medicine and Physiology Fitness*. V.31, n.2, p.231-234, 1991

RINGEL, Y.; RINGEL-KULKA, T.; MAIER, D.; CARROLL, I.; GALANKO, J.A.; LEYER, G.;

PALSSON, O.S. Clinical trial: Probiotic Bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 Versus Placebo for the Symptoms of Bloating in Patients with Functional Bowel Disorders - a Double-Blind Study. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 6, p. 518-525, p. 2011.

ROBERTS, J.D. *et al.* An exploratory investigation of endotoxin levels in novice long distance triathletes, and the effects of a multi-strain probiotic/prebiotic, antioxidant intervention. **Nutrients**. V. 8, n.11, pii: E733, 2016.

ROUND, J.L.; MAZMANIAN, S.K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. V.107, n.27, p.12204-12209, 2010.

ROWELL, L.B.; BLACKMON, J.R.; BRUCE, R.A. Indocyanine green clearance and estimated hepatic blood flow during mild to maximal exercise in upright man. *The journal of Clinical Investigations*.V.43, p. 1677-1690, 1964.

SÁNCHEZ B. *et al.* Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition of Food Research**. V. 61, n.1, 2017.

SANTOS, V.C. *et al.* Changes in lymphocyte and neutrophil function induced by a marathon race. **Cell Biochemistry and Function**. V.31,n.3,p.237-243,2013.

SANTOS, V.C.; SIERRA, A.P.R.; OLIVEIRA, R.; CAÇULA, K.G.; MOMESSO, C.M.; SATO, F. T.; SILVA, M.B.B.; OLIVEIRA, H.H.; PASSOS, M.E.P.; SOUZA, D.R.; GONDIM, O.S.; BENETTI, M., LEVADA-PIRES, A.C.; GHORAYEB, N.; KISS, M.A.P.D.M.; GORJÃO, R. ; PITHON-CURI, T.C.; CURY-BOAVENTURA, M.F. Marathon Race Affects Neutrophil Surface Molecules: Role of Inflammatory Mediators. **PLoS One**, v. 11, n. 12, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0166687. eCollection 2016.

SAWKA, M.N. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and fluid replacement. *Medicine and Science Sports and Exercise*. V.39, n.2, p.377-390, 2007.

SHEPHARD, R.J. Adhesion molecules, catecholamines and leucocyte redistribution during and following exercise. **Sports Medicine**. V. 33, p. 261-284, 2000.

SHING, C.M. *et al.* Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflammation and exercise performance in the heat. **European Journal of Applied Physiology**. V.114, n.1, p. 93-103, 2014.

SLOAN, T.J.; JALANKA, J.; MAJOR, G.A.D.; KRISHNASAMY, S.; PRITCHARD, S.; ABDELRAZIG, S.; KORPELA, K.; SINGH, G.; MULVENNA, C.; HOAD, C.L.; MARCIANI, L.; BARRETT, D.A.; LOMER, M.C.E.; DE VOS, W.M.; GOWLAND, P.A.; SPILLER, R.C. A low FODMAP diet is associated with changes in the microbiota and reduction in breath

hydrogen but not colonic volume in healthy subjects. **PLoS One**, v. 13, n. 7, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0201410. PMID: 30048547; PMCID: PMC6062106.

SMITH, J.A.; TELFORD, R.D.; MASON, M.; WEIDEMANN, M.J. Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. **International Journal of Sports Medicine**, v. 11, p. 179-187, 1990.

STRASSER, B. et al. Probiotic supplements beneficially affect tryptophan-kynurenine metabolism and reduce the incidence of upper respiratory tract infections in trained athletes: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **Nutrients**. V.8, n.11, pii: E752, 2016.

STRAUB, R.H.; CUTOLO, M.; BUTTGEREIT, F.; PONGRATZ, G. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. **J Intern Med**, v. 267, n. 6, 2010., p. 543-60. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02218.x.

SUBRAMANIAN, K.; BERGMAN, P.; HENRIQUES-NORMARK, B.; Vitamin D Promotes Pneumococcal Killing and Modulates Inflammatory Responses in Primary Human Neutrophils. **J Innate Immun**, v. 9, n. 4, 2017, p. 375-386. doi:10.1159/000455969

SUGAMA, K.; SUZUKI, K.; YOSHITANI, K.; SHIRAISHI, K.; KOMETANI, T. Urinary excretion of cytokines versus their plasma levels after endurance exercise. **Exerc Immunol Rev.**, v. 19, n. 29, 2013, p. 29-48.

SUZUKIK, Katsuhiko. Cytokine Response to Exercise and Its Modulation. **Faculty of Sport Sciences**, 2017

SUZUKI, K.; NAKAJI, S.; YAMADA, M.; LIU, Q.; KURAKAKE, S.; OKAMURA, N.; KUMAE, T.; UMEDA, T.; SUGAWARA, K. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 2, 2003. doi: 10.1249/01.MSS.0000048861.57899.04. PMID: 12569227.

TARAS, D.; SIMMERING, R.; COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A.; BLAUT, M. Reclassification of *Eubacterium formicigenerans* Holdeman and Moore 1974 as *Dorea formicigenerans* gen. nov., comb. nov., and description of *Dorea longicatena* sp. nov., isolated from human faeces. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, 2002, p.423-428. doi:10.1099/00207713-52-2-423

THAISS, C.A. *et al.* The interplay between the innate immune system and the microbiota. **Current Opinion Immunology**. V.26, p.41-48, 2014.

THOMAS, D.T.; ERDMAN, K.A.; BURKE, L.M. American College of Sports Medicine Joint Position Statement. Nutrition and Athletic Performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 48, n. 3, 2016, p. 543–568. doi:10.1249/MSS.0000000000000852

TIMMERMAN, H.M. *et al.* Monostrain, multistrain and multispecies probiotics-A comparison of functionality and efficacy. **Internacional Journal of Food Microbiology**. V. 96, n.3, p. 219-33, 2004

VAN BAARLEN, P. *et al.* Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**. V.108, Suppl 1, p. 4607-14, 2011.

VAN DE VYVER, M. *et al.* Neutrophil and monocyte responses to downhill running: Intracellular contents of MPO, IL-6, IL-10, pstat3, and SOCS3. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**. V. 26, n.6, p.638-47, 2015.

WALSH, N.P. *et al.* Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exercise Immunology Review**. V. 17, p. 6-63, 2011.

WALSH, N.P.; OLIVER, S.J. Exercise, immune function and respiratory infection: An update on the influence of training and environmental stress. **Immunology Cell Biology**. V.94, n.2, p.132-139, 2016.

WALSH, N.P. Recommendations to maintain immune health in athletes. **European Journal of Sport Science**. V.18, n., p.820-831,2018.

WANG F, *et al.* Dynamic alteration of the colonic microbiota in intestinal ischemia-reperfusion injury. **Plos One**. V.7, n.7, e42027, 2012.

WANG, S.; LI, H.; DU, C.; *et al.* Effects of dietary supplementation with *Lactobacillus acidophilus* on the performance, intestinal physical barrier function, and the expression of NOD-like receptors in weaned piglets. **PeerJ**, 2018. doi:10.7717/peerj.6060

WELLS, J.M. *Et al.* Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**. V.108, Suppl 1, p.4607-4614, 2011.

WEST, N.P. *et al.* Lactobacillus fermentum (PCC®) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: a randomized control trial in athletes. **Nutrition Journal**. V.10, n.30, 2011

WEST, N.P. *et al.* Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals. **Clinical Nutrition**. V.33, n.4, p.581-587, 2014.

WU, H.J.; WU, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut microbes**, v. 3, n. 1, p. 4–14, 2012.

YU, X.; ÅVALL-JÄÄSKELÄINEN, S.; KOORT, J.; *et al.* A Comparative Characterization of Different Host-sourced *Lactobacillus ruminis* Strains and Their Adhesive, Inhibitory, and Immunomodulating Functions. *Front Microbiol*, v. 8, n. 657, 2017. doi:10.3389/fmicb.2017.00657

ZENG, Q.; LI, D.; HE, Y.; LI, Y.; YANG, Z.; ZHAO, X.; LIU, Y.; WANG, Y.; SUN, J.; FENG, X.; WANG, F.; CHEN, J.; ZHENG, Y.; YANG, Y.; SUN, X.; XU, X.; WANG, D.; KENNEY, T.; JIANG, Y.; GU, H.; LI, Y.; ZHOU, K.; LI, S.; DAI, W. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities. *Sci Rep*, v. 9, n. 1, 2019 doi: 10.1038/s41598-019-49462-w.

ANEXOS

Dados relacionados o produção de citocinas pelos neutrófilos sem relativização pela massa magra

Produção de citocinas pelos neutrófilos

Em relação as citocinas mensuradas foram encontradas diferenças em relação aos diferentes momentos para Interleucina 4 (IL-4); Interleucina 2 (IL-2); Interleucina 15 (IL-15); Interferon gama (INF- γ) e Interleucina 10 (IL-10).

Para IL-4, IL-2 e IL-15 em ambos os grupos o momento recuperação foi diferentes de todos os outros momento basal (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$); prova (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$); pós prova (PL; $p<0,0001$; PR; $p<0,0001$). Em relação ao INF- γ no grupo placebo o momento recuperação foi diferentes de todos os outros momento basal ($p<0,0001$); prova ($p<0,0001$); pós prova ($p<0,0001$) e para o grupo probiótico o momento recuperação foi diferente do basal ($p=0,04$) e do pós prova ($p=0,04$).

Para IL-10 perfil observado foi um pouco diferente do apresentado pelos outras citocinas, para o grupo placebo o momento pós prova foi diferente de todos os outros momento, basal ($p=0,002$), prova ($p=0,0003$), recuperação ($p=0,0001$). No grupo probiótico o momento pós-prova foi diferente do momento prova ($p=0,009$) e recuperação ($p=0,002$).

Citocinas plasmáticas

Em relação as citocinas mensuradas foram encontradas diferenças em relação aos diferentes momentos para Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina-1-beta (IL1- β), Interleucina 4 (IL-4), Interferon gama (INF- γ); Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 15 (IL-15).

Em relação ao INF- γ somente o grupo placebo apresentou alteração, sendo o momento basal foi diferente dos momentos pós prova ($p=0,03$). Em relação a IL-10 ambos os grupos apresentaram resultados semelhantes o momento basal foi diferente do momento pós prova (PLA; $p=0,0005$; PRO; $p=0,007$), prova diferente do pós prova (PLA; $p=0,01$; PRO; $p=0,0003$), pós prova diferente do recuperação (PLA; $p=0,0002$; PRO; $p=0,002$). Em relação a IL-15, para o grupo placebo o momento basal foi diferente de todos os outros momentos, prova ($p<0,0001$), pós-prova ($p<0,0001$), recuperação ($p<0,0001$). O grupo probiótico o momento prova foi diferente do momento pós prova ($p=0,03$) e recuperação ($p=0,02$). Em relação a IL1- β , para o grupo placebo o momento basal foi diferente de todos os outros momentos, prova ($p=0,04$), pós-prova ($p<0,0001$), recuperação ($p<0,0001$). O grupo probiótico o momento basal foi diferente do momento pós prova ($p=0,03$) e recuperação ($p=0,0004$). Para IL-2 o grupo placebo no momento basal foi diferente de todos os outros momentos, prova ($p<0,0001$), pós-prova ($p<0,0001$), recuperação ($p<0,0001$) e para o grupo probiótico, o momento prova foi diferente do momento pós prova ($p=0,01$) e recuperação ($p=0,0004$). Para IL-4 o grupo placebo no momento basal foi diferente de todos os outros momentos, prova ($p=0,005$), pós-prova ($p<0,0001$), recuperação ($p<0,0001$) e para o grupo probiótico, o momento prova foi diferente do momento pós prova ($p=0,002$) e recuperação ($p=0,0004$). Em relação ao TNF- α ambos os grupos apresentaram resultados semelhantes, o momento basal foi diferente de todos os outros momentos, prova (PLA; $p=0,0001$; PRO; $p=0,0007$), pós-prova (PLA; $p<0,0001$; PRO; $p=0,0002$), recuperação (PLA; $p=0,0001$; PRO; $p<0,0001$).

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**1. DADOS DO INDIVÍDUO**

Nome completo

Sexo

☐
☐

Masculino

Feminino

RG

Data de
nascimento

Endereço
completo

CEP

Fone

e-mail

2. RESPONSÁVEL LEGAL

Nome completo

Natureza (grau de parentesco, tutor,
curador, etc.)

Sexo ☐ Masculino
☐ Feminino

RG

Data de
nascimento

Endereço
completo

CEP

Fone

e-mail

Título do Projeto de Pesquisa: Exercício Agudo Prolongado Extenuante, Suplementação de Probióticos e Função Imunológica no período de recuperação pós esforço

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Antônio Herbert Lancha Jr. e Prof. Geovana Silva Fogaça Leite.

Cargo/Função: Professor /Estudante de Doutorado

4. Avaliação do risco da pesquisa:

☐ RISCO MÍNIMO ☒ RISCO BAIXO ☐ RISCO MÉDIO ☐ RISCO MAIOR |
 (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

Duração da Pesquisa: 9 meses

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO INDIVÍDUO

1. Justificativa e os objetivos (s);

Estudos em atletas indicam que, a ingestão diária de probióticos pode resultar na diminuição do número de dias e severidade de doenças do trato respiratório superior e risco de infecções gastrointestinais. Porém grande parte destes estudos se distanciam da real situação vivenciada por atletas no momento da competição. Desta forma o objetivo do presente estudo é verificar após exercício agudo prolongado extenuante se a suplementação de probióticos é capaz de alterar a função imunológica durante o período de recuperação e a influência da suplementação sobre a função das células imunológicas, parâmetros inflamatórios e intestinais (permeabilidade e microbiota).

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos,

Primeiramente gostaríamos de convidá-lo a participar do estudo, caso você aceite o convite, você realizará alguns exames que estão descritos abaixo, na Escola de Educação Física e Esportes – EEFE (USP).

Após estes exames, você será sorteado a participar inicialmente em um dos dois grupos: grupo suplementação o qual receberá por 70 dias a suplementação de cápsulas de gelatina contendo elementos probióticos (10×10^9 UFC) composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, ou grupo placebo o qual receberá por 70 dias capsulas de gelatina contendo gelatina em pó incolor.

Após o período de suplementação refaremos alguns dos exames feitos inicialmente, e após estes exames você será convidado a participar de uma competição de triathlon na distância olímpica.

Logo após a prova e nos 3 dias procedentes você realizará coletas de sangue e fezes para que nós possamos analisar alguns marcadores bioquímicos posteriormente

Numa segunda fase, após um período de 10 semanas da competição nós iniciaremos novamente o período de suplementação fazendo a troca dos grupos, ou seja se você recebeu placebo, agora você receberá a suplementação e se você recebeu a suplementação você receberá o placebo. E então após o período de suplementação realizaremos uma nova prova, e após a prova e nós 3 dias procedentes você realizará coletas de sangue e fezes para que nós possamos analisar alguns marcadores bioquímicos posteriormente.

3. Exames que serão realizados por você no início do estudo

- Teste em esteira - Antes de iniciarmos os procedimentos referentes ao estudo você realizará um teste de esforço em esteira para verificação da função cardíaca, este teste será realizado por um médico e você deverá correr na esteira até seu esforço máximo para sabermos o quanto você consegue correr.

Exames que serão realizados por você no início do estudo e após o período de suplementação

- Teste de Consumo de Oxigênio – Este teste será muito semelhante ao teste anterior porém nele nós verificaremos por meio de um analisador de gases qual é o seu consumo máximo de oxigênio.

- Avaliação da Composição Corporal – Para sabermos o quanto você tem de volume corporal total e as quantidades de gordura e massa livre de gordura, esta avaliação será realizada por meio de um equipamento chamado pletismografo (Bod Pod[®])

- Aplicação de questionários – Serão aplicados alguns questionários referentes ao seu padrão alimentar, rotina de treinos e sintomas de infecções respiratórias e sintomas gastrointestinais, estes questionários serão aplicados pelo pesquisador responsável juntamente com uma das nutricionistas de nosso laboratório.

Procedimentos que serão realizados no início do estudo, após o período de suplementação, no dia da prova antes e após a realização da prova e nos 3 dias procedentes.

- Coleta sanguínea – Será realizada sempre com período de jejum mínimo de 4 horas para determinar as concentrações de fatores inflamatórios e a função de células imunológicas. As coletas de sangue serão sempre realizadas por um profissional de saúde capacitado.

- Coleta de fezes – Será realizada a coleta da primeira defecação feita após a coleta sanguínea para determinar parâmetros de permeabilidade intestinal e sobre a composição da microbiota.

4. Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos 2 e 3

Se você tem medo de agulha, você poderá sentir algum desconforto durante as coletas de sangue, que poderá causar um leve desconforto no local da picada, mas deve desaparecer em 1 dia.

É válido ressaltar que a suplementação testada não trará risco ou queda no desempenho de suas atividades da vida diárias ou em relação prejuízos ao seu desempenho esportivo.

5. Benefícios que poderão ser obtidos;

A partir da suplementação utilizada é possível que você sinta melhora de sua função intestinal, diminuição da incidência de gripes ou resfriados, melhora da função imunológica geral.

Você terá acesso aos resultados referentes ao teste de esteira, consumo de oxigênio e a avaliação da composição corporal, então você poderá utilizá-los para o seu planejamento de treinos habituais a partir de parâmetros individuais e específicos.

6. Garantia de acesso

Durante todo o decorrer do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Prof^a. Geovana Leite, sobre orientação do Prof. Antônio Herbert Lancha Jr. Os quais podem ser encontrados no endereço Av. Professor Melo Moraes – Cidade Universitária - 05508030 – Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicada a Atividade Motora. Telefone : (11)30913096

7. Você poderá desistir ou interromper sua colaboração e deixar de participar deste estudo no momento em que desejar sem qualquer prejuízo a você.
8. Os resultados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes e mantidos em sigilo. Serão divulgados apenas em publicações científicas, sem a menção de seus dados pessoais. Caso você queira, poderá pessoalmente tomar conhecimento dos resultados ao final da pesquisa.
9. Você não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e avaliações. E também não haverá compensação financeira relacionada a sua participação.
10. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisa científica

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. **Exercício físico agudo prolongado extenuante, suplementação de probióticos e função imunológica no período de recuperação pós-esforço.** Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do Voluntário/ representante legal

Data: __/__/__

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntário o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____