

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

STEPHANIE MICHELIN SANTANA PEREIRA

**EFEITOS DO *WHEY PROTEIN* ADICIONADO DE CURCUMINA SOBRE A SAÚDE
INTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P436e
2024
Pereira, Stephanie Michelin Santana, 1997-
Efeitos do *whey protein* adicionado de curcumina sobre a
saúde intestinal de ratos submetidos a exercício físico exaustivo /
Stephanie Michelin Santana Pereira. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (128 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Ceres Mattos Della Lucia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Nutrição e Saúde, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.615>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Exercícios físicos - Aspectos da saúde. 2. Atletas -
Nutrição. 3. Natação. 4. Corridas (Atletismo). 5. Intestinos -
Metabolismo. 6. Cúrcuma. 7. Proteína do soro de leite. 8. Ratos
como animais de laboratório. I. Della Lucia, Ceres Mattos,
1984-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da
Nutrição. III. Título.

CDD 22. ed. 613.7

STEPHANIE MICHELIN SANTANA PEREIRA

**EFEITOS DO *WHEY PROTEIN* ADICIONADO DE CURCUMINA SOBRE A SAÚDE
INTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof^a. Ceres Mattos Della Lucia

Coorientadores:

Prof^a. Hércia Stampini Duarte Martino

Prof^a. Reggiani Vilela Gonçalves

Prof. Antônio José Natali

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2024

STEPHANIE MICHELIN SANTANA PEREIRA

**EFEITOS DO *WHEY PROTEIN* ADICIONADO DE CURCUMINA SOBRE A SAÚDE
INTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição, para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 27/08/2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **STEPHANIE MICHELIN SANTANA PEREIRA**
Data: 26/09/2024 11:40:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Stephanie Michelin Santana Pereira
Autora

Documento assinado digitalmente
 **CERES MATTOS DELLA LUCIA**
Data: 30/09/2024 19:16:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Ceres Mattos Della Lucia
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus pais, Anísio e Gercimare, por todo o amor, apoio incondicional e incentivo ao longo desta jornada acadêmica. Sem vocês, nada disso seria possível. Agradeço também aos meus irmãos, Douglas e Ana Carolina, pela compreensão, companheirismo e pelas palavras de encorajamento nos momentos mais difíceis.

Ao meu noivo, Vinícius Brilhante, meu eterno agradecimento por todo carinho, paciência e suporte emocional. Sua presença constante foi fundamental para que eu conseguisse seguir em frente e concluir esta etapa com tranquilidade e confiança.

Gostaria de estender meus sinceros agradecimentos ao Laboratório de Análise de Vitaminas, onde fui calorosamente acolhida e tive a oportunidade de aprender e crescer profissionalmente. Meu especial reconhecimento à Kelly, Lívy, Lívia, Laura, Michele, Thaís e Karina, pela colaboração, amizade e pelos momentos de partilha que tornaram esta experiência tão enriquecedora.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Ceres Mattos, por sua orientação precisa, paciência e dedicação ao longo deste trabalho. Sua *expertise* e incentivo foram essenciais para a realização deste projeto.

Gostaria de expressar minha gratidão aos meus coorientadores, pelo constante apoio, orientação e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho. Suas contribuições foram essenciais para o aprimoramento e a finalização desta pesquisa. Agradeço também aos membros da banca, por aceitarem o convite para avaliar este trabalho e por suas valiosas sugestões, que certamente enriqueceram a qualidade do estudo.

Não poderia deixar de agradecer aos laboratórios parceiros, Laboratório de Nutrição Experimental, Laboratório de Patologia e Laboratório de Biologia Estrutural, pelos recursos e pela infraestrutura disponibilizados, que foram fundamentais para a realização dos experimentos e análises.

Manifesto minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste mestrado, bem como pela estrutura e suporte oferecidos durante todo o curso.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, que viabilizou minha dedicação exclusiva a este estudo, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto, sem o qual a concretização desta pesquisa não seria possível.

A todos vocês, meu sincero e profundo agradecimento. Esta conquista é, sem dúvida, fruto do esforço conjunto e do apoio de cada um de vocês.

RESUMO

PEREIRA, Stephanie Michelin Santana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **Efeitos do *whey protein* adicionado de curcumina sobre a saúde intestinal de ratos submetidos a exercício físico exaustivo.** Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia. Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino, Reggiani Vilela Gonçalves, Antônio José Natali

O exercício físico, quando praticado de forma moderada, é capaz de promover adaptações positivas no trato gastrointestinal e na microbiota. O exercício físico exaustivo, no entanto, pode interferir na manutenção da saúde intestinal, afetando a permeabilidade intestinal, a inflamação e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Essas alterações podem ser moduladas por meio de modificações da dieta, incluindo componentes capazes de influenciar nessa mudança, como o *whey protein* concentrado (WPC) e a curcumina (CCM), visto que ambos possuem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, além de atuarem na produção de AGCC. Objetivou-se, portanto, revisar os efeitos do exercício físico na saúde intestinal e avaliar o efeito do WPC+CCM na saúde intestinal de ratos submetidos a exercício físico exaustivo (EE). Buscas por artigos originais foram realizadas no PubMed/MEDLINE, Scopus, Web of Science e Embase, e um total de 18 estudos foram selecionados. A análise desses estudos revelou que diferentes intensidades e tipos de exercício, como corrida e natação, podem modificar significativamente a microbiota intestinal, afetando a diversidade, a abundância de certos microrganismos e a funcionalidade metabólica. Assim, os benefícios do exercício físico na saúde intestinal estão associados à intensidade do treinamento, com potencial impacto positivo na composição e função da microbiota. Para o estudo experimental, ratos Wistar com idade de 12 semanas foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos, a saber: G1: grupo controle, que recebeu dieta padrão (AIN-93M; n = 8); G2: grupo controle, que recebeu dieta padrão submetido ao EE (AIN-93M EE; n = 8); G3: grupo proteína concentrada do soro de leite adicionado de curcumina (WPC + CCM; n = 8); G4: grupo proteína concentrada do soro de leite adicionado de curcumina submetido ao EE (WPC + CCM EE; n = 8); G5: grupo curcumina (CCM); e G6: grupo curcumina submetido ao EE (CCM EE; n = 8). Após 4 semanas de dieta, os animais foram submetidos ao EE em natação e, após 24 horas, sofreram a eutanásia, sendo coletadas as fezes do ceco, para avaliação de AGCC, e o intestino (cólon), para avaliação de variáveis inflamatórias, antioxidantes e histológicas. O conteúdo de AGCC permaneceu estável nos grupos teste em comparação aos controles. Em relação aos produtos de peroxidação, ao analisar o efeito do exercício físico, os níveis de malondialdeído permaneceram constantes, no

entanto, o grupo que recebeu WPC+CCM apresentou maiores concentrações de proteína carbonilada. Quanto ao óxido nítrico, observou-se uma redução nos grupos que receberam as intervenções. Em relação às enzimas antioxidantes, os grupos que receberam WPC+CCM e CCM apresentaram as maiores concentrações de superóxido dismutase e catalase, enquanto os níveis de glutatona foram reduzidos. A expressão dos marcadores NF- κ B e IL-1 β , bem como de Nrf2, se manteve estável após a realização do EE nos grupos que receberam WPC+CCM. A espessura da camada muscular longitudinal e a profundidade e espessura das criptas não diferiram entre os grupos. Sob estresse físico, o consumo de CCM, isoladamente ou combinado com WPC, resultou em espessura da mucosa, submucosa e camada muscular circular semelhante ao grupo controle. A administração de CCM, isoladamente ou combinada com WPC, foi eficaz na manutenção do número de células caliciformes após EE. Conclui-se, portanto, que a associação de WPC+CCM preveniu o aumento do estresse oxidativo e da inflamação e preservou a produção de AGCC, a atividade antioxidante e a integridade intestinal dos ratos. Isso pode ser benéfico para a recuperação, desempenho físico e prevenção de distúrbios gastrointestinais associados ao exercício exaustivo.

Palavras-chaves: Natação, cúrcuma, integridade intestinal, proteína concentrada do soro de leite.

ABSTRACT

PEREIRA, Stephanie Michelin Santana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2024. **Effects of whey protein added with curcumin on the intestinal health of rats submitted to exhaustive physical exercise.** Advisor: Ceres Mattos Della Lucia. Co-advisors: Hércia Stampini Duarte Martino, Reggiani Vilela Gonçalves, Antônio José Natali

Physical exercise, when practiced in moderation, is capable of promoting positive adaptations in the gastrointestinal tract and microbiota. However, exhaustive physical exercise can interfere with the maintenance of intestinal health, affecting intestinal permeability, inflammation and the production of short-chain fatty acids (SCFA). These changes can be modulated by dietary modifications, including components capable of influencing this change, such as whey protein concentrate (WPC) and curcumin (CCM), since both have anti-inflammatory and antioxidant properties, in addition to acting on the production of SCFA. Therefore, the aim of this study was to review the effects of physical exercise on intestinal health and to evaluate the effect of WPC+CCM on the intestinal health of rats submitted to exhaustive physical exercise (EE). Searches for original articles were performed in PubMed/MEDLINE, Scopus, Web of Science and Embase, and a total of 18 studies were selected. The analysis of these studies revealed that different intensities and types of exercise, such as running and swimming, can significantly modify the intestinal microbiota, affecting the diversity, abundance of certain microorganisms and metabolic functionality. Thus, the benefits of physical exercise on intestinal health are associated with the intensity of training, with a potential positive impact on the composition and function of the microbiota. For the experimental study, 12-week-old Wistar rats were randomly distributed into 6 groups, namely: G1: the control group that received a standard diet (AIN-93M; n = 8); G2: the control group that received a standard diet submitted to EE (AIN-93M EE; n = 8); G3: the curcumin-added whey protein concentrate group (WPC + CCM; n = 8); G4: the curcumin-added whey protein concentrate group submitted to EE (WPC + CCM EE; n = 8); G5: the curcumin group (CCM); and G6: the curcumin group submitted to EE (CCM EE; n = 8). After 4 weeks of diet, the animals were submitted to EE in swimming and, after 24 hours, they were euthanized, and feces were collected from the cecum for evaluation of SCFA and the intestine (colon) for evaluation of inflammatory, antioxidant and histological variables. The SCFA content remained stable in the test groups compared to the controls. Regarding peroxidation products, when analyzing the effect of physical exercise, malondialdehyde levels remained constant, however, the group that received WPC + CCM presented higher concentrations of carbonyl protein. As for nitric oxide, a reduction was observed in the groups

that received the interventions. Regarding antioxidant enzymes, the groups that received WPC+CCM and CCM presented the highest concentrations of superoxide dismutase and catalase, while glutathione levels were reduced. The expression of NF- κ B and IL-1 β markers, as well as Nrf2, remained stable after EE in the groups that received WPC+CCM. The thickness of the longitudinal muscle layer and the depth and thickness of the crypts did not differ between the groups. Under physical stress, CCM consumption, alone or combined with WPC, resulted in mucosal, submucosal and circular muscle layer thickness similar to the control group. The administration of CCM, alone or combined with WPC, was effective in maintaining the number of goblet cells after EE. Therefore, it is concluded that the association of WPC+CCM prevented the increase in oxidative stress and inflammation and preserved the production of SCFA, antioxidant activity and intestinal integrity of rats. This may be beneficial for recovery, physical performance, and prevention of gastrointestinal disorders associated with exhaustive exercise.

Keywords: Swimming, turmeric, intestinal integrity, whey protein concentrate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Efeitos da dieta e do exercício exaustivo na saúde intestinal.	20
Figura 2. Vias de produção dos ácidos graxos de cadeia curta.	22
Figura 3. Estrutura intestinal.	23
Figura 4. Efeitos do exercício exaustivo no organismo.	27
Figura 5. Estrutura química da curcumina.	35
Figura 6. Desenho experimental.	42

Artigo 1:

Figure 1. PRISMA diagram.	72
Figure 2. Risk of bias assessment: Summary of authors' judgments on the risk of bias item for each included study.	86
Figure 3. Impacts of physical exercise on the microbiota in an animal model.	88

Artigo 2:

Figure 1. Experimental design.	103
Figure 2. Analysis of oxidative balance in the intestine (colon).	108
Figure 3. Gene expression of Nrf2, NF- κ B and IL-1 β in intestine.....	110
Figure 4. Representative photomicrographs of the colon stained with hematoxylin and eosin in rats from experimental groups.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis utilizadas para o cálculo amostral	40
Tabela 2. Composição das dietas experimentais	43
Tabela 3. Sequência de primers utilizados na análise de RT-PCR	51

Artigo 1:

Table 1. PICOS criteria for the inclusion of studies	70
Table 2. Characteristics of the studies included.	76

Artigo 2:

Table 1. Composition of experimental diets	104
Table 2. Sequence of primers used in the RT-PCR analysis	106
Table 3. Quantification of acetic, propionic and butyric acids in cecal samples	107
Table 4. Histomorphometry of the colon of rats submitted or not to exhaustive test.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta

AIN-93M: Dieta padrão

AIN-93M TE: AIN-93M submetido a teste de exaustão

AMPK: 5'-monofosfato-adenosina proteína quinase ativada

ANOVA: Análise de variância

ATP: Trifosfato de adenosina

BSA: Albumina de soro bovino

CAT: Catalase

CCM: Curcumina

CCM TE: CCM submetido a teste de exaustão

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CuSO₄: Sulfato de cobre

DII: Doenças inflamatórias intestinais

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GSH: Glutathiona reduzida

GST: Glutathiona-S-transferase

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

H₃PO₄: Ácido fosfórico

IDA: Ingestão diária aceitável

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-18: Interleucina 18

IL-1 β : Interleucina 1 β

JAMs: Moléculas de adesão juncional

JNK: c-Jun N-terminal quinase

LPS: Lipopolissacarídeo

MDA: Malondialdeído

MEKK1: Proteína quinase 1 ativada por mitógeno

MLCK: Cadeia leve da miosina quinase

Na₂CO₃: Carbonato de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

ON: Óxido nítrico

p38 MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitógeno p38

PCN: Proteína carbonilada

RNA: Ácido ribonucleico

RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SOD: Superóxido dismutase

TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TE: Teste de exaustão

TGI: Trato gastrointestinal

TJs: *Tight junctions*

TMPO: 1,1,3,3-tetrametoxipropano

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

WP: *Whey protein*

WPC: *Whey protein* concentrado

WPC+CCM: *Whey protein* concentrado adicionado de curcumina

WPC+CCM TE: WPC+CCM submetido a teste de exaustão

ZO: Zônulas occludens

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Saúde intestinal.....	18
2.1.1. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).....	21
2.1.2. Morfologia intestinal.....	23
2.1.3. Microbiota intestinal.....	25
2.2. Exercício físico exaustivo.....	26
2.2.1. Exercício físico exaustivo, inflamação, estresse e saúde intestinal.....	28
2.3. <i>Whey protein</i>	29
2.3.1. Peptídeos bioativos.....	30
2.3.2. <i>Whey protein</i> e exercício físico exaustivo.....	31
2.3.3. <i>Whey protein</i> e saúde intestinal.....	32
2.4. Curcumina.....	34
2.4.1. Curcumina e exercício físico exaustivo.....	36
2.4.2. Curcumina e saúde intestinal.....	37
3. JUSTIFICATIVA.....	38
4. OBJETIVOS.....	39
4.1. Objetivo geral.....	39
4.2. Objetivos específicos.....	39
5. HIPÓTESES.....	39
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
6.1. Matéria prima.....	39
6.1.1. Curcumina.....	39
6.1.2. Desenvolvimento do concentrado proteico de soro de leite (WPC) pelo método de spray drying.....	39
6.1.3. <i>Whey protein</i> concentrado adicionado de curcumina.....	40

6.2.	Cálculo amostral	40
6.3.	Ensaio biológico	41
6.3.1.	Animais.....	41
6.3.2.	Desenho experimental	41
6.3.3.	Dietas experimentais.....	42
6.3.4.	Protocolo de exercício exaustivo	43
6.3.5.	Eutanásia.....	43
6.4.	Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).....	44
6.5.	Balço oxidativo	45
6.5.1.	Obtenção do homogenato	45
6.6.	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).....	49
6.6.1.	Extração do RNA	49
6.6.2.	Síntese de cDNA	50
6.6.3.	PCR quantitativo (qPCR)	50
6.7.	Morfologia intestinal.....	51
6.8.	Análise estatística	51
6.9.	Aspectos éticos	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7.	RESULTADOS	68
7.1.	Artigo 1	68
7.2.	Artigo 2	100
8.	CONCLUSÃO GERAL	125
9.	ANEXOS	127
9.1.	Anexo A - Composição centesimal da Theracurmin®	127
9.2.	Anexo B - Certificado de Aprovação no CEUA/UFV	128

1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal tem como principal função a digestão dos alimentos e a absorção dos nutrientes, mas também desempenha papel crucial na proteção contra infecções por patógenos e na manutenção da tolerância imunológica (De Santis *et al.*, 2015; Zhang, 2022). Dentre as células que compõem esse sistema, citam-se as caliciformes, que são mais abundantes na região distal e responsáveis pela produção de muco, que atua como a primeira linha de defesa contra micro-organismos comensais e patógenos, devido a sua composição rica em glicoproteínas (Pelaseyed *et al.*, 2014; Zhang, 2022).

Ainda, a microbiota intestinal desempenha um papel na manutenção da homeostase intestinal. Ela contribui para a digestão de componentes dietéticos complexos, a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), a modulação da resposta imune e a proteção contra patógenos. Alterações na composição da microbiota podem levar à disbiose, o que está associado a várias doenças, incluindo doenças inflamatórias intestinais, obesidade e diabetes. Portanto, a microbiota é um componente chave na manutenção da saúde intestinal, influenciando diretamente a função da barreira intestinal e a resposta imune local (Aya *et al.*, 2021).

A permeabilidade da barreira intestinal é rigorosamente regulada em um intestino saudável. As bactérias comensais ajudam a manter essa barreira fornecendo energia na forma de AGCC e liberando substâncias antimicrobianas que inibem patógenos. Os AGCC promovem a integridade do epitélio intestinal ao induzir as células caliciformes a aumentar a produção de mucina e ao estimular os enterócitos a secretar IL-18, essencial para o reparo epitelial (Paradis *et al.*, 2021).

Entretanto, alguns fatores, como o exercício físico exaustivo, podem interferir na manutenção da saúde intestinal, levando ao processo de disbiose. Se realizado de forma moderada, o exercício físico pode atuar de forma benéfica na saúde intestinal, porém, deve-se ter atenção quanto a sua intensidade e ao volume, uma vez que atividades físicas extenuantes podem afetar a permeabilidade intestinal, a inflamação e a produção de AGCC, ocasionando diarreia e maior translocação bacteriana para a corrente sanguínea (Soares, 2021). Além disso, os exercícios extenuantes levam a um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, com aumento de bactérias patogênicas e redução de espécies benéficas (Aya *et al.*, 2021).

Essas alterações, no entanto, podem ser moduladas por meio de modificações da dieta, incluindo componentes dietéticos capazes de influenciar nessa mudança, como o *whey protein* (WP). O WP é muito conhecido devido aos seus efeitos na recuperação, desempenho corporal

e manutenção da massa magra. Além disso, o WP atua como um substrato para fermentação bacteriana no intestino, contribuindo para a produção de AGCC, fortalecendo a barreira intestinal e modulando a resposta imune. O WP também desempenha função fundamental na defesa contra bactérias patogênicas e outros patógenos no intestino, além de possuir ação prebiótica por meio de seus substratos fermentáveis, como os aminoácidos, peptídeos e lactose (Boscaini *et al.*, 2023; Sánchez-Moya *et al.*, 2017).

Outro componente que pode influenciar nessas mudanças é o consumo de polifenóis, como a curcumina (CCM). A CCM, após ser consumida, se acumula no trato gastrointestinal, e apresenta potencial para restaurar a permeabilidade intestinal. A curcumina é eficaz na atenuação da disfunção da barreira epitelial intestinal, reduzindo a ativação da p38 MAPK induzida por IL-1 β , diminuindo as concentrações séricas de TNF- α e LPS, e melhorando significativamente a função da barreira através da restauração da atividade da fosfatase alcalina intestinal. Ainda, a CCM pode restaurar a composição da microbiota em estados de disbiose, promovendo o crescimento de bactérias benéficas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, enquanto reduz a abundância de microrganismos patogênicos (Dias, 2018; Farzaei; Rahimi; Abdollahi, 2015; Scazzocchio; Minghetti; D'archivio, 2020).

Estudos prévios mostraram que a associação de uma proteína de alto valor biológico, como o WP, a um nutracêutico com potencial antioxidante e anti-inflamatório, como a curcumina, como forma de substituição parcial à oferta de proteína diária, apresentou efeitos promissores na redução do estresse oxidativo, respostas inflamatórias e desempenho físico (Da Conceição *et al.*, 2021; Dias *et al.*, 2022). Além disso, já está bem estabelecido que a utilização do WP e da CCM, isoladamente, promovem a saúde intestinal (Rackerby *et al.*, 2024; Zhu; He, 2024)

Tendo em vista a necessidade de uma recuperação mais eficiente entre atletas e esportistas, por meio da melhora da saúde intestinal, a investigação da associação entre compostos nutricionais com potencial benéfico é fundamental. Além disso, não há na literatura estudos que avaliem os benefícios da associação de polifenóis a um suplemento proteico de alto valor biológico sobre a saúde intestinal. Assim, este trabalho apresenta caráter inovador, com possíveis resultados inéditos e de grande impacto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Saúde intestinal

O intestino compreende a maior superfície do corpo humano exposta ao ambiente externo, abrangendo uma área de cerca de 200–300 m². O intestino desempenha papel fundamental na digestão e absorção de nutrientes, além de regular o sistema imunológico; portanto, um intestino saudável é crucial para o equilíbrio do organismo e pode influenciar vários aspectos da saúde física (Dommett *et al.*, 2005; Portincasa *et al.*, 2021).

A barreira intestinal consiste em um sistema morfológico e funcional complexo, composto pela barreira microbiana intestinal, muco, motilidade e secreção gastrointestinal, barreira epitelial, barreira imunológica (inata e adaptativa), além das barreiras vascular intestinal e hepática (Vancamelbeke; Vermeire, 2017). A saúde intestinal é caracterizada pela permeabilidade seletiva de nutrientes, água e produtos bacterianos, regulada por uma série de fatores neurais, celulares, imunológicos e hormonais. Há uma íntima interação entre nutrientes, como fibras alimentares, proteínas e gorduras, e a microbiota intestinal, que é responsável pela produção de metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta e lipopolissacarídeos. Essa interação é importante na manutenção da integridade da barreira intestinal, que desempenha um papel crucial tanto em condições saudáveis quanto em doenças intestinais (Figura 1) (Portincasa *et al.*, 2021).

Agentes externos possuem forte impacto na função da barreira intestinal, afetando a interação com a microbiota, o sistema imunológico intestinal e a capacidade de secretar peptídeos e imunoglobulinas com propriedades antimicrobianas. Assim, alterações na função e permeabilidade intestinal podem ter implicações significativas na homeostase metabólica (Vancamelbeke; Vermeire, 2017). Os hábitos alimentares são importantes nesse contexto, com potenciais consequências em todos os níveis da barreira intestinal.

Dietas desequilibradas em macro e micronutrientes podem desencadear processos prejudiciais, visto que apresentam a capacidade de remodelar a microbiota intestinal, reduzir a espessura do muco e aumentar a permeabilidade intestinal, resultando em inflamação intestinal de baixo grau com ativação de macrófagos produtores de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e redução da produção de ácidos graxos de cadeia curta protetores (Figura 1) (Portincasa *et al.*, 2021; Sonnenburg; Bäckhed, 2016). Desse modo, a alimentação é um dos pilares mais importantes para manter a saúde intestinal, pois uma dieta diversificada, rica em fibras, polifenóis e proteínas de boa qualidade, é essencial para o bom funcionamento do intestino.

Além disso, o estilo de vida também influencia na saúde do intestino. O exercício físico moderado e regular é importante, pois está associado à melhora da motilidade intestinal, preservação da mucosa e promoção do equilíbrio da microbiota, enquanto o estresse elevado promovido pelo exercício exaustivo pode alterar a composição da microbiota intestinal, aumentar a permeabilidade intestinal, reduzir a motilidade gástrica, gerar lesão epitelial, alterar a integridade da mucosa, resultando em absorção prejudicada de nutrientes e endotoxemia, com posterior inflamação local e sistêmica de baixo grau (Figura 1) (Pedroza Matute; Iyavoo, 2023; Ribeiro *et al.*, 2021).

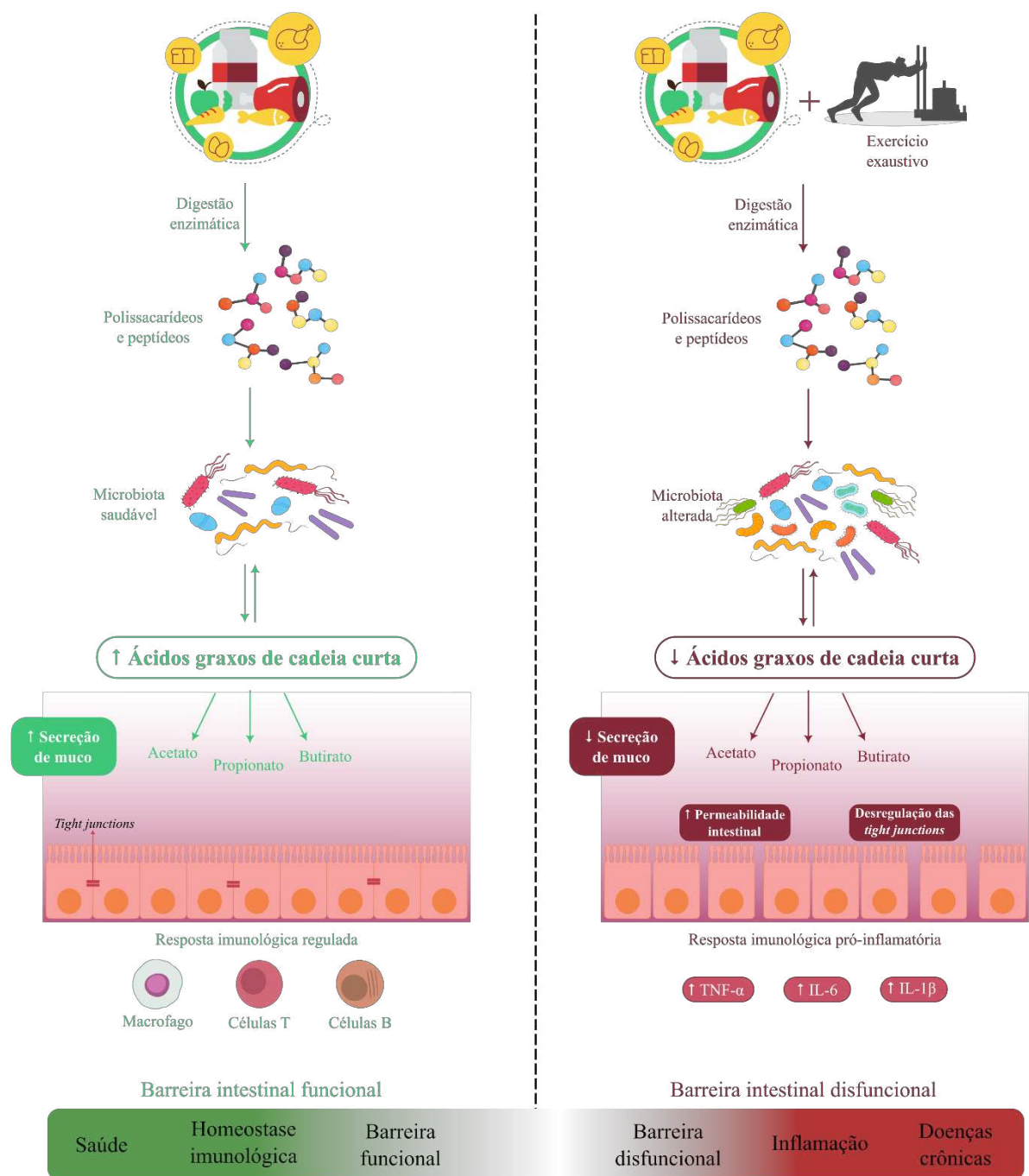


Figura 1. Efeitos da dieta e do exercício exaustivo na saúde intestinal.

Fonte: A autora.

Frente a isso, várias técnicas estão sendo utilizadas para estudar a saúde intestinal *in vivo*. Os métodos variam de análise quantitativa de AGCC, morfologia intestinal, parâmetros envolvidos na resposta antioxidante e anti-inflamatória, e análise da microbiota intestinal (Camilleri; Vella, 2022).

2.1.1. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os ácidos graxos de cadeia curta são componentes que possuem uma cadeia composta de 2 a 6 átomos de carbono. Nos humanos, são produzidos pelas bactérias intestinais, por meio da fermentação de fibras, peptídeos e proteínas ingeridos na dieta. Os AGCC incluem o acetato, propionato, butirato, pentanoato, malonato, dentre outros, sendo os mais predominantes o acetato, butirato e propionato, correspondendo a mais de 90% dos AGCC e encontrados no trato gastrointestinal na proporção de 3:1:1, sendo que essa proporção pode variar de acordo com a dieta, composição da microbiota e fermentação (Cong; Zhou; Zhang, 2022).

A produção dos AGCC envolvem uma série de vias e grupos microbianos. O acetato corresponde a mais da metade dos AGCC presentes nas fezes, sendo considerado o mais abundante no cólon. Esse ácido graxo pode ser produzido por duas vias, sendo a primeira a via do acetil-CoA e a segunda a via Wood-Ljungdahl, estando envolvidas nessas vias as bactérias *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Blautia hydrogenotrophica*, *Clostridium spp.* e *Ruminococcus spp.* Ainda, o acetato pode ser produzido pelas bactérias acetogênicas a partir do dióxido de carbono (Figura 2) (Liu *et al.*, 2021; Louis; Hold; Flint, 2014).

O propionato também pode ser produzido por duas vias: a via do succinato e a via do acrilato. A primeira via envolve a produção do propionil-CoA por meio da descarboxilação do metilmalonil-CoA, participando desta via as bactérias dos filos Bacteroidetes e Firmicutes (Reichardt *et al.*, 2014). Já a via do acrilato envolve as bactérias das famílias *Veillonellaceae* e *Lachnospiraceae*, que fazem a conversão de lactato em propionato (Figura 2) (Hetzl *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2021).

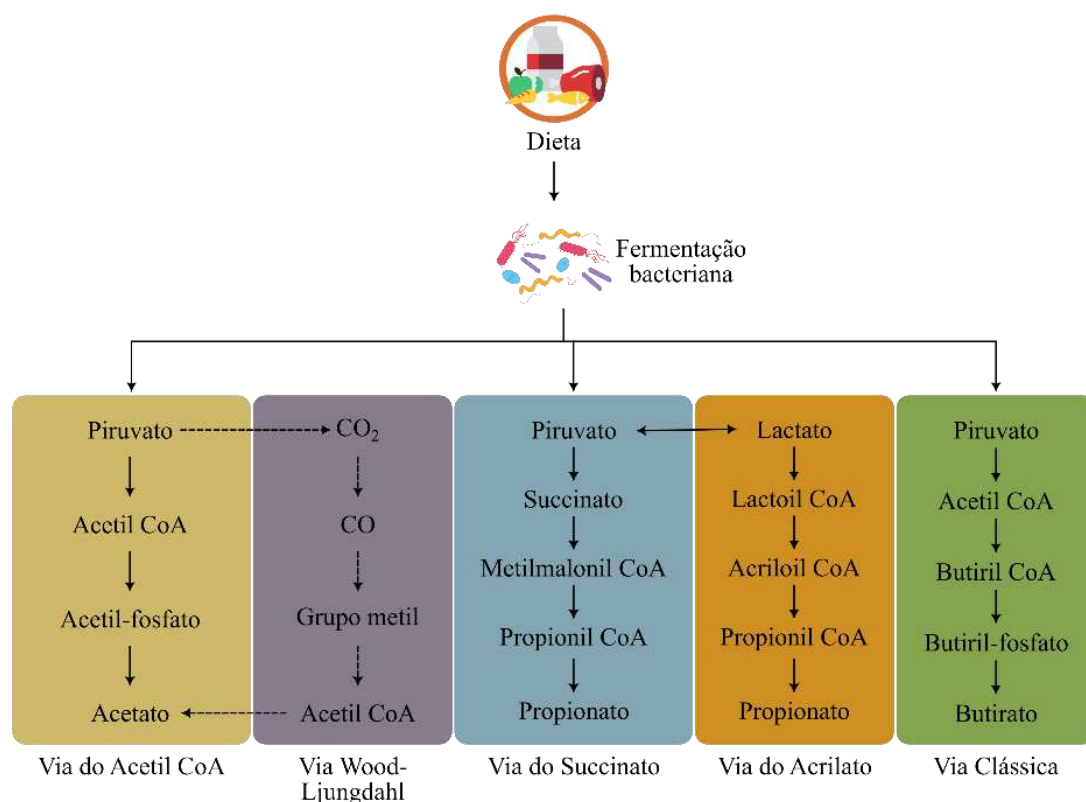


Figura 2. Vias de produção dos ácidos graxos de cadeia curta.

Fonte: A autora.

O butirato, por sua vez, possui muitos meios de produção, pois pode ser produzido de forma clássica pela via do acetil-CoA ou por várias bactérias do filo Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Thermotogae. Uma microbiota rica em bactérias destes filos apresenta enzimas importantes na produção de butirato, como butiril coenzima A desidrogenase, butiril-CoA transferase e butirato quinase (Figura 2). Ainda, o butirato também pode ser produzido pela via da lisina, por meio das proteínas (Liu *et al.*, 2021; Vital; Howe; Tiedje, 2014).

Esses AGCC são absorvidos de forma rápida pelas células epiteliais do trato gastrointestinal, e atuam na regulação de alguns processos celulares, por exemplo, diferenciação, proliferação e apoptose, quimiotaxia, expressão gênica e mecanismos anti-inflamatórios. Depois de serem produzidos, os AGCC serão absorvidos pelos colonócitos através dos transportadores de monocarboxilato dependentes de H⁺ ou de sódio (Den Besten *et al.*, 2013). Após, esses ácidos serão transportados para as demais partes do corpo pela corrente sanguínea, podendo atuar na regulação do metabolismo. Dessa forma, os ácidos graxos possuem a capacidade de atuar na saúde intestinal, por meio da manutenção da integridade da barreira, produção de muco e atividade anti-inflamatória (He *et al.*, 2020).

2.1.2. Morfologia intestinal

A morfologia intestinal desempenha papel importante na saúde e funcionamento adequado do sistema digestivo, otimizando a digestão, a absorção de nutrientes e a defesa contra patógenos. A parede intestinal é composta por várias camadas, incluindo mucosa, submucosa, muscular e serosa, cada uma com funções específicas que contribuem para o processamento de alimentos e a proteção do organismo (O'Brien *et al.*, 2001; Pompili *et al.*, 2021).

A mucosa, camada mais interna do intestino, é diretamente envolvida na absorção de nutrientes e na interação com o conteúdo luminal. Esta camada possui vilosidades e microvilosidades que aumentam significativamente a área de superfície disponível para a absorção. A mucosa é composta pelo epitélio, que inclui enterócitos (células absorptivas), células caliciformes (produtoras de muco), células de Paneth (produtoras de defensinas e enzimas antimicrobianas) e células enteroendócrinas (produtoras de hormônios). A submucosa, por sua vez, é uma camada de tecido conjuntivo que realiza o suporte da mucosa e fornece a ela vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, atuando na regulação das secreções da mucosa e o fluxo sanguíneo local, transportam os nutrientes absorvidos, abriga células imunológicas, além de ajudar na motilidade intestinal (Figura 3) (Thomson *et al.*, 2020; Van Eyken *et al.*, 2014).

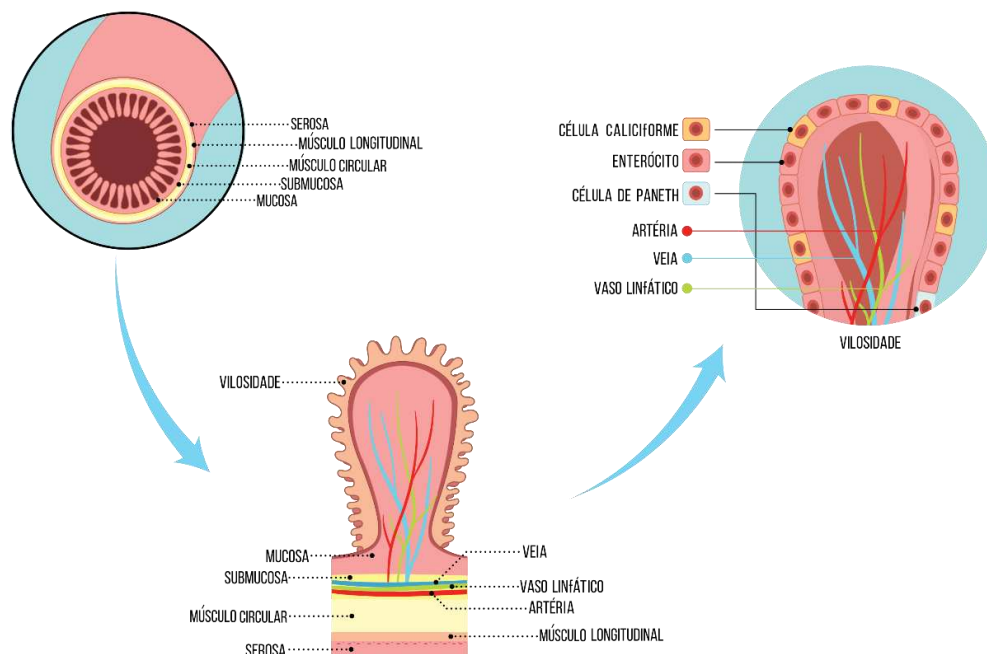


Figura 3. Estrutura intestinal.

Fonte: A autora.

A camada muscular, composta por músculos circulares e longitudinais, é responsável pela motilidade intestinal, que move o conteúdo digestivo ao longo do trato intestinal. O plexo mioentérico (de Auerbach), localizado entre as camadas muscular circular e longitudinal, coordena as contrações musculares para uma motilidade eficiente. A serosa, a camada mais interna do tecido entérico, composta por uma fina camada de tecido conjuntivo coberta por epitélio plano simples (mesotélio), protege as camadas internas e secreta um fluido seroso que reduz o atrito entre as superfícies intestinais e outras estruturas abdominais durante a motilidade (Figura 3) (Thomson *et al.*, 2020; Tullie *et al.*, 2022).

Além das camadas mencionadas, as células caliciformes desempenham funções essenciais na proteção e manutenção do epitélio intestinal. Localizadas ao longo de todo o trato gastrointestinal, especialmente no intestino delgado e no cólon, essas células especializadas produzem e secretam muco, que cria uma camada viscosa que cobre a superfície do epitélio. Esse muco protege as células epiteliais subjacentes contra danos mecânicos, químicos e biológicos, facilitando o transporte do conteúdo intestinal e prevenindo infecções. As células caliciformes também interagem com o sistema imunológico, contribuindo para a defesa contra patógenos e a manutenção da homeostase intestinal (Ensari; Marsh, 2018; Hosoyamada; Sakai, 2005).

As células caliciformes são encontradas nas criptas intestinais, que são invaginações da mucosa que se estendem da base das vilosidades no intestino delgado e da superfície epitelial no cólon. A arquitetura das criptas, junto com as vilosidades no intestino, aumenta a área de superfície total disponível para a absorção de nutrientes, ou seja, uma maior profundidade e espessura das criptas podem contribuir para uma absorção mais eficiente de nutrientes, além de desempenhar um papel na regulação do transporte de íons e água, essencial para a manutenção da homeostase eletrolítica e hídrica do corpo (Ensari; Marsh, 2018; Hosoyamada; Sakai, 2005).

Além disso, essas estruturas abrigam células-tronco responsáveis pela constante renovação do epitélio intestinal; logo a profundidade adequada das criptas garante um nicho protetor, permitindo proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares. Ainda, a profundidade e espessura das criptas determinam a quantidade de células secretoras, como células de Paneth e células caliciformes, influenciando a eficiência da digestão e a proteção da mucosa intestinal. Alterações na profundidade e espessura das criptas estão associadas a diversas condições patológicas, como doenças inflamatórias intestinais, síndrome do intestino irritado e câncer colorretal; sendo assim, a integridade dessas criptas é importante para garantir a saúde intestinal (Ensari; Marsh, 2018; Hosoyamada; Sakai, 2005).

2.1.3. *Microbiota intestinal*

Estima-se que o trato gastrointestinal possui mais de 10^{14} microrganismos, o que corresponde a cerca de 10 vezes mais células bacterianas do que o número de células humanas, além de apresentar mais de 100 vezes a quantidade de conteúdo genômico (microbioma) que o genoma humano (Gill *et al.*, 2006; Thursby; Juge, 2017). Na população adulta, cerca de 90% das bactérias presentes no intestino são dos filos Bacteroidetes e Firmicutes, já os 10% restante são Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia (Álvarez *et al.*, 2021; Arumugam *et al.*, 2011).

Diversos benefícios são proporcionados pela microbiota ao organismo através de várias funções fisiológicas, como por exemplo, a regulação do sistema imunológico, proteção contra patógenos, fortalecimento da integridade intestinal, além de modular o epitélio intestinal. Entretanto, a composição da microbiota pode vir a ser alterada, atrapalhando o funcionamento correto desses mecanismos, causando uma disbiose (Gensollen *et al.*, 2016; Natividad; Verdu, 2013).

Entre os principais metabólitos gerados pela microbiota saudável estão os AGCC, como o acetato, propionato e butirato. Esses AGCC são absorvidos de forma rápida pelas células epiteliais do trato gastrointestinal, e atuam na regulação de alguns processos celulares, por exemplo, diferenciação, proliferação e apoptose, quimiotaxia, expressão gênica e mecanismos anti-inflamatórios (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2016; Ríos-Covián *et al.*, 2016).

A microbiota também participa da biotransformação de polifenóis, compostos bioativos presentes em frutas, vegetais e outros alimentos. Os polifenóis, muitas vezes na forma de glicósidos ou polímeros, são metabolizados pelas bactérias intestinais em formas mais bioativas, como ácidos fenólicos e urolitinas, que têm demonstrado efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anticancerígenos (Cardona *et al.*, 2013; Tomás-Barberán; Selma; Espín, 2016). Além disso, a microbiota contribui para a maturação e a regulação do sistema imunológico, estimulando o desenvolvimento de células T reguladoras (Tregs), que são fundamentais para o controle da resposta imunológica e para a prevenção de reações autoimunes. A microbiota também atua na produção de peptídeos antimicrobianos e na modulação da expressão de genes relacionados à imunidade inata, protegendo o hospedeiro contra a colonização por patógenos (Fan; Pedersen, 2020; Tanoue *et al.*, 2019).

Entretanto, a composição e diversidade da microbiota pode ser alterada devido à presença de gradientes nutricionais, químicos e imunológicos na extensão de todo o intestino. O intestino delgado, por exemplo, possui um trânsito rápido, com alta quantidade de ácidos,

compostos antimicrobianos e oxigênio, que acaba possibilitando o crescimento bacteriano apenas de bactérias anaeróbias facultativa com crescimento rápido (Donaldson; Lee; Mazmanian, 2015). Quanto ao estilo de vida, fatores como estresse, consumo de álcool e tabaco, prática de exercício físico e composição da dieta também podem afetar a microbiota (Chen; Xu; Chen, 2021; Sánchez-Moya *et al.*, 2017).

2.2.Exercício físico exaustivo

Os efeitos benéficos do exercício físico regular moderado a intenso são conhecidos há muito tempo, e sua eficácia na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes, câncer, hipertensão, obesidade, depressão, osteoporose e morte prematura, está bem estabelecida. No entanto, esses benefícios podem ser comprometidos quando o exercício é realizado de forma exaustiva (Suzuki; Hayashida, 2021; Thirumalai *et al.*, 2011). O exercício físico é considerado extenuante quando exige um esforço intenso e prolongado, resultando em um alto nível de fadiga muscular, aumento significativo da frequência cardíaca e respiratória, e uma demanda elevada de energia que pode levar à exaustão. Esse tipo de exercício geralmente ultrapassa a capacidade de resistência física normal de uma pessoa, requerendo um período de recuperação considerável para que o corpo possa se restabelecer (Powers; Howley; Quindry, 2023).

O exercício físico exaustivo promove perturbação na homeostase pró-oxidante intracelular. Durante esse processo, a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, o polimorfoneutrófilo e a xantina oxidase são identificadas como as principais fontes de geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) intracelulares (Thirumalai *et al.*, 2011). Essas EROs representam uma ameaça ao sistema de defesa antioxidante celular quando em excesso no organismo, causando a diminuição da reserva de vitaminas antioxidantes e glutathione, além de aumentar a suscetibilidade dos tecidos ao dano oxidativo (Figura 4) (Estruel-Amades *et al.*, 2020).

Durante o exercício exaustivo, o elevado consumo de oxigênio induz a produção de EROs por meio da cadeia de transporte de elétrons, além de causarem uma liberação significativa de citocinas pró-inflamatórias, levando a danos musculares, lesões teciduais e danos em todas as macromoléculas celulares, como lipídios, proteínas e DNA (Figura 4) (Aguiló *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2020).

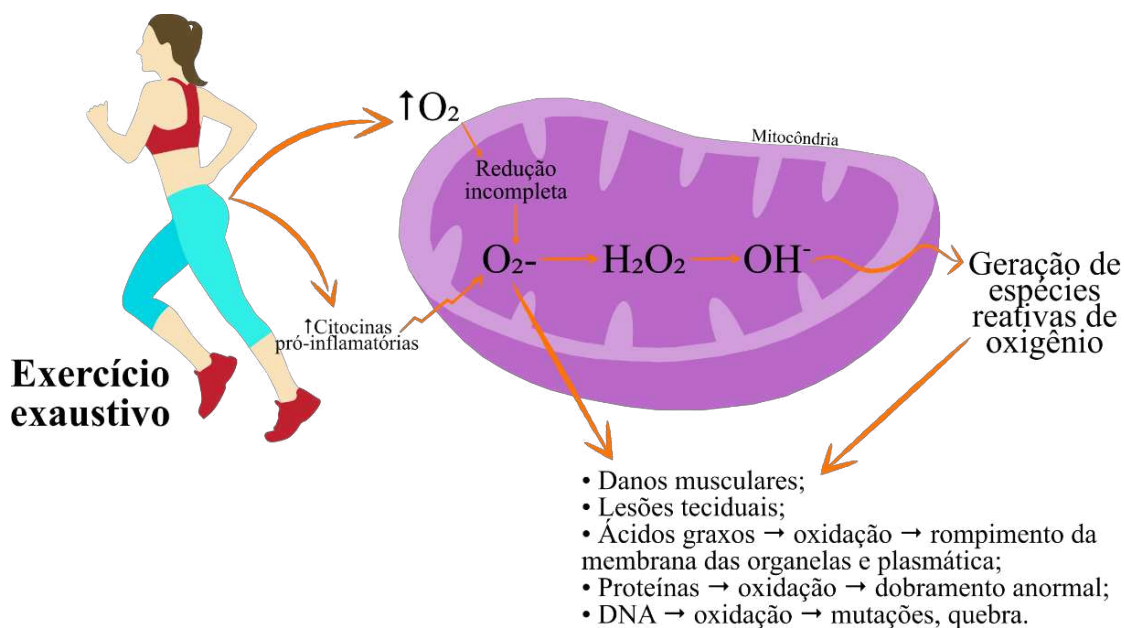


Figura 4. Efeitos do exercício exaustivo no organismo.

Fonte: A autora.

Entretanto, o exercício físico estimula a liberação de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, como mecanismo compensatório. No entanto, isso pode prejudicar as respostas imunológicas, visto que a pronunciada resposta anti-inflamatória induzida por exercícios exaustivos pode levar à supressão transitória de vários componentes imunológicos, aumentando o risco de infecção. Ainda, o treinamento físico exaustivo está associado a um perfil inflamatório com aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (Figura 4) (Cerqueira *et al.*, 2020; Estruel-Amades *et al.*, 2020).

Além disso, a ativação de células inflamatórias, como neutrófilos e linfócitos, durante o exercício, pode aumentar ainda mais a produção de superóxido, causando danos diretos ao DNA, como quebras nas fitas simples e duplas, que pode levar a mutações, oxidação de bases, como a guanina, resultando em erros de pareamento, e formação de ligações covalentes entre o DNA e proteínas associadas, como histonas, que podem interferir na replicação e transcrição do DNA. Ainda, durante o exercício exaustivo, ocorre liberação de catecolaminas, e essas podem ser auto oxidadas, levando à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que irá aumentar o estresse oxidativo celular e a ativação das cascatas inflamatórias (Figura 4) (Cobley *et al.*, 2015; Tryfidou *et al.*, 2020).

Assim, enquanto o exercício físico moderado regular oferece inúmeros benefícios comprovados para a saúde, o exercício extenuante poderá induzir um estado de estresse oxidativo e inflamação elevado, que compromete a integridade celular e a função de vários

sistemas do organismo. Dessa forma, é necessário encontrar um equilíbrio adequado na intensidade e duração do exercício para maximizar seus benefícios à saúde, evitando os efeitos adversos associados ao excesso.

2.2.1. Exercício físico exaustivo, inflamação, estresse e saúde intestinal

O exercício físico, quando praticado de forma moderada, é capaz de promover adaptações positivas no trato gastrointestinal, como a diminuição do risco de câncer de cólon (Oruc; Kaplan, 2019). Entretanto, a exposição exacerbada ao estresse físico gerado pelo exercício exaustivo pode impactar negativamente o ambiente gastrointestinal, contribuindo para o agravamento de outras condições clínicas (Ribeiro *et al.*, 2021).

Sabe-se que o exercício físico leva ao aumento da demanda energética do músculo esquelético com consequente adaptação do organismo para suprir essa demanda. Com isso, a atividade do sistema nervoso simpático altera a hemodinâmica, reduzindo e redistribuindo o fluxo sanguíneo dos órgãos vitais para os músculos em exercício, gerando um efeito hipóxico que resultará em alterações no sistema gastrointestinal. A isquemia intestinal local é uma das principais características do exercício físico resistido vigoroso, e um dos principais fatores fisiológicos que causam danos e distúrbios celulares, devido à redução na síntese de trifosfato de adenosina (ATP) na respiração mitocondrial (Giil *et al.*, 2015; Stewart; Pratt-Phillips; Gonzalez, 2017).

A hipoperfusão esplâncnica e a subsequente isquemia podem danificar as células de Paneth e as células caliciformes, permitindo que endotoxinas como o lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas pró-inflamatórias atravessem as células epiteliais devido à permeabilidade (Giil *et al.*, 2015). Esse aumento de LPS e citocinas pró-inflamatórias afeta diretamente a composição e diversidade da microbiota intestinal, condição conhecida como disbiose, que é caracterizada por uma redução na diversidade microbiana e um aumento na proporção de espécies patogênicas em relação às benéficas, com consequente impacto na produção de AGCC importantes para a produção de energia dos colonócitos (Aya *et al.*, 2021). Além disso, o exercício extenuante também é conhecido por induzir a síntese da proteína de ligação de ácidos graxos intestinais derivada de enterócitos (I-FABP), um biomarcador intestinal de dano e isquemia de enterócitos (Chantler *et al.*, 2021), sendo o seu aumento na circulação um indicador de danos aos enterócitos maduros.

A regulação da permeabilidade intestinal é um processo complexo que envolve múltiplas vias de sinalização e a ação coordenada de várias proteínas e enzimas. Citocinas

inflamatórias como IL-1 β e TNF- α desempenham papéis críticos, modulando a atividade de quinases como a proteína quinase 1 ativada por mitógeno (MEKK1) e a cadeia leve da miosina quinase (MLCK). Nas células epiteliais intestinais, a IL-1 β causa rápido aumento na MEKK1, resultando na fosforilação de outras quinases, como a c-Jun N-terminal quinase (JNK) e a p38 MAPK, que são fundamentais na regulação da resposta inflamatória, proliferação celular, diferenciação e apoptose, ao modificar a atividade de fatores de transcrição que controlam a expressão gênica e a atividade de proteínas-chave (Al-Sadi *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2021). O TNF- α pode induzir a desorganização das junções estreitas, resultando em um aumento na permeabilidade paracelular. Este efeito é mediado, em parte, pela ativação da MLCK, que promove a fosforilação da cadeia leve da miosina, resultando na contração do citoesqueleto de actina-miosina (Al-Sadi *et al.*, 2013; Cunningham; Turner, 2012).

Para mitigar os efeitos negativos do exercício físico exaustivo sobre o trato gastrointestinal, podem-se adotar estratégias que ajudem a manter a integridade da mucosa intestinal e a saúde geral do intestino, como uma nutrição balanceada, rica em fibras, prebióticos e probióticos, para ajudar a preservar a diversidade e a função da microbiota intestinal (Hughes; Holscher, 2021). Adicionalmente, a suplementação com compostos que protejam a mucosa intestinal e reduzam a inflamação pode ser benéfica. Suplementos como proteínas de alta qualidade e antioxidantes têm mostrado potencial para apoiar a função intestinal e mitigar os efeitos negativos do estresse físico.

2.3. *Whey protein*

O soro de leite, conhecido atualmente como *whey protein* (WP), é a porção líquida amarelo-esverdeada presente no leite e, por muitos anos, foi considerado um resíduo lácteo relacionado ao descarte, devido à sua alta demanda de oxigênio e matéria orgânica. Atualmente, tem sido explorado de várias formas pelas indústrias, visto que é uma fonte em potencial de nutrientes e compostos bioativos (Ahn; Park; Lee, 2001; ALIMENTARIUS, 2011).

A porção proteica do WP é composta por 5 frações, sendo elas a β -lactoglobulina, α -lactoglobulina, imunoglobulina, albumina e lactoferrina, conferindo ao WP propriedades funcionais e nutricionais relacionados a ação anti-inflamatória, anti-carcinogênica e antimicrobiana (Poppi *et al.*, 2010). Durante a hidrólise dessas frações são liberados peptídeos bioativos, nomeadamente α -lactotensina, β -lactotensina, serofina, albutensina A, lactoferricina B e lactoferrampina, que contribuem para as respostas antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-carcinogênica e antimicrobiana (Madureira *et al.*, 2007).

2.3.1. *Peptídeos bioativos*

A obtenção de peptídeos bioativos é, em sua maioria, realizada por meio da digestão enzimática, utilizando enzimas pancreáticas, como a tripsina. Os peptídeos bioativos manifestam seus efeitos fisiológicos após serem liberados durante a digestão intestinal e alcançarem seus locais-alvo na borda em escova ou após serem absorvidos pelos órgãos periféricos. Este processo de digestão ocorre através da hidrólise enzimática de oligopeptídeos por peptidases, que clivam os oligopeptídeos em aminoácidos livres e dipeptídeos, facilitando a passagem desses compostos (Minj; Anand, 2020; Olvera-Rosales *et al.*, 2023). Os efeitos fisiológicos incluem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e imunomoduladoras, todos os quais estão associados a diversas condições de saúde (Minj; Anand, 2020; Zhao; Ashaolu, 2020).

Os peptídeos que resistem à proteólise intestinal são absorvidos intactos e entram na corrente sanguínea, onde as peptidases séricas posteriormente hidrolisam as ligações peptídicas. Consequentemente, a resistência à degradação por peptidases é fator determinante para a obtenção dos efeitos fisiológicos dos peptídeos bioativos (Olvera-Rosales *et al.*, 2023).

A lactoferrina é o componente mais estudado do soro de leite em termos de atividade antimicrobiana (Bruni *et al.*, 2016). Integrante do sistema imunológico inato, a lactoferrina exibe atividade contra parasitas, bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de fungos (Olvera-Rosales *et al.*, 2023). A hidrólise da lactoferrina pela pepsina gástrica resulta na produção de lactoferricina, um peptídeo com atividade antimicrobiana aumentada. O mecanismo antimicrobiano da lactoferricina, bem como da β -lactoglobulina e da α -lactalbumina, ocorre por meio de interações eletrostáticas entre os resíduos positivamente carregados dos peptídeos e os componentes da superfície microbiana, particularmente os lipopolissacarídeos negativamente carregados (Sah *et al.*, 2018). Essas interações comprometem a integridade da bicamada lipídica microbiana, aumentando sua permeabilidade e levando à lise celular (Olvera-Rosales *et al.*, 2023).

Já a atividade antioxidante dos peptídeos está intimamente relacionada à sua estrutura, composição e hidrofobicidade. Aminoácidos aromáticos como tirosina, triptofano, metionina, lisina e histidina, além de aqueles contendo grupos sulfeto como cisteína, exibem alto potencial antioxidante devido à sua capacidade de doar prótons a radicais livres (Mann *et al.*, 2019; Olvera-Rosales *et al.*, 2023; Power; Jakeman; Fitzgerald, 2012). A funcionalidade dos peptídeos antioxidantes pode estar associada à conversão intracelular de cisteína em glutatona, proporcionando proteção celular contra danos induzidos por EROs. Entre os mecanismos

envolvidos estão a inativação de EROs, eliminação de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica e quelação de íons metálicos pró-oxidantes (Mann *et al.*, 2019; Olvera-Rosales *et al.*, 2023; Power; Jakeman; Fitzgerald, 2012).

Por fim, a atividade imunomoduladora dos peptídeos resulta da hidrólise proteica, que libera peptídeos capazes de modular o sistema imunológico, aprimorando a imunidade inata da mucosa intestinal (Brandelli; Daroit; Corrêa, 2015). A modulação da resposta imune por peptídeos pode estimular a proliferação de linfócitos, fagocitose por macrófagos, regulação de citocinas, síntese de anticorpos e neutralização de LPS. O aumento de linfócitos, como TGF- β 1, está relacionado ao incremento da imunoglobulina IgA após a ingestão de *whey protein*; além disso, a produção de linfócitos pode ser estimulada pela hidrólise de β -lactoglobulina e α -lactalbumina (Kiewiet *et al.*, 2018). Ademais, os peptídeos imunomoduladores interferem na interação de LPS com receptores *toll-like*, modulando a produção de citocinas inflamatórias, como proteína C reativa (PCR), IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Adak; Khan, 2018).

2.3.2. *Whey protein e exercício físico exaustivo*

Como já mencionado, durante o exercício físico exaustivo, o corpo humano enfrenta um aumento significativo nas demandas energéticas. O *whey protein* possui a capacidade de modular as vias metabólicas, especialmente por meio da via de sinalização mTOR (*mammalian target of rapamycin*), uma proteína quinase que regula o crescimento e a proliferação celular em resposta a nutrientes, fatores de crescimento e energia, resultando em síntese proteica e a recuperação celular, essencial para a adaptação ao exercício físico intenso (Farnfield *et al.*, 2012; Sahin *et al.*, 2024).

Ainda, os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) presentes no *whey protein*, particularmente a leucina, são rapidamente metabolizados e podem servir como fontes de energia durante o exercício, poupando as reservas de glicogênio muscular e hepático, isso não apenas melhora a resistência durante o exercício prolongado, mas também retarda a fadiga, permitindo uma performance física mais sustentada (Plotkin *et al.*, 2021).

O exercício exaustivo é associado ao aumento da produção de EROs, que causam danos oxidativos a células e tecidos. O *whey protein* contém altos níveis de cisteína, um aminoácido essencial para a síntese de glutathione, um dos antioxidantes endógenos mais poderosos. Assim, a complementação com *whey protein* às proteínas da dieta, pode aumentar os níveis de glutathione no organismo, melhorando a capacidade de neutralizar as EROs e reduzindo o dano oxidativo (Ahmed; Hamdy; Hammam, 2020). Estudos mostram que a elevação dos níveis de

glutathione não só protege contra o estresse oxidativo, mas também melhora a função imunológica e acelera a recuperação pós-exercício, mantendo a integridade celular e reduzindo o risco de lesões e doenças associadas ao estresse oxidativo (Veskoukis *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Além disso, o exercício físico exaustivo também induz uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pela elevação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6. A suplementação com *whey protein* tem mostrado reduzir os níveis dessas citocinas inflamatórias, contribuindo para a modulação do sistema imunológico e atenuando a resposta inflamatória por meio da lactoferrina e as imunoglobulinas. A lactoferrina, em particular, possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, que podem ajudar a reduzir a inflamação e o dano tecidual induzidos pelo exercício exaustivo, e a presença de aminoácidos essenciais pode promover a síntese de proteínas anti-inflamatórias, contribuindo para uma recuperação mais rápida e eficaz (Mansinhbhai *et al.*, 2022).

Em resumo, o *whey protein* oferece uma gama de benefícios além do suporte à síntese proteica muscular, sendo importante aliado na otimização das vias metabólicas, na mitigação do estresse oxidativo e na modulação da resposta inflamatória durante e após exercícios físicos exaustivos. Sua capacidade de influenciar positivamente a via mTOR, aumentar os níveis de glutathione e reduzir a inflamação destaca seu potencial como um suplemento multifuncional, essencial para a manutenção da homeostase e a melhoria do desempenho físico e da saúde geral (Sahin *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2021).

2.3.3. *Whey protein e saúde intestinal*

O *whey protein*, além de ser um suplemento amplamente utilizado para melhorar desempenho esportivo e a recuperação muscular, tem mostrado efeitos benéficos na manutenção e recuperação da integridade da barreira intestinal. Grandes quantidades de proteínas e peptídeos do leite chegam ao intestino grosso, onde são degradados em peptídeos com efeitos fisiológicos conhecidos, como atividade imunomoduladora e gastrointestinal. A degradação das proteínas no cólon começa com a hidrólise em peptídeos e aminoácidos menores por proteases e peptidases bacterianas, mais ativas em pH neutro a alcalino (Boscaini *et al.*, 2023).

Muitos estudos sugerem que as proteínas e peptídeos bioativos do soro de leite têm um efeito positivo na saúde intestinal, fornecendo defesa não imunológica contra bactérias patogênicas e exercendo um efeito probiótico. Os principais substratos fermentáveis do *whey*

são a lactose, os peptídeos e os aminoácidos, que produzem AGCC e ácidos graxos de cadeia ramificada (BCFAs). A lactose do soro de leite tem um efeito prebiótico para bactérias benéficas, como lactobacilos e bifidobactérias, e pode ser hidrolisada em galactooligossacarídeos (GOS) pela ação da enzima β -galactosidase liberada pela microbiota intestinal, inibindo o crescimento de patógenos como *Salmonella* e *E. coli* (Rackerby *et al.*, 2024; Sánchez-Moya *et al.*, 2017).

O aminoácido treonina, por sua vez, é incorporado diretamente nas mucinas intestinais, que protegem as células intestinais e fortalecem a função de barreira do intestino. Os aminoácidos contendo enxofre, como a cisteína, servem como precursores de compostos antioxidantes, como a glutathione e a taurina, que possuem propriedades anti-inflamatórias, importantes na prevenção e/ou redução de doenças inflamatórias intestinais. A glutamina presente no soro de leite e a derivada dos BCAAs serve como substrato para células imunocompetentes, amplamente presentes no tecido linfóide associado ao intestino (Beaumont; Blachier, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Embora os AGCC sejam os principais produtos finais da fermentação de carboidratos, também são produzidos a partir de muitos aminoácidos por desaminação redutiva, principalmente no cólon distal, onde a fermentação proteica se torna mais eficiente. Os AGCC são rapidamente absorvidos pelo cólon e representam importantes mediadores da interação entre micróbios intestinais e hospedeiros, com o butirato atuando como fonte de energia para os colonócitos, o propionato sendo transportado para o fígado para a gliconeogênese e o acetato usado na lipogênese (Boscaini *et al.*, 2023; Sánchez-Moya *et al.*, 2017).

A suplementação com *whey protein* também tem mostrado aumentar o número e a atividade das células caliciformes. Em modelos animais, o consumo de *whey protein* foi associado a um aumento na produção de mucinas, especificamente MUC2, a principal mucina secretada no intestino delgado, protegendo a mucosa intestinal e facilitando a cicatrização e regeneração do epitélio intestinal danificado (Navis *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2023). O equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é crucial para a homeostase intestinal. Desequilíbrios, como o aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), estão associados a condições inflamatórias crônicas, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa (Ma *et al.*, 2016).

O *whey protein* possui propriedades anti-inflamatórias que ajudam a regular esse balanço, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e este efeito imunomodulador é parcialmente mediado pela

presença de imunoglobulinas e lactoferrina no *whey protein* (Minj; Anand, 2020). Em modelos experimentais de colite, a suplementação com *whey protein* resultou em redução significativa na infiltração de células inflamatórias e na expressão de citocinas inflamatórias (Ahn; Jeong; Kim, 2022; Tunc *et al.*, 2022).

Os efeitos benéficos do *whey protein* na saúde intestinal podem ser atribuídos a vários mecanismos moleculares. Peptídeos bioativos derivados da digestão do *whey protein*, como as β -lactoglobulinas e α -lactoalbuminas, têm potencial para ativar vias de sinalização que promovem a sobrevivência celular e a integridade da barreira epitelial. Esses peptídeos podem interagir com receptores de superfície celular, como o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o receptor de insulina, promovendo a reparação tecidual e a resposta anti-inflamatória (Ma *et al.*, 2016; Sah *et al.*, 2018).

Além disso, o *whey protein* pode modular a expressão de microRNAs (miRNAs) que regulam a expressão gênica envolvida na resposta inflamatória e na manutenção da barreira intestinal. Alguns miRNAs induzidos pelo *whey protein* podem inibir a expressão de genes pró-inflamatórios, enquanto outros podem aumentar a expressão de genes que fortalecem as junções celulares (Zhang *et al.*, 2023). Estudos demonstraram que a proteína do soro de leite protegeu camundongos contra a inflamação intestinal, com a treonina e a cisteína desempenhando um papel crucial na anti-inflamação ao estimular a síntese de mucina e a proliferação normal da microflora (Araújo *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2023; Zou *et al.*, 2023).

Assim, além de seus benefícios amplamente reconhecidos para a saúde muscular, o *whey protein* exerce efeitos significativos na saúde intestinal. Ele fortalece a integridade da barreira intestinal, estimula as células caliciformes na produção de muco e modula a produção de citocinas inflamatórias. Esses efeitos combinados contribuem para a manutenção de um ambiente intestinal saudável, portanto, a complementação com *whey protein* emerge não apenas como uma ferramenta nutricional para o desempenho atlético, mas também como um potencial modulador da saúde gastrointestinal.

2.4.Curcumina

O açafrão da Índia (*Curcuma longa L.*) é uma planta pertencente à família do gengibre (*Zingiberaceae*) muito usada na culinária. Seu rizoma é rico em um composto conhecido como curcumina (CCM), um pigmento bioativo (Amalraj; Divya; Gopi, 2020). A CCM é um polifenol insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos, como etanol e acetona, além de ser estável quando exposto ao pH ácido do estômago (Aggarwal; Kumar; Bharti, 2003).

Possui três grupos funcionais reativos, uma porção dicetona e dois grupos fenólicos, que estão envolvidos nas reações químicas importantes (Figura 5).

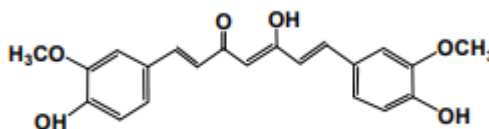


Figura 5. Estrutura química da curcumina.

As interações químicas críticas da curcumina em sistemas biológicos ocorrem por meio da ligação de hidrogênio do grupo β-dicarbonila e dos grupos hidroxila fenólicos, além do grupo metoxi éter, e da ligação com metais e não metais. Estudos demonstraram que a curcumina pode se ligar diretamente a várias moléculas sinalizadoras, incluindo moléculas inflamatórias, proteínas quinase, proteínas redutase, histona acetiltransferase, histona desacetilase, glioxalase I, xantina oxidase, proteínas transportadoras e íons metálicos. Além disso, a curcumina tem a capacidade de se ligar diretamente ao DNA e ao ácido ribonucleico (RNA) (Heger *et al.*, 2013; Urošević *et al.*, 2022).

A habilidade da curcumina de interagir com diversas moléculas permite a modulação seletiva de múltiplas vias de sinalização celular associadas a várias doenças crônicas. Este composto é um potente regulador epigenético em várias doenças, incluindo distúrbios neurológicos, doenças inflamatórias, diabetes e diferentes tipos de câncer. Além disso, a curcumina modula várias vias proteasomais e diminui o metabolismo do glicogênio por meio da inibição seletiva da enzima fosforilase quinase. Pesquisas indicam que a curcumina exibe efeitos anti-inflamatórios, hipoglicêmicos, antioxidantes, antimicrobianos, antivirais, anticancerígenos, neuroprotetores, entre outros (Hassan *et al.*, 2019; Kunnumakkara *et al.*, 2017).

No entanto, a aplicação clínica da curcumina é limitada devido a sua baixa biodisponibilidade. Essa limitação decorre de vários fatores, como sua reduzida solubilidade aquosa, rápida degradação em pH neutro ou alcalino, baixa absorção gastrointestinal, rápida conjugação no fígado e intestino, e eliminação acelerada pelo organismo. Essas características resultam em uma concentração plasmática baixa após a administração oral, comprometendo a eficácia terapêutica da curcumina (Sabet *et al.*, 2021; Sohn *et al.*, 2021).

Para superar esses obstáculos, diversas estratégias têm sido investigadas. Uma das abordagens mais comuns envolve a coadministração com piperina, um alcaloide presente na pimenta-preta. Outras abordagens incluem a utilização de sistemas de liberação controlada,

como nanopartículas poliméricas e micelas, que melhoram a solubilidade e estabilidade da curcumina no ambiente gastrointestinal. Essas inovações têm mostrado resultados promissores em aumentar a concentração plasmática e a meia-vida da curcumina, potencializando seu efeito terapêutico e permitindo que seus benefícios sejam mais plenamente explorados em aplicações clínicas (Sasaki *et al.*, 2011; Stohs *et al.*, 2020).

2.4.1. Curcumina e exercício físico exaustivo

A curcumina modula várias vias metabólicas que são ativadas em resposta ao estresse oxidativo, sendo que uma das principais vias reguladas pela curcumina é a via da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que desempenha um papel crucial na regulação do metabolismo energético no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. A ativação da AMPK pela curcumina pode melhorar a oxidação de ácidos graxos e a captação de glicose, fornecendo uma fonte de energia eficiente durante períodos de exercício prolongado (Cao *et al.*, 2020).

A curcumina tem o potencial de atuar como um potente antioxidante, neutralizando diretamente os radicais livres no soro sanguíneo, músculo, fígado, coração e cérebro e aumentando a capacidade antioxidante endógena em tecidos como o fígado, músculos e intestino. Ela induz a expressão de várias enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, por meio da ativação do fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2). A ativação do Nrf2 pela curcumina melhora a defesa celular contra o estresse oxidativo, reduzindo, assim, o dano celular e melhorando a recuperação após o exercício exaustivo (Oliveira *et al.*, 2020).

A curcumina também possui potentes propriedades anti-inflamatórias, mediadas pela inibição da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), regulador chave da resposta inflamatória, podendo atuar na resposta inflamatória gerada pelo exercício físico exaustivo, consequentemente diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β , reduzindo a inflamação sistêmica e local induzida pelo exercício. Além disso, a curcumina pode modular a atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da lipoxigenase (LOX), enzimas envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios. A inibição dessas enzimas pela curcumina contribui ainda mais para a sua atividade anti-inflamatória, promovendo um ambiente mais favorável à recuperação pós-exercício (Zhang *et al.*, 2024).

Assim, a curcumina exerce efeitos benéficos no contexto do exercício físico exaustivo por meio de múltiplos mecanismos em diferentes tecidos e sistemas corporais. Suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, juntamente com a modulação de vias

metabólicas críticas, podem ajudar a mitigar o estresse oxidativo e a inflamação induzidos pelo exercício em diversos órgãos, melhorando o desempenho e acelerando a recuperação. Esses efeitos tornam a curcumina um composto promissor para atletas e indivíduos envolvidos em atividades físicas intensas (Suhett *et al.*, 2021).

2.4.2. Curcumina e saúde intestinal

A curcumina possui a capacidade de exercer uma influência positiva na integridade da barreira intestinal, na funcionalidade das células caliciformes, na produção de muco e na modulação de citocinas inflamatórias, além de impactar a composição da microbiota intestinal. A curcumina tem demonstrado proteger a barreira epitelial intestinal, efeito este mediado pela ativação de vias de sinalização, como a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a via da proteína quinase C (PKC), que podem atuar na neutralização da secreção de IL-1 β induzida por LPS (Zhu; He, 2024).

Ainda, a curcumina aumenta a atividade e o número de células caliciformes, resultando em uma produção de muco mais robusta. Este aumento na produção de mucina fortalece a camada de muco, servindo como uma barreira física adicional que impede a aderência e a penetração de microrganismos patogênicos. A mucina não só protege as células epiteliais subjacentes, mas também desempenha um papel na captura e remoção de partículas estranhas e agentes patogênicos do trato gastrointestinal (Scazzocchio; Minghetti; D'archivio, 2020).

A curcumina também é capaz de suprimir a ativação de NF- κ B e a expressão de mediadores pró-inflamatórios nas células epiteliais do cólon, atenuando a inflamação induzida por LPS, inibindo a ativação das vias de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B. A curcumina inibe a imunidade ao LPS ligando-se à proteína extracelular ligada ao domínio estrutural do TLR4, a proteína de diferenciação mieloide 2 (MD-2), que inibe a resposta imune ao LPS e reduz a liberação de fatores inflamatórios. A curcumina ainda previne a degradação de I κ B e inibe a ativação de NF- κ B reduzindo a expressão de TNF- α , IL-1, IL-6 e liberação de outras citocinas. Além disso, foi demonstrado que a curcumina foi capaz de inibir a inflamação bloqueando seletivamente o receptor COX-2 e atenuar a ativação de p38 MAPK (Burge *et al.*, 2019).

Quanto a sua atividade antioxidante, a curcumina aumenta a atividade de enzimas antioxidantes no intestino, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase, que ajudam a decompor e remover os radicais livres, protegendo as células intestinais de danos oxidativos. Ainda, a curcumina melhora a resposta antioxidante ao ativar o

Nrf2, aumentando a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes e proteínas de desintoxicação (Di Meo *et al.*, 2019).

Além disso, a CCM tem mostrado efeitos prebióticos, modulando a composição, riqueza e diversidade da microbiota intestinal de maneira favorável, favorecendo o crescimento de cepas benéficas, como *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* e bactérias produtoras de butirato, e reduzindo a abundância de cepas patogênicas, como *Coriobacterales*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* e *Enterobacteria* (Shen; Liu; Ji, 2017).

3. JUSTIFICATIVA

O exercício físico tem sido amplamente estudado e associado a inúmeros benefícios para a saúde geral. No entanto, exercícios físicos exaustivos (i.e., alta intensidade, longa duração e tempo insuficiente para recuperação) têm sido relacionados a aumento na oxidação de macromoléculas, respostas inflamatórias exacerbadas e, conseqüentemente, prejuízos no desempenho esportivo. Além disso, esse tipo de exercício pode afetar negativamente o trato gastrointestinal, que possivelmente se associa a um pior rendimento entre atletas e praticantes de atividade física.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que a associação do *whey protein* com a curcumina apresentou efeitos promissores na redução do estresse oxidativo, respostas inflamatórias e desempenho esportivo, ao analisar os tecidos hepático e muscular. Além disso, já está bem estabelecido que a utilização do *whey protein* e da curcumina, isoladamente, pode resultar na modulação da microbiota, promovendo a saúde intestinal.

Tendo em vista a necessidade de uma recuperação mais eficiente entre atletas e esportistas, por meio da melhora na saúde intestinal, a investigação da associação entre compostos nutricionais com potencial benéfico é fundamental. Além disso, a escassez de estudos que investiguem os efeitos da associação de proteínas de alto valor biológico, como o *whey protein* a um polifenol, como a curcumina sobre a saúde intestinal, torna este estudo inovador.

Nesse sentido, o uso do *whey protein* combinado à curcumina pode resultar em efeitos promissores e fornecer benefícios adicionais a saúde intestinal. Espera-se contribuir com novos esclarecimentos acerca dessa associação para o avanço do conhecimento científico nas áreas da nutrição, exercício físico e saúde intestinal, fornecendo uma base para futuras pesquisas e possivelmente abrindo portas para intervenções terapêuticas ou preventivas relacionadas a saúde intestinal.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do *whey protein* concentrado (WPC) adicionado de curcumina (CCM) sobre a saúde intestinal de ratos submetidos a exercício físico exaustivo.

4.2. Objetivos específicos

- Revisar sistematicamente os efeitos do exercício físico na saúde intestinal;
- Analisar o efeito do WPC+CCM sobre a produção dos ácidos graxos de cadeia curta;
- Avaliar o efeito da associação WPC+CCM no estresse oxidativo do cólon;
- Analisar a expressão gênica de marcadores inflamatórios e antioxidantes no cólon (Nrf2, NF- κ B, IL-1 β);
- Avaliar o efeito do WPC+CCM sobre a morfologia intestinal.

5. HIPÓTESES

A associação do WPC à CCM irá melhorar a função intestinal após exercício exaustivo, aumentando a produção de ácidos graxos de cadeia curta, a expressão de Nrf2, a profundidade das criptas intestinais e o número de células caliciformes, além de reduzir a concentração de marcadores do estresse oxidativo e a inflamação.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Matéria prima

6.1.1. Curcumina

A curcumina utilizada foi de alta absorção e dispersa em nanopartículas coloidais (Theracurmin[®]; Theravalues, Tóquio, Japão). A Theracurmin[®] é composta por 30 w/w% de CCM, apresentando 27 vezes mais biodisponibilidade do que a CCM convencional (Anexo A).

6.1.2. Desenvolvimento do concentrado proteico de soro de leite (WPC) pelo método de spray drying

O leite utilizado para a fabricação do WPC foi adquirido no estábulo da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para a obtenção do soro, o leite foi submetido à microfiltração e foram coletadas amostras referentes a quatro dias de produção do queijo. Após a obtenção do soro, este foi armazenado em embalagens plásticas devidamente fechadas e identificadas em *ultrafreezer* (-80 °C) até o momento de sua utilização.

A secagem do soro foi realizada em um secador de pulverização de nível único, modelo único (modelo MSD 1.0), equipado com um bico de pulverização de 1 mm de diâmetro (Labmaq, Brasil). Após testes iniciais, as taxas de ar e fluxo de produto foram obtidas segundo a metodologia de (Perrone *et al.*, 2013), onde o ar de entrada é de $170 \pm 2^\circ\text{C}$ e o fluxo de saída é de 1 L h^{-1} .

6.1.3. Whey protein concentrado adicionado de curcumina

Para a elaboração do WPC adicionado de CCM, a curcumina foi adicionada ao WPC de forma a se obter um produto com concentração de 0,8 g de CCM para cada 100 g de WPC. Para isso, considerou-se um indivíduo de 70 kg que consome uma suplementação proteica por meio do WPC de 0,3 g/Kg/dia (Schoenfeld; Aragon, 2018) e uma ingestão de curcumina de 3,0 mg/Kg/dia (valor máximo estabelecido pela IDA para humanos) (Stankovic, 2004).

Sendo assim, o consumo de proteína pelos animais, por meio do WPC, correspondeu a 30% das necessidades de proteína para ratos em fase de manutenção (Reeves; Nielsen; Fahey, 1993).

6.2. Cálculo amostral

Os animais foram alocados de acordo com o método proposto por Conagin (1959). Para o cálculo amostral foi utilizada a seguinte equação e os dados de referência para o cálculo amostral (Tabela 1):

$$r = 2 \times s^2 \times (t\alpha + t\beta) \times (t\alpha + t\beta) / d^2$$

Em que: r= número de repetições calculado;

s²= variância dos dados de referência;

t α = probabilidade do erro tipo 1 em função do grau de liberdade do resíduo;

t β = probabilidade do erro tipo 2 em função do grau de liberdade do resíduo;

d= distância mínima entre médias.

Tabela 1. Variáveis utilizadas para o cálculo amostral

	Média+DP	Média+DP	Média+DP
	Grupo 1	Grupo 2	Para fórmula
Peso (g)	306,9 + 7,4	280,9 + 2,6	293,9 + 5
N	10	10	10

Fonte: (Maithilikarpagaselvi *et al.*, 2016).

$$s^2 = 25$$

$$t\alpha = 2,262, \text{ considerando } \alpha \text{ de } 0,05$$

$$t\beta = 1,833, \text{ considerando } \beta \text{ de } 0,1$$

$$d = 10 \text{ g}$$

$$2 \times 25 \times (2,262 + 1,833) \times (2,262 + 1,833) / (10^2) \rightarrow 8 \text{ animais/grupo.}$$

6.3. Ensaio biológico

6.3.1. Animais

Foram utilizados 48 ratos machos jovens (idade: 12 semanas) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, Rodentia), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da UFV.

Os animais foram recebidos do Biotério Central após desmame (i.e., 30 dias de idade), alojados no Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV) e, após 12 semanas, divididos aleatoriamente em 6 grupos, e distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12h) controlados e receberam água ultrapura e suas respectivas dietas experimentais *ad libitum*.

O transporte dos animais do Biotério Central até o Departamento de Nutrição e Saúde foi feito em carro próprio e em curto espaço de tempo. Durante o transporte, os animais tiveram livre acesso à água e ração, e cuidados adicionais para a manutenção de uma temperatura agradável.

6.3.2. Desenho experimental

Os ratos foram divididos randomicamente em 6 grupos experimentais contendo 8 animais cada ($n=8$), a saber: AIN-93M : grupo controle, que recebeu dieta padrão; AIN-93M EE: grupo controle, que recebeu dieta padrão submetido ao exercício exaustivo; WPC + CCM: grupo proteína concentrada do soro de leite adicionado de curcumina; WPC + CCM EE: grupo proteína concentrada do soro de leite adicionado de curcumina submetido ao exercício exaustivo; CCM : grupo curcumina; e CCM EE: grupo curcumina submetido ao exercício exaustivo E (Figura 6).

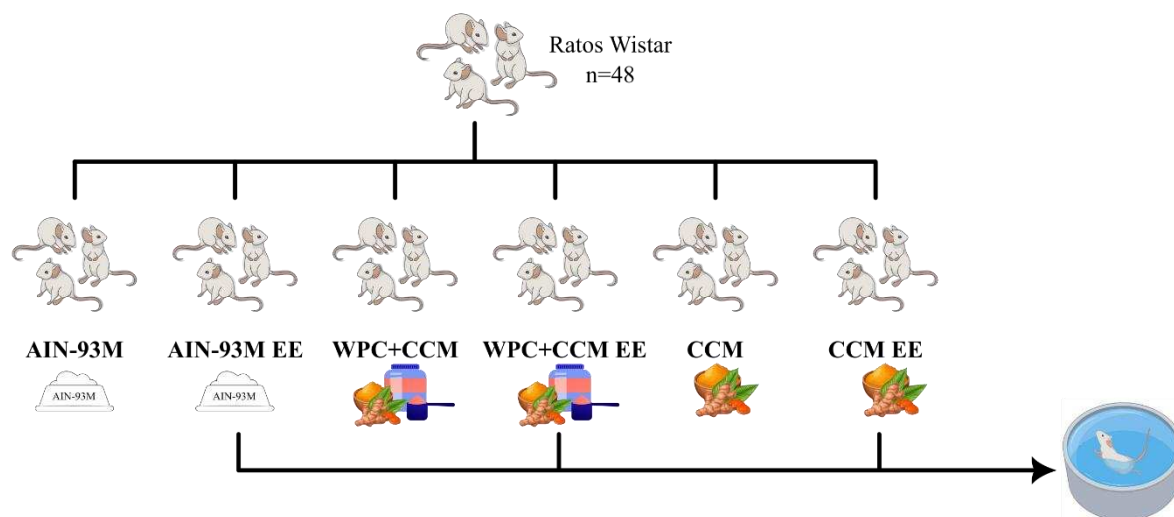


Figura 6. Desenho experimental.

AIN-93M: grupo controle, que recebeu dieta padrão; AIN-93M EE: grupo controle, que recebeu dieta padrão submetido ao exercício exaustivo; WPC + CCM: grupo proteína concentrada do soro de leite adicionado de curcumina; WPC + CCM EE: grupo proteína concentrada do soro de leite adicionado de curcumina submetido ao exercício exaustivo; CCM: grupo curcumina; e CCM EE: grupo curcumina submetido ao exercício exaustivo.

6.3.3. Dietas experimentais

Os animais receberam dieta comercial até completarem doze semanas de idade, e a partir de então, as dietas experimentais foram introduzidas e mantidas pelo período de 4 semanas. As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as recomendações AIN-93M, propostas para manutenção de animais adultos (Reeves; Nielsen; Fahey, 1993), sendo elas: dieta AIN-93M (controle), dieta WPC + CCM (30% da necessidade de proteína foi advinda do WPC) e dieta CCM (AIN-93M + CCM) (Tabela 2).

Tabela 2. Composição das dietas experimentais

Ingredientes	g/kg de dieta		
	AIN-93M	WPC+CCM	CCM
Amido de Milho	455,7	455,7	455,7
Albumina*	150	105	150
Maltodextrina	155	155	155
Sacarose	100	99	99
Óleo de Soja	40	40	40
Celulose	50	50	50
Mistura de Minerais	35	35	35
Mistura de Vitaminas	10	10	10
L-cistina	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
WPC	-	45	-
Curcumina (Theracurmin®)	-	1,2	1,2

Fonte: Reeves et al., 1993; WPC: *whey protein* concentrado; CCM: curcumina. *Considerou-se a albumina e o WPC como tendo 80% de proteína.

As dietas foram confeccionadas e oferecidas na forma de pó, e armazenadas protegidas da luz, em temperaturas de 0 a 4°C, até o momento da sua utilização. Os animais receberam água destilada e dieta *ad libitum*.

6.3.4. Protocolo de exercício exaustivo

Os animais dos grupos G2, G4 e G6 foram submetidos a teste exaustivo em natação após 4 semanas de consumo das dietas experimentais e 24 horas antes a eutanásia. Os animais foram forçados a nadar até a exaustão, suportando um peso de 5% do peso corporal fixo à cauda (Venditti; Di Meo, 1996). A exaustão foi definida quando o rato permaneceu submerso por 10 segundos ou quando não conseguiu mais manter seus movimentos corporais (Dawson; Horvath, 1970).

O exercício exaustivo foi realizado no Laboratório de Biologia do Exercício (BioEx), em um tanque de alvenaria azulejado (largura: 65 cm, comprimento: 75 cm, altura: 85 cm), com água na temperatura de 28°C±1°C e altura da água de 45 cm.

6.3.5. Eutanásia

Os ratos foram anestesiados com isoflurano inalatório a 5% (Isoforine, Cristália®) e eutanasiados por punção cardíaca, com período de jejum de 12h. Os animais foram acondicionados individualmente em caixas transparentes e vedadas para saturação do anestésico, ampliando, assim, os efeitos aguardados da sedação e anestesia profunda. Foram avaliados parâmetros fisiológicos e reflexos para averiguação do grau de sensibilidade da

anestesia para que os animais pudessem ser submetidos à exsanguinação total. Todo procedimento foi feito com objetivo de favorecer uma morte humanitária dos animais (RN No 37, 2018).

Após eutanásia, parte do cólon foi coletado e armazenado em formalina até o momento de ser utilizado para a análise histomorfométrica, e a outra parte foi coletada e armazenada a -80°C, para as demais análises de saúde intestinal. As fezes do ceco também foram coletadas e armazenadas em -80°C para posterior análise de AGCC.

A eutanásia ocorreu no Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV) por uma equipe treinada em ambiente tranquilo e adequado, longe da sala de experimentação.

6.4. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

O conteúdo de ácido propiônico, acético e butírico nas fezes foi determinado de acordo com Siegfried et al. (1984), com algumas modificações. Para tal, foram usadas 100 mg de fezes e suspensas em 300 µL de água e centrifugadas em microcentrífuga a 12000 x g por 10 minutos (HITACHI, Centrifuge CT15RE). Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução de hidróxido de cálcio (3,3 g de Ca(OH)₂ + 200 mL de água ultrapura) e 150 µL de solução de sulfato cúprico (50 g de CuSO₄ · 5H₂O + 2 g de ácido crotônico + 400 mL de água ultrapura), e agitado em vórtex (IKEME, Vortex Mixer MX-S) por 10 segundos e congelado.

Após, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos (HITACHI, Centrifuge CT15RE), e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado de 28 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, sendo congelado posteriormente. Em seguida, esses foram descongelados em temperatura ambiente e congelados novamente. Por fim, as amostras finais foram descongeladas em temperatura ambiente, centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos (HITACHI, Centrifuge CT15RE) e foram transferidos 300 µL do sobrenadante para *vials* e armazenados a 4 °C.

Os sobrenadantes foram avaliados em cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence 20A acoplado a um detector de índice de refração (RID) (Shimadzu Scientific Instruments Inc, Japan), utilizando coluna Biohad (HPX-87H 300 x 7,8mm, 9µm) (Bio-Rad, Munique, Alemanha) mantida a 45°C. A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 5,0 mM com fluxo de 0,7 mL/min. Ácido crotônico foi utilizado como padrão interno nas amostras e curva de calibração. A concentração de ácidos orgânicos foi normalizada pelo fator de resposta (RF) e expressa como fração do total de ácidos orgânicos (AGVs) produzidos (mol/100 mol).

6.5. Balanço oxidativo

O balanço oxidativo foi avaliado por meio da quantificação dos produtos da oxidação malondialdeído (MDA), proteína carbonilada (PCN) e óxido nítrico (ON) e por meio da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational-S-transferase (GST), no Laboratório de Patologia Experimental (DBA/UFV).

Todos os resultados foram normalizados segundo o teor de proteínas totais presentes em cada amostra e foram expressos em mg de proteína. Para análise de proteínas totais foi realizada uma curva padrão com solução de albumina de soro bovino (BSA), sendo que o primeiro ponto foi feito com uma solução de 3mg/mL de BSA e os outros pontos foram feitos a partir de diluição seriada da solução mãe (Lowry *et al.*, 1951).

A análise foi realizada em uma placa de 96 poços e em um ambiente escuro, onde foram pipetadas 20 µL de cada amostra (sobrenadante) em duplicata, 20 µL de cada ponto da curva em duplicata, 20 µL de água destilada para o branco. Em seguida, foram pipetados 200 µL da solução ABC (Solução A: Na₂CO₃ (carbonato de sódio) e NaOH (hidróxido de sódio); Solução B: CuSO₄ (sulfato de cobre); Solução C: tartarato de sódio e potássio) em todos os poços e esperado 10 minutos.

Decorrido os 10 minutos, foi pipetado 20 µL da solução Folin (1:2) em todos os poços e a placa foi incubada por 30 minutos (Lowry *et al.*, 1951). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Multiskan SkyHigh) a 700nm.

6.5.1. Obtenção do homogenato

Para obtenção do homogenato, 200 mg do tecido intestinal (cólon) foram homogeneizados em 1mL de tampão fosfato 7,4 com EDTA e centrifugados (Nova Técnica, Microcentrífuga de Bancada NT 800) a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi armazenado para as análises de MDA, ON, SOD, CAT, GST e proteínas totais. Já o pellet formado foi utilizado para quantificação de PCN.

6.5.1.1. Malondialdeído (MDA)

Os níveis de MDA foram utilizados para medir a peroxidação lipídica. O MDA é considerado um dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico que, quando aquecido em meio ácido, forma um produto de coloração rósea. A concentração de MDA foi determinada usando a curva padrão de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO), para isso foi feita a solução de TMPO à 10 mM (16,45 µL da solução original + 10 mL de água destilada)

e essa foi diluída 1/500 v/v (20 µL da solução de TMPO à 10 mM + 10 mL de água destilada, concentração final: 20 µM) (Wallin *et al.*, 1993). A curva padrão foi feita a partir das seguintes diluições, em *ependorfs*:

Curva (µM)	P1 (0)	P2 (1,25)	P3 (2,5)	P4 (5,0)	P5 (10,0)	P6 (15,0)	P7 (20,0)
Solução TMPO (µL)	0	12,5	25	50	100	150	200
Água (µL)	200	187,5	175	150	100	50	0

Foram identificados *ependorfs* para cada amostra, ponto da curva e branco (tampão fosfato). Nos *ependorfs* da amostra foram adicionados 200 µL do sobrenadante de cada amostra e deixado no gelo. Em seguida, foram adicionados 400 µL solução TBARS (HCL 0,25M + TCA (ácido tricloroacético) + TBA (Ácido 2-tiobarbitúrico)) em todos os *ependorfs*, inclusive na curva, e agitado no vórtex (Thermo Scientific®, Agitador Vórtex LP) por 10 segundos.

Feito isso, os *ependorfs* foram colocados em banho maria a 90°C por 40 minutos e, em seguida, no gelo por 5 minutos. Decorrido o tempo, foram adicionados 600 µL de álcool butílico P.A. (n-butanol), inclusive na curva, agitados em vórtex (Thermo Scientific®, Agitador Vórtex LP) por 1-2 minutos para inversão de fase (a parte superior fica rósea), e centrifugados (Nova Técnica, Microentrífuga de Bancada NT 800) por 10 minutos a 3500 rpm a 15°C. Foram pipetados 200 µL do sobrenadante na placa (parte rosa claro). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Multiskan SkyHigh) a 540 nm e os dados foram expressos em unidades de MDA por mg de proteína totais.

6.5.1.2. Proteína carbonilada (PCN)

A análise de PCN é um método para detectar e quantificar a oxidação de proteínas. A amostra é incubada com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em ambiente ácido, onde DNPH reage com os grupos carbonila das proteínas oxidadas, formando derivados hidrazona.

Para a análise, foram utilizadas as seguintes soluções: HCl 2M; 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM; TCA 10%; Etanol + Acetato de etila; e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 6%.

Nesta análise, foi utilizado o *pellet* de cada amostra e esse foi ressuspenso com 500 µL de TCA e homogeneizado, e adicionados mais 500 µL de TCA e passado no vórtex (Thermo Scientific®, Agitador Vórtex LP). Em seguida, foram separados 2 *ependorfs* com 500 µL de amostra em cada, sendo um *ependorf* utilizado como branco e o outro como a amostra. Estes

foram centrifugados (Nova Técnica, Microcentrífuga de Bancada NT 800) a 3000 rpm por 10 minutos a 15 °C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 µL de DNPH na amostra e 500 µL de HCl no branco, agitados em vórtex (Thermo Scientific®, Agitador Vórtex LP), incubados no escuro por 30 minutos, e passados no vórtex (Thermo Scientific®, Agitador Vórtex LP) no minuto 15 e 30 (Levine *et al.*, 1990).

Os *eppendorfs* foram centrifugados (Nova Técnica, Microcentrífuga de Bancada NT 800) a 3000 rpm por 10 minutos a 15 °C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 µL de TCA em todos os *eppendorfs*, passado no vórtex (Thermo Scientific®, Agitador Vórtex LP) e centrifugado (Nova Técnica, Microcentrífuga de Bancada NT 800) a 3000 rpm por 10 minutos a 15 °C, descartando o sobrenadante no final. Em seguida, foram feitas 3 lavagens que consistiram em adicionar 1 mL de acetato + etanol, passar no vórtex (Thermo Scientific®, Agitador Vórtex LP), centrifugar (Nova Técnica, Microcentrífuga de Bancada NT 800) a 3000 rpm por 10 minutos a 15 °C e descartar sobrenadante. Após as lavagens, foram adicionados 1 mL da solução de SDS em todos *eppendorfs*, colocados em banho a 32°C por 30 minutos, passado em vórtex (Thermo Scientific®, Agitador Vórtex LP) e centrifugado (Nova Técnica, Microcentrífuga de Bancada NT 800) a 6000 rpm por 10 minutos a 15°C. Por fim, foram pipetados 200 µL na placa de 96 poços (Levine *et al.*, 1990).

A quantificação das proteínas carboniladas foi realizada medindo-se a absorbância a 370 nm em um espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Multiskan SkyHigh), utilizando um ensaio de controle para estabelecer a linha de base. Comparando a absorbância com um padrão conhecido, calculou-se a quantidade de proteínas carboniladas em termos de nmol de carbonilas por mg de proteína totais (Levine *et al.*, 1990).

6.5.1.3. Óxido nítrico (ON)

A produção de ON foi estimada pela produção de NO₂/NO₃ pela reação padrão de Griess (Tsikas, 2017). Para a quantificação, prepara-se uma curva padrão, a partir de diluições seriadas, com concentrações conhecidas de nitrito (6,9 mg para 400 mL de água destilada).

A análise foi realizada em placa de 96 poços, onde foram pipetados 50 µl de cada amostra em duplicata, 50 µl de cada ponto da curva, e 50 µl de tampão fosfato 7,0 para o branco. Após, foi preparada a solução AB na proporção 1/1 (Solução A (Sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 85%); Solução B (Nafitil etileno 0,1% em H₃PO₄ 85%)). Foram adicionados 100 µL de solução AB em todos os poços e esperados 10 minutos em abrigo de luz para reação.

A intensidade da cor, que é proporcional à concentração de nitrito, foi medida por espectrofotometria (Thermo Scientific®, Multiskan SkyHigh) a 570 nm. A quantificação foi expressa em unidades de ON por mg de proteína totais.

6.5.1.4. *Superóxido dismutase (SOD)*

A atividade da SOD foi determinada a partir da sua habilidade em eliminar o radical superóxido, diminuindo a auto-oxidação do pirogalol (Dieterich *et al.*, 2000). Para isso, foram pipetados 30 µL de cada amostra em placa de 96 poços, 45 µL de tampão 8,0 no poço destinado ao branco, e 30 µL de tampão 8,0 no poço destinado ao padrão. Em seguida, foram adicionados 99 µL de tampão 8,0 em todos os poços, 6 µL de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT), e 15 µL de pirogalol em todos os poços, exceto no branco.

Feito isso, a placa foi incubada por 20 minutos na estufa a 37°C, coberta com papel alumínio. Após incubação, foi pipetado 150 µL de DMSO em todos os poços. A medição da absorbância foi realizada a 570 nm (Thermo Scientific®, Multiskan SkyHigh). A porcentagem de inibição da auto-oxidação do pirogalol pela amostra é expressa em unidades de inibição por mg de proteína.

6.5.1.5. *Catalase (CAT)*

A atividade da CAT foi determinada com base no decaimento de absorbância, pela reação de degradação do peróxido de hidrogênio catalisada pela enzima (Rocha, 2020). Para a quantificação, preparou-se uma curva padrão a partir de diluições seriadas do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com tampão fosfato de sódio e potássio, esperou-se 3 minutos e adicionou-se solução de molibdato de amônio para parar a reação. Para o branco, foram pipetados 100 µL de tampão fosfato de sódio e potássio e 150 µL de molibdato de amônia.

Neste protocolo, foram montadas duas placas de 96 poços, sendo um referente ao controle e a outra ao teste. Na placa controle, foram pipetados 5 µL de cada amostra, 100 µL de tampão fosfato de sódio e potássio, e 150 µL de molibdato de amônia em todos os poços. Já na placa teste, foram pipetados 5 µL da amostra, 100 µL de H₂O₂, cronometrados 3 minutos, e adicionados 150 µL de molibdato de amônia (Rocha, 2020). A absorbância foi lida em comprimento de onda de 374 nm (Thermo Scientific®, Multiskan SkyHigh). A quantificação foi expressa em unidades de catalase por mg de proteína totais (Rocha, 2020).

6.5.1.6. Glutathione-S-transferase

A análise da atividade da enzima GST envolve medir a capacidade das amostras biológicas de catalisar a conjugação da glutathione com substratos eletrofílicos, como o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Para isso, foram utilizadas as soluções de CDBN e GSH reduzida.

O espectrofotômetro foi zerado com tampão 7,0, e realizada a leitura do branco (980 µL de tampão 7,0 + 10 µL de CDBN + 10 µL de GSH), nos tempos T0, T30, T60 e T90, em triplicata. Para as amostras foram adicionados na cubeta 970 µL de tampão 7,0, 10 µL de CDBN, 10 µL de amostra, e 10 µL de GSH, e lidas nos tempos T0, T30, T60 e T90, em triplicata.

A habilidade de metabolizar o CDBN, conjugado com a glutathione reduzida (GSH), foi medida por espectrofotometria (Thermo Scientific®, Multiskan SkyHigh) a 340 nm, e expressa em unidades de GSH por mL de amostra (Habig; Jakoby, 1981).

6.6. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

6.6.1. Extração do RNA

A extração do RNA consistiu em macerar 100 mg de cólon em gral livre de RNase com 1 mL do reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), utilizando nitrogênio líquido para manter o órgão congelado. Em seguida, os homogeneizados foram transferidos para *ependorfs* de 1,5 mL e agitados manualmente durante 5 minutos. Após, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e feita agitação vigorosa, com vórtex (IKEME, Vortex Mixer MX-S), durante 30 segundos, e centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4°C (HITACHI, Centrifuge CT15RE).

Em seguida, 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo *ependorf*, juntamente com 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA. Os *ependorfs* foram agitados por inversão, incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4°C (HITACHI, Centrifuge CT15RE). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o RNA foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 9.500g por 5 minutos a 4°C (HITACHI, Centrifuge CT15RE).

Por fim, o sobrenadante foi descartado por inversão, o *pellet* foi colocado para secar em caixa de isopor com gelo e, em seguida, foi ressuspensão em 50 µL de água Mili-Q tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (Invitrogen Brasil Ltda.). Feito isso, o RNA foi armazenado a -80°C, até a realização da síntese do cDNA.

6.6.2. Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, foi utilizado o kit M-MLV *reverse transcriptase* (Invitrogen Brasil Ltda.). Assim, 2 µg de RNA foram adicionados a um tubo e tratados com 1 µL de tampão DNase e 2 µL de DNase. A mistura foi incubada em banho metabólico (Marconi, Banho Metabólico Dubnoff MA093) a 37°C durante 1 hora, para que ocorresse a reação de transcriptase reversa e consequente síntese do cDNA.

Em seguida, foi adicionado 1µL de *stop solution* e feita nova incubação em banho metabólico (Marconi, Banho Metabólico Dubnoff MA093) a 65°C durante 10 minutos. Após o banho, a amostra foi colocada no gelo enquanto se preparava o mix de oligo dT + dNTPs. Foram adicionados 2 µL desse mix em cada amostra, incubados por 5 minutos a 65°C e colocados no gelo. Feito isso, foram adicionados 7,1 µL do mix de tampão + DTT + RNase Out e 1µL de MMLV transcriptase reverse, e a mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora e, depois, a 70°C por 10 minutos (Livak; Schmittgen, 2001).

O cDNA foi armazenado a -80°C até o momento da realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

6.6.3. PCR quantitativo (qPCR)

Para a reação, foram utilizados 9 µL de mix de cada primer (*forward + reverse*), 1 µL de cDNA de cada amostra (*forward e reverse*). As sequências dos *primers* utilizados estão descritas na Tabela 3.

Para a amplificação e detecção foram realizadas com o sistema Eco™ Real-Time PCR (Illumina, CA, EUA), com as seguintes condições: transcrição reversa a 48°C por 15 minutos, desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 30 segundos.

Para cálculo do aumento da expressão do gene utilizou-se o método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001).

Tabela 3. Sequência de primers utilizados na análise de RT-PCR

Genes	Oligonucleotide (5'-3')	
	Forward	Reverse
Nrf2	CACATCCAGACAGACACCAAGT	CTACAAATGGGAATGTCTCTGC
NF-κB	CTGCGCGCTGACGGC	TCGTCGTCTGCCATGTTGAA
IL-1β	CCAGGATGAGGACCAAGCA	TGCTTGCCTCATCCTGG
β-actina	TTCGTTGCCGGTCCACACCC	GCTTTGCACATGCCGGAGCC

Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; NF-κB: fator nuclear kappa B; IL-1β: interleucina-1β.

6.7.Morfologia intestinal

Fragmentos do intestino de todos os animais de cada grupo foram removidos e fixados em formaldeído em temperatura ambiente. Após fixação, os tecidos foram desidratados em gradiente crescente de etanol (70 % até absoluto), e incluídos em resina contendo endurecedor (Leica, Historesin®). Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático Leica®.Em seguida os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, e examinadas sob microscópio de luz, utilizando objetiva de 4X e 10X.

Foram avaliadas profundidade e espessura das criptas, espessuras das camadas musculares circular e longitudinal, espessura da camada mucosa e submucosa, e número e área de células caliciformes, utilizando o aplicativo ImagePro-Plus®, versão 4.5 (Media Cybernetics) (Sabarense *et al.*, 2012).

6.8.Análise estatística

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 9.0.2 (GraphPad Prism Inc, La Jolla, CA, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste t foi utilizado para avaliar diferenças dentro de um mesmo grupo (não submetido ao EE x submetido ao EE). As diferenças intragrupos (AIN-93M, WPC + CCM e CCM) foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de médias de Newman-Keuls. Foi adotado valor de $p < 0,05$. Os resultados são expressos em média e desvio padrão (média ± DP).

6.9.Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sob o número de protocolo 72/2018 (Anexo B).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAK, A.; KHAN, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 3, p. 473–493, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-018-2943-4>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 23, n. 1A, p. 363–398, 2003.
- AGUILÓ, A. *et al.* Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. **Physiology & Behavior**, v. 84, n. 1, p. 1–7, 2005. Acesso em: 20 jun. 2024.
- AHMED, M. E.; HAMDY, A. M.; HAMMAM, A. R. A. Therapeutic Benefits and Applications of Whey Protein. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 9, n. 7, p. 337–345, 2020.
- AHN, E.; JEONG, H.; KIM, E. Differential effects of various dietary proteins on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Nutrition Research and Practice**, v. 16, n. 6, p. 700–715, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9702549/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35402549/). Acesso em: 25 jun. 2024.
- AHN, W. S.; PARK, S. J.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 3, p. 235–240, 2001.
- ALIMENTARIUS, C. **Milk and Milk Products**. Second Edied. Rome, 2011.
- AL-SADI, R. *et al.* IL-1 β -Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability Is Mediated by MEKK-1 Activation of Canonical NF- κ B Pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 5, p. 2322, 2010. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2966790/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2066790/). Acesso em: 23 jun. 2024.
- AL-SADI, R. *et al.* TNF- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier is regulated by ERK1/2 activation of Elk-1. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 6, p. 1871–1884, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24121020/>. Acesso em: 23 jun. 2024.
- ÁLVAREZ, J. *et al.* Microbiota intestinal y salud. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 44, n. 7, p. 519–535, 2021. Acesso em: 2 mar. 2023.

AMALRAJ, A.; DIVYA, C.; GOPI, S. The Effects of Bioavailable Curcumin (Cureit) on Delayed Onset Muscle Soreness Induced by Eccentric Continuous Exercise: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Study. **Journal of Medicinal Food**, v. 23, n. 5, p. 545–553, 2020.

ARAÚJO, D. F. S. *et al.* Intestinal anti-inflammatory effects of goat whey on DNBS-induced colitis in mice. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185382, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185382>. Acesso em: 25 jun. 2024.

ARUMUGAM, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature09944>. Acesso em: 2 mar. 2023.

AYA, V. *et al.* Association between physical activity and changes in intestinal microbiota composition: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0247039, 2021. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0247039>. Acesso em: 3 out. 2023.

BEAUMONT, M.; BLACHIER, F. Amino Acids in Intestinal Physiology and Health. *In*: AMINO ACIDS IN NUTRITION AND HEALTH. Springer, 2020. v. 1265, p. 1–20. Disponível em: <http://www.springer.com/series/5584>.

BOSCAINI, S. *et al.* The ‘Whey’ to good health: Whey protein and its beneficial effect on metabolism, gut microbiota and mental health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 133, p. 1–14, 2023. Acesso em: 3 out. 2023.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149–161, 2015. Acesso em: 24 jun. 2024.

BRUNI, N. *et al.* Antimicrobial Activity of Lactoferrin-Related Peptides and Applications in Human and Veterinary Medicine. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 752, 2016. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/6/752/htm>. Acesso em: 24 jun. 2024.

BURGE, K. *et al.* Curcumin and Intestinal Inflammatory Diseases: Molecular Mechanisms of Protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1912, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/8/1912/htm>. Acesso em: 26 jun. 2024.

CAMILLERI, M.; VELLA, A. What to do about the leaky gut. **Gut**, v. 71, n. 2, p. 424–435, 2022. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/71/2/424>. Acesso em: 28 maio 2024.

CAO, S. *et al.* Curcumin ameliorates oxidative stress-induced intestinal barrier injury and mitochondrial damage by promoting Parkin dependent mitophagy through AMPK-TFEB signal pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 147, p. 8–22, 2020. Acesso em: 26 jun. 2024.

CARDONA, F. *et al.* Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013. Acesso em: 5 set. 2024.

CERQUEIRA, É. *et al.* Inflammatory Effects of High and Moderate Intensity Exercise—A Systematic Review. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 489354, 2020. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 20 jun. 2024.

CHANTLER, S. *et al.* The Effects of Exercise on Indirect Markers of Gut Damage and Permeability: A Systematic Review and Meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 51, n. 1, p. 113–124, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40279-020-01348-y>. Acesso em: 23 jun. 2024.

CHEN, Yijing; XU, J.; CHEN, Yu. Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 2099, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/6/2099/htm>. Acesso em: 28 fev. 2023.

COBLEY, J. N. *et al.* The basic chemistry of exercise-induced DNA oxidation: Oxidative damage, redox signaling, and their interplay. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. JUN, p. 147699, 2015. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 20 jun. 2024.

CONAGIN, A. Determination of number of replications in the planning of experiments. **Bragantia**, v. 18, n. unico, p. 13–31, 1959. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87051959000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 23 nov. 2020.

CORRÊA-OLIVEIRA, R. *et al.* Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 4, p. e73, 2016. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4855267/](https://pmc/articles/PMC4855267/). Acesso em: 4 mar. 2023.

CUNNINGHAM, K. E.; TURNER, J. R. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1258, n. 1, p. 34–42, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22731713/>. Acesso em: 23 jun. 2024.

DA CONCEIÇÃO, A. R. *et al.* Protective effects of whey protein concentrate admixture of curcumin on metabolic control, inflammation and oxidative stress in Wistar rats submitted to exhaustive exercise. **British Journal of Nutrition**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33902765/>. Acesso em: 12 jul. 2021.

DAWSON, C.; HORVATH, S. M. Swimming in small laboratory animals. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, p. 51–78, 1970.

DE SANTIS, S. *et al.* Nutritional keys for intestinal barrier modulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. DEC, p. 167739, 2015. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 19 maio 2024.

DEN BESTEN, G. *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 9, p. 2325–2340, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23821742/>. Acesso em: 9 jun. 2024.

DI MEO, F. *et al.* Curcumin, Gut Microbiota, and Neuroprotection. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2426, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/10/2426/htm>. Acesso em: 26 jun. 2024.

DIAS, K. A. *et al.* Curcumin-Added Whey Protein Positively Modulates Skeletal Muscle Inflammation and Oxidative Damage after Exhaustive Exercise. **Nutrients**, v. 14, n. 22, p. 4905, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/22/4905/htm>. Acesso em: 3 out. 2023.

DIAS, I. M. de M. **Impacto do Consumo de Alimentos Ricos em Polifenóis no Eixo Intestino-Cérebro na Doença de Parkinson**. 2018. Disponível em: <http://ieeauthorcenter.ieee.org/wp-content/uploads/IEEE-Reference-Guide.pdf%0Ahttp://wwwlib.murdoch.edu.au/find/citation/ieee.html%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.cie.2019.07.022%0Ahttps://github.com/ethereum/wiki/wiki/White-Paper%0Ahttps://tore.tuhh.de/hand>.

DIETERICH, S. *et al.* Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33–39, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10618301/>. Acesso em: 23 nov. 2020.

DOMMETT, R. *et al.* Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. **Molecular immunology**, v. 42, n. 8, p. 903–912, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15829280/>. Acesso em: 27 maio 2024.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20–32, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3552>. Acesso em: 2 mar. 2023.

ENSARI, A.; MARSH, M. N. Exploring the villus. **Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench**, v. 11, n. 3, p. 190, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6040026/>. Acesso em: 13 jun. 2024.

ESTRUEL-AMADES, S. *et al.* Alterations in the innate immune system due to exhausting exercise in intensively trained rats. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-57783-4>. Acesso em: 20 jun. 2024.

FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55–71, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0433-9>. Acesso em: 5 set. 2024.

FARNFIELD, M. M. *et al.* Activation of mTOR signalling in young and old human skeletal muscle in response to combined resistance exercise and whey protein ingestion. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 37, n. 1, p. 21–30, 2012. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/h11-132>. Acesso em: 25 jun. 2024.

FARZAEI, M.; RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. The Role of Dietary Polyphenols in the Management of Inflammatory Bowel Disease. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 196–210, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25601607/>. Acesso em: 20 set. 2021.

GENSOLLEN, T. *et al.* How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 539–544, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27126036/>. Acesso em: 2 mar. 2023.

GILL, S. K. *et al.* 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. 114–128, 2015. Disponível em: www.alandalus-ut.com.

GILL, S. R. *et al.* Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355, 2006. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3027896/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16294471/). Acesso em: 2 mar. 2023.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases (Rat and Human). **Methods in Enzymology**, v. 77, n. C, p. 218–231, 1981. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6173570/>. Acesso em: 23 nov. 2020.

HASSAN, F. U. *et al.* Curcumin as an Alternative Epigenetic Modulator: Mechanism of Action and Potential Effects. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 514, 2019. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6557992/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3481111/). Acesso em: 25 jun. 2024.

HE, J. *et al.* Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6356, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6356/html>. Acesso em: 9 jun. 2024.

HEGER, M. *et al.* The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 222–307, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24368738/>. Acesso em: 25 jun. 2024.

HETZEL, M. *et al.* Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 5, p. 902–910, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12603323/>. Acesso em: 9 jun. 2024.

HOSOYAMADA, Y.; SAKAI, T. Structural and mechanical architecture of the intestinal villi and crypts in the rat intestine: Integrative reevaluation from ultrastructural analysis. **Anatomy and Embryology**, v. 210, n. 1, p. 1–12, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00429-005-0011-y>. Acesso em: 13 jun. 2024.

HUGHES, R. L.; HOLSCHER, H. D. Fueling Gut Microbes: A Review of the Interaction between Diet, Exercise, and the Gut Microbiota in Athletes. **Advances in Nutrition**, v. 12, n. 6, p. 2190–2215, 2021. Acesso em: 23 jun. 2024.

KIEWIET, M. B. G. *et al.* Immunomodulating protein aggregates in soy and whey hydrolysates and their resistance to digestion in an in vitro infant gastrointestinal model: new insights in the mechanism of immunomodulatory hydrolysates. **Food & Function**, v. 9, n. 1, p. 604–613, 2018. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/fo/c7fo01537b>. Acesso em: 24 jun. 2024.

KUNNUMAKKARA, A. B. *et al.* Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1325–1348, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.13621>. Acesso em: 25 jun. 2024.

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. C, p. 464–478, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1978225/>. Acesso em: 17 jul. 2021.

LI, M. *et al.* Donkey whey proteins ameliorate dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by downregulating the S100A8-TRAF6-NF- κ B axis-mediated inflammatory response. **Food Science and Human Wellness**, v. 12, n. 5, p. 1809–1819, 2023. Acesso em: 25 jun. 2024.

LIU, L. *et al.* Biological Function of Short-Chain Fatty Acids and Its Regulation on Intestinal Health of Poultry. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 736739, 2021. Acesso em: 9 jun. 2024.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Acesso em: 7 set. 2024.

LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 661–672, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25198138/>. Acesso em: 9 jun. 2024.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. Acesso em: 20 maio 2024.

MA, Y. *et al.* Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 9, p. 6902–6912, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27394940/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

MADUREIRA, A. R. *et al.* Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, n. 10, p. 1197–1211, 2007. Acesso em: 2 fev. 2023.

MAITHILIKARPAGASELVI, N. *et al.* Preventive effect of curcumin on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in high-fat fed obese rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 13, n. 2, p. 137–143, 2016.

MANN, B. *et al.* Bioactive Peptides from Whey Proteins. *In: WHEY PROTEINS: FROM MILK TO MEDICINE*. Academic Press, 2019. p. 519–547. Acesso em: 24 jun. 2024.

MANSINHBHAI, C. H. *et al.* Significance of whey protein hydrolysate on anti-oxidative, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities and release of peptides with biofunctionality: an in vitro and in silico approach. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 7, p. 2629–2642, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-021-05282-3>. Acesso em: 25 jun. 2024.

MINJ, S.; ANAND, S. Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. **Dairy**, v. 1, n. 3, p. 233–258, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2624-862X/1/3/16/htm>. Acesso em: 2 fev. 2023.

NATIVIDAD, J. M. M.; VERDU, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. **Pharmacological research**, v. 69, n. 1, p. 42–51, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23089410/>. Acesso em: 2 mar. 2023.

NAVIS, M. *et al.* Beneficial Effect of Mildly Pasteurized Whey Protein on Intestinal Integrity and Innate Defense in Preterm and Near-Term Piglets. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1125, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/4/1125/htm>. Acesso em: 25 jun. 2024.

O'BRIEN, D. P. *et al.* Intestinal Adaptation: Structure, Function, and Regulation. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 10, n. 2, p. 56–64, 2001. Disponível em: Acesso em: 13 jun. 2024.

OLIVEIRA, R. da S. *et al.* Ação Quimiopreventiva dos Fitoquímicos por meio da Regulação do Fator de Transcrição Nrf2: Revisão Integrativa da Literatura. **Revista Brasileira de**

Cancerologia, v. 66, n. 1, 2020. Disponível em:

<https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/428>. Acesso em: 26 jun. 2024.

OLVERA-ROSALES, L. B. *et al.* Bioactive peptides of whey: obtaining, activity, mechanism of action, and further applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 30, p. 10351–10381, 2023. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2022.2079113>. Acesso em: 24 jun. 2024.

ORUC, Z.; KAPLAN, M. A. Effect of exercise on colorectal cancer prevention and treatment.

World journal of gastrointestinal oncology, v. 11, n. 5, p. 348–366, 2019. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31139306/>. Acesso em: 23 jun. 2024.

PARADIS, T. *et al.* Tight Junctions as a Key for Pathogens Invasion in Intestinal Epithelial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2506, 2021. Disponível

em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2506/htm>. Acesso em: 19 maio 2024.

PEDROZA MATUTE, S.; IYAVOO, S. Exploring the gut microbiota: lifestyle choices,

disease associations, and personal genomics. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, p. 1225120, 2023. Acesso em: 28 maio 2024.

PELASEYED, T. *et al.* The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system.

Immunological Reviews, v. 260, n. 1, p. 8–20, 2014. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imr.12182>. Acesso em: 19 maio 2024.

PERRONE, Í. T. *et al.* Influence of pilot spray dryer settings on moisture and water activity of whole milk powder. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 393, p. 5–9, 2013. Acesso em: 5 jun. 2022.

PLOTKIN, D. L. *et al.* Isolated Leucine and Branched-Chain Amino Acid Supplementation for Enhancing Muscular Strength and Hypertrophy: A Narrative Review. **International**

Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, v. 31, n. 3, p. 292–301, 2021.

Disponível em: <https://journals.humankinetics.com/view/journals/ijsnem/31/3/article-p292.xml>. Acesso em: 25 jun. 2024.

POMPILI, S. *et al.* The Charming World of the Extracellular Matrix: A Dynamic and Protective Network of the Intestinal Wall. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 610189, 2021. Acesso em: 13 jun. 2024.

POPPI, F. A. *et al.* Soro de leite e suas proteínas: Composição e Atividade Funcional. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 2, p. 31–38, 2010.

PORTINCASA, P. *et al.* Intestinal Barrier and Permeability in Health, Obesity and NAFLD. **Biomedicines** v. 10, n. 1, p. 83, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/10/1/83/htm>. Acesso em: 27 maio 2024.

POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, v. 44, n. 3, p. 797–820, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-012-1393-9>. Acesso em: 7 set. 2024.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T.; QUINDRY, J. C. **Exercise Physiology: Theory and Application to Fitness and Performance**. 12th. ed.: McGraw Hill, 2023.

RACKERBY, B. *et al.* Potential Prebiotic Properties of Whey Protein and Glycomacropeptide in Gut Microbiome. **Food Science of Animal Resources**, v. 44, n. 2, p. 308, 2024. Disponível em: [/pmc/articles/PMC11097032/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/45811097032/). Acesso em: 25 jun. 2024.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

REICHARDT, N. *et al.* Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. **The ISME Journal**, v. 8, n. 6, p. 1323–1335, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24553467/>. Acesso em: 9 jun. 2024.

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 37, D. 15 D. F. D. 2018. **DIRETRIZ DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA**. 2018.

RIBEIRO, F. M. *et al.* Is There an Exercise-Intensity Threshold Capable of Avoiding the Leaky Gut?. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 627289, 2021. Acesso em: 28 maio 2024.

RÍOS-COVIÁN, D. *et al.* Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 185, 2016. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4756104/](https://pmc/articles/PMC4756104/). Acesso em: 4 mar. 2023.

ROCHA, B. de M. **Catalase PEGuilada como potencial biofármaco para tratamento do vitiligo**. 2020. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

SABARENSE, C. M. *et al.* A new computational method for hepatic fat microvesicles counting in histological study in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 418, n. 2, p. 284–289, 2012.

SABET, S. *et al.* Recent advances to improve curcumin oral bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 253–266, 2021. Acesso em: 25 jun. 2024.

SAH, B. N. P. *et al.* Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 726–740, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2016.1217825>. Acesso em: 24 jun. 2024.

SAHIN, K. *et al.* Effects of Whey Protein Combined with Amylopectin/Chromium on the Muscle Protein Synthesis and mTOR Phosphorylation in Exercised Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 202, n. 3, p. 1031–1040, 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-023-03732-x>. Acesso em: 25 jun. 2024.

SÁNCHEZ-MOYA, T. *et al.* In vitro modulation of gut microbiota by whey protein to preserve intestinal health. **Food and Function**, v. 8, n. 9, p. 3053–3063, 2017.

SASAKI, H. *et al.* Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 5, p. 660–665, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21532153/>. Acesso em: 20 dez. 2020.

SCAZZOCCHIO, B.; MINGHETTI, L.; D'ARCHIVIO, M. Interaction between Gut Microbiota and Curcumin: A New Key of Understanding for the Health Effects of Curcumin. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2499, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2499/htm>. Acesso em: 7 fev. 2023.

SCHOENFELD, B. J.; ARAGON, A. A. How much protein can the body use in a single meal for muscle-building? Implications for daily protein distribution. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 10, 2018. Acesso em: 23 nov. 2020.

SHEN, L.; LIU, L.; JI, H. F. Regulative effects of curcumin spice administration on gut microbiota and its pharmacological implications. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5553098/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35553098/). Acesso em: 9 fev. 2023.

SIEGFRIED, R.; RÜCKEMANN, H.; STUMPF, G. An HPLC method for determining organic acids in silage. **Landwirtschaftliche Forschung**, v. 37, n. 3/4, p. 298–304, 1984.

SOARES, N. L. **EFEITO DO JEJUM INTERMITENTE ASSOCIADO AO TREINAMENTO AERÓBICO SOBRE O EIXO INTESTINO-CÉREBRO DE RATOS WISTAR**. 2021. 1–90 f. - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, 2021.

SOHN, S. I. *et al.* Biomedical Applications and Bioavailability of Curcumin—An Updated Overview. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 2102, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/12/2102/htm>. Acesso em: 25 jun. 2024.

SONNENBURG, J. L.; BÄCKHED, F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 56–64, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature18846>. Acesso em: 28 maio 2024.

STANKOVIC, I. CURCUMIN - Chemical and Technical Assessment. **FAO**, v. 61st JECFA, p. 1–8, 2004.

STEWART, A. S.; PRATT-PHILLIPS, S.; GONZALEZ, L. M. Alterations in Intestinal Permeability: The Role of the “Leaky Gut” in Health and Disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 10–22, 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6467570/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35553098/). Acesso em: 23 jun. 2024.

STOHS, S. J. *et al.* Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 6, 2020. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7144558/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35553098/). Acesso em: 7 fev. 2023.

SUHETT, L. G. *et al.* Effects of curcumin supplementation on sport and physical exercise: a systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 946–958, 2021. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2020.1749025>. Acesso em: 26 jun. 2024.

SUZUKI, K. *et al.* Characterization and Modulation of Systemic Inflammatory Response to Exhaustive Exercise in Relation to Oxidative Stress. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 401, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/5/401/htm>. Acesso em: 8 nov. 2023.

SUZUKI, K.; HAYASHIDA, H. Effect of Exercise Intensity on Cell-Mediated Immunity. **Sports**, v. 9, n. 1, p. 8, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4663/9/1/8/htm>. Acesso em: 20 jun. 2024.

TANOUE, T. *et al.* A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. **Nature**, v. 565, n. 7741, p. 600–605, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-0878-z>. Acesso em: 5 set. 2024.

THIRUMALAI, T. *et al.* Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 1, n. 1, p. 63–66, 2011.

THOMSON, C. A. *et al.* Immunological roles of intestinal mesenchymal cells. **Immunology**, v. 160, n. 4, p. 313–324, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.13191>. Acesso em: 13 jun. 2024.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 2017. Disponível em: </biochemj/article/474/11/1823/49429/Introduction-to-the-human-gut-microbiota>. Acesso em: 2 mar. 2023.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; SELMA, M. V.; ESPÍN, J. C. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 19, n. 6, p. 471–476, 2016. Disponível em: https://journals.lww.com/clinicalnutrition/fulltext/2016/11000/interactions_of_gut_microbiota_with_dietary.12.aspx. Acesso em: 5 set. 2024.

TRYFIDOU, D. V. *et al.* DNA Damage Following Acute Aerobic Exercise: A Systematic Review and Meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 50, n. 1, p. 103–127, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40279-019-01181-y>. Acesso em: 20 jun. 2024.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical**

biochemistry, v. 524, p. 13–30, 2017. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27789233/>. Acesso em: 16 out. 2022.

TULLIE, L. *et al.* Building gut from scratch — progress and update of intestinal tissue engineering. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 19, n. 7, p. 417–431, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41575-022-00586-x>. Acesso em: 13 jun. 2024.

TUNC, N. *et al.* Favourable effects of whey protein on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rat model. **Archives of Medical Science**, v. 18, n. 6, p. 1625, 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC9710278/>. Acesso em: 25 jun. 2024.

UROŠEVIĆ, M. *et al.* Curcumin: Biological Activities and Modern Pharmaceutical Forms. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 135, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/2/135/htm>. Acesso em: 25 jun. 2024.

VAN EYKEN, P. *et al.* The Normal Biopsy: Mucosa and Submucosa. *In: COLITIS: A PRACTICAL APPROACH TO COLON BIOPSY INTERPRETATION*. Springer, Cham, 2014. p. 1–16. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-08028-4_1. Acesso em: 13 jun. 2024.

VANCAMELBEKE, M.; VERMEIRE, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 9, p. 821–834, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17474124.2017.1343143>. Acesso em: 27 maio 2024.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 331, n. 1, p. 63–68, 1996.

VESKOUKIS, A. S. *et al.* Whey protein boosts the antioxidant profile of rats by enhancing the activities of crucial antioxidant enzymes in a tissue-specific manner. **Food and Chemical Toxicology**, v. 142, p. 111508, 2020. Acesso em: 25 jun. 2024.

VITAL, M.; HOWE, A. C.; TIEDJE, J. M. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. **mBio**, v. 5, n. 2, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24757212/>. Acesso em: 9 jun. 2024.

WALLIN, B. *et al.* Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: Its use for evaluation of antioxidants.

Analytical Biochemistry, v. 208, n. 1, p. 10–15, 1993. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8434778/>. Acesso em: 23 nov. 2020.

YAO, Q. *et al.* The Milk Active Ingredient, 2'-Fucosyllactose, Inhibits Inflammation and Promotes MUC2 Secretion in LS174T Goblet Cells In Vitro. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 186, 2023.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/1/186/htm>. Acesso em: 25 jun. 2024.

ZHANG, H. *et al.* Advances in relieving exercise fatigue for curcumin: Molecular targets, bioavailability, and potential mechanism. **Journal of Food Science**, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1750-3841.17162>. Acesso em: 26 jun. 2024.

ZHANG, C. *et al.* Advances in the protection of intestinal mucosal barrier function by milk-derived miRNAs. **Food & Function**, v. 14, n. 9, p. 3909–3928, 2023. Disponível em:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/fo/d3fo00137g>. Acesso em: 25 jun. 2024.

ZHANG, P. Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9588, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/9588/htm>. Acesso em: 19 maio 2024.

ZHANG, S. *et al.* Polymerized Whey Protein Concentrate-Based Glutathione Delivery System: Physicochemical Characterization, Bioavailability and Sub-Chronic Toxicity Evaluation. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1824, 2021. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/7/1824/htm>. Acesso em: 25 jun. 2024.

ZHAO, C.; ASHAOLU, T. J. Bioactivity and safety of whey peptides. **LWT**, v. 134, p. 109935, 2020. Acesso em: 24 jun. 2024.

ZHU, J.; HE, L. The Modulatory Effects of Curcumin on the Gut Microbiota: A Potential Strategy for Disease Treatment and Health Promotion. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 642, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/12/4/642/htm>. Acesso em: 26 jun. 2024.

ZOU, W. *et al.* Whey Protein Hydrolysate Exerts Anti-Inflammatory Effects to Alleviate Dextran Sodium Sulfate (DSS)-Induced Colitis via Microbiome Restoration. **Nutrients**, v. 15,

n. 20, p. 4393, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/20/4393/htm>.
Acesso em: 25 jun. 2024.

7. RESULTADOS

7.1.Artigo 1

Can physical exercise modify intestinal integrity and gut microbiota composition? A systematic review of *in vivo* studies

Submetido na revista Biology of Sport

Abstract

There are little evidences about how physical exercise affects the intestinal microbiota since studies in the field are relatively recent. Thus, we aimed to systematically review the main effects of regular physical exercise on the intestinal integrity and microbiota composition in animal models, discuss the mechanisms involved and indicate future directions. Searches for original articles were performed in PubMed/MEDLINE, Scopus, Web of Science and Embase. A total of 18 studies were selected. These studies suggests that physical exercise has a significant impact on the intestinal microbiota. Voluntary running increased the thickness of duodenal villi and microbiota diversity but reduced its richness. Low-intensity treadmill running increased the abundance of the phylum Actinobacteria and the family Bifidobacteriaceae, while that of moderate-intensity reduced the Bacteroides/Prevotella ratio. High-intensity swimming and treadmill running altered the gut microbiota, evidenced by β -diversity, and increased the Shannon and Chao indices, but reduced short-chain fatty acids. Resistance exercise increased the Chao index and altered the functionality of the gut microbiota, increasing carbohydrate metabolism and reducing lipid and amino acid metabolism. Thus, regular physical exercise of different intensity and type can modify the gut microbiota, and the exercise benefits appear to be positively associated with training intensity.

Keywords: Microbiome; Microbial Community Compositions; Physical Activity; Training.

1.Introduction

Microbiota is the set of microorganisms that inhabit an environment (Marchesi and Ravel, 2015). A population of more than 100 trillion bacteria is found in humans and experimental animals, which act in the modulation of metabolic pathways in their host (Castro et al., 2021; Huttenhower et al., 2012).

Several studies have demonstrated the essential role of the microbiota in modulating metabolic pathways, including digestion, nutrient metabolism, regulation of the immune system, development of intestinal epithelial tissue, in addition to acting in the prevention of chronic diseases and production of bioactive compounds, such as short-chain fatty acids (SCFA) (Allam-Ndoul et al., 2020; Bonomini-Gnutzmann et al., 2022; Matson et al., 2021). However, the composition of the microbiota can change, disrupting the correct functioning of these mechanisms (Gensollen et al., 2016; Natividad and Verdu, 2013). The change in the composition and diversity of the microbiota may occur due to the presence of chemical components, immunological activity, and lifestyle factors like diet and physical activity, among others (Donaldson et al., 2015).

In mice, the practice of highly intensive physical exercises can increase the diversity and abundance of beneficial bacteria, such as Bacteroidetes, which plays a crucial role in several metabolic pathways like the degradation of complex sugar polymers, the improvement of glucose metabolism, and branch-chain amino acid degradation (Bonomini-Gnutzmann et al., 2022; Wang et al., 2020). In addition, physical exercise has been shown to increase mitochondrial function, resulting in the development of essential bacteria for urease production and lactate metabolism, processes relevant to the performance and recovery of athletes (Imdad et al., 2022). However, physical exercise was reported to interfere with the balance of the microbiota, leading to increased intestinal permeability and the Firmicutes/Bacteroidetes ratio, and a possible increase in food intake and weight gain (Tansathitaya et al., 2022).

Understanding the mechanisms underlying the influences of regular physical exercise in the microbiota and vice versa is of interest for athletes since the modulation of the intestinal microbiota can improve the use of nutrients and sports performance and reduce the recovery time during trainings and competitions (Mohr et al. 2020). For the practitioners of physical activities in general the modulation of the intestinal microbiota can reduce the risk of chronic diseases (Clarke et al. 2014). Thus, we aimed to systematically review the main effects of regular physical exercise on the intestinal integrity and gut microbiota composition, discuss the mechanisms involved and indicate future directions in the field of nutrition science and physical exercise.

2. Methodology

2.1. Protocol and registration

This systematic review was based on the following question: "Can physical exercise modify intestinal integrity and the composition of the intestinal microbiota?". The Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines were used to report the systematic review (Page et al., 2021). The review was registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) (Register number: CRD42023420063).

2.2. Eligibility criteria

The studies included in this review were *in vivo* studies with healthy rats or mice. Eligibility criteria were original studies that evaluated the effect of voluntary or forced physical exercise, with any follow-up time, on gut microbiota markers such as composition, diversity, and functionality. The results were compared to the control group, which is the group without physical exercise. Review articles, book chapters, studies that did not assess the markers of interest and studies carried out with other types of animals other than rats or mice were not included.

The population, intervention or exposure, comparator, outcomes and, study design (PICOS) used for this study are shown in Table 1.

Table 1. PICOS criteria for the inclusion of studies

Parameter	Inclusion criteria
Population	<i>In vivo</i> studies using rats and mice.
Intervention or exposure	Physical exercise (forced or voluntary and regardless of duration).
Comparison	Control (without physical exercise).
Outcome	Intestinal barrier integrity and gut microbial community analysis.
Study design	Experimental studies.

2.3. Search

Searches were conducted across multiple databases, including MEDLINE (via PubMed PubMed/MEDLINE <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Scopus

(<https://www.scopus.com/home.uri>), Embase (<https://www.embase.com>), and Web of Science (<https://www.webofknowledge.com>). Publication date and language were not used as restriction criteria.

A combination of the following search terms was performed: microbiome, gastrointestinal microbiome, microbial community, microbial community composition, microbial community structure, gut microbiome AND exercises, physical activity, physical exercise, acute exercise, isometric exercises, aerobic exercise, exercise training (Table S1). The search in PubMed was prepared according to the hierarchical distribution of MeSH terms (Medical Subject Headings), which was adapted for other platforms. The last search was performed on April 2, 2024.

The references and citations of selected articles (gray literature) were used to find other relevant studies. Also, the snowball method was performed to find national articles. After that, the articles were read and compared by the authors to resolve the differences.

2.4. Selection of studies

Two authors (SMSP and VPBSJ) independently selected the after reading the titles and abstracts, with a final level of agreement assessed by the kappa index of 0.93. Afterward, the were read in full, and the in vivo that evaluated the effect of performing or not performing physical exercise on the composition and integrity of the microbiota were included. For the removal of duplicates and blind reading by the authors (SMSP, VPBSJ, KVCM, LBL), the Rayyan software was used (Ouzzani et al., 2016). Differences between authors were resolved in consultation with another reviewer (AS) and the entire work was guided and reviewed by the other authors (AS, PF, AJN, HSDM, CMDL, JB).

2.5. Data extraction

After selecting the articles, the following data were extracted in a standardized and independent way: reference, year of publication, animal model, study protocol, duration, characteristics of the intervention, and the results of interest. Then, these data were analyzed by both authors to guarantee the study's reliability and integrity (Table 2).

2.6. Risk of bias

To assess the quality of the included studies, the SYRCLE Risk of Bias (RoB) methodology was used (Hooijmans et al., 2014). This assessment was carried out by the two

authors independently, considering the SYRCLE checklist, composed of 9 items that assess various types of bias (attrition bias, selection bias, detection bias, reporting bias, and performance bias, among others). The answers to each item are given by yes, no, and uncertain, which express, respectively, low risk (+), high risk (-) and unclear (?) risk of bias. Cochrane's Review Manager software version 5.4 was used to produce the figure with the final risk of bias of each study.

3. Results

3.1. Selection of studies

A total of 2,386 articles were identified. Then, 495 duplicates were removed, resulting in 1,891 articles, of which 1,872 were excluded after reading the titles and abstracts. After reading the articles in full, we excluded 1 article that did not evaluate the markers of interest. Thus, 18 articles were included in this review (Figure 1).

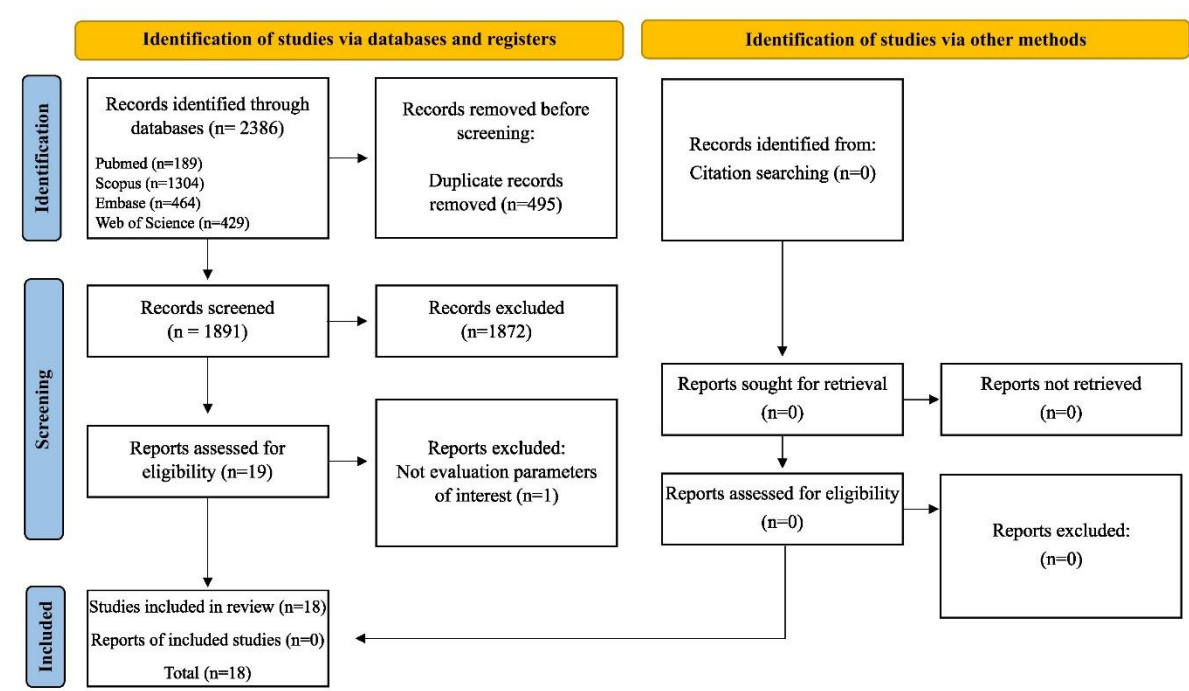


Figure 1. PRISMA diagram. Different phases of the selection of studies for conducting qualitative and quantitative analyses. Flow diagram of the systematic review literature search results. Based on Systematic review.

3.2. Characteristics of the included studies

Out of the 18 articles included in our review, 13 (72.2%) used male animals (7 with rats and 6 with mice) (Allen et al., 2015; Batacan et al., 2017; Campbell et al., 2016; Castro et al.,

2021; Lambert et al., 2015; Meliala et al., 2021; Mika et al., 2015; Queipo-Ortuño et al., 2013; Soares et al., 2021; Tansathitaya et al., 2022; Wan et al., 2022; Yang et al., 2021; Yuan et al., 2018), one (5.5%) used female mice (Yun et al., 2022), two (11.1%) used mice of both sexes (Anhê et al. 2022; Lamoureux et al., 2017) and two (11.1%) did not describe the sex of the mice used (Chen See et al., 2022; Wang et al., 2020). CB57/BL6 mice (n=6) and Wistar rats (n=4) were the two more commonly used species, the rest of the studies (n=8) used Sprague Dawley rats, Fischer F344 rats, Kunmin mice, ICR mice, C57/ WT, KM mice. The age of the evaluated animals ranged from 24 days to 12 months and the duration of the studies from 6 days to 24 months (Table 2).

Regarding the type of physical exercise performed by the animals, in 16 out of the 18 selected articles, the effects of exercise were evaluated using treadmill running (n=10) or running wheels (n=6). One study evaluated the effect of resistance exercise (i.e., ladder climbing) (Castro et al., 2021), and another tested the effects of swimming (Yuan et al., 2018). It is noteworthy that in all studies there was the presence of a control group that did not practice any physical exercise. In addition, in all studies, both animals that practiced physical activity and those that did not were given the same type of diet (Table 2).

Out of the 18 included articles, 16 (89%) used PCR of the 16S rRNA gene as the method for analyzing the gut microbiota, while 2 (11%) performed the analysis of the gut microbiota through specific culture media.

3.3. Alpha diversity

Out of the 18 articles selected, 16 of them evaluated alpha diversity, which was evaluated according to the abundance of phyla, orders, families, genera, and species, and also through richness and diversity indices.

3.3.1. Phylum

The phylum level was evaluated in 11 articles, of which four studies observed an increase in Actinobacteria after the practice of voluntary exercise (Lamoureux et al., 2017; Mika et al. 2015; Queipo-Ortuño et al. 2013), low-intensity exercise (Batacan et al., 2017).

Five articles observed an increase in the abundance of Bacteroidetes after voluntary freewheeling exercises (Lamoureux et al., 2017; Mika et al. 2015; Queipo-Ortuño et al. 2013), swimming (Yuan et al., 2018) or treadmill running (Yang et al., 2021). It is noteworthy that the study by Mika et al. (2015) reported this increase only in trained young animals. In three studies,

no differences were observed in the abundance of Bacteroidetes, either during voluntary or forced training (Allen et al., 2015), or when comparing forced exercise with sedentary exercise (Lamoureux et al., 2017; Yun et al. 2022).

Six articles evaluated the abundance of Firmicutes, and 3 of them found a decrease in the Firmicutes phylum in groups that underwent freewheeling training (Mika et al., 2015; Queipo-Ortuño et al., 2013) or forced training on a treadmill (Lamoureux et al., 2017). In the study by Mika et al. (2015), the decrease was observed in the young trained group. Two articles reported an increase in Firmicutes, specifically in relation to freewheeling (Lamoureux et al., 2017) and swimming (Yuan et al., 2018). Two studies found no significant change in the abundance of Firmicutes between groups (Allen et al., 2015; Yun et al., 2022).

Two studies analyzed the Firmicutes/Bacteroidetes ratio. Tansathitaya et al. (2022) reported a positive correlation between this ratio and heavy treadmill training compared to the sedentary group. On the other hand, Chen See et al. (2022) did not observe any changes in this ratio in trained animals.

In two articles, an increase in the abundance of Tenericutes was found in animals submitted to forced training (Allen et al., 2015) or that underwent low-intensity training (Batacan et al., 2017).

Five studies reported the presence of the Proteobacteria phylum. In 3 of these studies, a decrease in abundance was observed in trained young animals (Mika et al., 2015), animals that swim (Yuan et al., 2018), and animals that underwent high-intensity water training (Wang et al., 2020). Allen et al. (2015) found an increase in Proteobacteria in animals submitted to forced training, while Lamoureux et al. (2017) did not observe any difference in this phylum between the animals that performed voluntary exercise and the sedentary group.

Three other phyla were observed in three studies. Mika et al. (2015) reported an increase in the phylum Euryarchaeota in trained young animals. Wang et al. (2020) observed an increase in TM7 in the group that performed high-intensity training. Yun et al. (2022) found an increase in Cyanobacteria in the trained group.

Furthermore, it is noteworthy that Batacan et al. (2017) found no differences in the microbiota composition of trained and untrained animals.

3.3.2. Order

Three studies evaluated the composition of the microbiota at the order level and observed increased Clostridiales in the trained group in freewheeling for 12 weeks (Campbell

et al., 2016) and voluntary exercise for 55 days (Lamoureux et al., 2017) and 4 weeks (Wan et al., 2022). Furthermore, when only the response to forced running on a treadmill was evaluated, a decrease in Clostridiales and Lactobacillales were observed.

3.3.3. *Family*

Five studies assessed the microbiota composition at the family level. In one study, mice that exercised on a treadmill at 4.79 m/min for 60 min showed no difference in the Enterobacteriaceae family compared to the untrained group (Lambert et al., 2015). However, in another study, Wistar rats that ran on a treadmill at 8 m/min for 125 min showed an increased in Erysipelotrichaceae, Bifidobacteriaceae, and Coreobacteriaceae (Batacan et al., 2017). In another study, it was found that animals undergoing voluntary exercise showed no change in Bacteroidaceae compared to the control group (Lamoureux et al., 2017). However, despite this, voluntary exercise increased the abundance of the S24-7 family and decreased the abundance of Rikenellaceae.

In their study, Yuan et al. (2018) observed that animals submitted to two daily swimming sessions until exhaustion showed an increase in the abundance of the Helicobacteriaceae family and a decrease in Bacteroidales_S24-7_group and Lachnospiraceae. Additionally, Anhê et al. (2022) found that elderly mice undergoing aerobic exercise reduced Lachnospiraceae family compared to sedentary elderly mice, in this same group, a decrease in Turicibacteriaceae abundance was also reported.

Table 2. Characteristics of the studies included

Author, year	Animal model	Study protocol	Follow-up	Intervention characteristics	Main results
Queipo-Ortuño et al., 2013	5-wk-old male Sprague Dawley rats	G1: Exercise group (n = 10)	6 days	Voluntary running (Free access to running wheel)	↑ Genus: <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Clostridium</i> , and <i>Helicobacter</i> in G2 vs. G1; Genus: <i>B. Coccoides-E rectale</i> , <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> , Phylum: Actinobacteria and Bacteroidetes in G1 vs. G2.
		G2: Sedentary group (n = 10)			↓ Phylum: Firmicutes; Genus: <i>Enterococcus</i> in G1 vs. G2.
Allen et al., 2015	6-wk-old male C57BL/6J mice	FTR group (n = 10)	6 weeks	Treadmill running (Intensity: 8–12 m/min, 5% grade); 40 min/session; 1 session/day; 5 days/wk.	↔ Species richness in the feces between the groups by Shannon index; Bacteroidetes and Firmicutes.
		VWR group (n= 10)		Voluntary running (Free access to running wheel)	↑ Species richness in cecal contents in VWR by Shannon index; Tenericutes and Proteobacteria in FTR (FTR vs. SED/VWR); Genus: <i>Dorea</i> in FTR (FTR vs. SED), <i>Anaerotruncus</i> in VWR (VWR vs. SED).
		SED group (n= 9)			↓ Species richness in both the feces and the cecal contents in VWR by Chao1; Genus: <i>Turicibacter</i> in VWR (VWR vs. SED). * The exercise modified the beta diversity.
Lambert et al., 2015	6-wk-old male C57BL/KsJ mice	G1: Sedentary group (n = 10)	6 weeks	Treadmill running (Intensity: 2. 87-4,79 m/min, 0% grade); 60-66 min/session; 1 session/day; 5 days/wk.	↔ Total bacteria and <i>Enterobacteriaceae</i> family.
		G2: Exercise group (n = 10)			↑ Specie: <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Clostridium leptum</i> and <i>Clostridium cluster</i> (C-I) in G2. ↓ Genus: <i>Bacteroides/Prevotella spp.</i> and <i>Methanobrevibacter spp.</i> in G2.

Mika et al., 2015	Male Fischer F344 rats	G1: Juvenile sedentary group (n = 10) G2: Adult sedentary group (n = 10) G3: Juvenile run group (n = 10) G4: Adult run group (n = 10)	6 weeks	Voluntary running (Free access to running wheel)	↔ Microbial communities and species between G2 and G4. ↑ Microbial communities balanced (G2 and G4); Species, Phylum Actinobacteria in adult groups (Adults vs. Juvenile); Phylum Euryarchaeota and Bacteroidetes, Genus <i>Blautia spp.</i>, <i>Anaerostipes spp.</i> and <i>Methanosphaera spp.</i> in G3; Genus <i>Rikenellaceae g_AF12</i>, <i>Rikenellaceae g_</i> and <i>Turicibacter spp.</i> in G4. ↓ Microbial communities balanced in G3 (G1 vs. G3); Species in run groups (Run vs. Sedentary); Species, Phylum Firmicutes and Proteobacteria in G3 (G1 vs. G3); Genus: <i>Rikenellaceae g_AF12</i>, <i>Rikenellaceae g_</i> and <i>Desulfovibrio spp.</i> in G3. * Dissimilarity of microbial communities between the G1 and the G3 group.
Campbell et al., 2016	6-wk-old male C57BL/6NTac mice	LX: Lean exercise group (n = 9) LS: Lean sedentary group (n = 9)	12 weeks	Voluntary running (Free access to running wheel)	↔ Occludin expression, COX-2 expression. ↑ Thickness of villi, Specie: <i>Allobaculum spp.</i> and <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>, Order: <i>Clostridiales</i> in LX. ↓ E-cadherin expression in LX.

Batacan et al., 2017	12-wk-old male Wistar rats	LIT: Light intensity trained group (n= 3)	12 weeks	Treadmill running (Intensity: 8 m/min, 0% grade), 4 x 125 min with 2 h interval/day; 5 days/wk.	↔ Phylum level, alpha diversity between activity groups. ↑ Beta diversity difference between groups; Tenericutes (Family <i>Erysipelotrichaceae</i>) and Actinobacteria (Families <i>Bifidobacteriaceae</i> and <i>Coriobacteriaceae</i>), Specie: <i>Parasutterella excrementihominis</i> and <i>Lactobacillus johnsonii</i> in LIT; Specie: <i>Clostridium saccharolyticum</i> in HIIT; Specie: <i>Clostridium geopurificans</i> in HIIT and LIT.
		HIIT: High-intensity interval trained group (n= 6)		Treadmill running (Intensity: 50 m/min, 10% grade), 4 x 150 s with 3 min resting interval/session; 1 session/day; 5 days/wk.	
		CLT: Control group (n= 6)			
		SED: Sedentary group (n=8)			
Lamour et al., 2017	6- to 10-wk-old male and female C57BL/6 mice	VE: Voluntary exercise group (n= 10)	55 days	Voluntary running (Free access to running wheel)	↔ Alpha diversity; Species richness for mucosal samples; Beta-diversity; Phylum: Proteobacteria and Family: <i>Bacteroidaceae</i> (VE vs. VC); Phylum: Bacteroidetes (FE vs. VC). ↑ Phylum: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria and Family: S24-7 and Order: <i>Clostridiales</i> (VE vs. VC); Genus: <i>Bacteroides</i> (FE vs. VC). ↓ Family: <i>Rikenellaceae</i> (VE vs. VC); Phylum: Firmicutes and Genus: <i>Parabacteroides</i> and Order: <i>Clostridiales</i> , <i>Lactobacillales</i> (FE vs. VC).
		FE: Forced exercise group (n= 11)		Treadmill running, (Intensity: 15-20 m/min, 0% grade); 40 min/session; 5 days/wk.	
		VC: Sedentary control group (n=21)			

Yuan et al., 2018	6-wk-old male Kunmin mice	ES: Chow diet plus excessive swimming group (n = 10) NS: Chow diet plus non-swimming group (n = 10)	4 weeks	Swimming Two sessions/day (morning and afternoon) of swimming until exhaustion; 7 days/wk.	↔ Small intestine and colon structures. ↑ Abundant phyla: Bacteroidetes and Firmicutes; Abundant family: <i>Helicobacteraceae</i> ; Abundant genera: <i>Helicobacter</i> , <i>Bacteroides</i> in ES. ↓ Overall diversity of the microbiota; Abundant phyla: Proteobacteria; Abundant family: <i>Bacteroidales_S24-7_group</i> , <i>Lachnospiraceae</i> ; Abundant genera: <i>Odoribacter</i> in ES. * Dissimilarity of bacterial communities between the NS and the ES group.
Wang et al., 2020	12-month-old ICR mice	G1: Control plus AIN-93M diet group (n = 9) G2: High-intensity interval training plus AIN-93M diet group (n = 9)	7 weeks	Treadmill running (Intensity: 90% $\text{VO}_{2\text{max}}$, 0% grade); intermittent run (5 x 3 min to 6 x 4 min with 2-min resting intervals/session); 1 session/day; 5 days/wk.	↑ Shannon index; Phylum: TM7 and Genus: <i>Dorea</i> and <i>Dehalobacterium</i> ; Functions related to carbohydrate metabolism in G2. ↓ Phylum Proteobacteria and <i>Candidatus arthromitus</i> genera; Genes related to diseases in G2. * Beta diversity analysis showed differences between the groups.
Castro et al., 2021	45-day-old male Wistar	G1: Sedentary control group G2: Resistance training group	12 weeks	Resistance training (Intensity: progressive till exhaustion); over 4 climbings on a vertical ladder/session; 1 session/day; 3 days/wk.	↑ Chao index in the G2 (G1 vs. G2); Genus: <i>Coprococcus_1</i> relative abundance. ↓ Genus: <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> and <i>Comamonas</i> relative abundance, lipid and amino acids metabolism, cellular processes and signaling in G2. * Beta diversity analysis showed differences between G2 compared to G1 and G2 baseline.

Meliala et al., 2021	3- to 4-month-old male Wistar rats	G1: Control group (n = 6) G2: Moderate-intensity physical exercise group (n = 6) G3: High-intensity physical exercise group (n = 6)	5 weeks	Treadmill running G2: (Intensity: 55% VO _{2max} , 10% grade); 30 min/session; 1 session/day; 5 days/wk. G3: (Intensity: 85% VO _{2max} , 10% grade); 30 min/session; 5 days/wk.	↔ SCFA production in G2 (G1 vs. G2); Lactic acid bacteria among the groups. ↓ SCFA production in G3 (G1 vs. G3); Specie: <i>Escherechia coli</i> in G2 (G2 vs. G3).
Soares et al., 2021	140-day-old male Wistar rats	G1: Sedentary plus commercial diet group (n = 10) G2: Trained plus commercial diet group (n = 10)	4 weeks	Treadmill running (Intensity: 15 m/min, 10% grade); 30 min/session; 1 session/day; 5 days/wk.	↔ Bacteria count, colon histology. ↑ Propionic acid on the gut and feces in G2. ↓ Succinic acid in the gut and acetic acid in the feces in G2.
Yang et al., 2021	5-wk-old male C57BL/6 mice	G1: No exercise group (n = 15) G2: Exercise group (n = 15)	14 weeks	Treadmill running (Intensity: 14-19 m/min, 0% grade); 60 min/session; 1 session/day; 5 days/wk:	↔ Beta diversity. ↑ Bacteroidetes, metabolic activity was related to the increase of microbiota in G2; Chao index in G1.
Anhê et al., 2022	2- to 26-month-old male and female C57BL/6J mice	Y-SED: Young sedentary group (n= 39) O-SED: Old sedentary group (n= 26) O-AET: Old lifelong aerobic exercise group (n= 30)	24 months	Voluntary running (Free access to running wheel)	↔ Beta diversity (O-SED vs. O-AET) ↓ Family: <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Turicibacteriaceae</i> , Genus: <i>Allobaculum</i> , <i>Anaeroplasma</i> and <i>Akkermansia</i> in O-AET (O-SED vs. O-AET); Genus: <i>Eubacterium</i> in O-AET (O-AET vs. Y-SED).

Chen See et al., 2022	16-wk-old C57/WT mice	G1: No exercise group (n= 12) G2: Exercise group (n= 11)	8 weeks	Treadmill running, (Intensity: 15 m/min, 0% grade); 30 min/session; 1 session/day; 5 days/wk.	↔ Alfa diversity; Firmicutes/Bacteroidetes ratio. * Beta diversity analysis showed differences between the groups.
Tansathitay et al., 2022	8- to 11-wk-old male Sprague-Dawley rats	G1: No exercise group (n= 6) G2: Light exercise group (n= 6) G3: Heavy exercise group (n= 6)	45 days	Treadmill running (60 min/session; 1 session/day; 5 days/wk). Light (Intensity: 10-15 m/min, 0% grade). Heavy (Intensity: 20-25 m/min, 0% grade).	↑ Chao 1 index in G3 (G2 vs. G3). * Beta diversity analysis showed differences among exercise groups compared to G1. <i>Prevotella</i> genus showed a negative correlation with G2 and G3. Firmicutes/Bacteroidetes showed positive correlation with G3 and G1.
Wan et al., 2022	1-month-old male KM mice	G1: Control group (n= 15) G2: Running group (n= 15)	4 weeks	Voluntary running (Free access to running wheel)	↔ ACE, Chao and Shannon index. ↑ Abundance of Genus: <i>Parabactoids</i> , <i>Anaerovorax</i> , Order: <i>Clostridiales</i> in G2; Abundance of Genus: <i>Anaerotruncus</i> and <i>Odoribacter</i> in G1. ↓ Genus: <i>Intestinimonas</i> on G2. * Beta diversity analysis showed differences between the communities of the groups.
Yun et al., 2022	4-wk-old female C57BL/6 mice	G1: Chow diet group (n= 5) G2: Chow diet plus exercise group (n= 5)	8 weeks	Treadmill running (Intensity: 15-20 m/min, 5% grade); 60 min/session; 1 session/day; 5 days/wk.	↔ Firmicutes and Bacteroidetes abundance; Beta diversity. ↑ Cyanobacteria in G2. ↓ <i>Paraprevotellaceae</i> family in G4. * Beta diversity analysis showed differences between the communities of the group.

ACE: Abundance Based Coverage Estimator. AET: Aerobic exercise training. FTR: Forced treadmill running. SED: Sedentary. VWR: Voluntary wheel running. VO₂max: Maximal oxygen consumption. wk: week.

3.3.4. Genus

Out of the selected studies, 3 studies evaluated the abundance of *Bacteroides*, and 2 of them reported an increase in the abundance of this genus following either forced exercise on a treadmill (Lamoureux et al., 2017) or swimming (Yuan et al., 2018). In contrast, another study found that the non-exercised group had an increased abundance of the genus *Bacteroides* (Queipo-Ortuño et al., 2013).

The genus *Prevotella* was evaluated by 2 studies, which presented similar data. In one study, the abundance of the *Prevotella* genus decreased with increasing exercise intensity, both in light and intense exercises, compared to the absence of physical exercise (Tansathitaya et al., 2022). In another study conducted by Queipo-Ortuño et al. (2013), a higher abundance of *Prevotella* was observed in untrained animals. Additionally, in a separate study, rats subjected to moderate to intense running exhibited a reduced *Bacteroides/Prevotella* ratio compared to sedentary rats (Lambert et al., 2015).

One study observed an increase in the *Turicibacter* abundance when adult animals actively engaged in wheel activity (Mika et al., 2015), another study observed a decrease in *Turicibacter* in animals that performed voluntary exercise compared to sedentary animals (Allen et al., 2015). As for the genus *Odoribacter*, the selected studies reported contradictory results. In the study by Yuan et al. (2018), a decrease in this genus was observed in animals that practiced swimming for 4 weeks. However, in the study by Wan et al. (2022), the practice of voluntary exercise led to its increase. Furthermore, in the latter study, an increase in the abundance of *Dorea* and *Anaerotruncus* was also observed, which aligns with the results found in the study by Allen et al. (2015).

Moreover, among the selected studies, 4 of them assessed the impact of voluntary exercise on the microbiota, revealing that physical exercise increased the abundance of the following genera: *Clostridium*, *B. Coccoides-E rectale*, *Blautia spp*, *Anaerostipes spp*, *Methanosphaera spp*, *Rikenellaceae g_AF12*, *Rikenellaceae g_Parabactoids* and *Anaerovorax* (Mika et al., 2015; Queipo-Ortuño et al., 2013; Wan et al., 2022). Additionally, it was found that physical exercise reduced the abundance of *Enterococcus*, *Rikenellaceae g_*, *Rikenellaceae g_AF12*, *Desulfovibrio spp*, *Allobaculum*, *Anaeroplasma*, *Akkermansia*, *Eubacterium* and *Intestinimonas* (Anhê et al., 2022; Mika et al., 2015; Queipo-Ortuño et al., 2013; Wan et al., 2022).

When the animals underwent forced treadmill training, researchers observed an increase in the abundance of *Dehalobacterium* and a decrease in *Methanobrevibacter*, *Parabacteroides*, *Candidatus arthromitus* (Lambert et al. 2015; Lamoureux et al., 2017; Wang et al. 2020).

Only one study evaluated the effect of resistance exercise on the intestinal microbiota, in which an increase in *Coprococcus_1* and a decrease in *Pseudomonas*, *Serratia* and *Comamonas* was found in animals manifested by resistance exercise (Castro et al., 2021).

3.3.5. Species

Among all the articles analyzed by this review, 5 studies assessed the microbiota at the species level. Among these, 3 articles evaluated the effect of forced exercise on a treadmill (Batacan et al., 2017; Lambert et al., 2015; Meliala et al., 2021), and 2 articles evaluated the effect to voluntary exercise on a wheel (Campbell et al., 2016; Mika et al., 2015).

Among the studies that evaluated forced exercise, increases in the species *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium leptum* and *Clostridium cluster* (C-I) (Lambert et al., 2015), *Parasutterella excrementihominis* and *Lactobacillus johnsonii*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium gelpurificans* were observed (Batacan et al., 2017). Furthermore, a reduction in *Escherichia coli* was observed (Meliala et al., 2021).

Regarding voluntary exercise, the study by Mika et al. (2015) found no difference in the species composition of the intestinal microbiota between the sedentary and trained adult groups. However, an increase in the number of species was observed when comparing adult animals with young ones. Additionally, there was a decrease in species in trained animals compared to sedentary ones. In the study by Campbell et al. (2016), an increase in *Halobaculum spp.* and *Faecalibacterium prausnitzii* was observed in trained animals.

3.3.6. Richness and diversity indexes

In 6 studies, the Shannon and Chao indexes were utilized to assess intestinal microbial richness and diversity in groups. The analysis of diversity using the Shannon index showed contradictory results among the selected studies.

In the study by Allen et al. (2015), both forced exercise on a treadmill and voluntary exercise did not alter the microbial diversity of mouse feces. However, when this diversity was evaluated in the cecal content, the animals that underwent voluntary training increased this index. In contrast to this result, the study by Wan et al. (2022) found no difference in the Shannon index in mice submitted to voluntary training or not. In another study, where mice

were exposed to high-intensity intermittent exercise, an increase in diversity was also observed in the trained group.

Similar to the Shannon index, the Chao index also presents contradictory data among studies. In animals that exercised voluntarily, there was a reduction in the Chao 1 index (Allen et al., 2015). A similar result was found by Yang et al. (2021), where the sedentary group had a higher Chao index compared to the trained group. In contrast, in studies by Castro et al. (2021) and Tansathitaya et al. (2022), which focused on resistance exercise and high-intensity treadmill running, respectively, there was an increase in the Chao index in trained animals. In a more recent study evaluating the effect of voluntary exercise on the intestinal microbiota, no differences were found in diversity using the Chao index (Wan et al., 2022). Furthermore, in terms of species richness analysis, Lamoureux et al. (2017) found no difference in species richness in a sample of intestinal mucosa between trained and untrained groups.

3.4. Beta diversity

Among the included studies, 12 evaluated beta diversity. Out of these, 5 studies examined the effect of voluntary exercise on intestinal microbial beta diversity. In 3 of out 5 studies, voluntary exercise did not have an impact on microbial diversity between trained and untrained rats (Anhê et al. 2022; Lamoureux et al., 2017; Mika et al. 2015). In the studies conducted by Allen et al. (2015) and Wan et al. (2022), the practice of voluntary physical exercise in a circle altered beta diversity.

Eight studies analyzed the effects of forced treadmill exercise on microbial diversity. In 6 of these studies, running on a treadmill, whether light or heavy, continuous or intermittent, changed the intestinal microbiota of trained rats, resulting in the formation of distinct communities when compared to sedentary control (Allen et al., 2015; Batacan et al., 2017; Chen See et al., 2022; Tansathitaya et al., 2022; Wang et al., 2020; Yun et al., 2022). Lamoureux et al. (2017) found that rats that voluntarily exercised did not exhibit changes in beta diversity compared to the sedentary group. Similarly, Yang et al. (2021) observed no changes in microbial diversity between the rats that underwent the training program and the control group.

Additionally, Yuan et al. (2018) observed a dissimilarity between bacterial communities in animals that underwent swimming compared to sedentary animals. The study by Castro et al. (2021) showed a difference in the beta diversity between animals subjected to vertical climbing for 12 weeks and sedentary animals (Castro et al., 2021).

3.5. Mucosal integrity

The integrity of the mucosa is directly linked to the intestinal microbiota, which can modulate the expression of proteins associated with intestinal permeability and also alter the morphology of this organ. In the study conducted by Campbell et al. (2016), an increase in duodenal villi thickness and a decrease in e-cadherin were observed in trained animals. However, the expression of occludins and COX 2 showed no significant difference between the trained and sedentary groups. In two other studies that examined intestinal morphology after physical exercise (swimming or running on a treadmill), no discernible differences were observed in the structures of the small intestine and colon in these animals compared to the untrained group (Soares et al., 2021; Yuan et al., 2018).

3.6. Functionality of the microbiota

Two studies observed a decrease in lipid and amino acid metabolism, cellular processes, and signaling in resistance training compared to the sedentary control group (Castro et al., 2021; Wang et al., 2020). Additionally, a reduction in genes associated with diseases, such as obesity, was observed in the high-intensity interval training group compared to the control group (Wang et al., 2020).

The practice of physical exercise increased the functions of the microbiota related to carbohydrate metabolism and decreased the metabolism of lipids and amino acids (Castro et al., 2021; Wang et al., 2020). In a study conducted by Yang et al. (2021), a positive correlation was observed between the practice of moderate-intensity physical exercises and the enhancement of metabolic activity in the intestinal microbiota.

Trained rats exhibited increased production of propionic acid in both feces and the intestine, while showing reduced production of acetic acid in the feces and succinic acid in the intestine compared to the sedentary group (Soares et al., 2021). Similar findings were observed in rats submitted to high-intensity exercises, where the production of SCFA decreased compared to the control group (Meliala et al., 2021). However, in the same study, when evaluating the effect of moderate physical activity, no significant differences were observed in SCFA production between the moderately trained and sedentary groups. Additionally, there were no difference in lactic acid bacteria among all the groups evaluated in the study.

3.7. Risk of bias

In the studies included in this systematic review (n=18), the random component in the sequence generation process was described in only one article (5.56%), the baseline characteristics were mentioned in three articles (16.67%). Allocation concealment, caregiver and investigator blindness, random selection for outcome assessment, and rater blinding were not described in all articles (100%). Random allocation of animals was reported in 13 studies (72.22%), in one study not all pre-specified primary outcomes were reported (5.56%) and finally, one study did not make it clear that it was free from other problems that could result in a high risk of bias (5.56%) (Figure 2).

	Random sequence generation (selection bias)	Baseline characteristics	Allocation concealment (selection bias)	Random housing	Blinding of participants and personnel (performance bias)	Random outcome assessment	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
Allen, 2015	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Anhê, 2022	?	+	?	?	?	?	?	+	+
Batacan, 2017	?	?	?	+	?	?	?	-	+
Campbell, 2016	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Castro, 2021	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Chen See, 2022	?	?	?	?	?	?	?	+	?
Lambert, 2015	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Lamoureux, 2017	-	?	?	?	?	?	?	+	+
Meliala, 2021	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Mika, 2015	+	+	?	+	?	?	?	+	+
Queipo-Ortuño, 2013	?	+	?	+	?	?	?	+	+
Soares, 2021	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Tansathitaya, 2022	?	?	?	?	?	?	?	+	+
Wan, 2022	-	?	?	-	?	?	?	+	+
Wang, 2020	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Yang, 2021	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Yuan, 2018	?	?	?	+	?	?	?	+	+
Yun, 2022	?	?	?	+	?	?	?	+	+

Figure 2. Risk of bias assessment: Summary of authors' judgments on the risk of bias item for each included study. Articles were scored with “yes” indicating low risk of bias, “no” indicating high risk of bias, or “unclear” indicating that the item was not reported, according to the Center for Systematic Review for Experimentation with Laboratory Animals parameters. (SYRCLE). Green (+): Low risk of bias; Yellow (?): Possible risk of bias; Red (-): High risk of bias.

4. Discussion

The studies revised here suggest that regular physical exercise has a significant impact on the intestinal microbiota (Allen et al. 2015; Anê et al. 2022; Lamoureux et al., 2017; Mika et al. 2015). Moreover, such impact is highly variable according to the type and intensity of the exercise performed, and to the age of individuals (Mika et al., 2015; Mohr et al., 2020b).

Several studies have shown that most human diseases, such as obesity, diabetes, and psychiatric diseases, affect the diversity of the intestinal microbiota (Gomes, 2017; Lach et al., 2017; Mosca et al., 2016; Rodrigues, 2016). Thus, the practice of different types of exercise, either forced or voluntary, as a strategy for modulating the composition of the intestinal microbiota is of paramount importance for maintaining good microbiological diversity, as well as its stability, which is associated with a healthier status (Clarke et al., 2014b; Mika et al., 2015; Yuan et al., 2018) (Figure 3).

Among the most interesting alterations observed was the increase in the abundance of the Phylum Firmicutes, as well as in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio, after training. This data is controversial since the increase in Firmicutes as well as in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio has been correlated with an obese and unhealthy phenotype (Stojanov et al., 2020), due to its greater efficiency in extracting calories from food, promoting a more efficient absorption with consequent weight gain (Berry, 2016; Krajmalnik-Brown et al., 2012).

Despite that, these results must be evaluated with caution since the microbiota analysis at the phylum level presents a very broad character, therefore, it becomes dangerous to characterize an entire phylum as bad. For example, *Clostridium leptum*, belonging to the Firmicutes phylum, is related to increased production of butyrate and SCFA, which has beneficial functions such as improvement of the intestinal epithelium, protection against pathogens and intestinal diseases (Berry and Reinisch, 2013; Matsumoto et al., 2008; Queipo-Ortuño et al., 2013). Thus, the elevation of butyrate-producing Firmicutes can be beneficial to the host (Guilloteau et al., 2010; Lambert et al., 2015).

Two out of the 18 evaluated studies showed consensus on the role of regular physical exercise in increasing the abundance of the phylum Firmicutes (Allen et al., 2015; Batacan et al., 2017). Despite that, the role of this phylum in the intestinal microbiota is still contradictory. Studies have already associated this phylum with the ingestion of high-fat diets and also ulcerative colitis (Lee and Ko, 2014; Wirosko et al., 1990), but in another study, its abundance was reduced in colitis (Nagalingam et al., 2011). Therefore, deeper research must be carried out to understand its role in the homeostasis of the gastrointestinal tract.

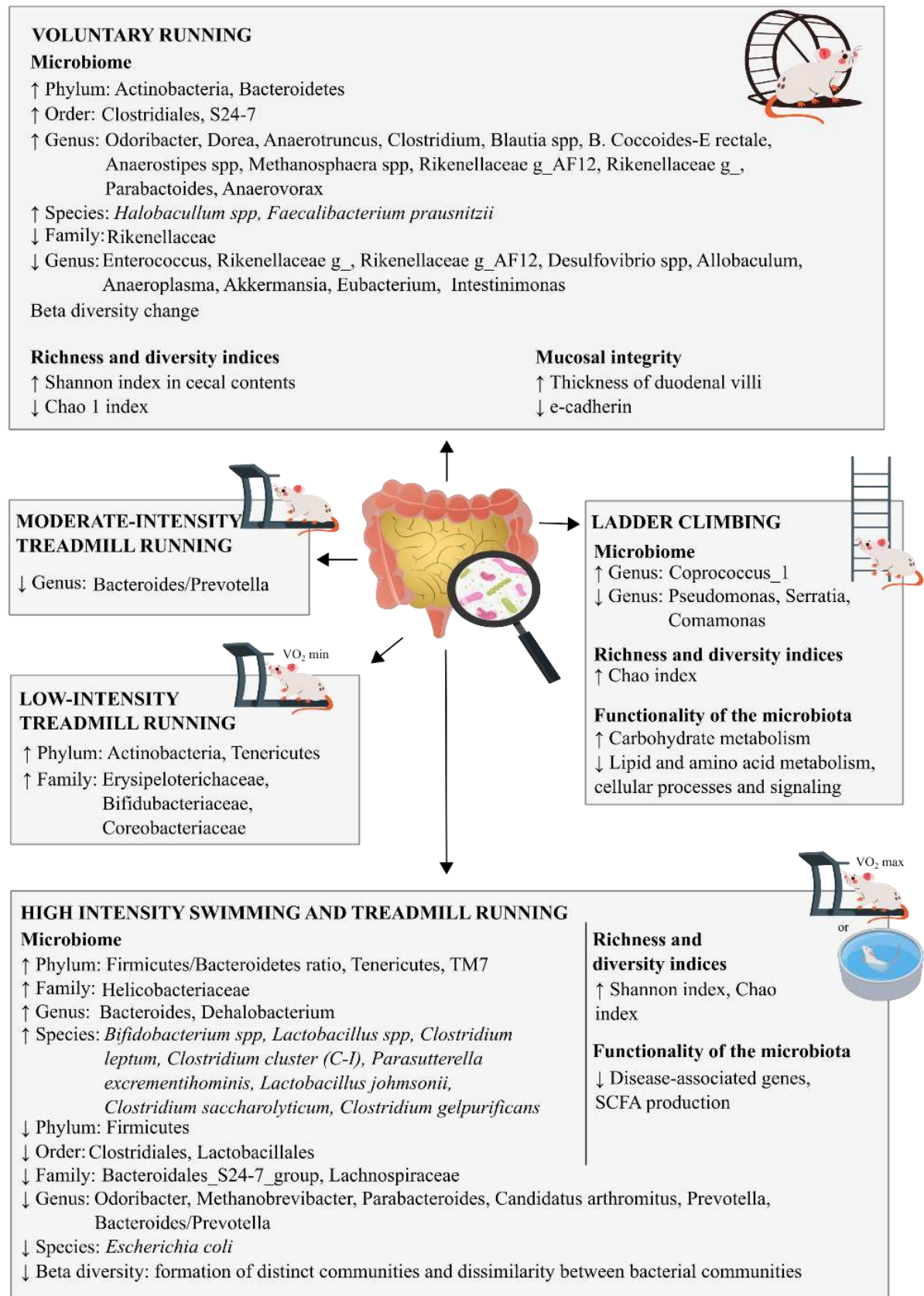


Figure 3. Impacts of physical exercise on the microbiota in an animal model.

When evaluating the taxonomic level of order, the Clostridiales call attention. Voluntary running increased the abundance of this order (Campbell et al. 2016; Lamoureux et al., 2017; Wan et al. 2022). Bacteria belonging to this order produce SCFA (Baotherman et al., 2016), which can act in the prevention of obesity, colon cancer, and Crohn's disease (Joossens et al., 2011; Lin et al., 2012; Moeinian et al., 2014).

Regarding the family level, unexpected results were observed by Yuan et al. (2018) and Anhê et al. (2022), in which the abundance of Lachnospiraceae reduced in mice who underwent swimming or voluntary running protocols, respectively. This family of bacteria is known for its high production of butyrate, which has several health benefits (Pedersen et al., 2001). It is hypothesized that a slight change in the inflammatory response can cause immunological and neuroendocrine changes that contribute to the alteration of the intestinal microbiota (Monda et al., 2017; Nilsson et al., 2019). This result, found by Yuan et al. (2018) and Anhê et al. (2022), was corroborated by a study that associated Lachnospiraceae with a more inflammatory state (Zeng et al., 2016).

When analyzing the results at the genus level, the increase in the abundance of *Bacteroides* seems to be related to the practice of enforced exercises (i.e., treadmill running and swimming) (Lamoureux et al., 2017; Yuan et al. 2018), while the practice of voluntary running does not have such effect (Queipo-Ortuño et al., 2013). Bacteria belonging to this genus produce SCFA, mainly acetate and propionate, which help control energy metabolism (Kong et al., 2013; Wan et al., 2022). In a study conducted by Yang et al. (2017), *Bacteroides acidifaciens* were related to the prevention of obesity, through the improvement of insulin sensitivity and energy metabolism. This effect is likely due to acetate's ability to promote insulin secretion (Kong et al., 2013).

The practice of physical exercise also altered beneficially the abundance of the genera *Prevotella* and *Turicibacter*, both of which can act in the modulation of the host's immune response. *Prevotella* species can act on type 17 helper T cells and regulatory T cells, initiating an immune imbalance that is related to a high risk of rheumatoid arthritis (Dimitriu et al., 2013; Moreno, 2015). In a study carried out with knockout mice for Toll-like receptor 2, no *Turicibacter* population was detected, showing its relationship with the immune response (Kellermayer et al., 2011).

Out of the selected studies, only 5 assessed the intestinal microbiota down to the species level. Among the species that had their abundance increased, *Lactobacillus spp* stands out (Lambert et al., 2015), and it has been observed that probiotic supplements with *Lactobacillus*

strains have been associated with improved physical performance (Pyne et al., 2015). Despite that, the increase in the abundance of *Lactobacillus* was observed only with the performance of moderate to intense physical exercise, whereas at low intensity they may have the opposite effect (Lambert et al. 2015; Lamoureux et al., 2017).

Alpha diversity analyzes were performed using the Chao and Shannon indexes. In general, the Chao index measures community richness while the Shannon index assesses the richness and uniformity of a community. Among the selected studies, 4 had a test group that underwent voluntary running, and observed reduced alpha-diversity in 2 of these studies (Allen et al., 2015; Yang et al., 2021) while the other 2 studies showed no difference between exercised and control mice (Lamoureux et al., 2017; Wan et al. 2022). However, when forced exercise was evaluated, it proved to be more efficient in changing diversity. For example, in the studies by Castro et al. (2021) and Tansathitaya et al. (2022), the rats submitted to ladder climbing or treadmill running, respectively, showed an increase in alpha diversity when compared to their non-exercised controls.

Thus, as with alpha diversity, enforced exercise is more effective in modifying beta diversity. Studies have suggested that increased diversity is related to improved metabolic functions and general health status (Shanahan, 2010). These effects may be related to the activation of intracellular AMP kinase, caused by physical exercise. Activation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway leads to improved insulin sensitivity, and improved metabolic regulation, and may exert an anti-inflammatory action that is reflected in the improvement of the microbiota (Allen et al., 2015; Coughlan et al., 2014).

With regard to intestinal morphology, regular physical exercise, regardless of being voluntary or forced, does not seem to lead to histologically visible changes (Campbell et al., 2016; Soares et al., 2021; Yuan et al., 2018). However, in the study by Campbell et al. (2016), it was possible to find a reduction in e-cadherin in mice who had free access to running wheels. This reduction can lead to increased intestinal permeability with possible health damage (Kline et al., 2020). Nevertheless, these results found by Campbell should be analyzed with caution, since the mice did not receive an ad libitum diet, and prolonged fasting periods have already been shown to be related to increased intestinal permeability (Sonoyama et al., 2009).

Therefore, more experimental studies are needed to clarify the possible effects of different exercises on the intestinal microbiota. Future studies should focus on the use of standardized and appropriate diets and animal models, as well as prioritize the use of

metagenomic data, mainly through shotgun sequencing, for a deeper understanding of changes in the intestinal microbiota generated by regular physical exercise.

5. Knowledge Gaps, Challenges, and Future Directions

The studies included in this systematic review point to the positive effects of regular physical exercise on intestinal health in animal models. However, there is a significant knowledge gap in this area, and additional research is needed to establish a solid scientific basis that can support recommending physical exercise as a means of improving gut health.

One of the challenges encountered is associated with the collection and analysis of microbiota data, since the standardization of sampling, sequencing and analysis methods is essential to ensure the consistency of results between studies. Heterogeneity in methods can make data comparison and synthesis difficult, hindering the construction of a solid overview.

Another important challenge on the topic is understanding the mechanisms by which physical exercise affects intestinal integrity and the microbiota, as although there is emerging evidence that regular physical exercise can have a positive impact on intestinal health, the mechanisms need to be elucidated in more detail, carrying out an investigation of how regular physical exercise affects the immune system, intestinal permeability, and interactions between different bacterial species.

6. Conclusion

Together, the studies included in this review demonstrated that the benefits of regular physical exercise on the intestinal microbiota seem to be positively associated with training intensity. High-intensity swimming, ladder climbing and treadmill running showed greater benefits in modulating the intestinal microbiota, through increased richness and diversity, without any change in intestinal morphology and integrity. However, this systematic review presents high variability of data in the studies included, and more experimental studies are needed to clarify the possible effects of different physical exercise protocols on the intestinal microbiota.

7. Author contributions

Conceptualization: S. M. S. P., V. P. B. S. J., A. S., K. V. C. M., L. B. L., P. F., A. J. N., H. S. D. M., C. M. D. L. and J. B.; Investigation: S. M. S. P. and V. P. B. S. J.; Methodology: S. M. S. P., V. P. B. S. J., K. V. C. M., and L. B. L.; Supervision: H. S. D. M., C. M. D. L. and J. B.;

Roles/Writing - original draft: S. M. S. P., V. P. B. S. J., K. V. C. M., and L. B. L.; and Writing - review & editing: S. M. S. P., V. P. B. S. J., A. S., K. V. C. M., L. B. L., P. F., A. J. N., H. S. D. M., C. M. D. L. and J. B.

8. Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interests.

9. Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

10. Acknowledgment

The authors would like to thank the Graduate Program in Nutrition Science at Universidade Federal de Viçosa.

11. References

- Allam-Ndoul, B., Castonguay-Paradis, S., Veilleux, A., 2020. Gut microbiota and intestinal trans-epithelial permeability. *Int J Mol Sci* 21, 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21176402>
- Allen, J.M., Miller, M.E.B., Pence, B.D., Whitlock, K., Nehra, V., Gaskins, H.R., White, B.A., Fryer, J.D., Woods, J.A., 2015. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J Mice. *J Appl Physiol* 118, 1059–1066. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01077.2014>
- Anhê, F.F., Zlitni, S., Barra, N.G., Foley, K.P., Nilsson, M.I., Nederveen, J.P., Koch, L.G., Britton, S.L., Tarnopolsky, M.A., Schertzer, J.D., 2022. Life-long exercise training and inherited aerobic endurance capacity produce converging gut microbiome signatures in rodents. *Physiol Rep* 10, 1–10. <https://doi.org/10.14814/phy2.15215>
- Baothman, O.A., Zamzami, M.A., Taher, I., Abubaker, J., Abu-Farha, M., 2016. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids Health Dis* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0278-4>

- Batacan, R.B., Fenning, A.S., Dalbo, V.J., Scanlan, A.T., Duncan, M.J., Moore, R.J., Stanley, D., 2017. A gut reaction: the combined influence of exercise and diet on gastrointestinal microbiota in rats. *J Appl Microbiol* 122, 1627–1638. <https://doi.org/10.1111/jam.13442>
- Berry, D., 2016. The emerging view of Firmicutes as key fibre degraders in the human gut. *Environ Microbiol* 18, 2081–2083. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13225>
- Berry, D., Reinisch, W., 2013. Intestinal microbiota: A source of novel biomarkers in inflammatory bowel diseases? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.005>
- Bonomini-Gnutzmann, R., Plaza-Díaz, J., Jorquera-Aguilera, C., Rodríguez-Rodríguez, A., Rodríguez-Rodríguez, F., 2022. Effect of Intensity and Duration of Exercise on Gut Microbiota in Humans: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* 19, 9518. <https://doi.org/10.3390/ijerph19159518>
- Campbell, S.C., Wisniewski, P.J., Noji, M., McGuinness, L.R., Häggblom, M.M., Lightfoot, S.A., Joseph, L.B., Kerkhof, L.J., 2016. The effect of diet and exercise on intestinal integrity and microbial diversity in mice. *PLoS One* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150502>
- Castro, A.P., Silva, K.K.S., Medeiros, C.S.A., Alves, F., Araujo, R.C., Almeida, J.A., 2021. Effects of 12 weeks of resistance training on rat gut microbiota composition. *Journal of Experimental Biology* 224. <https://doi.org/10.1242/jeb.242543>
- Chen See, J.R., Amos, D., Wright, J., Lamendella, R., Santanam, N., 2022. Synergistic effects of exercise and catalase overexpression on gut microbiome. *Environ Microbiol* 24, 4220–4235. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15670>
- Clarke, S.F., Murphy, E.F., O’Sullivan, O., Lucey, A.J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O’Reilly, M., Jeffery, I.B., Wood-Martin, R., Kerins, D.M., Quigley, E., Ross, R.P., O’Toole, P.W., Molloy, M.G., Falvey, E., Shanahan, F., Cotter, P.D., 2014a. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 63, 1913–1920. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306541>
- Clarke, S.F., Murphy, E.F., O’Sullivan, O., Lucey, A.J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O’Reilly, M., Jeffery, I.B., Wood-Martin, R., Kerins, D.M., Quigley, E., Ross, R.P., O’Toole, P.W., Molloy, M.G., Falvey, E., Shanahan, F., Cotter, P.D., 2014b. Exercise and

associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 63, 1913–1920.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306541>

Coughlan, K.A., Valentine, R.J., Ruderman, N.B., Saha, A.K., 2014. AMPK activation: A therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr Obes* 7, 241–253.
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S43731>

Dimitriu, P.A., Boyce, G., Samarakoon, A., Hartmann, M., Johnson, P., Mohn, W.W., 2013. Temporal stability of the mouse gut microbiota in relation to innate and adaptive immunity. *Environ Microbiol Rep* 5, 200–210. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00393.x>

Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K., 2015. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 2015 14:1 14, 20–32.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>

Gensollen, T., Iyer, S.S., Kasper, D.L., Blumberg, R.S., 2016. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 352, 539–544.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD9378>

Gomes, A.P.P., 2017. A microbiota intestinal e os desenvolvimentos recentes sobre o seu impacto na saúde e na doença. Universidade de Lisboa.

Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., Van Immerseel, F., 2010. From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev* 23, 366–384. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000247>

Hooijmans, C.R., Rovers, M.M., De Vries, R.B.M., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., Langendam, M.W., 2014. SYRCLE’s risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol* 14, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>

Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J.H., Chinwalla, A.T., Creasy, H.H., Earl, A.M., Fitzgerald, M.G., Fulton, R.S., Giglio, M.G., White, O., 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214.
<https://doi.org/10.1038/nature11234>

Imdad, S., Lim, W., Kim, J.H., Kang, C., 2022. Intertwined Relationship of Mitochondrial Metabolism, Gut Microbiome and Exercise Potential. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 2679 23, 2679. <https://doi.org/10.3390/IJMS23052679>

- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., Vermeire, S., 2011. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 60, 631–637. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.223263>
- Kellermayer, R., Dowd, S.E., Harris, R.A., Balasa, A., Schaible, T.D., Wolcott, R.D., Tatevian, N., Szigeti, R., Li, Z., Versalovic, J., Smith, C.W., 2011. Colonic mucosal DNA methylation, immune response, and microbiome patterns in Toll-like receptor 2-knockout mice. *The FASEB Journal* 25, 1449–1460. <https://doi.org/10.1096/fj.10-172205>
- Kline, K.T., Lian, H., Zhong, X.S., Luo, X., Winston, J.H., Cong, Y., Savidge, T.C., Dashwood, R.H., Powell, D.W., Li, Q., 2020. Neonatal Injury Increases Gut Permeability by Epigenetically Suppressing E-Cadherin in Adulthood. *The Journal of Immunology* 204, 980–989. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900639>
- Kong, L.C., Tap, J., Aron-Wisnewsky, J., Pelloux, V., Basdevant, A., Bouilliot, J.L., Zucker, J.D., Doré, J., Clément, K., 2013. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: Increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *American Journal of Clinical Nutrition* 98, 16–24. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.058743>
- Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z.E., Kang, D.W., DiBaise, J.K., 2012. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutrition in Clinical Practice* 27, 201–214. <https://doi.org/10.1177/0884533611436116>
- Lach, G., Morais, L.H., Costa, A.P.R., Hoeller, A.A., 2017. ENVOLVIMENTO DA FLORA INTESTINAL NA MODULAÇÃO DE DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS. *VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde* 29, 64–82. <https://doi.org/10.14295/vittalle.v29i1.6413>
- Lambert, J.E., Myslicki, J.P., Bomhof, M.R., Belke, D.D., Shearer, J., Reimer, R.A., 2015. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 40, 749–752. <https://doi.org/10.1139/apnm-2014-0452>
- Lamoureux, E. V., Grandy, S.A., Langille, M.G.I., 2017. Moderate Exercise Has Limited but Distinguishable Effects on the Mouse Microbiome. *mSystems* 2, 1–14. <https://doi.org/10.1128/msystems.00006-17>
- Lee, H., Ko, G., 2014. Effect of Metformin on Metabolic Improvement and Gut Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 80, 5935–5943. <https://doi.org/10.1128/AEM.01357-14>

- Lin, H. V., Frassetto, A., Kowalik, E.J., Nawrocki, A.R., Lu, M.M., Kosinski, J.R., Hubert, J.A., Szeto, D., Yao, X., Forrest, G., Marsh, D.J., 2012. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035240>
- Marchesi, J.R., Ravel, J., 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Matson, V., Chervin, C.S., Gajewski, T.F., 2021. Cancer and the Microbiome—Influence of the Commensal Microbiota on Cancer, Immune Responses, and Immunotherapy. *Gastroenterology* 160, 600–613. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.11.041>
- Matsumoto, M., Inoue, R., Tsukahara, T., Ushida, K., Chiji, H., Matsubara, N., Hara, H., 2008. Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 572–576. <https://doi.org/10.1271/bbb.70474>
- Meliala, A., Narwidina, P., Nirwati, H., Nuryastuti, T., Kamil, M., Ardiansyah, L., Pranindyo, A., 2021. The impact of moderate- and high-intensity exercise on microbiota population and short-chain fatty acid production in the cecum of rats. *J Appl Pharm Sci* 11, 90–97. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.110813>
- Mika, A., Van Treuren, W., González, A., Herrera, J.J., Knight, R., Fleshner, M., 2015. Exercise Is More Effective at Altering Gut Microbial Composition and Producing Stable Changes in Lean Mass in Juvenile versus Adult Male F344 Rats. *PLoS One* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125889>
- Moeinian, M., Ghasemi-Niri, S.F., Mozaffari, S., Abdolghaffari, A.H., Baeeri, M., Navaea-Nigjeh, M., Abdollahi, M., 2014. Beneficial effect of butyrate, *Lactobacillus casei* and L-carnitine combination in preference to each in experimental colitis. *World J Gastroenterol* 20, 10876–10885. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i31.10876>
- Mohr, A.E., Jäger, R., Carpenter, K.C., Kerksick, C.M., Purpura, M., Townsend, J.R., West, N.P., Black, K., Gleeson, M., Pyne, D.B., Wells, S.D., Arent, S.M., Kreider, R.B., Campbell, B.I., Bannock, L., Scheiman, J., Wissent, C.J., Pane, M., Kalman, D.S., Pugh, J.N., Ortega-Santos, C.P., Ter Haar, J.A., Arciero, P.J., Antonio, J., 2020a. The athletic gut microbiota. *J Int Soc Sports Nutr* 17, 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00353-w>

- Mohr, A.E., Jäger, R., Carpenter, K.C., Kerksick, C.M., Purpura, M., Townsend, J.R., West, N.P., Black, K., Gleeson, M., Pyne, D.B., Wells, S.D., Arent, S.M., Kreider, R.B., Campbell, B.I., Bannock, L., Scheiman, J., Wissent, C.J., Pane, M., Kalman, D.S., Pugh, J.N., Ortega-Santos, C.P., Ter Haar, J.A., Arciero, P.J., Antonio, J., 2020b. The athletic gut microbiota. *J Int Soc Sports Nutr* 17, 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00353-w>
- Monda, V., Villano, I., Messina, A., Valenzano, A., Esposito, T., Moscatelli, F., Viggiano, A., Cibelli, G., Chieffi, S., Monda, M., Messina, G., 2017. Exercise modifies the gut microbiota with positive health effects. *Oxid Med Cell Longev* 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/3831972>
- Moreno, J., 2015. Prevotella copri and the microbial pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin* 11, 61–63. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2014.11.001>
- Mosca, A., Leclerc, M., Hugot, J.P., 2016. Gut microbiota diversity and human diseases: Should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front Microbiol* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00455>
- Nagalingam, N.A., Kao, J.Y., Young, V.B., 2011. Microbial ecology of the murine gut associated with the development of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17, 917–926. <https://doi.org/10.1002/ibd.21462>
- Natividad, J.M.M., Verdu, E.F., 2013. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res* 69, 42–51. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2012.10.007>
- Nilsson, M.I., Bourgeois, J.M., Nederveen, J.P., Leite, M.R., Hettinga, B.P., Bujak, A.L., May, L., Lin, E., Crozier, M., Rusiecki, D.R., Moffatt, C., Azzopardi, P., Young, J., Yang, Y., Nguyen, J., Adler, E., Lan, L., Tarnopolsky, M.A., 2019. Lifelong aerobic exercise protects against inflammaging and cancer. *PLoS One* 14, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210863>
- Ouzzani, M., Hammady, H., Fedorowicz, Z., Elmagarmid, A., 2016. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev* 5, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>
- Page, M.J., McKenzie, J.E., Bossuyt, P.M., Boutron, I., Hoffmann, T.C., Mulrow, C.D., Shamseer, L., Tetzlaff, J.M., Akl, E.A., Brennan, S.E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw,

- J.M., Hróbjartsson, A., Lalu, M.M., Li, T., Loder, E.W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., McGuinness, L.A., Stewart, L.A., Thomas, J., Tricco, A.C., Welch, V.A., Whiting, P., Moher, D., 2021. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 372, 1–9. <https://doi.org/10.1136/BMJ.N71>
- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Schjerling, P., 2001. Exercise and interleukin-6. *Curr Opin Hematol* 8, 137–141. <https://doi.org/10.1097/00062752-200105000-00002>
- Pyne, D.B., West, N.P., Cox, A.J., Cripps, A.W., 2015. Probiotics supplementation for athletes – Clinical and physiological effects. *Eur J Sport Sci* 15, 63–72. <https://doi.org/10.1080/17461391.2014.971879>
- Queipo-Ortuño, M.I., Seoane, L.M., Murri, M., Pardo, M., Gomez-Zumaquero, J.M., Cardona, F., Casanueva, F., Tinahones, F.J., 2013. Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065465>
- Rodrigues, L. dos S.V., 2016. Relação entre microbiota intestinal e obesidade: terapêutica nutricional através do uso de probióticos. Centro Universitário de Brasília. CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA.
- Shanahan, F., 2010. Probiotics in perspective. *Gastroenterology* 139, 1808–1812. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.025>
- Soares, N.L., Dorand, V.A.M., Cavalcante, H.C., Batista, K.S., de Souza, D.M., Lima, M. dos S., Salvadori, M.G. da S.S., Magnani, M., Alves, A.F., Aquino, J. de S., 2021. Does intermittent fasting associated with aerobic training influence parameters related to the gut-brain axis of Wistar rats? *J Affect Disord* 293, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.06.028>
- Sonoyama, K., Fujiwara, R., Takemura, N., Ogasawara, T., Watanabe, J., Ito, H., Morita, T., 2009. Response of gut microbiota to fasting and hibernation in Syrian hamsters. *Appl Environ Microbiol* 75, 6451–6456. <https://doi.org/10.1128/AEM.00692-09>
- Stojanov, S., Berlec, A., Štrukelj, B., 2020. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms* 8, 1715. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>

- Tansathitaya, V., Sarasin, W., Phakham, T., Sawaswong, V., Chanchaem, P., Payungporn, S., 2022. Different Exercise Intensity Associates with Varied Disease Biomarkers of Guts-Microbiome Genera Change in Rats: Preliminary Study. *J Pure Appl Microbiol* 16, 1130–1137. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.2.39>
- Wan, C., Liu, Z. Bin, Tan, H., Zhang, Z., Zhou, Q., Yao, L.H., Meng, W., Wang, S., 2022. Effect of voluntary wheel running on gut microbiota composition in developing mice. *Nutr Hosp* 39, 896–904. <https://doi.org/10.20960/nh.03944>
- Wang, G., Zhou, H., Zhang, L., Li, R., Luo, L., Yu, Z., Wan, Z., 2020. Effects of high-intensity interval training on gut microbiota profiles in 12 months' old ICR mice. *J Physiol Biochem* 76, 539–548. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00758-w>
- Wirotko, E., Johnson, L., Wirotko, B., 1990. Ulcerative colitis associated chronic uveitis. Parasitization of intraocular leucocytes by mollicute-like organisms. *J Submicrosc Cytol Pathol* 22, 231–239.
- Yang, W., Liu, Y., Yang, Guang, Meng, B., Yi, Z., Yang, Guan, Chen, M., Hou, P., Wang, H., Xu, X., 2021. Moderate-Intensity Physical Exercise Affects the Exercise Performance and Gut Microbiota of Mice. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.712381>
- Yuan, X., Xu, S., Huang, H., Liang, J., Wu, Y., Li, C., Yuan, H., Zhao, X., Lai, X., Hou, S., 2018. Influence of excessive exercise on immunity, metabolism, and gut microbial diversity in an overtraining mice model. *Scand J Med Sci Sports* 28, 1541–1551. <https://doi.org/10.1111/sms.13060>
- Yun, E.J., Imdad, S., Jang, J., Park, J., So, B., Kim, J.H., Kang, C., 2022. Diet Is a Stronger Covariate Than Exercise in Determining Gut Microbial Richness and Diversity. *Nutrients* 14, 2507. <https://doi.org/10.3390/nu14122507>
- Zeng, H., Ishaq, S.L., Zhao, F.Q., Wright, A.D.G., 2016. Colonic inflammation accompanies an increase of β -catenin signaling and Lachnospiraceae/Streptococcaceae bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 35, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.05.015>

7.2.Artigo 2

Consumption of curcumin-added whey protein concentrate is capable of positively modulate intestinal health parameters after exhaustive exercise

Abstract

Exhaustive physical exercise can impact intestinal health, affecting permeability, inflammation and the production of short-chain fatty acids (SCFA). Dietary modifications, such as the consumption of whey protein concentrate (WPC) and curcumin (CCM), can modulate these effects due to their anti-inflammatory and antioxidant properties. This study evaluated the impact of WPC+CCM and CCM in Wistar rats submitted to exhaustive exercise. Forty-eight male Wistar rats (age:~12 weeks) were randomly divided into 6 groups of 8 animals each, as follows: G1: control group receiving a standard diet (AIN-93M); G2: control group receiving a standard diet submitted to exhaustive exercise (AIN-93M EE); G3: whey protein concentrate group added with curcumin (WPC+CCM); G4: whey protein concentrate group added with curcumin submitted to exhaustive exercise (WPC+CCM EE); G5: curcumin group (CCM); and G6: curcumin group submitted to the exhaustive exercise (CCM EE). After 4 weeks on diet, rats from G2, G4 and G6 groups were submitted to an exhaustive swimming test. Twenty-four hours later, animals from all experimental groups were euthanized, and had feces collected from the cecum and the intestine (i.e., colon) dissected for the analyses of interest. The results showed that the SCFA content remained stable, malondialdehyde levels did not vary, but the WPC+CCM group showed higher carbonylated protein concentration. Nitric oxide decreased in the treated groups, while antioxidant enzymes increased in the WPC+CCM and CCM groups, except for glutathione, which decreased. The expression of Nrf2, NF- κ B and IL-1 β was maintained after physical stress with the consumption of WPC+CCM, while the consumption of CCM reduced the expression of NF- κ B and IL-1 β . CCM increased mucosal thickness and preserved goblet cells. In conclusion, WPC+CCM prevented increased oxidative stress and inflammation and preserved the production of short-chain fatty acids, antioxidant activity and intestinal integrity of rats after exhaustive exercise.

Keywords: Swimming, turmeric, intestinal integrity, whey protein concentrate.

1. Introduction

Regular physical exercise is recognized for its numerous health benefits, including improving cardiovascular fitness, increasing muscle mass, regulating body weight and promoting general well-being (Sallam & Laher, 2016). However, when performed exhaustively, it can trigger a series of adverse effects, ranging from extreme fatigue to damage to cellular and tissue structures. Among the affected systems, intestinal health emerges as an area of interest, as exhaustive exercise can compromise the integrity of this biological barrier (Steinbacher & Eckl, 2015; Suzuki, 2020).

Exhaustive physical exercise leads to changes in the immune system, causing oxidative stress and inflammation, resulting in a series of negative changes in intestinal health, including inflammation of intestinal tissue, reduction of short-chain fatty acids (SCFA), changes in intestinal morphology and increased oxidative stress (Engel et al., 2018). These changes can compromise normal intestinal function, leading to symptoms such as abdominal discomfort, diarrhea and impaired nutrient absorption (Soares, 2021).

Given this, these changes can be influenced through adjustments in the diet, including the incorporation of food components with modulating potential, such as Whey Protein (WP). WP has been studied as a dietary supplement capable of modulating several physiological responses to physical exercise, including those related to intestinal health, as its composition rich in branched-chain amino acids and bioactive peptides has been associated with preserving the integrity of the intestinal barrier, reduced inflammation and increased SCFA concentration (Boscaini et al., 2023).

In addition to WP, another component that can influence intestinal health is curcumin, a bioactive compound found in turmeric, which has demonstrated anti-inflammatory, antioxidant and immune system modulating properties. Curcumin can protect intestinal health by reducing inflammation, preserving the integrity of the intestinal mucosa and reducing oxidative stress induced by exhaustive physical exercise, acting on intestinal permeability (Gupta et al., 2013; Scazzocchio et al., 2020).

Considering the relevance of the relationship between exhaustive physical exercise and intestinal health, as well as the potential modulating role of WP and curcumin, this study seeks to fill an important gap in the scientific literature. Thus, the main objective was to evaluate the combined effects of WP and curcumin on intestinal health of rats submitted to exhaustive exercise. The results of this study are expected to provide a more comprehensive understanding

of the mechanisms by which these supplements may influence gut health during periods of very high physical stress.

2. Material and methods

2.1. Feedstock

2.1.1. Curcumin

The curcumin used was Theracurmin[®] (Theravalues, Tokyo, Japan), which has high absorption and is dispersed in colloidal nanoparticles. Theracurmin[®] is composed of 30 w/w% CCM, showing higher bioavailability than conventional CCM.

2.1.2. Whey protein concentrate

The milk used to manufacture WPC was purchased from the stable of Universidade Federal de Viçosa (UFV, Minas Gerais, Brazil). To obtain the whey, the milk was submitted to microfiltration, and then dried in a single-level, single-model spray dryer (model MSD 1.0), equipped with a 1 mm diameter spray nozzle (Labmaq, Brazil), with air rates and product flow according to the methodology of Perrone et al. (2013).

2.1.3. Curcumin-added whey protein concentrate

To formulate WPC with added CCM, curcumin was incorporated into WPC to achieve a concentration of 0.8 g of CCM per 100 g of WPC. This formulation was developed considering a 70 kg subject who ingests protein supplementation through WPC at a rate of 0.3g/kg/day (Schoenfeld & Aragon, 2018), and a curcumin intake of 3.0 mg/kg/day (maximum value established by IDA for humans) (STANKOVIC, 2004). Thus, protein intake, through WPC, corresponded to 30% of protein needs for rats in the maintenance phase (Reeves et al., 1993).

2.2. Biological assay

2.2.1. Animals

Forty-eight male Wistar rats (young adults) (*Rattus norvegicus*, variety albinus, Rodentia) were used, coming from the Central Animal Facility of the Center of Biological and Health Sciences, at UFV. The animals were housed in individual stainless-steel cages, in an environment with controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and photoperiod (12h) and, after 12 weeks, they were divided into 6 groups: G1: the control group that received a standard diet (AIN-93M);

G2: the control group that received a standard diet submitted to the exhaustive exercise (AIN-93M EE); G3: the curcumin-added whey protein concentrate group (WPC + CCM); G4: the curcumin-added whey protein concentrate group submitted to the exhaustive exercise (WPC + CCM EE); G5: the curcumin group (CCM); and G6: the curcumin group submitted to the exhaustive exercise (CCM EE) (Figure 1). These animals received distilled water and their respective experimental diets *ad libitum*.

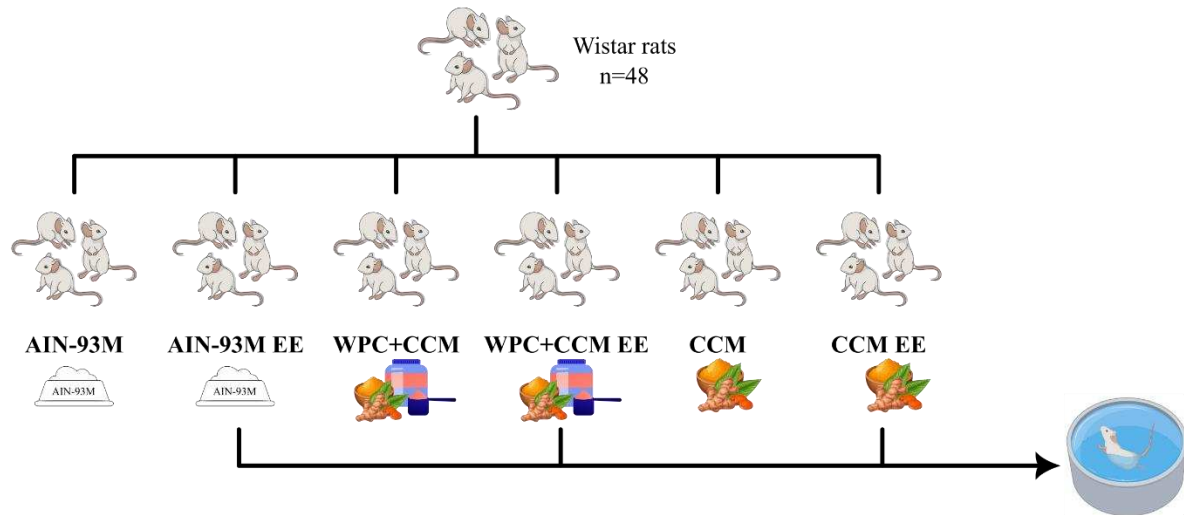


Figure 1. Experimental design. G1: the control group that received a standard diet (AIN-93M); G2: the control group that received a standard diet submitted to the exhaustive exercise (AIN-93M EE); G3: the curcumin-added whey protein concentrates group (WPC + CCM); G4: the curcumin-added whey protein concentrate group submitted to the exhaustive exercise (WPC + CCM EE); G5: the curcumin group (CCM); and G6: the curcumin group submitted to the exhaustive exercise (CCM EE).

2.2.2. Experimental diets

The experimental diets were formulated in accordance with the AIN-93M recommendations, proposed by the American Institute of Nutrition (1993) for the maintenance of adult animals, namely: AIN-93M diet (control), WPC + CCM diet (30% of the protein requirement coming from the WPC) and CCM diet (AIN-93M + CCM) (Table 1), and were offered in powder form.

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	g/kg of diet		
	AIN-93M	WPC+CCM	CCM
Maize starch	455.7	455.7	455.7
Albumin*	150	105	150
Maltodextrin	155	155	155
Sucrose	100	99	99
Soybean oil	40	40	40
Cellulose	50	50	50
Mineral mixture	35	35	35
Vitamin blend	10	10	10
L-cystine	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
WPC	-	45	-
Curcumin (Theracurmin®)	-	1.2	1.2

Source: Reeves et al., 1993. WPC: whey protein concentrate; CCM: curcumin*Albumin and WPC was considered to be 80% protein.

2.2.3. Exhaustive exercise protocol

Animals in groups G2, G4 and G6 underwent an exhaustive swimming test. The animals were forced to swim until exhaustion, supporting a weight of 5% of their body weight attached to the tail (Venditti & Di Meo, 1996). Exhaustion was defined when the rat remained submerged for 10 seconds or when they were no longer able to maintain their body movements (Dawson & Horvath, 1970).

2.2.4. Euthanasia

Twenty-four hours after carrying out the exhaustive exercise, the animals from all experimental groups were anesthetized with 5% inhaled isoflurane (Isoforine, Cristália®) and euthanized by cardiac puncture, with a 12-hour fasting period. The entire procedure was carried out with the aim of promoting a humane death of the animals (RN N° 37, 2018). Colon and feces from the cecum were collected for further analysis.

2.3. Analysis

2.3.1. Short-chain fatty acid (SCFA)

The content of propionic, acetic and butyric acid in feces was determined according to Siegfried et al. (1984), with some modifications. Feces from the cecum were suspended in water and centrifuged. Then, calcium hydroxide and cupric sulfate solutions were added, shaken and frozen. After thawing, the samples were treated with sulfuric acid (H₂SO₄) and injected in a

liquid chromatograph (Shimadzu Scientific Instruments Inc, Japan), using an Biohad column (HPX-87H 300 x 7.8mm, 9 μ m) (Bio-Rad, Munich, Germany). Identification was made by comparing the retention time of the external standard with a mixture of free short-chain fatty acids. Quantification was done using the standard curve.

2.3.2. Oxidative balance

For oxidative balance analyses, a homogenate of intestinal tissue (colon) was prepared, and the tissues were homogenized in phosphate buffer and subsequently centrifuged. The resulting supernatants were then stored to conduct analyzes of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), while the pellet was reserved for analysis of carbonyl protein (PCN).

The assessment of malondialdehyde consisted of measuring lipid peroxidation through MDA levels, which were determined using a standard curve of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO). NO production was estimated by the amount of NO₂/NO₃, using the standard Griess method (Tsikas, 2017), and micromolar concentrations of NO were calculated based on a sodium nitrite standard curve. The concentration of carbonyl proteins was measured using the reagent 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), which reacts with carbonyl groups to form stable derivatives (Levine et al., 1990).

Regarding the analysis of the antioxidant profile, the activity of SOD was determined by its ability to eliminate free radicals such as superoxide and hydrogen peroxide (Dieterich et al., 2000). GST activity was obtained from its ability to metabolize 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), forming a conjugate with reduced glutathione (GSH) (Habig & Jakoby, 1981). Finally, CAT activity was determined by the decay rate of hydrogen peroxide (H₂O₂).

2.3.3. Real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

For intestinal gene expression analysis, RNA was extracted with TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and then used for cDNA synthesis with the M-MLV reverse transcription kit (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) (Livak & Schmittgen, 2001).

The mRNA expression levels of the genes were analyzed by RT-qPCR, using the SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the analyzes were performed on the StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). The primer sequences, sense and antisense (Choma Biotechnologies) were ordered for amplification of

Nrf2, TNF- α , NF- κ B, IL-1 β , IL-10. Relative mRNA expression levels were normalized relative to the endogenous β -actin control (Table 2).

Table 2. Sequence of primers used in the RT-PCR analysis

Genes	Oligonucleotide (5'-3')	
	Forward	Reverse
Nrf2	CACATCCAGACAGACACCAGT	CTACAAATGGGAATGTCTCTGC
NF- κ B	CTGCGCGCTGACGGC	TCGTCGTCTGCCATGTTGAA
IL-1 β	CCAGGATGAGGACCAAGCA	TGCTTGCCTCATCCTGG
β -actin	TTCGTTGCCGGTCCACACCC	GCTTTGCACATGCCGGAGCC

Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NF- κ B: nuclear factor kappa B; IL-1 β : interleukin-1 β .

2.3.4. Intestinal histomorphometry

Intestine fragments from all animals were removed and fixed in formaldehyde. After fixation, the tissues were dehydrated in an increasing gradient of ethanol, and embedded in resin containing hardener (Leica, Historesin[®]). Semi-serial histological sections 3 μ m thick were obtained using a Leica[®] automatic microtome, then the colon was stained and examined under a light microscope (CX31 photomicroscope, Olympus, Japan), using a 4X and 10X objective.

The depth and thickness of the crypts, the thickness of the internal and external muscular layers, the thickness of the mucosa and submucosa and the number and area of goblet cells were evaluated, using the ImagePro-Plus[®] application version 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, USA) (Sabarense et al., 2012).

2.4. Statistical analysis

Statistical analyzes and graph construction were performed using GraphPad Prism software, version 9.0.2 (GraphPad Prism Inc, La Jolla, CA, USA). Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. The t test was used to assess differences within the same group (not submitted to EE $\times$ submitted to EE). Intragroup differences (AIN-93M, WPC + CCM and CCM) were submitted to analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman-Keuls mean test. A p-value <0.05 was adopted. The results are expressed as mean and standard deviation (mean $\pm$ SD).

2.5. Ethical aspect

This project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), under protocol number 72/2018.

3. Results

3.1. Short-chain fatty acid (SCFA)

Acetic acid remained stable in the exercised groups compared to controls. However, the AIN-93M group showed higher concentrations compared to the groups that received WPC+CCM and CCM ($p < 0.05$). For propionic and butyric acids, there were no significant differences among the groups (Table 3).

Table 3. Quantification of acetic, propionic and butyric acids in cecal samples

Variables	Groups					
	AIN-93M	WPC+CCM	CCM	AIN-93M EE	WPC+CCM EE	CCM EE
Acetic acid (mM)	9.33 ± 1.90 ^a	7.16 ± 1.14 ^b	6.17 ± 0.78 ^b	9.20 ± 1.31 ^a	6.19 ± 0.80 ^b	6.63 ± 1.16 ^b
Propionic acid (mM)	17.83 ± 5.26 ^a	16.30 ± 1.83 ^a	15.17 ± 4.05 ^a	18.24 ± 3.50 ^a	13.47 ± 3.51 ^a	15.03 ± 2.05 ^a
Butyric acid (mM)	1.79 ± 0.25 ^a	1.51 ± 0.43 ^a	1.76 ± 0.60 ^a	1.60 ± 0.55 ^a	1.51 ± 0.41 ^a	1.46 ± 0.19 ^a

AIN-93M: group that received a standard diet; AIN-93M EE: group submitted to the exhaustive exercise that received a standard diet; WPC + CCM: group not submitted to EE that received curcumin-added whey protein concentrate; WPC + CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin-added whey protein concentrate; CCM: group not submitted to EE that received curcumin; CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin; EE: exhaustive exercise. *Indicates significant differences between the same group (sedentary x EE), according to the t test ($p < 0.05$). Different lowercase letters (a – b) indicate significant differences within groups, according to ANOVA, followed by the Newman-Keuls test, at 5% probability. Data expressed as mean ± standard deviation.

3.2. Oxidative balance

MDA concentrations were lower in the groups that received CCM, isolated or associated with WPC ($p < 0.05$). When evaluating the effect of exercise, MDA levels were maintained in the groups that received the WPC+CCM and CCM diets, while the non-exercised AIN-93M group showed higher MDA ($p < 0.05$) (Figure 2A).

As for PCN analysis, the WPC+CCM EE group showed higher concentrations compared to the WPC+CCM group ($p < 0.05$). No differences were observed intragroup, both in the groups that performed exhaustive exercise and those that did not (Figure 2B). In the NO analysis, it was observed that among the non-exercised groups there was an increase in NO in the groups that received curcumin, isolated or associated with WPC, while exhaustive exercise reduced nitric oxide concentrations in these groups ($p < 0.05$) (Figure 2C).

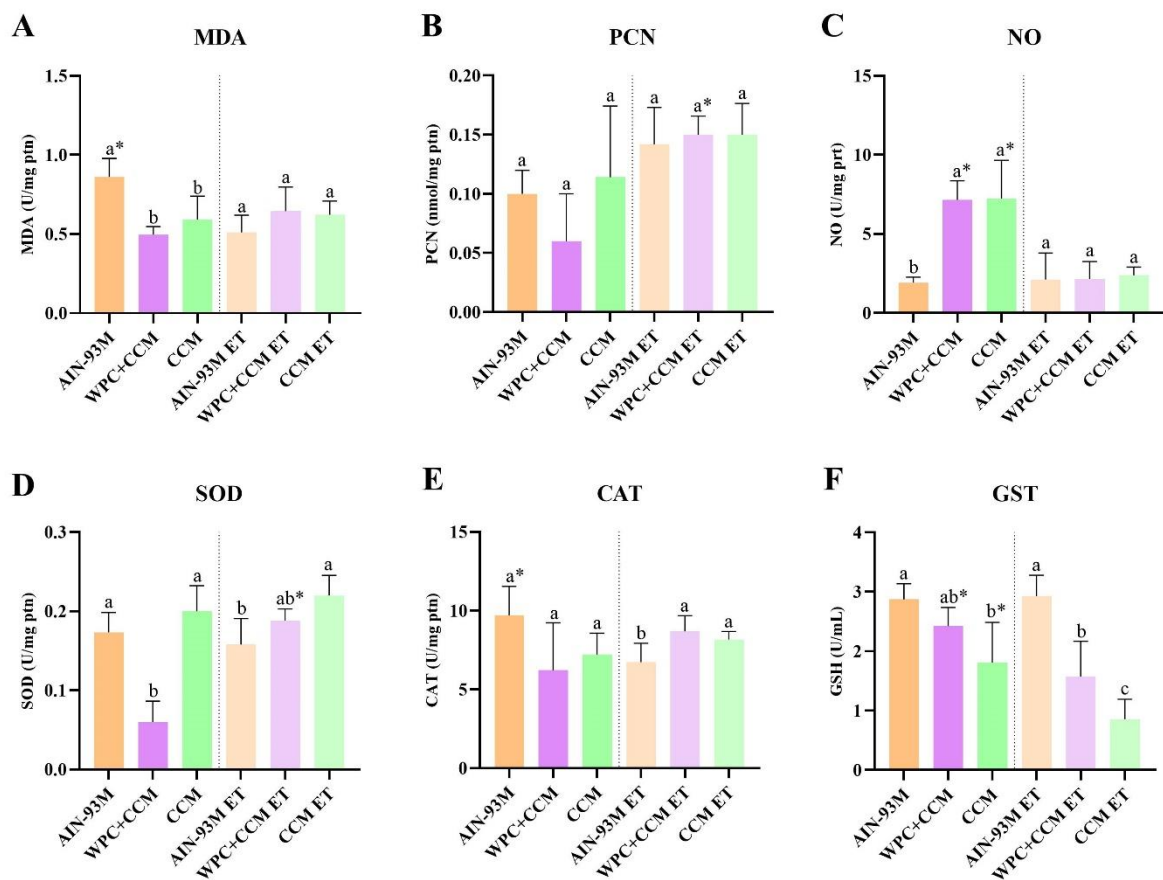


Figure 2. Analysis of oxidative balance in the intestine (colon).

AIN-93M: group that received a standard diet; AIN-93M EE: group submitted to the exhaustive exercise that received a standard diet; WPC + CCM: group not submitted to EE that received curcumin-added whey protein concentrate; WPC + CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin-added whey protein concentrate; CCM: group not submitted to EE that received curcumin; CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin; EE: exhaustive exercise. The graphs show (A) Malondialdehyde, (B) Carbonylated protein, (C) Nitric oxide, (D) Superoxide dismutase, (E) Catalase, (F) Glutathione S-transferase. *Indicates significant differences between the same group (sedentary x EE), according to the t test ($p < 0.05$). Different lowercase letters (a – c) indicate significant differences within groups, according to ANOVA, followed by the Newman-Keuls test, at 5% probability. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation.

For the SOD analysis, lower concentrations were observed in the group that received WPC+CCM ($p<0.05$) compared to the other groups without exhaustive exercise. However, there was a significant increase compared to the trained group ($p<0.05$). Furthermore, among the exercised groups, the group that received CCM isolated had the highest SOD concentrations ($p<0.05$) (Figure 2D).

The non-exercised groups did not show significant differences in the concentrations of CAT. However, among the exercise groups, those who received CCM, isolated or combined, showed higher concentrations of this enzyme ($p<0.05$). Furthermore, exhaustive exercise reduced CAT concentrations in the control group ($p<0.05$) (Figure 2E). For GST, the AIN-93M groups showed higher concentrations, while exercise reduced concentrations in the WPC+CCM and CCM groups ($p<0.05$) (Figure 2F).

3.3. Real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

When evaluating the effect of the diet on antioxidant and inflammatory markers, it was observed that the CCM group presented higher expressions of Nrf2 and IL-1 β compared to the other groups that were not submitted to exhaustive exercise (Figures 3A and 3C), and WPC+CCM was the group that presented the lowest expressions of all the markers evaluated (Figure 3B). Furthermore, among the groups that underwent exhaustive exercise, WPC+CCM EE and CCM EE showed lower expressions of antioxidant and inflammatory markers compared to AIN-93M EE (Figure 3).

Regarding the effect of the exhaustive exercise, AIN-93M and CCM groups presented higher expressions of Nrf2, NF- κ B and IL-1 β compared to their respective groups submitted to exhaustive exercise (Figure 3). Conversely, the groups that received WPC+CCM, submitted or not to exhaustive exercise, showed no difference in the expression of the genes evaluated (Figure 3B).

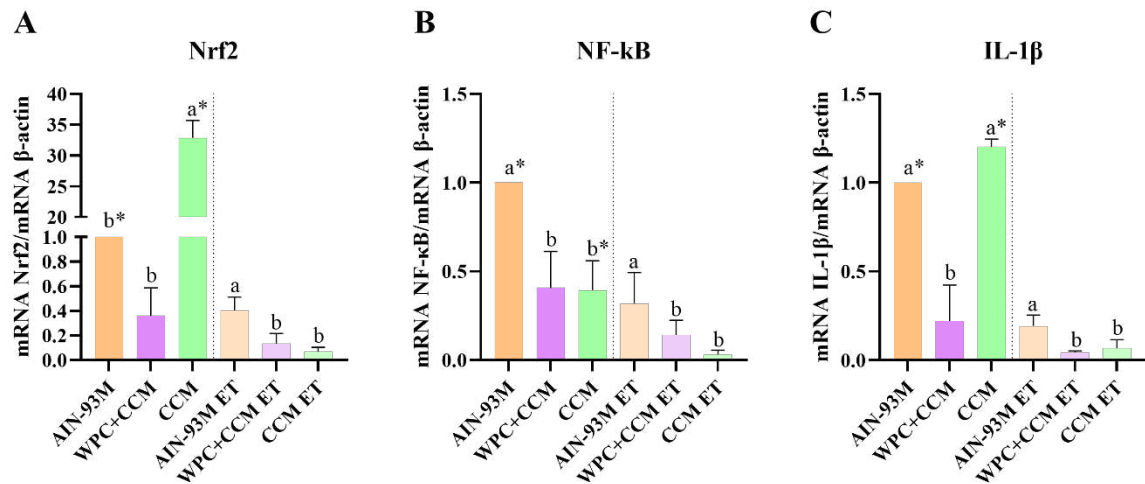


Figure 3. Gene expression of Nrf2, NF-κB and IL-1β in intestine.

AIN-93M: group that received a standard diet; AIN-93M EE: group submitted to the exhaustive exercise that received a standard diet; WPC + CCM: group not submitted to EE that received curcumin-added whey protein concentrate; WPC + CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin-added whey protein concentrate; CCM: group not submitted to EE that received curcumin; CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin; EE: exhaustive exercise. The graphs show (A) Nrf2, (B) NF-κB, (C) IL-1β. *Indicates significant differences between the same group (sedentary x EE), according to the t test ($p < 0.05$). Different lowercase letters (a – c) indicate significant differences within groups, according to ANOVA, followed by the Newman-Keuls test, at 5% probability. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation.

3.4. Intestinal histomorphometry

The longitudinal muscular layer thickness and the crypts depth and thickness did not differ among the groups. The circular muscle layer showed no difference in thickness among the non-exercised groups, but among the groups that were submitted to the exhaustive exercise, the WPC+CCM EE and CCM EE groups showed smaller thicknesses compared to the AIN-93M EE group (Figure 4, Table 4).

CCM consumption increased mucosal thickness ($p < 0.05$). However, under physical stress, consumption of CCM, isolated or combined with WPC, resulted in mucosal thickness similar to the control group. Furthermore, the consumption of WPC+CCM and CCM maintained the thickness of the submucosa under physical stress, although this thickness was lower than that of the control group ($p < 0.05$). The control group, on the other hand, was unable to maintain submucosal thickness under the same stress ($p < 0.05$) (Figure 4, Table 4).

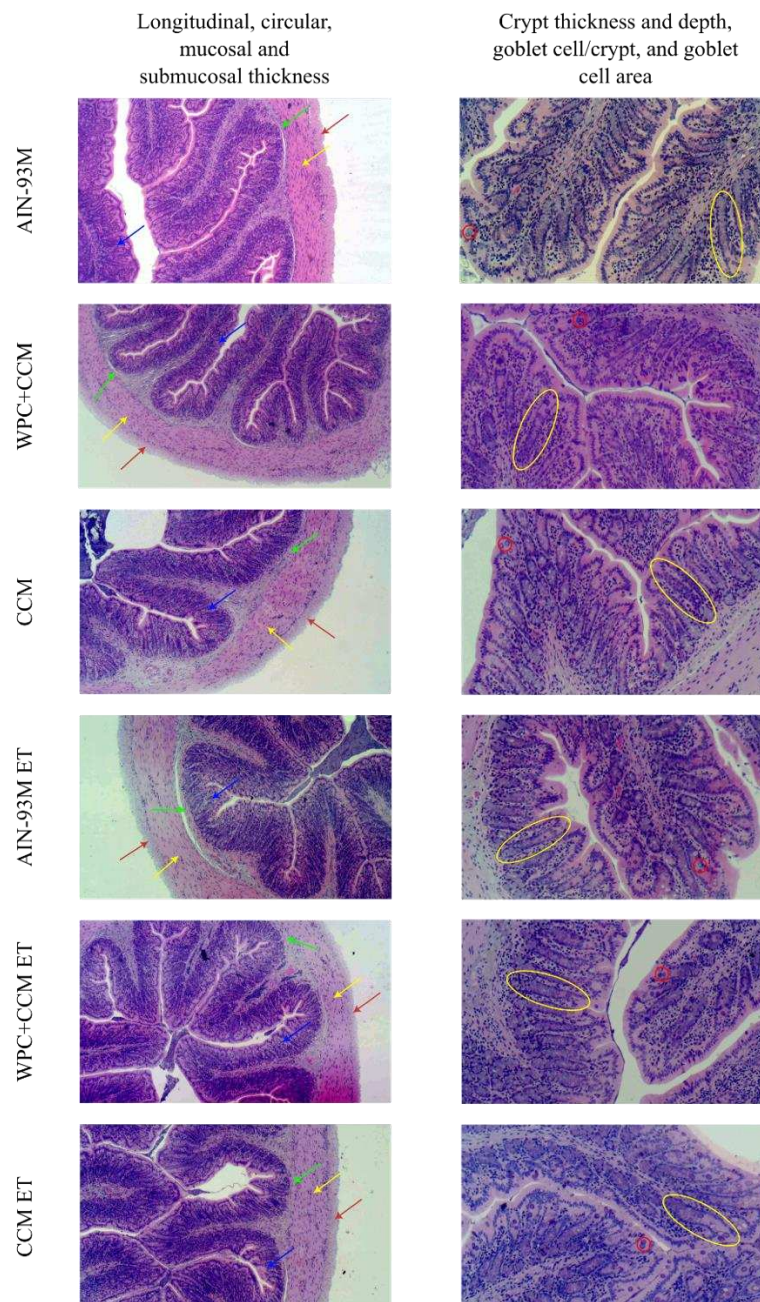


Figure 4. Representative photomicrographs of the colon stained with hematoxylin and eosin in rats from experimental groups.

AIN-93M: group that received a standard diet; AIN-93M EE: group submitted to the exhaustive exercise that received a standard diet; WPC + CCM: group not submitted to EE that received curcumin-added whey protein concentrate; WPC + CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin-added whey protein concentrate; CCM: group not submitted to EE that received curcumin; CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin; EE: exhaustive exercise. Red arrows: Longitudinal thickness; Yellow arrows: Circular thickness; Green arrows: Submucosa; Blue arrows: Mucosa; Yellow circles: Crypts; Red circles: Goblet cell.

Table 4. Histomorphometry of the colon of rats submitted or not to exhaustive test

Variables	Groups					
	AIN-93M	WPC+CCM	CCM	AIN-93M EE	WPC+CCM EE	CCM EE
Longitudinal thickness (µm)	67.92 ± 10.15 ^a	63.00 ± 4.48 ^a	66.26 ± 5.92 ^a	66.46 ± 5.26 ^a	59.13 ± 2.29 ^a	62.14 ± 5.04 ^a
Circular thickness (µm)	161.98 ± 15.27 ^a	152.95 ± 7.19 ^a	177.91 ± 18.31 ^a	210.53 ± 37.29 ^a	162.52 ± 10.27 ^b	177.33 ± 10.34 ^b
Mucous thickness (µm)	176.89 ± 14.56 ^b	168.40 ± 15.41 ^b	198.78 ± 6.28 ^{a*}	179.99 ± 11.34 ^a	172.77 ± 6.87 ^a	184.49 ± 9.89 ^a
Submucous thickness (µm)	69.59 ± 13.10 ^{a*}	42.07 ± 10.33 ^b	48.21 ± 2.33 ^b	53.94 ± 3.19 ^a	41.02 ± 6.62 ^b	45.55 ± 4.11 ^b
Crypt thickness (µm)	23.76 ± 2.14 ^a	22.95 ± 2.07 ^a	24.10 ± 1.52 ^a	22.75 ± 1.42 ^a	24.47 ± 2.24 ^a	24.02 ± 1.65 ^a
Crypt depth (µm)	157.12 ± 19.42 ^a	176.43 ± 27.36 ^a	177.43 ± 15.00 ^a	160.04 ± 28.67 ^a	152.10 ± 10.56 ^a	162.86 ± 15.18 ^a
Goblet cell per crypt	16.00 ± 2.00 ^a	14.00 ± 3.00 ^a	18.00 ± 3.00 ^a	18.00 ± 2.00 ^a	16.00 ± 2.00 ^b	20.00 ± 1.00 ^a
Goblet cell area (µm ²)	118.63 ± 7.23 ^{a*}	99.30 ± 16.80 ^{a*}	71.20 ± 7.66 ^b	89.17 ± 6.57 ^a	78.90 ± 7.30 ^b	76.83 ± 4.34 ^b

AIN-93M: group that received a standard diet; AIN-93M EE: group submitted to the exhaustive exercise that received a standard diet; WPC + CCM: group not submitted to EE that received curcumin-added whey protein concentrate; WPC + CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin-added whey protein concentrate; CCM: group not submitted to EE that received curcumin; CCM EE: group submitted to the exhaustive exercise that received curcumin; EE: exhaustive exercise. *Indicates significant differences between the same group (sedentary x EE), according to the t test ($p < 0.05$). Different lowercase letters (a – b) indicate significant differences within groups, according to ANOVA, followed by the Newman-Keuls test, at 5% probability. Data expressed as mean ± standard deviation.

Administration of CCM, isolated or combined with WPC, was effective in maintaining goblet cell numbers during exhaustive exercise. Notably, the use of CCM in its isolated form demonstrated superior efficacy ($p<0.05$) (Figure 4, Table 4). Regarding the area of goblet cells, the consumption of isolated CCM was able to maintain the area of these cells after exhaustive exercise, although they were still smaller compared to the control group ($p<0.05$). Conversely, the combined use of CCM with WPC did not achieve similar results, showing a reduction in cell area after exercise ($p<0.05$) (Figure 4, Table 4).

4. Discussion

The production and absorption of SCFAs are essential for intestinal health, regulating cellular processes such as differentiation, proliferation, apoptosis, gene expression and anti-inflammatory mechanisms. These acids are produced by a variety of intestinal bacteria, each contributing in a specific way to their synthesis. For example, acetate is mainly produced by enteric bacteria such as *Blautia hydrogenotrophica*, while propionate can be generated by Firmicutes and Bacteroidetes, and butyrate is produced by bacteria in the phylum Firmicutes (Liu et al., 2021).

Changes in the diet have the potential to influence the production and absorption of these SCFAs, as the composition of the diet can modify the composition of the intestinal microbiota. Therefore, it is crucial to understand how different dietary interventions or external factors can affect gut health, especially in situations of physiological stress such as exhaustive exercise. Exhaustive exercise is known to induce oxidative stress and inflammation in the body, affecting intestinal health, and consequently increasing intestinal permeability (Engel et al., 2018; Rosa, 2019).

Our results demonstrated that there was no change in the levels of propionic and butyric acids after exhaustive exercise. Furthermore, the ability of the experimental groups to maintain the levels of these acids may indicate an effective regulation of intestinal permeability, ensuring SCFA production is adequate for metabolic requirements. This preservation of SCFA levels can be attributed to several potential mechanisms, such as the fact that exercise can improve the diversity and abundance of certain bacterial genera, such as those from the Firmicutes phylum (Dalton et al., 2019), which is directly related to production of these two SCFAs, and also the fact that whey protein concentrate admixture with curcumin may have a protective or preservation role for these acids. The fermentation of whey protein by intestinal bacteria leads to an increase in the concentration of SCFA, and CCM also has a regulatory effect on the

composition of the intestinal microbiota, favoring the growth of beneficial strains and butyrate-producing bacteria (Boscaini et al., 2023; Dalton et al., 2019).

The interaction between curcumin and WPC is particularly interesting in this context. Curcumin, known for its low bioavailability, has been used in a form with high absorption and bioavailability in this study. Its combination with WPC may enhance the overall antioxidant and anti-inflammatory effects due to complementary mechanisms of action. Curcumin has been shown to modulate the gut microbiota, promoting the growth of beneficial bacteria and improving gut barrier function, while WPC, a rich source of bioactive peptides and amino acids, supports muscle recovery and immune function. Together, they provide a synergistic effect, enhancing the production of SCFAs and potentially improving the intestinal barrier integrity. This synergism justifies the inclusion of both components in a single formulation, as they may work together to offer enhanced protection against oxidative stress and inflammation induced by exhaustive exercise.

The possible decrease in acetic acid compared to the control group can be justified by the fact that most of this acid produced by the microbiota was readily transported to the liver and metabolized, or used by skeletal muscle as a source of energy, as highlighted by Hijova (2007). In this context, during exhaustive exercise, the body can direct more metabolic resources to meet immediate energy demands, resulting in an increase in hepatic metabolism and, consequently, in the accelerated metabolization of acetic acid. Despite this difference in relation to the control group, acetic acid levels remained stable during exercise. This indicates that, although there is greater use and metabolization of acetic acid due to increased energy demands, the production of this acid by the intestinal microbiota continues to adequately meet these needs (Boscaini et al., 2023).

Furthermore, SCFAs, particularly butyrate, play a role in intestinal homeostasis, directly influencing the redox balance and antioxidant response of the intestinal epithelium. These metabolites, produced by microbial fermentation, modulate the production of reactive oxygen species (ROS), which, in excess, can lead to oxidative stress and cellular damage. These acids have the ability to stimulate the expression of antioxidant genes, including superoxide dismutase (SOD), in addition to promoting the synthesis of glutathione, one of the main intracellular antioxidants. Thus, SCFAs not only act as energy sources for colonic epithelial cells, but are also key mediators in the regulation of the intestinal oxidative environment (González-Bosch et al., 2021).

MDA is a degradation product of unsaturated lipids and is often used as a marker of oxidative stress and cellular damage. The formation of MDA occurs mainly through lipid peroxidation, a process in which unsaturated lipids are attacked by free radicals, resulting in damage to the cell membrane (Del Rio et al., 2005; Hendrix et al., 2020). In this study, it was observed that the group that was not submitted to the exhaustive test showed higher concentrations of MDA compared to the groups that were submitted to the test. This may indicate an adaptive response of the body to exercise-induced stress, where the increase in antioxidant activity, resulting from the association of whey protein and curcumin, can mitigate lipid peroxidation and, consequently, reduce MDA levels.

PCN is another marker of oxidative stress, where amino acid residues are modified by reactive oxygen species (ROS), compromising the structure and function of proteins. In our study, the group that underwent the exhaustion test showed higher concentrations of PCN, reflecting an increase in oxidative stress during exercise. The combination of WPC with CCM does not appear to significantly influence these levels, however, CCM isolated manages to maintain these levels stable. This can be attributed to the fact that CCM and WPC act through different antioxidant mechanisms, possibly resulting in the absence of a synergistic effect (Chaves et al., 2018; Szymanski et al., 2018). Although both compounds have antioxidant effects, their combination did not provide additional protection against exercise-induced oxidative stress. This suggests that the antioxidant mechanisms involved may be more complex than initially considered, and that specific interactions between different dietary compounds should be taken into account when formulating antioxidant supplements or therapies, and it is important to understand how they interact at the molecular and physiological level. This reinforces the need for further studies about the interactions between dietary compounds to develop effective interventions against oxidative stress, especially in contexts of high physical exertion, such as strenuous exercise (Bjørklund & Chirumbolo, 2017).

Under physiological conditions, NO acts regulating intestinal tone, promoting a favorable environment for water and electrolyte absorption. However, in inflammatory contexts, high NO production can stimulate liquid secretion from the intestine, contributing to inflammation-associated diarrhea, in addition to being harmful to host cells, leading to apoptosis and necrosis of enterocytes, compromising the integrity of the intestinal barrier (Lundberg & Weitzberg, 2013; Mourad et al., 1999). During exercise, increased metabolism and increased oxygen demand by muscle tissues can lead to greater NO production to promote vasodilation and increase blood flow to working muscles. Therefore, it is possible that NO

levels in the intestine decrease during exercise as more NO is consumed by working tissues (Oral, 2021).

The results of our study indicate that curcumin supplementation, isolated or associated with WPC, increases NO levels in non-exercised groups, which may be beneficial for maintaining intestinal homeostasis under physiological conditions. However, the reduction in NO concentrations observed after exhaustive exercise suggests a redistribution of NO to working muscles, which is an expected adaptive response to meet the increased metabolic demand during exercise. This redistribution may protect the intestine from possible harmful effects of excess NO in inflammatory conditions, while supporting muscle performance during exercise. This is corroborated by a previous study conducted by our research group, in which the same animals in this study demonstrated a significant increase in NO levels in muscles during exercise (Dias et al., 2022).

The gastrointestinal (GI) tract is an important source of ROS. Although the intestinal epithelium acts as a physical and antimicrobial barrier, ingested substances and enteric pathogens and physical stress can trigger inflammation, resulting in the production of pro-inflammatory cytokines (Tian et al., 2017). To combat the damage caused by oxidative stress, the body has a variety of antioxidants, both enzymatic and non-enzymatic. For example, SOD converts superoxide anion to hydrogen peroxide, while CAT and GST degrade hydrogen peroxide (Perkins et al., 2015).

Damage induced by oxidative stress can lead to infiltration of the intestinal mucosa by activated leukocytes, resulting in an overload of the tissue's antioxidant defenses. However, diets rich in polyphenols can help control excessive ROS production (Sahoo et al., 2023). In the present study, we observed an increase in SOD production in the group supplemented with WPC and CCM that underwent exercise, indicating an adaptive response of the body to an increased antioxidant activity during exercise. On the other hand, CAT activity did not show significant differences, while GST activity decreased in the same group. This suggests that the ingestion of antioxidant compounds was effective in defending the body against physical stress, reducing the need for endogenous production of these antioxidant compounds (Sahoo et al., 2023). These results highlight the importance of antioxidant consumption in protecting the gastrointestinal tract against the effects of oxidative stress during physical exercise.

Several cellular defense mechanisms against oxidative stress are induced by different molecular pathways, in particular the nuclear factor erythroid-2-associated factor 2 (Nrf2) pathway. Nrf2 is a transcription factor that regulates antioxidants within the cell, acting as a

stress-responsive transcription factor (Kerasioti et al., 2018; Ma et al., 2023). In our study, we observed that the consumption of curcumin associated with WPC prevented changes in Nrf2 expression in response to oxidative stress. Whey protein, as well as curcumin, can induce Nrf2 phosphorylation, Keap1 dissociation, nuclear translocation and finally activation of antioxidant enzymes. Furthermore, bioactive peptides, potentially capable of crossing the intestinal barrier, exert an antioxidant action through activation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway (Rahban et al., 2020; Tonolo et al., 2020).

Nrf2 under activation can inactivate inflammatory signaling pathways, such as the NF- κ B pathway, an inducible transcription factor that regulates many genes involved in the development and regulation of inflammatory and immunomodulatory processes. Studies have shown that whey protein can mitigate oxidative stress and modulate the inflammatory response during and after exhaustive physical exercise. The immunomodulatory peptides present in WP modulate the production of inflammatory cytokines by acting on the NF- κ B pathway (Adak; Khan, 2018; Sahin et al., 2024; Zhang et al., 2021).

Furthermore, curcumin also has potent anti-inflammatory properties, mediated by inhibition of the NF- κ B pathway, and may act on the inflammatory response generated by exhaustive physical exercise, consequently reducing the production of pro-inflammatory cytokines (Zhang et al., 2024). In this study, we observed a reduction in this marker in the groups that received WPC+CCM and CCM compared to the control group, and CCM isolated was also effective in reducing NF- κ B under physical stress.

Generally, vital NF- κ B activators are pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , an elevated marker in inflammatory conditions (Kaminsky; Al-Sadi; Ma, 2021; Matarazzo et al., 2022). Due to their already established anti-inflammatory properties, CCM and WPC have the ability to act in the reduction of this cytokine, which was observed in our study, in which the combination of WPC and CCM reduced IL-1 β levels compared to the control diet and prevented the increase of this cytokine in response to physical stress. Despite the increase in IL-1 β in the CCM group, we were able to observe an increase in Nrf2 expression in the same group, indicating that CCM helped in the antioxidant response, in order to decrease inflammation.

The muscular layer of the intestine is crucial for the proper movement of food through the gastrointestinal tract. Changes in the thickness or integrity of this layer can affect the effectiveness of intestinal motility, impacting digestion and nutrient absorption (Ünsal et al., 2018). In our study, we observed that the groups that received CCM, isolated or combined with WPC, were able to maintain the thickness of the circular and longitudinal layers in the face of

physical stress. This suggests that, although it did not lead to an increase in muscle layer, animals that consumed a diet rich in polyphenols and good quality protein did not show a negative response in the intestine to exercise, possibly not affecting intestinal motility and transit (Ünsal et al., 2018).

The intestinal mucosa is responsible for the absorption of essential nutrients; changes in its thickness may indicate changes in the absorption capacity of these nutrients (Campbell et al., 2016; Yang & Yu, 2021). In the present study, mucosal thickness was greater in the curcumin-treated group without test, suggesting a potential decrease in absorption area after exercise. However, this difference was not observed in the WPC+CCM group submitted to exhaustive test, which despite not increasing its mucous layer, maintained its thickness in relation to the WPC+CCM not submitted to ET, thus not affecting the absorption capacity.

The submucosa is related to the intestinal immune response, as it is where lymphocytes and other components of the immune system associated with the gastrointestinal tract are located (Campbell et al., 2016; Yang & Yu, 2021). Although the groups that received CCM, isolated or combined with WPC, had smaller thicknesses compared to the control group, no difference was observed in the thickness of the submucosa in relation to the WPC+CCM and CCM groups submitted to exhaustive test. Thus, we concluded that the production capacity of lymphocytes and components involved in the immune response of these groups was not affected after physical exercise, possibly due to the antioxidant and anti-inflammatory properties of whey protein and curcumin (Boscaini et al., 2023; Scazzocchio et al., 2020).

In addition to the muscular and mucosal layers, adequate integrity and function of the crypts are critical for maintaining intestinal homeostasis and preventing gastrointestinal disorders and other related conditions. Intestinal crypts house stem cells responsible for the continuous renewal of the intestine, and this function is essential for maintaining the integrity of the intestinal barrier. Additionally, crypts house immune cells that help modulate the inflammatory response and protect against foreign invaders (Gehart & Clevers, 2018; Yang & Yu, 2021). The results of this study revealed a constancy in the thickness and depth of the intestinal crypts, indicating morphological stability. This finding is particularly promising, as the preservation of this cryptal architecture can be considered a positive factor, as it suggests potential resistance to adverse changes that could compromise intestinal function.

Among the cells present in the crypts are goblet cells, which play a fundamental role in protecting the intestinal mucosa, producing mucus that acts as a barrier against physical damage, pathogens and irritating substances. Variations in the number and area of these cells

can directly impact the intestine's defense capacity against damage and infections (Gehart & Clevers, 2018; Yang & Yu, 2021). In our study, a reduction in both the number and area of goblet cells per crypt was observed in the group submitted to the exhaustive test with WPC+CCM. This observation suggests a possible response to the consumption of WPC+CCM, as in situations of physical stress, the body tends to increase the production of goblet cells to reinforce the production of protective mucus (Mello et al., 2012). Therefore, the combination of whey protein and curcumin appeared to be effective in protecting against oxidizing and inflammatory agents, offering additional defense to the intestine in stressful conditions.

5. Conclusions

The consumption of WPC+CCM has a limited impact on the production of short-chain fatty acids, while CCM either isolated or associated with WPC reduced MDA levels, indicating less oxidative stress. The WPC+CCM combination also increased SOD and CAT activity after exhaustive exercise, showing a positive antioxidant response, which was confirmed by the expression of Nrf2.

The consumption of CCM, either isolated or combined with WPC, was able to reduce the expression of inflammatory markers (i.e., NF- κ B and IL-1 β), and maintained the thickness of the mucosa and submucosa as well as preserved the number and area of goblet cells after exhaustive exercise.

We conclude that the consumption of WPC+CCM has beneficial effects on intestinal health, especially in preserving the production of short-chain fatty acids, avoided increased oxidative stress and inflammatory markers, and maintained intestinal integrity. Such composition may be beneficial for recovery, physical performance and prevention of gastrointestinal disturbances associated very high physical stress.

6. Acknowledgements

We would like to thank the partner laboratories, the Postgraduate Program in Nutritional Science, the Federal University of Viçosa and the Minas Gerais State Research Support Foundation - FAPEMIG, who contributed to the project being carried out.

7. Funding

This work was supported by the Minas Gerais State Research Support Foundation - FAPEMIG [grant number: APQ-04073-23].

8. References

- Batacan, R. B., Fenning, A. S., Dalbo, V. J., Scanlan, A. T., Duncan, M. J., Moore, R. J., & Stanley, D. (2017). A gut reaction: the combined influence of exercise and diet on gastrointestinal microbiota in rats. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1627–1638. <https://doi.org/10.1111/JAM.13442>
- Bjørklund, G., & Chirumbolo, S. (2017). Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition*, 33, 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.07.018>
- Boscaini, S., Skuse, P., Nilaweera, K. N., Cryan, J. F., & Cotter, P. D. (2023). The ‘Whey’ to good health: Whey protein and its beneficial effect on metabolism, gut microbiota and mental health. *Trends in Food Science & Technology*, 133, 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2022.12.009>
- Campbell, S. C., Wisniewski, P. J., Noji, M., McGuinness, L. R., Häggblom, M. M., Lightfoot, S. A., Joseph, L. B., & Kerkhof, L. J. (2016). The Effect of Diet and Exercise on Intestinal Integrity and Microbial Diversity in Mice. *PLOS ONE*, 11(3), e0150502. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0150502>
- Chaves, F. M., Baptista, I. L., Simabuco, F. M., Quaresma, P. G. F., Pena, F. L., Bezerra, R. M. N., Pauli, J. R., Da Cunha, Di. T., Campos-Ferraz, P. L., & Antunes, A. E. C. (2018). High-intensity-exercise-induced intestinal damage is protected by fermented milk supplemented with whey protein, probiotic and pomegranate (*Punica granatum* L.). *British Journal of Nutrition*, 119(8), 896–909. <https://doi.org/10.1017/S0007114518000594>
- Dalton, A., Mermier, C., & Zuhl, M. (2019). Exercise influence on the microbiome–gut–brain axis. *Gut Microbes*, 10(5), 555. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1562268>
- Dawson, C., & Horvath, S. M. (1970). Swimming in small laboratory animals. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 51–78. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4939286/>
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316–328. <https://doi.org/10.1016/J.NUMECD.2005.05.003>

- Dias, K. A., da Conceição, A. R., Pereira, S. M. S., Oliveira, L. A., da Silva Rodrigues, J. V., Dias, R. S., de Paula, S. O., Natali, A. J., da Matta, S. L. P., Gonçalves, R. V., Tako, E., Martino, H. S. D., & Lucia, C. M. Della. (2022). Curcumin-Added Whey Protein Positively Modulates Skeletal Muscle Inflammation and Oxidative Damage after Exhaustive Exercise. *Nutrients* 2022, Vol. 14, Page 4905, 14(22), 4905. <https://doi.org/10.3390/NU14224905>
- Dieterich, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., & Prestle, J. (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, 101(1), 33–39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>
- Engel, F. A., Ackermann, A., Chtourou, H., & Sperlich, B. (2018). High-Intensity Interval Training Performed by Young Athletes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in physiology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.01012>
- Gehart, H., & Clevers, H. (2018). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2018 16:1, 16(1), 19–34. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>
- González-Bosch, C., Boorman, E., Zunszain, P. A., & Mann, G. E. (2021). Short-chain fatty acids as modulators of redox signaling in health and disease. *Redox biology*, 47, 102165.
- Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. (2013). Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. *AAPS Journal*, 15(1), 195–218. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9432-8>
- Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1981). Glutathione S-Transferases (Rat and Human). *Methods in Enzymology*, 77(C), 218–231. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77029-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77029-0)
- Hendrix, J., Nijs, J., Ickmans, K., Godderis, L., Ghosh, M., & Polli, A. (2020). The Interplay between Oxidative Stress, Exercise, and Pain in Health and Disease: Potential Role of Autonomic Regulation and Epigenetic Mechanisms. *Antioxidants*, 9(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9111166>
- Hijova, E. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy*, 108(8), 354–358. www.bmj.sk.
- Kaminsky, L. W., Al-Sadi, R., & Ma, T. Y. (2021). IL-1 β and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier. *Frontiers in Immunology*, 12, 767456. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.767456/BIBTEX>

- Kerasioti, E., Stagos, D., Tsatsakis, A. M., Spandidos, D. A., Taitzoglou, I., & Kouretas, D. (2018). Effects of sheep/goat whey protein dietary supplementation on the redox status of rats. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 5774–5781. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8622>
- Laurindo, L. F., Santos, A. R. de O. dos, Carvalho, A. C. A. de, Bechara, M. D., Guiguer, E. L., Goulart, R. de A., Vargas Sinatora, R., Araújo, A. C., & Barbalho, S. M. (2023). Phytochemicals and Regulation of NF- κ B in Inflammatory Bowel Diseases: An Overview of In Vitro and In Vivo Effects. *Metabolites*, 13(1), 96. <https://doi.org/10.3390/METABO13010096>
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*, 186(C), 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
- Liu, L., Li, Q., Yang, Y., & Guo, A. (2021). Biological function of short-chain fatty acids and its regulation on intestinal health of poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 736739.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2013). Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut*, 62(4), 616–629. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2011-301649>
- Ma, Y., Xu, J., Guo, R., Teng, G., Chen, Y., & Xu, X. (2023). In vitro gastrointestinal model for the elderly: Effect of high hydrostatic pressure on protein structures and antioxidant activities of whey protein isolate. *Food Bioscience*, 52, 102452. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102452>
- Matarazzo, L., Hernandez Santana, Y. E., Walsh, P. T., & Fallon, P. G. (2022). The IL-1 cytokine family as custodians of barrier immunity. *Cytokine*, 154, 155890. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2022.155890>
- Mello, R. de O., da Silva, C. M. G., Fonte, F. P., Silva, D. L. F., Pereira, J. A., Margarido, N. F., & Martinez, C. A. R. (2012). Avaliação do número de células caliciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 39(2), 139–145. <https://doi.org/10.1590/S0100-69912012000200010>

- Mourad, F. H., Turvill, J. L., & Farthing, M. J. G. (1999). Role of nitric oxide in intestinal water and electrolyte transport. *Gut*, 44(2), 143–147. <https://doi.org/10.1136/GUT.44.2.143>
- Oral, O. (2021). Nitric oxide and its role in exercise physiology. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 61(9), 1208–1211. <https://doi.org/10.23736/S0022-4707.21.11640-8>
- Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2015). Peroxiredoxins: Guardians Against Oxidative Stress and Modulators of Peroxide Signaling. *Trends in biochemical sciences*, 40(8), 435. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2015.05.001>
- Perrone, Í. T., Simeão, M., Rodrigues Júnior, P. H., Stephani, R., & Carvalho, A. F. de. (2013). Influence of pilot spray dryer settings on moisture and water activity of whole milk powder. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 68(393), 5–9. <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20130029>
- Rahban, M., Habibi-Rezaei, M., Mazaheri, M., Saso, L., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2020). Anti-Viral Potential and Modulation of Nrf2 by Curcumin: Pharmacological Implications. *Antioxidants*, 9(12), 1228. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9121228>
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- RESOLUÇÃO NORMATIVA No 37, D. 15 D. F. D. 2018. (2018). Diretriz da Prática de Eutanásia do Conceia.
- Rosa, J. M. (2019). Efeito Profilático Do Exercício Físico Sobre O Comportamento Tipo-Depressivo E Alterações Na Plasticidade Hipocampal E No Eixo Intestino-Microbiota-Cérebro Induzidos Por Aβ1-40. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.
- Sabarense, C. M., Rocha, K. S. O., Rosa, D. D., Martins, J. H., Pereira, M. M. L. da S., Silva, F. F., & Steward, B. L. (2012). A new computational method for hepatic fat microvesicles counting in histological study in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(2), 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.011>
- Sahoo, D. K., Heilmann, R. M., Paital, B., Patel, A., Yadav, V. K., Wong, D., & Jergens, A. E. (2023). Oxidative stress, hormones, and effects of natural antioxidants on intestinal

inflammation in inflammatory bowel disease. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1217165. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1217165/BIBTEX>

Sallam, N., & Laher, I. (2016). Exercise Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Aging and Cardiovascular Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Scazzocchio, B., Minghetti, L., & D'archivio, M. (2020). Interaction between Gut Microbiota and Curcumin: A New Key of Understanding for the Health Effects of Curcumin. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 2499, 12(9), 2499. <https://doi.org/10.3390/NU12092499>

Schoenfeld, B. J., & Aragon, A. A. (2018). How much protein can the body use in a single meal for muscle-building? Implications for daily protein distribution. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 15(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0215-1>

Siegfried, R., Rückemann, H., & Stumpf, G. (1984). An HPLC method for determining organic acids in silage.

Soares, N. L. (2021). Efeito do Jejum Intermitente Associado do Treinamento Aeróbico sobre o Eixo Intestino-Cérebro de Ratos Wistar. UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA.

STANKOVIC, I. (2004). CURCUMIN - Chemical and Technical Assessment. FAO, 61st JECFA, 1–8.

Steinbacher, P., & Eckl, P. (2015). Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules*, 5(2), 356–377. <https://doi.org/10.3390/biom5020356>

Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*, 91(1), e13357. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13357>

Szymanski, M. C., Gillum, T. L., Gould, L. M., Morin, D. S., & Kuennen, M. R. (2018). Short-term dietary curcumin supplementation reduces gastrointestinal barrier damage and physiological strain responses during exertional heat stress. *Journal of Applied Physiology*, 124(2), 330–340.

<https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00515.2017/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG0121724240003.JPEG>

- Tian, T., Wang, Z., & Zhang, J. (2017). Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4535194>
- Tonolo, F., Folda, A., Cesaro, L., Scalcon, V., Marin, O., Ferro, S., Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2020). Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 64, 103696. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.103696>
- Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical biochemistry*, 524, 13–30. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2016.10.021>
- Ünsal, C., Ünsal, H., Ekici, M., Koç Yildirim, E., Üner, A. G., Yildiz, M., Güleş, Ekren Aşici, G. S., Boyacioglu, M., Balkaya, M., & Belge, F. (2018). The effects of exhaustive swimming and probiotic administration in trained rats: Oxidative balance of selected organs, colon morphology, and contractility. *Physiology International*, 105(4), 309–324. <https://doi.org/10.1556/2060.105.2018.4.25>
- Venditti, P., & Di Meo, S. (1996). Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Archives of biochemistry and biophysics*, 331(1), 63–68. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1996.0283>
- Yang, S., & Yu, M. (2021). Role of goblet cells in intestinal barrier and mucosal immunity. *Journal of Inflammation Research*, 14, 3171–3183. <https://doi.org/10.2147/JIR.S318327>

8. CONCLUSÃO GERAL

Em relação à saúde intestinal, a partir da revisão sistemática, a prática regular de exercícios físicos intensos, como natação de alta intensidade, escalada de escada e corrida em esteira, mostrou promover benefícios significativos na modulação da microbiota intestinal, aumentando sua riqueza e diversidade sem alterar a morfologia e a integridade intestinal.

A partir dos resultados do estudo experimental, a combinação de WPC e CCM mostrou potencial para melhorar a saúde intestinal e a capacidade antioxidante em situações de exercício exaustivo. Esta combinação foi eficaz na manutenção do estresse oxidativo e expressão de

marcadores inflamatórios, e na preservação da produção de ácidos graxos de cadeia curta e da integridade intestinal.

Por fim, acredita-se que a combinação de WPC e CCM pode ser benéfica para a recuperação, desempenho físico e prevenção de problemas gastrointestinais associados ao exercício intenso, o que demanda mais pesquisas experimentais para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos, bem como avaliar a aplicabilidade prática dessa suplementação em humanos.

9. ANEXOS

9.1. Anexo A - Composição centesimal da Theracurmin®

Value creation through innovation



THERAVALUES CORPORATION

1F, Kioicho Building, 3-12, Kioicho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0094, Japan

<http://theravalues.com/english/index.html>

NUTRITIONAL DATA ANALYSIS

Sample Theracurmin CR-033P

Test Item	Result	Detection Limit	Note	Method
Water	3.1g/100g	-		Heat under Reduced Pressure Method
Protein	0.6g/100g	-	1	Kjeldahl Method
Lipid	1.4 g/100g	-		Thermal Decomposition Method
Ash	0.3 g/100g	-		Direct Ashing Method
Carbohydrate	94.6 g/100g	-	2	-
Energy	393kcal/100g	-	3	-
Sodium	7.2mg/100g	-		Atomic Absorption Method
NaCl equivalent	0.018g/100g	-	4	-
Fe	0.32mg/100g	-		ICP Atomic Emission Spectroscopy
Ca	95.2mg/100g	-		ICP Atomic Emission Spectroscopy
Vitamin A (Retinol Activity Equivalent)			5	
Retinol	Not Detected	3µg/100g		HPLC
α-Carotene	Not Detected	6µg/100g		HPLC
β-Carotene	Not Detected	6µg/100g	6	HPLC
Total Ascorbic Acid	Not Detected	1mg/100g	7	HPLC
Fructose	Not Detected	0.05g/100g		HPLC
Glucose	1.62/100g	-		HPLC
Sucrose	Not Detected	0.05g/100g		HPLC
Maltose	25.5g/100g	-		HPLC
Lactose	Not Detected	0.05g/100g		HPLC
Galactose	Not Detected	0.05g/100g		HPLC
Saturated Fatty acid	Not Detected	0.01g/100g		GC
Trans Fatty Acid	Not Detected	0.05g/100g	8	GC
Cholesterol	Not Detected	1mg/100g		GC
Total Fat	1.4g/100g	0.01g/100g		ICP
Potassium	57mg/100g	1mg/100g		ICP
Vitamin D	0µg/100g	1000mcg/100g		GC
Added Sugars	38g/100g	0.1g/100g	9	GC

Note1. Nitrogen:protein Scale Factor:6.25

Note2. Calculation Formula (The Food Labelling Standard, 2015 Cabinet Office Ordinance No.10): 100 (water+Protein+Lipid+Ash)

Note3. Calculation Formula (The Food Labelling Standard, 2015 Cabinet Office Ordinance No.10): 100 (water+Protein+Lipid+Ash+Dietary)

Note4. Calculation Formula $Na \times 2.54$

Note5. Not calculated due to not detected

Note6. By The Food Labelling Standard, 2015 Cabinet Office Ordinance No.10)

Note7. Modified by hydrazine, first.

Note8. Measurement Object: Carbon 14-22 monotrans fatty acid and carbon 18 di- and tri-trans fatty acid (Ref. AOAC 996.06, AOCS Co)

Note9. Including Maltose 30% (Composition ratio)

For and Behalf of : THERAVALUES CORPORATION

Position : Director

Signature :


Kim Young Min.

Date :

...July 31, 2018.....

9.2. Anexo B - Certificado de Aprovação no CEUA/UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 72/2018, intitulado **“Whey protein concentrado adicionado de cúrcuma: efeitos sobre parâmetros bioquímicos inflamatórios, antioxidantes e histológicos de ratos Wistar submetidos a exercício exaustivo”**, coordenado pela professora Ceres Mattos Della Lucia do Departamento de Nutrição e da Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 12/11/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 72/2018, named **“Whey protein concentrate added to turmeric: effects on inflammatory, antioxidant and histological biochemical parameters of Wistar rats undergoing exhaustive exercise”**, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on November 12, 2018 valid for 12 months.



Prof.ª Átina Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV