



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



FERNANDA MACHADO CHAVES

**DESEMPENHO FÍSICO, MICROBIOTA INTESTINAL E FUNÇÃO
BARREIRA EM RATOS WISTAR SUPLEMENTADOS COM BEBIDA
ESPORTIVA CONTENDO ROMÃ, PROBIÓTICO E CONCENTRADO
PROTEICO DO SORO DE LEITE E SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
AGUDO**

Limeira

2017

FERNANDA MACHADO CHAVES

**DESEMPENHO FÍSICO, MICROBIOTA INTESTINAL E FUNÇÃO
BARREIRA EM RATOS WISTAR SUPLEMENTADOS COM BEBIDA
ESPORTIVA CONTENDO ROMÃ, PROBIÓTICO E CONCENTRADO
PROTEICO DO SORO DE LEITE E SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
AGUDO**

Dissertação apresentada a
Faculdade de Ciências
Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de
Mestra em Ciências da
Nutrição do Esporte e do
Metabolismo, na área de
Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Lopes de Campos Ferraz

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
FERNANDA MACHADO CHAVES, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. ADRIANE ELISABETE
ANTUNES DE MORAES.

Limeira

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

C398d Chaves, Fernanda Machado, 1989-
Desempenho físico, microbiota intestinal e função barreira em ratos Wistar suplementados com bebida esportiva contendo romã, probiótico e concentrado proteico do soro de leite e submetidos a exercício agudo / Fernanda Machado Chaves. – Limeira, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Adriane Elisabete Antunes de Moraes.
Coorientador: Patrícia Lopes Campos de Ferraz.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Exercícios físicos. 2. Probióticos. 3. Soro do leite. 4. Atividade antioxidante. 5. Microbiota. I. Antunes, Adriane Elisabete Costa, 1975-. II. Ferraz, Patrícia Lopes de Campos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Physical performance, intestinal microbiota and barrier function in Wistar rats supplemented with sport drink containing pomegranate, probiotic and whey protein concentrate and submitted to acute exercise

Palavras-chave em inglês:

Physical exercises
Probiotics
Whey protein
Antioxidant activity
Microbiota

Área de concentração: Nutrição

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Adriane Elisabete Antunes de Moraes [Orientador]
Fúlvia de Barros Manchado Gobatto
Glaucia Maria Pastore

Data de defesa: 03-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autor: Fernanda Machado Chaves

Título: Desempenho físico, microbiota intestinal e função barreira em ratos wistar suplementados com bebida esportiva contendo romã, probiótico e concentrado proteico do soro de leite e submetidos a exercício agudo.

Natureza: Pesquisa na área básica em Nutrição.

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas.

Aprovado em: Limeira, 03/08/2017.

Presidente: Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes (Orientadora)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP)

A Ata de Defesa foi devidamente assinada pelos membros da Comissão Examinadora e consta no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial, a minha família. Sem eles eu não estaria aqui, pois acreditaram em meus sonhos, me acompanharam e viveram comigo todos os momentos até agora. Espero que continuem fazendo parte da minha vida. Além disso, dedico aos meus novos e velhos amigos, que me ajudaram e que torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu tenho muito a agradecer aos meus pais por me darem a vida, a possibilidade de um futuro, e permitir a graça de tê-los como minha inspiração por tudo que passaram, lutaram e conquistaram ao longo de suas vidas, para dar com dignidade um padrão de vida excelente para mim e meus irmãos. Agradeço também aos meus irmãos e minha família por fazerem parte da minha vida e torcerem por mim.

Agradeço a todos os meus novos e velhos amigos que de alguma forma me fizeram feliz, e aqueles que mesmo que distante sempre estiveram presentes. Agradeço a grande amiga Paula Quaresma por continuar me ensinando, incentivando e apoiando.

Agradeço em especial, a minha Orientadora Adriane Elisabete Antunes de Moraes e Co-Orientadora Patrícia Lopes de Campos Ferraz por todos os ensinamentos, oportunidades e confiança.

Agradeço a todos os colaboradores deste projeto.

E agradeço a todos que me apoiaram e me ajudaram de uma forma ou de outra e que porventura não agradei, deixo o meu muito obrigado, por fazerem parte de tudo isso e por estarem comigo transformando um sonho em realidade.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

RESUMO

O uso de suplementos em busca de melhor desempenho está cada vez mais frequente, sendo que o consumo de algumas substâncias podem apresentar riscos à saúde. O uso de proteínas do soro de leite é uma prática eficaz e segura devido ao estímulo da síntese proteica promovida pela elevada concentração de aminoácidos de cadeia ramificada presentes nessas proteínas. O consumo de probióticos podem promover diversos benefícios à saúde, como melhora na função barreira e microbiota intestinal, tendo em vista o elevado risco de infecções que praticantes de exercício físicos e atletas estão expostos, após provas exaustivas. Além das proteínas do lactosoro, destacam-se também os compostos fenólicos presentes na romã, que podem combater o estresse oxidativo causado pelo exercício intenso e os probióticos, que melhoram a função intestinal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito combinado da suplementação de proteínas do soro do leite, probióticos e suco de romã (*Punica granatum*, L.) sobre a microbiota intestinal, estrutura de vilosidades do trato intestinal e marcadores inflamatórios de ratos Wistar submetidos a exercício agudo e de alta intensidade. Os ratos (n=24) foram divididos nos grupos controle, suplementado, exercitado e exercitado e suplementado. Os animais suplementados receberam durante seis semanas a bebida esportiva por gavagem e foram submetidos a exercício agudo e intenso. O exercício físico agudo e intenso pareceu comprometer a função barreira intestinal, diminuir o trânsito intestinal e a proporção de espécies do gênero *Lactobacillus*, além de aumentar espécies do gênero *Clostridium*. Por outro lado, a suplementação com a bebida esportiva acelerou o trânsito intestinal, além de, restabelecer a microbiota e a função barreira intestinal. Conclui-se que o efeito combinado dos componentes da bebida esportiva desenvolvida restabeleceu parâmetros de microbiota intestinal e função barreira protegendo os animais suplementados dos efeitos deletérios do exercício agudo e intenso.

Palavras-chave: desempenho físico, probiótico, soro do leite, atividade antioxidante, romã, microbiota.

ABSTRACT

Recently, it is increasingly common the use of dietary supplements for improvement of performance, however the consumption of some substances may incur health risks. Consumption of whey proteins is effective, safe and promotes protein synthesis from the high concentration of branched chain amino acids. The consumption of probiotics can promote several health benefits, such as improvement in the barrier function and intestinal microbiota. This property may be an important allied for athletes after exhausting tests, once they have greater risk for infections development. Moreover, phenolics present in pomegranate can contribute in oxidative stress shrinkage, especially after exercise. In this study, our main goal was the evaluation of combined effect of whey proteins, probiotics and pomegranate juice dietary supplementation in intestinal structure and microbiota, and inflammatory markers in rats submitted to high intensity acute exercise. The dietary supplementation was administered daily via intragastric gavage of the sports drink for 6 weeks, and an intense and acute exercise session was proceeded. Our results suggest that an acute and intense exercise session compromised the intestinal barrier function, decreased intestinal transit and the proportion of species of the genus *Lactobacillus*, besides increased species of the genus *Clostridium*. On the other hand, supplementation with sports drink accelerated intestinal transit, promoted maintenance and balance, and reestablished the microbiota and intestinal barrier function. Therefore, our data showed that the combined effect of whey protein, probiotics and pomegranate juice supplementation reestablished intestinal microbiota parameters and barrier function protecting from the deleterious effects of acute and intense exercise.

Key words: physical performance, probiotic, whey, antioxidant activity, pomegranate, microbiota.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
qPCR	Real-time polymerase chain reaction
RNA	Ácido ribonucleico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOS-MUP	Propionate Agar
ZO1	Zônula de oclusão 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	ARTIGO	14
3	CONCLUSÃO GERAL	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXOS	58
	ANEXO 1	59
		60

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de suplementos no meio esportivo está cada vez mais frequente, em busca de melhor desempenho ou forma física (Kreider, 1999). No entanto, há riscos à saúde, visto que alguns componentes presentes em suas formulações não foram analisados e comprovados como seguros à saúde.

As proteínas do soro de leite (*whey protein*) têm sido empregadas como suplemento alimentar devido à sua eficácia e segurança. O uso de proteínas do lactosoro tem sido cada vez mais comum entre praticantes de atividades físicas, visto que, essas proteínas possuem rápida e alta digestibilidade, alto valor biológico e eficiência metabólica, otimizando a recuperação em exercícios extenuantes (Borges et al., 2001). Estas proteínas possuem aminoácidos de cadeia ramificada (26%) e glutamato (6%), o qual pode ser utilizado exclusivamente para síntese de glutamina nos músculos (Souza et al., 2009). Além disso, podem ser utilizadas para preservar ou manter a glutamina muscular, que é amplamente utilizada por células do sistema imunológico e no exercício físico (Newsholme, Parry-Billings, 1990; Newsholme, Calder, 1997; Rohde, et al., 1998, Newsholme, 2001). Ademais, a glutamina apresenta importante papel na manutenção da função barreira intestinal (Wang et al, 2014). Dessa forma, as proteínas do soro de leite podem proteger o organismo em particular o intestino, durante atividades físicas, além de fortalecer o sistema imunológico (Souza et al., 2009, Castell, Newsholme, 1997).

O exercício físico altera funções de células do sistema imune conforme a intensidade (Nieman, 2008). Desta maneira, o exercício intenso pode aumentar a incidência de infecções do trato gástrico e trato respiratório superior, sendo responsável por alterações da imunidade em diversas partes do organismo (Nieman, 2008). Sendo assim, o exercício de alta intensidade pode ocasionar redução na atividade das células *natural killer* e no funcionamento das células B e T (Hoffman-Goetz e Pedersen, 1994).

Nieman e colaboradores (2005) demonstraram que corredores de ultra-maratona ou triatletas, alguns dias após o período competitivo apresentavam infecções no trato respiratório (Nieman et al., 2005; Glesson, Bishop, Oliveira e Tauler , 2011; Glesson, Bishop e Oliveira,

2012). Ademais, o exercício físico intenso e prolongado pode alterar negativamente os processos de absorção intestinal, resultando em consequente hipoperfusão e aumento de gordura no conteúdo intestinal, acarretando na maior ocorrência de diarreia (Nieman et al., 2005). Essas alterações fisiológicas estão relacionadas à modificação de proteínas estruturais chamadas *tight junctions*, que sofrem remodelamentos devido às constantes mudanças no fluxo sanguíneo no ambiente intestinal (Wijck et al., 2011).

A habilidade de controlar e equilibrar invasões de conteúdos maléficos a partir do lúmen intestinal para o organismo interno é denominada função barreira (Fanning *et al.*, 1999). Trabalhando em conjunto, células epiteliais, tecido linfóide associado ao intestino e bactérias luminais podem evitar invasões por agentes patogênicos, desempenhando assim esta função (Lamprecht e Frauwallner, 2012). Muitas proteínas transmembranas foram identificadas dentro das *tight junctions* com o objetivo de regular células do sistema imune, permeabilidade paracelular de água e solutos. Duas dessas proteínas são de principal interesse do presente estudo, a Zônula de oclusão 1 (ZO-1) e a Claudina-1.

A proteína ZO-1 é uma proteína de adesão celular responsável por transdução de sinal em junções célula-célula (Fanning, Mitic e Anderson, 1999; Gunzel e Yu, 2013). Já as claudinas, são proteínas integrais de membrana constituindo uma barreira tanto paracelular quanto de poros, desempenhando um importante papel na determinação das propriedades da permeabilidade das células epiteliais (Fanning, Mitic e Anderson, 1999; Gunzel e Yu, 2013). A claudina-1 é expressa principalmente no cólon intestinal e encontrada em ratos (Lu *et al.*, 2013). Além disso, Lu e colaboradores (2013), demonstraram que a privação de glutamina diminui a expressão de Claudina-1 (Lu *et al.*, 2013). A bebida esportiva oferecida neste estudo foi suplementada com proteínas do soro do leite, fornecendo glutamina necessária para proteção à saúde durante a prática de exercícios físicos (Castell e Newsholme, 1997; Li e Neu, 2009; Cruzat *et al.*, 2014). Ademais, probióticos podem alterar a expressão de proteínas *tight junctions* e melhorar a função barreira *in vitro* e em modelos animais (Macpherson, 2004; Keita e Söderholm, 2010).

Clancy et al. (2006) demonstraram que atletas fatigados apresentavam prejuízo na função das células T e reversão após terapia com probióticos. O qual, após suplementação com ingestão de cápsulas de *Lactobacillus acidophilus* por um mês, a secreção de IFN γ de células T aumentou significativamente. Cox et al. (2010) analisou corredores de longa distância, os quais receberam a suplementação de *Lactobacillus fermentum* VRI-003, por 4

meses, demonstrando manutenção dos níveis de interferon gama (INF γ), além de uma diminuição no número de dias e na severidade de doenças respiratórias durante o período experimental. Outro estudo analisou indivíduos que exerciam atividade física de resistência, os quais receberam culturas probióticas de *Lactobacillus casei* Shirota, por 16 semanas, demonstrando redução na frequência de infecções do trato respiratório superior (Gleeson et al., 2011). Dessa forma, o exercício físico exaustivo pode provocar distensão abdominal, diarreia, dor abdominal, em atletas (Pyne et al., 2014). E o uso de probióticos como suplemento pode auxiliar na redução da gravidade, duração e frequência de doenças respiratórias e problemas gastrointestinais, isto provavelmente pela interação direta destas culturas com a microbiota intestinal e com o sistema imune (Pyne et al., 2014). Ademais um único estudo reportou efeito ergogênico, com diminuição significativa no tempo de corrida em atletas até se atingir fadiga (Shing et al., 2014). Além do que, estudos relacionam a suplementação de probióticos na diminuição dos efeitos do exercício prolongado e intenso (Gleeson et al., 2011; Gleeson et al., 2012).

O exercício físico moderado diminui espécies reativas de oxigênio através de adaptações dos sistemas antioxidantes endógenos (Cruzat et al., 2014; Fuster-Munoz et al., 2016). O aumento na inflamação e o estresse oxidativo podem diminuir a função muscular (Fuster-Munoz et al., 2016). Antioxidantes endógenos podem proteger o organismo contra os danos oxidativos provocados pelo exercício físico, no entanto, eles podem não ser suficientes em exercícios intensos e/ou extenuantes (Cruzat et al., 2014). Por isso, muitas estratégias têm sido usadas para melhorar esses danos, como o uso de antioxidantes exógenos, através de intervenções nutricionais (Fuster-Munoz et al., 2016; Crum et al., 2017; Sharma et al., 2017). Nesse contexto, o suco de romã, é rico em polifenóis, como, flavonóis, antocianinas e elagitaninos (Gil et al., 2000; Fuster-Munoz et al., 2016) e pode ser oferecido como antioxidante exógeno. Alguns estudos têm comprovado a ação antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.), através da presença de compostos fenólicos, como o ácido gálico (Jardini et al., 2007). Testes feitos em coelhos que ingeriram sucos preparados com suspensão aquosa de romã em pó, apresentaram um aumento no nível de anticorpos e também da inibição na migração leucocitária (Ross et al., 2001). Chaves et al. (2014) analisou oito alimentos/condimentos, entre eles polpa e casca da romã, em relação às suas propriedades antioxidante e antimicrobiana. Os alimentos analisados demonstraram alto potencial antioxidante. Ao avaliar a propriedade antimicrobiana demonstraram que esses alimentos

foram capazes de reduzir o crescimento de bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, mas não observaram redução da viabilidade de bactérias probióticas *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus casei* defensius (Chaves et al., 2014). Assim, compostos presentes na romã podem apresentar atividade antimicrobiana, mas essa atividade não necessariamente é inibitória de culturas probióticas.

Ademais, Kaplan et al. (2009) suplementou camundongos ateroscleróticos durante 2 meses para determinar os efeitos da suplementação com suco de romã. Neste estudo foi fornecido 31 microlitros de suco de romã/dia equivalente à 0,875mmol/polifenóis/dia, mostrando que a bebida foi capaz de reduzir as variáveis pró-aterogênicas avaliadas. Carmo (2014) avaliou melhora do desempenho de ratos Wistar suplementados com extrato de romã e submetidos a teste agudo de natação. Os animais suplementados conseguiram nadar por mais tempo que os animais que não receberam extrato de suco de romã. Conforme a referida pesquisa os compostos bioativos presente no suco da romã participaram como agentes antioxidantes não enzimáticos no combate aos radicais livres gerados no exercício exaustivo, sendo que as doses de 0,875mmol e 1,75mmol de polifenóis/dia apresentaram maior potencial *in vivo*, em comparação aos controles.

Pelo presente exposto objetiva-se avaliar o efeito da suplementação de ratos Wistar com bebida esportiva elaborada com adição de proteínas do soro do leite, probióticos e suco de romã (*Punica granatum*, L.) sobre a microbiota intestinal, estrutura de vilosidades do trato intestinal e marcadores inflamatórios, quando submetidos a exercício agudo e de alta intensidade. A hipótese deste trabalho foi de que a suplementação poderia melhorar a função barreira intestinal e reverter efeitos inflamatórios induzidos pelo exercício físico extenuante.

2 ARTIGO

Este artigo está escrito no formato de artigo original de acordo com as normas e exigências da revista: **The British Journal of Nutrition**

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de ratos Wistar com bebida esportiva desenvolvida com adição de proteico do soro do leite (~80% proteínas), probiótico (*B. animalissubsp. lactis* BB12,) e suco de romã (*Punica granatum*, L.) sobre a microbiota intestinal, estrutura de vilosidades do trato intestinal e marcadores inflamatórios, quando submetidos a exercício agudo e de alta intensidade. Os ratos (n=24) foram divididos nos grupos controle, suplementado, exercitado e exercitado e suplementado. Os animais suplementados receberam durante seis semanas a bebida esportiva por gavagem e foram submetidos a exercício agudo e intenso em esteira rolante. Nossos resultados demonstraram que o exercício físico agudo e intenso parece comprometer a função barreira intestinal, diminuir o trânsito intestinal e a proporção de espécies do gênero *Lactobacillus*, além de aumentar espécies do gênero *Clostridium*. Enquanto que, a suplementação com a bebida esportiva acelerou o trânsito intestinal, modulou e reestabeleceu a proporção natural de gêneros componentes da microbiota, contribuindo para melhoria da função barreira intestinal. Concluimos que o efeito da bebida esportiva contendo proteínas do soro do leite, probióticos e suco de romã reestabeleceu parâmetros de microbiota intestinal e função barreira protegendo os animais suplementados dos efeitos deletérios do exercício agudo e intenso.

Introdução

As proteínas do soro de leite fornecem de forma abundante aminoácidos utilizados preferencialmente para síntese de glutamina nos músculos: os aminoácidos de cadeia ramificada (26%) e glutamato (6%)(Cruzat *et al.*, 2014). Sendo assim tais aminoácidos podem ser utilizados para preservar as reservas de glutamina muscular, a qual é largamente utilizada

pelas células do sistema imunológico como fonte energética em várias situações clínicas (Newsholme e Parry-Billings, 1990; Newsholme, 2001) e também no exercício físico (Newsholme e Calder, 1997; Rohde *et al.*, 1998). Há evidências que a glutamina desempenhe papel importante na manutenção da função barreira intestinal (Wang *et al.*, 2015), sobre a qual o exercício físico intenso e prolongado atua como regulador negativo, reduzindo a capacidade de absorção intestinal (Clark e Mach, 2016).

O exercício físico altera funções de células do sistema imune conforme a sua intensidade (Nieman e Pedersen, 1999). Desta maneira, o exercício intenso pode aumentar a incidência de infecções do trato gastrointestinal e trato respiratório superior devido a alterações no sistema imune (Nieman, 2008). Essas alterações fisiológicas estão relacionadas à modificação de proteínas estruturais chamadas *tight junctions*, que sofrem remodelamentos devido às constantes mudanças no fluxo sanguíneo no ambiente intestinal (Van Wijck *et al.*, 2011). Trabalhando em conjunto, células epiteliais, tecido linfóide associado ao intestino e bactérias luminais podem evitar invasões por agentes patogênicos, desempenhando importante papel na função barreira (Lamprecht e Frauwallner, 2012). Muitas proteínas transmembrana foram identificadas dentro das *tight junctions* com o objetivo de regular células do sistema imune, permeabilidade paracelular de água e solutos (Fanning *et al.*, 1999; Garcia-Hernandez *et al.*, 2017). Duas destas proteínas são extensamente estudadas em modelos animais, a zônula de oclusão 1 (ZO-1), proteína de adesão celular responsável por transdução de sinal em junções célula-célula; e claudina-1, pertencente à classe das claudinas, que são proteínas integrais de membrana constituindo uma barreira tanto paracelular quanto de poros e desempenhando um importante papel na determinação das propriedades da permeabilidade das células epiteliais (Fanning *et al.*, 1999; Gunzel e Yu, 2013).

O uso de probióticos como suplemento para atletas pode auxiliar na redução de

frequência, gravidade e/ou duração de problemas gastrointestinais, bem como de doenças respiratórias, e isso deve, provavelmente pela interação direta destas culturas com a microbiota intestinal e com o sistema imune (Pyne *et al.*, 2015).

A prática de exercícios físicos intensos ou extenuantes pode ocasionar um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e os sistemas antioxidantes endógenos, gerando um aumento das espécies reativas de oxigênio em relação aos antioxidantes (Fuster-Munoz *et al.*, 2016). Paralelamente, alguns estudos têm comprovado a ação antioxidante e anti-inflamatória da fruta romã (*Punica granatum*, L.), resultante da presença de compostos fenólicos, principalmente o ácido gálico (Gracious Ross *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2017; Varghese *et al.*, 2017).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação com bebida esportiva elaborada com concentrado proteico do soro de leite, probiótico e suco de romã (*Punica granatum*, L.) sobre a microbiota intestinal, estrutura de vilosidades do trato intestinal e marcadores inflamatórios de ratos Wistar submetidos a exercício agudo e de alta intensidade. A hipótese deste trabalho foi de que a suplementação desta bebida com combinação de agentes funcionais poderia melhorar a função barreira intestinal e reverter efeitos inflamatórios induzidos pelo exercício físico extenuante.

Materiais e Métodos

Declaração ética

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo 4150-1) e segue os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Grupos experimentais

Foram utilizados vinte e quatro ratos Wistar machos SPF provenientes do Biotério Central da Unicamp, com dez semanas de idade e com massa corporal de aproximadamente 350 gramas no início do experimento, os quais foram alocados no biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp – Limeira (FCA – UNICAMP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas, contendo 4 ratos/gaiola, em ambiente mantido a 25°C, com ciclos escuro - claro fixos (12/12 horas), recebendo água potável e *ad libitum* dieta padrão da marca Nuvilab.

Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo controle (Ctrl) – sem suplementação e sem exercício; grupo suplementado (Supp) – suplementado com a bebida esportiva e não exercitado; grupo exercitado (Exe) – sem suplementação e exercitado em esteira rolante; e grupo suplementado e exercitado (Exe+Supp) – suplementado com a bebida esportiva e exercitado em esteira rolante.

Os animais foram pesados semanalmente em balança semi-analítica estabilizada (Marte Científica, modelo UX620H) para avaliar o peso corporal durante o período experimental.

Doze horas após a sessão de exercício agudo, os ratos foram anestesiados através da administração intraperitoneal de uma mistura de hidrocloreto de quetamina e diazepam (70:30) (50 mg/kg, intraperitoneal) e eutanasiados. O cólon e as fezes foram cuidadosamente retirados, e imediatamente congelados em freezer -80°C, sendo partes do cólon distal congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido para análise histológica e de imunofluorescência. Amostras de sangue foram coletadas.

Suplementação com a bebida esportiva

A bebida fornecida aos animais era composta dos seguintes ingredientes: leite desnatado em pó (Molico ®), concentrado protéico do soro de leite (Alibra®, contendo cerca de 80% de proteína), maltodextrina (SweetMix ®), frutose (Lowçucar®), suco de romã variedade Wonderful (obtido diretamente da fruta com emprego de despulpador de frutas industrial, marca Tomasi®), sorbato de potássio (SweetMix ®), culturas stater *Streptococcus thermophilus* (TA 072) e probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, cedidas respectivamente pelas empresas Danisco e Chr-Hansen.

Para suplementação foi obtido semanalmente o peso médio dos animais e a partir daí calculado a quantidade de oferta de concentrado proteico de soro de leite, considerando-se dose equivalente a 20g dia de proteína deste ingrediente de acordo com Witard et al (Witard et al., 2014). Desta forma o concentrado proteico do soro de leite era adicionado à bebida previamente preparada e homogeneizado para administração aos animais, os quais receberam 2mL da bebida esportiva, cinco vezes por semana, contendo 8,9 log UFC de *B. animalis* BB12, concentrado proteico de soro de leite adicionado na quantidade semanalmente calculada e suco de romã na concentração de 2,625 mmol de polifenóis.

Determinação de proteínas

Para a determinação quantitativa do teor de proteínas do concentrado proteico do soro de leite foi utilizado o método Micro-Kjeldahl, empregando-se fator de conversão de 6,38 (Drochioiu et al., 2016).

Viabilidade da cultura probiótica na bebida esportiva

A viabilidade do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB12) foi

avaliado na bebida esportiva nos tempos 0, 14 dias e 28 dias empregando-se meio TOS-MUP com incubação em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) à 37°C por 72h.

Análise do teor de fenólicos e atividade antioxidante do suco de romã e do sangue (soro)

A determinação de fenólicos totais do suco de romã foi feita por método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Musci e Yao (Musci e Yao, 2017). Foram obtidos os extratos das amostras e depositados em cada poço da microplaca 20 microlitros da amostra, padrão ou água (branco); 100 microlitros da solução Folin-Ciocalteu e após 5 minutos, 75 microlitros de carbonato de sódio. Em seguida, a placa foi agitada e incubada a temperatura ambiente durante 40 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 740nm.

Para avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) foram obtidos os extratos das amostras e depositados em cada poço da microplaca 20 microlitros da amostra, padrão ou água (branco); 30 microlitros de água destilada e 200 microlitros do reagente FRAP (preparado no momento da análise) segundo metodologia de Benzie e Strain (Benzie e Strain, 1996) com algumas modificações. Em seguida, a placa foi agitada e incubada a 37°C durante 8 minutos, com leitura posterior em espectrofotômetro a 595nm. A atividade antioxidante foi expressa em equivalente de sulfato ferroso por meio da equação da reta obtida no gráfico da curva de calibração. Para essa equação, foi realizada plotagem da concentração no eixo y e a absorbância no eixo x.

A atividade antioxidante no soro dos ratos foi avaliada pelo FRAP, no qual o sangue dos animais foram coletados e centrifugados a 2000 x g por 10 minutos e utilizado o sobrenadante para a análise.

Protocolo de exercício agudo

Os animais foram adaptados em esteira rolante com estímulo de choque elétrico (AVS, São Paulo, Brasil) por 1 semana durante 10 minutos/dia a 6 m/s. Após a adaptação foram realizados três testes progressivo até a exaustão com corrida na esteira rolante sendo iniciado na velocidade de 6m/min, com incrementos de 3 m/min a cada três minutos até a exaustão do animal. O tempo de um teste para o outro foi de 48h de descanso. A partir do desempenho dos animais nos três testes, foram selecionados 12 animais para serem divididos aleatoriamente nos grupos exercitados. Os animais que tiveram baixo rendimento ou que se recusaram a correr foram alocados nos grupos sem exercício físico.

Após essa seleção os animais foram submetidos a seis semanas de tratamento, que consistiu na suplementação com a bebida esportiva ou água potável (controle). Na quarta semana os animais selecionados para realizar o exercício físico foram novamente adaptados por uma semana na esteira. Na quinta semana foram realizados dois testes progressivos até a exaustão com o tempo de 48h de descanso entre os testes.

Após o último período de familiarização em esteira e os testes progressivos até a exaustão descritos acima, os animais dos grupos exercitados foram submetidos à sessão aguda de exercício aeróbio de forma contínua em intensidade correspondente a 85% da velocidade máxima atingida no teste de exercício físico progressivo até a exaustão. Doze horas após o exercício agudo eles foram eutanasiados. Os grupos sedentários apenas ficaram na esteira desligada por 15 minutos, para mimetizar o possível estresse causado aos animais por serem colocados em num ambiente estranho à gaiola. Estes animais também foram eutanasiados doze horas após esta etapa.

Extração de RNA e PCR em tempo real

1µg de RNA extraído foi utilizado na típica reação de transcrição reversa, contendo OligodT (500ug/ml), 10nM de dNTP Mix, 5x FirstStrand Buffer, 0,1M de DTT e 200U de transcriptase reversa (MMLV Reverse Transcriptase - Promega Corporation). A transcrição reversa foi efetuada a 70°C por 10 minutos. Adicionada à enzima, continuou-se o ciclo a 42°C por 60 minutos e 95°C por 10 minutos. A expressão gênica foi analisada através da quantificação da fluorescência com QuantStudio Real-Time System (Thermo Fisher Scientific). A reação foi feita com cDNA (DNA complementar), diluído em mix contendo Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), água MiliQ e respectivos iniciadores senso e anti-senso. As condições de ciclagem utilizadas foram 60°C por 1 min, 50°C por 2min e 95°C por 10min e a amplificação ocorreu em 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s e anelamento e extensão a 60°C por 60s. Foi realizada a análise da expressão gênica através da fórmula: 2-DDCt, descrito por K. Livak no Manual do Usuário do Biosystem Sequence Detector Bulletin 2, onde DDCt = [Ct amostra – Ct controle interno da mesma amostra] – [Ct controle – Ct do controle interno com a mesma amostra controle]. A fórmula é baseada na suposição que a taxa com que o Ct muda versus a taxa que a cópia alvo muda, seja idêntica para o gene de interesse e o controle interno beta actina.

Todos os *primers* foram sintetizados pela empresa Sigma Life Science. Segue abaixo a lista de *primers* empregada:

Beta actina: Forward 5'-3'GTCTCACCCTGGCATTGTG, Reverse 5'-3'TCTCAGCTGTGGTGGT

Claudina 1: Forward 5'-3' CTGGGAGGTGCCCTACTTT, Reverse 5'-3' CCGCTGTCACACGTA GTCTT

ZO-1:Forward5'-3' GAGGCTTCAGAACGAGGCTATTT, Reverse 5'-3'

CATGTCGGAGAGTAGAGGTTCGA

IL1B: Forward 5'-3' CACCTCTCAAGCAGAGCACAG, Reverse 5'-3'
GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC

IL6: Forward 5'- TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC, Reverse 5'-3'
TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC

TNFa: Forward 5'- AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC, Reverse 5'-3'
TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC

Histologia

A estrutura intestinal dos animais foi analisada por histologia. Os cólons distais congelados em isopentano, resfriados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C foram cortados em cortes de 10 micrômetros (espessura) em criostato (Marca Leica, modelo CM1860). Os cortes histológicos não fixados foram coloridos com uma solução de hematoxilina e eosina (os dois na concentração 1% massa/volume) para revelar a morfologia geral. As imagens utilizadas para estas análises foram feitas em microscópio da marca Leica, através do software LAS X.

A partir das imagens obtidas na histologia, foi avaliado a distância entre as vilosidades intestinais pelo software ImageJ. Ao todo foram analisadas 4 imagens de cada animal, sendo n=3 por grupo.

Imunofluorescência

Secções transversais do cólon distal para imunomarcação foram fixadas em acetona gelada (-20°C) em 0,2 M de tampão fosfato (PB) por 10 min, lavando com tampão fosfato salino (PBS) 3 vezes por 3 minutos cada um e em seguida bloqueado com 0,1 glicina/0,2%

Triton X-100 em tampão PBS por 1 hora. Posteriormente as lâminas foram incubadas com uma solução contendo o anticorpo primário, 3% de soro normal de cabra e 0,3% Triton X-100/0.1 M (três vezes de 10 minutos cada) e montado com Vectashield, meio de montagem para fluorescência com 40, 6-diamididino-2-phenylindole (DAPI) cat (#H-1200, Vector Labs) e lamínulas. Os anticorpos primários utilizados para a imunolocalização foram Claudin-1 (código: 374900, Life Technologies do Brasil) e ZO-1/TJP1 (código: 402200, Life Technologies do Brasil). Os anticorpos secundários utilizados para a imunofluorescência foram: donkey Cy3 anti-mouse (1:500; cat 715-165-150 Jackson Lab) e donkey Cy3 anti-rabbit (1:500; cat # 711-165-152 Jackson Lab). As imagens foram feitas em microscópio da marca Leica, através do software LAS X.

Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A migração de neutrófilos para o intestino dos ratos foi avaliada pelo teste cinético-colorimétrico da mieloperoxidase (MPO). Aproximadamente 0,3g de cólon distal foram pesados. As amostras foram homogeneizadas em tampão tendo um pH de 4,7 (0.1 M NaCl, 0.02 M NaPO₄, 1.015 M NaEDTA) e centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. O sedimento foi submetido à lise hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl a 0,2% seguida por adição de um volume igual de solução contendo NaCl 1,6% e glucose 5%). Após centrifugação, o sedimento foi ressuspense em tampão 0.05 M NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Depois disso, o sedimento foi congelado instantaneamente em nitrogênio líquido por três vezes, foi centrifugado a 11963 x g durante 15 minutos e novamente homogeneizado. A atividade de mieloperoxidase no sedimento ressuspense foi analisada medindo a alteração na densidade óptica a 450nm utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). Os resultados foram calculados

comparando a densidade óptica do sobrenadante com uma curva padrão de números de neutrófilos (> 95% de pureza).

Análise de microbiota por sequenciamento de última geração

A análise da microbiota intestinal foi conduzida por sequenciamento de última geração, conduzida pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies, na qual a partir de 1 ng de DNA, foi realizada a amplificação com os *primers* específicos da região V3-V4 do rRNA 16S, 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), na concentração de 0.2uM. O preparo das bibliotecas de sequenciamento ocorreu de acordo com tecnologia da empresa e o sequenciamento realizado pela plataforma MiSeq (Illumina), conforme Christoff et al (2017).

Análise Estatística

Todos os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Os dados foram avaliados por análise de variância (two-way ANOVA), sendo utilizadas medidas repetidas quando o tempo aparecia como fator. Os testes foram seguidos por teste de significância post hoc (Bonferroni), sendo que o alfa escolhido para rejeitar a hipótese nula é de $p = 0,05$, através do software GraphPad Prism 5.

Resultados

Bebida esportiva

Previamente à elaboração da bebida esportiva foi avaliado o teor de fenólicos presentes no suco de romã extraído diretamente da fruta *in natura* e o teor de proteínas do

concentrado proteico do soro de leite. O suco obtido da fruta continha 4,64mM de polifenóis e a partir deste valor foi calculado seu percentual para adição na bebida visando alcançar a quantidade de 2,625 mmol de polifenóis. O teor de proteínas do concentrado proteico de soro de leite foi de $77.3 \pm 0.14\%$ e a partir desta informação calculou-se seu percentual de adição para se alcançar a dose equivalente a 20g/dia de proteína do soro de leite, calculado por peso semanal dos animais. Foi avaliada a viabilidade da cultura probiótica na bebida esportiva obtendo-se contagens acima de 8,5 log UFC/mL durante todo o tempo de validade do produto.

Desempenho dos animais

A Figura 1A mostra o teste progressivo até a exaustão antes dos animais receberem tratamento, demonstrando que o grupo exercitado e o grupo exercitado e suplementado eram equivalentes. A Figura 1B apresenta o mesmo teste após o tratamento, demonstrando que não houve diferença significativa entre os grupos. A Figura 1C demonstra o exercício agudo, a 85% da capacidade máxima dos animais obtida no teste progressivo até a exaustão (mostrado na Figura 1B), o tratamento com a bebida esportiva não aumentou ou diminuiu o desempenho dos animais exercitados e suplementados em comparação aos animais somente exercitados.

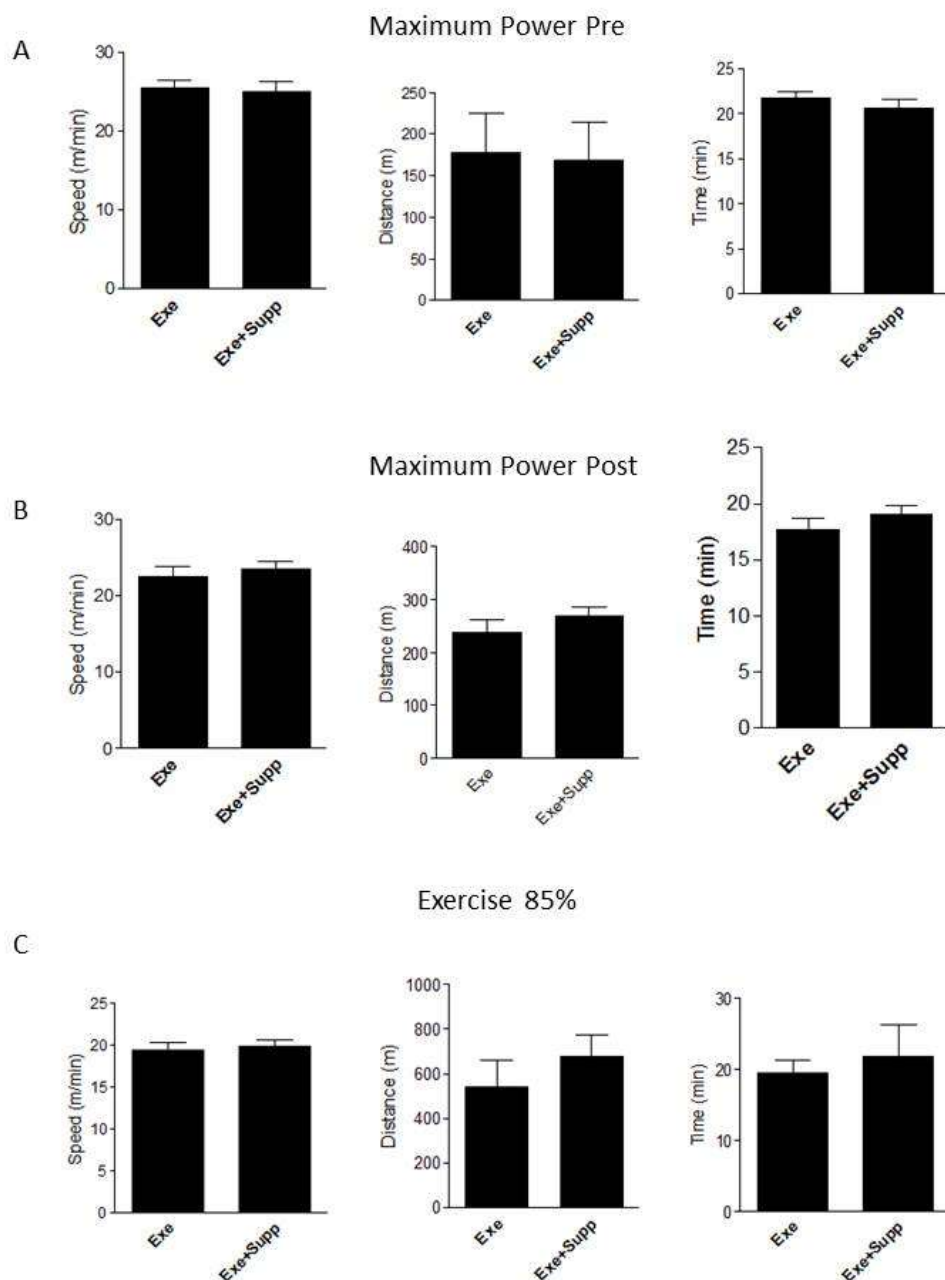
Figure 1

FIGURA 1. Desempenho dos animais em corrida em esteira rolante. (A) Teste progressivo até a exaustão (teste máximo) pré-tratamento, velocidade em m/min, distância em m e tempos em min. (B) Teste progressivo até a exaustão pós-tratamento, velocidade em m/min, distância em m e tempos em min. (C) Exercício agudo a 85% do teste máximo, velocidade em m/min, distância em m e tempos em min. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Resultados

representados em média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Avaliação corporal e conteúdo intestinal

A suplementação com bebida esportiva não resultou em ganho de peso superior, comparativamente aos animais controles (Figura 2A e 2B). Destaca-se, porém, que os animais apenas suplementados apresentaram menor conteúdo fecal no cólon quando comparado aos outros grupos, sem diferenças estatísticas (Figura 2C).

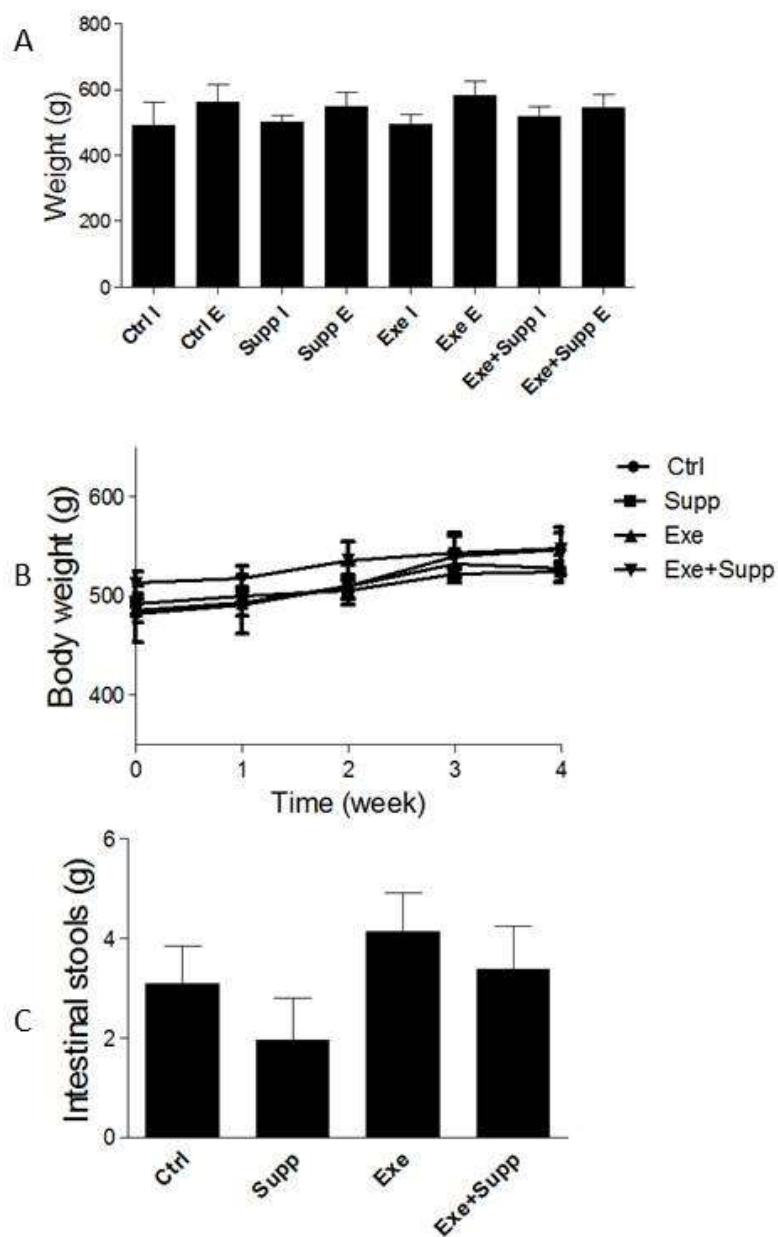
Figure 2

FIGURA 2. Avaliação corporal. (A) Peso inicial *versus* peso final. (B) Curva de peso corporal. (C) Peso das fezes do cólon. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Resultados representados em média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Histologia e distância entre as vilosidades intestinais

A Figura 3A apresenta histologia do cólon distal, demonstrando que o grupo suplementado apresentou as vilosidades intestinais muito semelhantes com a do grupo controle, enquanto que o grupo exercitado apresentou maior espaçamento entre as vilosidades, e o grupo suplementado e exercitado demonstrou reestabelecer o espaçamento original. Ao avaliar a distância entre as vilosidades intestinais pelo software ImageJ (Figura 3B), encontramos que o grupo exercitado apresentou significativamente maior espaçamento entre as vilosidades comparado ao grupo controle e ao grupo suplementado, indicando que o exercício agudo e intenso pode causar alterações estruturais nesta mucosa (a = $p < 0.05$ vs. Ctrl, b = $p < 0.05$ vs. Supp). Por outro lado, o tratamento com a bebida esportiva reestabeleceu o distanciamento original entre as vilosidades, denotando-se um efeito protetor dessa suplementação em exercício agudo de alta intensidade (c = $p < 0.05$ vs. Exe).

Figure 3

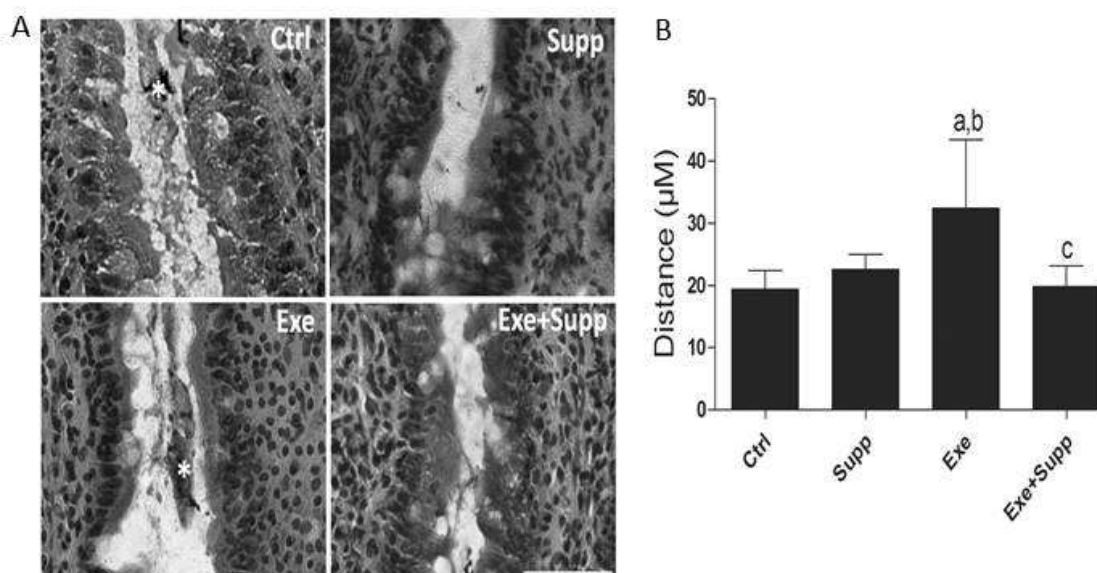


FIGURA 3. Histologia e distância entre as vilosidades intestinais. (A) Histologia do cólon

intestinal, barra: 50 μ m. (B) Distância entre as vilosidades do cólon intestinal. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Resultados representados em média $\pm$ desvio padrão. a = $p < 0.05$ vs. Ctrl, b = $p < 0.05$ vs. Supp e c = $p < 0.05$ vs. Exe.

Imunofluorescência e expressão de proteínas de função barreira

A Figura 4A apresenta a marcação da proteína Claudina 1, no qual o grupo suplementado e o grupo exercitado e suplementado demonstram marcação muito semelhante ao grupo controle, enquanto que o grupo apenas exercitado apresentou menor marcação. Ao analisar a expressão de mRNA da mesma proteína (Figura 4B), encontrou-se que a suplementação com a bebida esportiva aumentou significativamente a expressão de Claudina 1 (a = $p < 0.05$ vs. Ctrl), o exercício agudo e intenso não modificou a expressão desta proteína em comparação ao grupo controle. Porém, o grupo exercitado e suplementado apresentou um aumento da expressão de Claudina 1 (a = $p < 0.05$ vs. Ctrl, b = $p < 0.05$ vs. Supp e c = $p < 0.05$ vs. Exe), demonstrando que a suplementação aumentou a expressão desta proteína, mesmo em exercício agudo e intenso, corroborando os resultados expostos na Figura 4A. Resultados semelhantes foram observados para a proteína ZO-1, conforme Figura 4C e D.

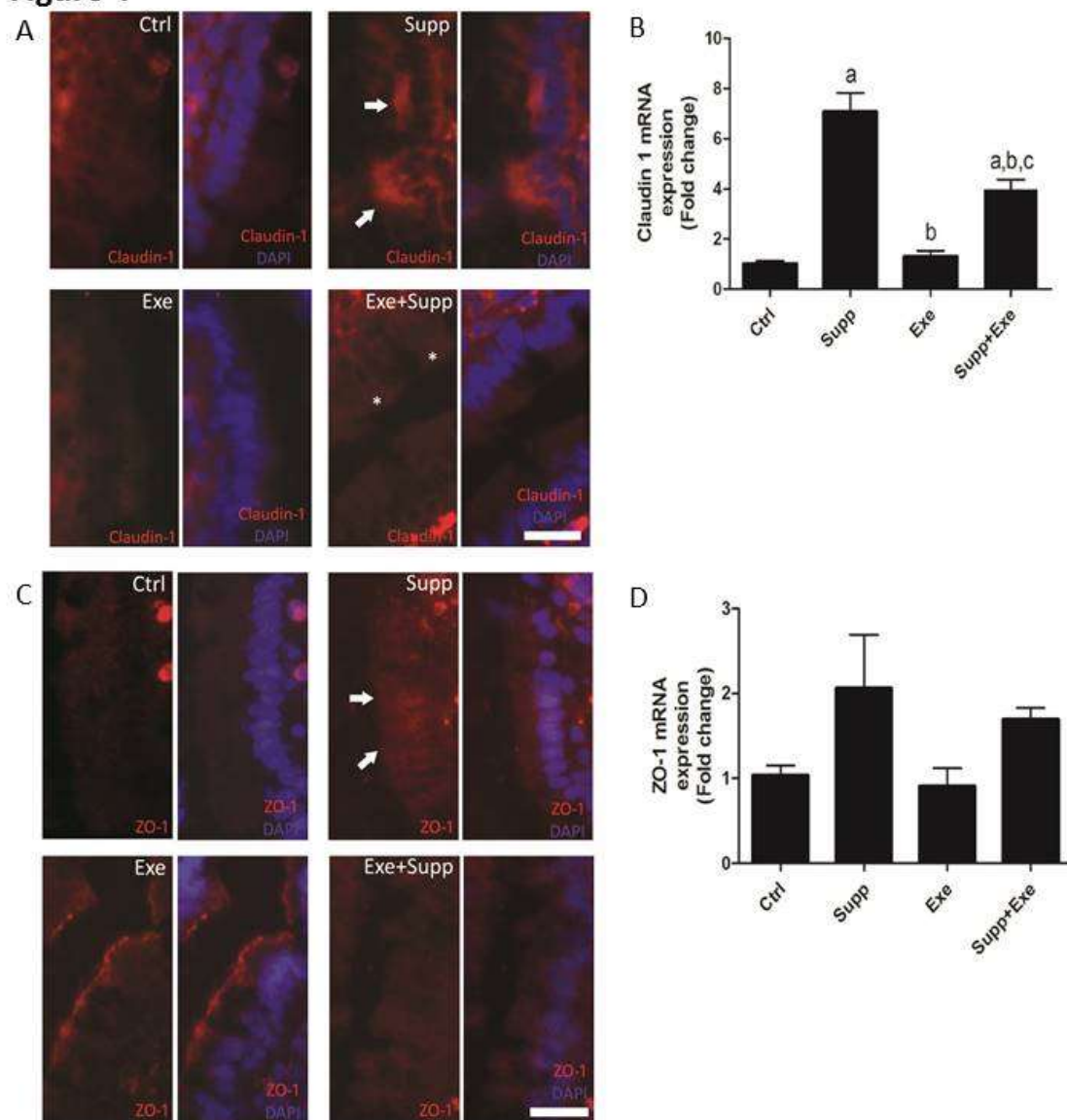
Figure 4

FIGURA 4. Imunofluorescência e expressão de proteínas de função barreira. (A) Imunofluorescência de Claudina 1, barra: 50 μ m. (B) Expressão de Claudina 1. (C) Imunofluorescência de ZO-1, barra: 50 μ m. (D) Expressão de ZO-1. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Resultados representados em média $\pm$ desvio padrão. a = $p < 0.05$ vs. Ctrl, b = $p < 0.05$ vs. Supp e c = $p < 0.05$ vs. Exe.

Expressão de citocinas pró-inflamatórias

Na expressão da citocina IL-1 β (Figura 5A) o exercício e a suplementação com a bebida esportiva pode ter um efeito protetor, diminuindo a expressão desta citocina inflamatória, porém, não observamos diferenças significativas entre os grupos. Ao analisar a citocina IL-6 (Figura 5B), a suplementação com a bebida parece diminuir a expressão desta citocina e o exercício agudo e intenso parece aumentar, no entanto, somente no grupo exercitado e suplementado observaram-se diferenças significativas em comparação aos grupos somente suplementado e somente exercitado ($b = p < 0.05$ vs. Supp e $c = p < 0.05$ vs. Exe). Em relação à citocina TNF- α , observou-se que a suplementação parece diminuir a expressão desta citocina, no entanto, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Figure 5

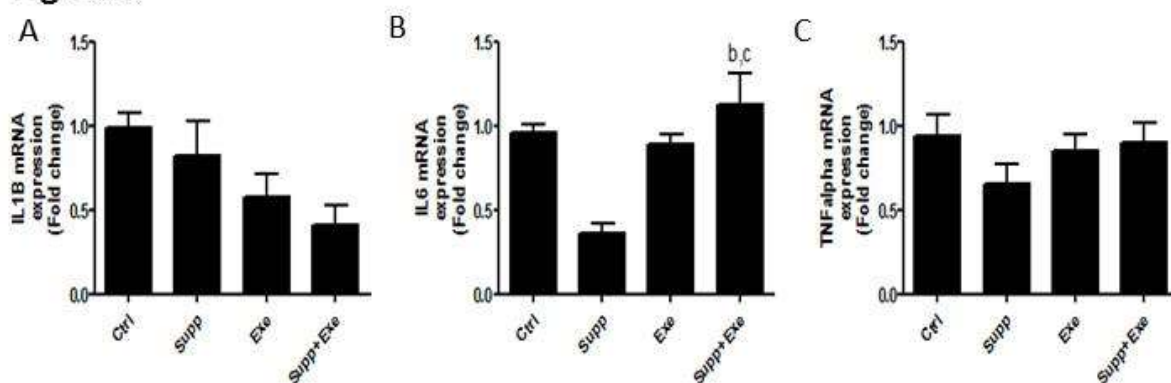


FIGURA 5. Expressão de citocinas pró-inflamatórias. (A) Expressão de IL1B. (B) Expressão de IL6. (C) Expressão de TNF alpha. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Resultados representados em média $\pm$ desvio padrão. $b = p < 0.05$ vs. Supp e $c = p < 0.05$ vs. Exe.

Análise antioxidante no sangue (soro) e atividade da mieloperoxidase (MPO)

A Figura 6A demonstra a análise antioxidante no soro pelo método FRAP. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Ao analisar a atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon distal para determinar a inflamação local (Figura 6B), foi observado que a suplementação com a bebida parece diminuir a infiltração de neutrófilos, porém não houve diferença estatística entre os grupos.

Figure 6

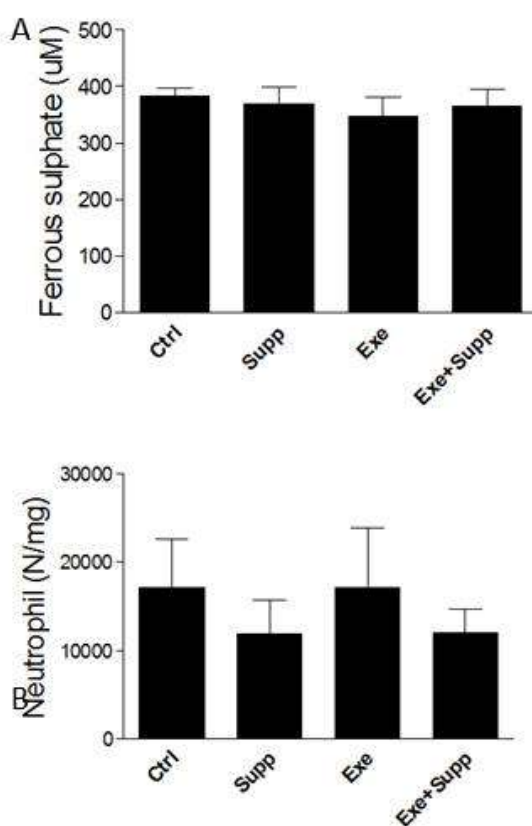


FIGURA 6. Análise antioxidante no soro e atividade da mieloperoxidase. (A) Análise antioxidante no soro por FRAP. (B) Análise da atividade da mieloperoxidase. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Resultados representados em média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Análise de microbiota por gênero e ordem

A Figura 7 apresenta os resultados do sequenciamento de última geração da microbiota dos ratos Wistar. Observou-se que o gênero *Lactobacillus* é um dos principais componentes da microbiota destes animais. O exercício agudo e intenso resultou em diminuição deste gênero. A suplementação com a bebida esportiva, por outro lado, modulou a microbiota no sentido de recuperar as proporções originais das ordens e gêneros, observados nos animais controles. Não foi encontrado na literatura um relato prévio deste achado. A presença de *Bifidobacterium animalis* não foi observada no grupo controle, enquanto que a suplementação com a bebida esportiva elevou a quantidade de bactérias do gênero *Bifidobacterium* nos grupos suplementado e exercitado e suplementado. Destaca-se que a bebida esportiva não continha adição de *Lactobacillus*, mas sim do *stater* e de *Bifidobacterium animalis*, que mesmo sendo de um gênero distinto ao modulado pela suplementação, foi capaz de gerar um microambiente favorável para a recuperação das proporções originais do *Lactobacillus* (semelhantes às dos animais não submetidos à prova extenuante). Outro achado interessante foi de que o exercício agudo e intenso aumentou a proporção do gênero *Clostridium* no grupo exercitado. Porém, a suplementação com a bebida esportiva reverteu essa condição, levando a diminuição do gênero *Clostridium* no grupo suplementado em relação ao grupo controle e no grupo exercitado e suplementado em relação ao grupo somente exercitado. Ainda assim devido à grande variabilidade entre os animais não observou-se diferença estatística.

Os mesmos padrões foram apresentados na análise por ordem (Figura 8).

Figure 7

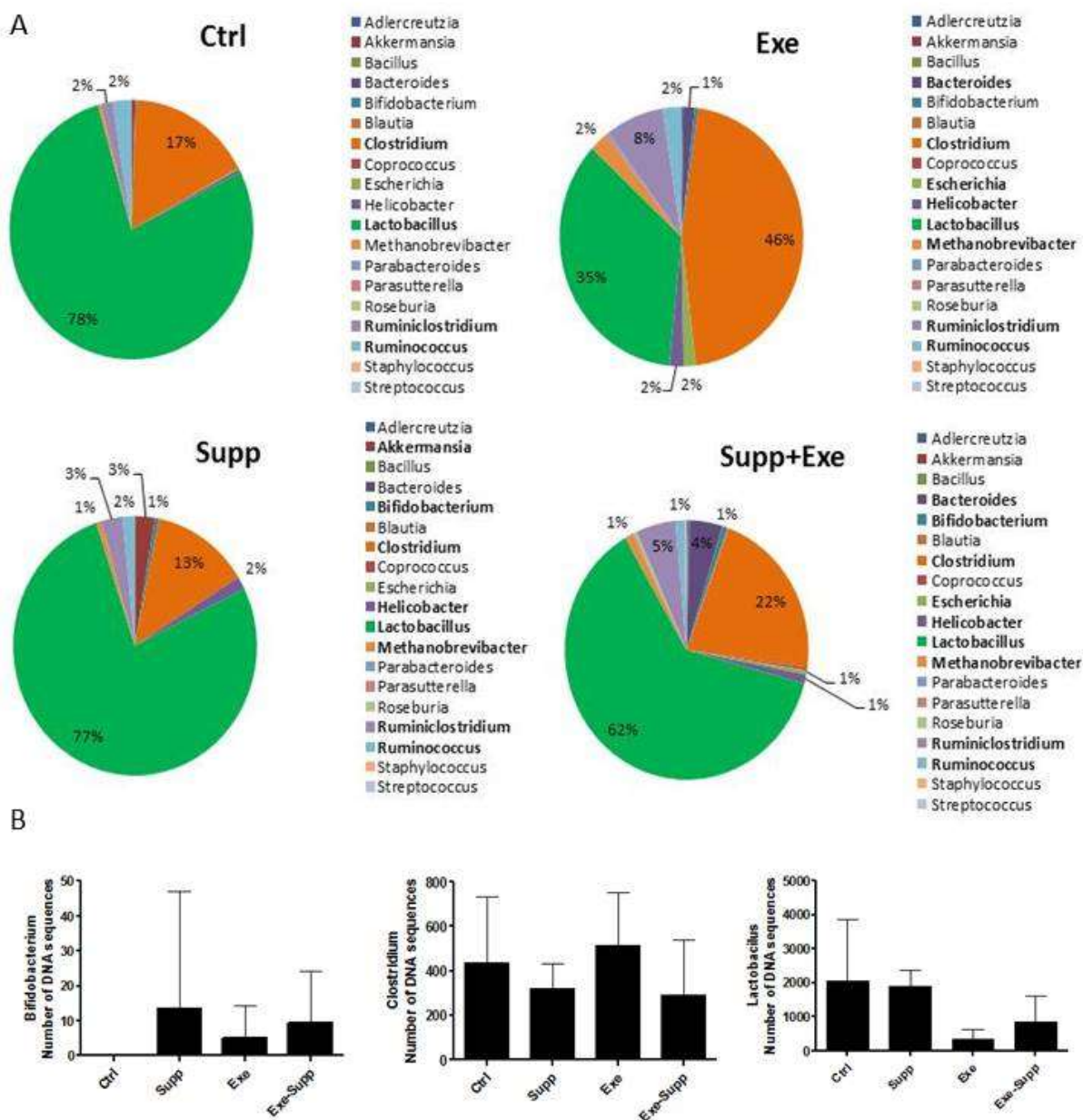


FIGURA 7. Análise de microbiota por gênero. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Resultados representados em média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figure 8

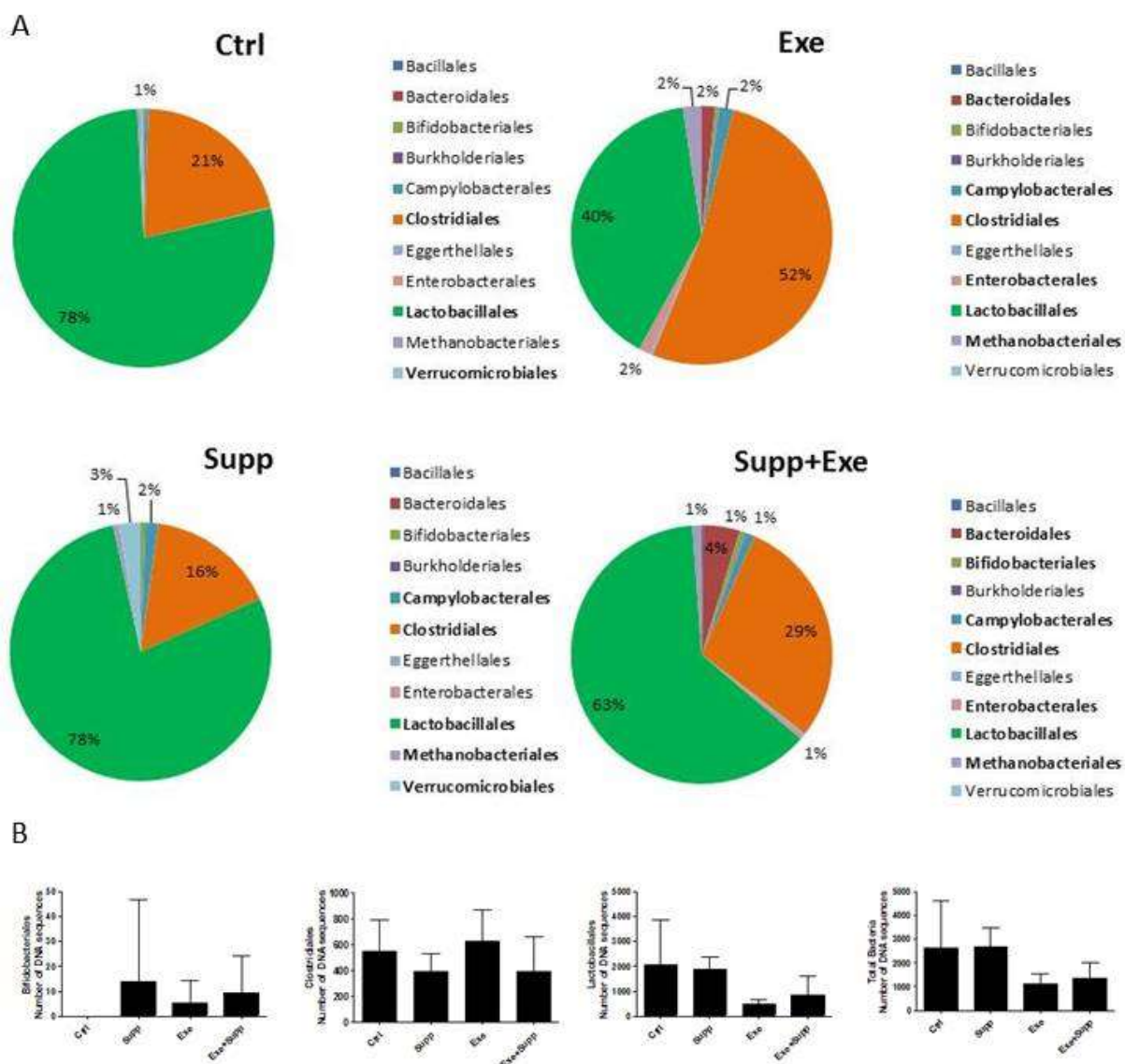


FIGURA 8. Análise de microbiota por ordem. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Resultados representados em média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Discussão

Nossos resultados demonstram que a suplementação com a bebida esportiva não alterou parâmetros de desempenho nos animais. Lollo et al (Lollo *et al.*, 2012) mostraram que a suplementação de queijo contendo probióticos em ratos Wistar submetidos a exercício agudo e intenso impede a imunossupressão causada pelo exercício extenuante, mas não altera diretamente parâmetros de desempenho físico. Outros estudos com praticantes de atividade física intensa ou atletas de endurance mostraram que a suplementação com probióticos também não alterou desempenho (Cox *et al.*, 2010; West *et al.*, 2011; Gleeson *et al.*, 2012; Valimaki *et al.*, 2012; West *et al.*, 2014). Na literatura foi encontrado um único estudo em humanos capaz de demonstrar efeito ergogênico através da suplementação com probióticos, obtendo-se aumento significativo no tempo de corrida (Shing *et al.*, 2014). Estudos com a suplementação de extrato ou suco de romã em humanos submetidos a exercício aeróbico de alta intensidade mostraram diminuição do estresse oxidativo provocado pelo exercício, mas não encontraram efeitos de melhora no desempenho físico (Fuster-Munoz *et al.*, 2016; Crum *et al.*, 2017).

Os animais suplementados com a bebida esportiva apresentaram menor conteúdo fecal no cólon comparado aos demais grupos. Corroborando nossos resultados, estudos anteriores demonstraram que o consumo de probióticos diminuem o tempo de trânsito intestinal, através do aumento do volume e peso das fezes, produção de gases, redução do pH intestinal, aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia curta, metabolização bacteriana de ácidos biliares e estímulo à produção de colecistocinina (Rolfe, 2000). Ademais, outras pesquisas também demonstraram que o exercício físico diminui o tempo de trânsito intestinal de forma positiva ou negativa, como o caso do exercício intenso que provoca a redução do

fluxo sanguíneo intestinal gerando desconfortos gastrointestinais (Gil *et al.*, 2000; Simren, 2002; Van Nieuwenhoven *et al.*, 2004). No entanto, neste estudo o grupo apenas exercitado apresentou resultados muito parecidos com o grupo controle. Van Nieuwenhoven, Brouns e Brummer (Van Nieuwenhoven *et al.*, 2004) avaliaram corredores e ciclistas profissionais em relação ao hábito intestinal, demonstrando também, atraso no trânsito intestinal provocado pelo exercício intenso.

O intestino é um órgão que além da função de digestão e absorção, possui uma barreira protetora contra agentes patogênicos (Lu *et al.*, 2013). Ao avaliar as vilosidades intestinais por histologia, observou-se que o consumo da bebida esportiva pode favorecer a manutenção da estrutura fisiológica do intestino. Enquanto que o exercício agudo e intenso pode alterar negativamente a integridade intestinal. Proteínas *tight junctions* são junções intercelulares que fornecem uma forma de adesão célula-célula em enterócitos, desempenhando um papel crítico na regulação da permeabilidade da barreira paracelular (Fanning *et al.*, 1999; Gunzel e Yu, 2013; Lu *et al.*, 2013; Garcia-Hernandez *et al.*, 2017). Dessa forma, alterações nessas proteínas levam a patologias associadas à ruptura da estrutura intestinal e má absorção de nutrientes (Tokes *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2013). Claudinas são os componentes funcionais e estruturais mais importantes das *tight junctions* (Lu *et al.*, 2013).

Como esperado, o exercício físico intenso pode alterar também negativamente a função barreira intestinal, como demonstrado por Wijck et al (Van Wijck *et al.*, 2011) e probióticos podem favorecer e restabelecer a barreira. O presente trabalho demonstrou que a suplementação com a bebida esportiva aumentou expressão de proteínas *tight junctions*. Assim, probióticos podem alterar a expressão de proteínas *tight junctions* e melhorar a função barreira *in vitro* e em modelos animais (Macpherson e Harris, 2004; Keita e Soderholm, 2010).

Patel et al. (Patel *et al.*, 2012) administraram antibióticos em camundongos neonatos, demonstrando função barreira e expressão de claudina diminuída. Ao ser fornecido *Lactobacillus rhamnosus* GG foi demonstrada acelerada maturação da barreira intestinal e indução da expressão da proteína claudina. Mostrando que, a administração de probióticos pode acelerar a expressão de proteínas de função barreira intestinal em um intestino imaturo (Patel *et al.*, 2012). Além disso, Lu e colaboradores demonstraram que a privação de glutamina diminui a expressão de Claudina-1 (Lu *et al.*, 2013). No entanto, a bebida esportiva oferecida neste estudo contém proteínas do soro do leite, em especial o aminoácido glutamina, que oferecem uma série de benefícios que fortalecem o sistema imunológico e o intestino em particular e permitem proteção à saúde durante a prática de exercícios físicos (Castell e Newsholme, 1997; Li e Neu, 2009; Cruzat *et al.*, 2014).

Citocinas são moduladas por estímulos fisiológicos, como hormônios, nutrientes, estresse oxidativo e exercício físico, onde as alterações dependem da intensidade, duração e tipo de exercício (Cannon, 2000; Cruzat *et al.*, 2014). No exercício moderado a produção de citocinas pró-inflamatórias é diminuída e citocinas anti-inflamatórias aumentada (Drenth *et al.*, 1995; Nieman e Pedersen, 1999). Enquanto que, no exercício intenso e extenuante os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-6 aumentam acima dos níveis normais. Tendo como exemplo, em um estudo, as concentrações plasmáticas de IL-6 aumentou mais de 100 vezes e as concentrações de IL-1 β e TNF- α aumentaram uma a duas vezes após exercício intenso e prolongado (Ostrowski *et al.*, 1999). Os resultados deste trabalho demonstraram que o exercício agudo e intenso parece aumentar os níveis de IL-6 e TNF- α , enquanto que a suplementação com a bebida esportiva parece diminuir a expressão dessas citocinas. No entanto, na expressão da citocina IL-1 β o exercício e a suplementação com a bebida esportiva pode ter um efeito protetor, diminuindo a expressão desta citocina

inflamatória. Porém, não foram observadas neste trabalho diferenças significativas entre os grupos. Cruzat e colaboradores encontraram que a suplementação de L-glutamina pode atenuar a lesão muscular e inflamação, como, diminuição nos níveis de TNF- α induzida por exercício extenuante (Cruzat *et al.*, 2010).

Ademais, nossos resultados demonstraram que não houve diferença na análise antioxidante no soro dos animais. Porém, ao analisar a atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon distal foi encontrado que a suplementação com a bebida promove uma diminuição, não significativa da infiltração de neutrófilos. Um estudo demonstrou que a disponibilidade de L-glutamina aumenta a atividade e função dos neutrófilos e linfócitos (Pithon-Curi *et al.*, 2002). Além disso, existe uma relação entre infiltração de neutrófilos, danos musculares e geração de espécies reativas de oxigênio no processo inflamatório (Niess e Simon, 2007). O exercício contínuo e moderado reduz espécies reativas de oxigênio através de adaptações dos sistemas antioxidantes endógenos (Cruzat *et al.*, 2014; Fuster-Munoz *et al.*, 2016). A inflamação exacerbada e o estresse oxidativo podem ocasionar diminuição de função muscular (Fuster-Munoz *et al.*, 2016). Os antioxidantes endógenos podem proteger o organismo contra os danos oxidativos provocados pelo exercício físico, no entanto, eles podem não ser suficientes para atletas de elite ou em exercícios intensos (Cruzat *et al.*, 2014). Por isso, muitas estratégias têm sido usadas para melhorar esses danos, como intervenções nutricionais e com antioxidantes (Fuster-Munoz *et al.*, 2016; Crum *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017). Nesse contexto, o suco de romã, é rico em polifenóis, como, flavonóis, antocianinas e elagitaninos (Gil *et al.*, 2000; Fuster-Munoz *et al.*, 2016) e pode ser usado como antioxidante exógeno.

O intestino e a microbiota são órgãos importantes para o desempenho esportivo porque são responsáveis pela entrega nutrientes, água e hormônios durante o exercício (Clark e Mach,

2016). A microbiota intestinal pode neutralizar agentes cancerígenos e ação de drogas, proteger o hospedeiro de agentes patogênicos, estimular o sistema imunológico e modular a mobilidade intestinal (Nicholson *et al.*, 2012; Clark e Mach, 2016). Além disso, alterações em funções epiteliais e na composição da microbiota intestinal podem exercer um papel na inflamação associada à obesidade (De La Serre *et al.*, 2010). O consumo de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* pode resultar em mudanças benéficas na atividade intestinal, como aumento da função barreira (Mackos *et al.*, 2013).

Ao se analisar a microbiota dos animais, observou-se que a espécie *Lactobacillus* foi dos principais componentes da microbiota dos ratos Wistar em estudo. A bebida esportiva ofertada aos animais continha a espécie *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (BB12), e não foi encontrada a mesma espécie como membro autóctone da microbiota dos animais do grupo controle. Mas, a suplementação com a bebida esportiva foi efetiva em introduzir (ao menos durante o período de estudo) o gênero *Bifidobacterium* nos grupos suplementado e exercitado e suplementado. Além do exposto, a suplementação de *B. animalis* favoreceu o equilíbrio dinâmico da microbiota dos animais exercitados favorecendo o aumento da proporção de *Lactobacillus* nos animais exercitados de forma extenuante, proporcionando um efeito protetor, já que, o exercício agudo e intenso apresentou efeito supressor para *Lactobacillus*.

Em uma revisão sistemática, Clark e Mach concluem que probióticos podem estimular o aumento de microrganismos específicos, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e metabólitos benéficos para melhorar a função barreira, imune e metabólica, podendo ser utilizados como uma terapia para atletas (Clark e Mach, 2016).

Ademais, demonstramos que o exercício agudo e intenso aumentou o gênero *Clostridium* no grupo exercitado, sendo este gênero associado à disbiose, doenças inflamatórias intestinais e câncer de cólon (Hsu *et al.*, 2004; De La Serre *et al.*, 2010). A

suplementação com a bebida esportiva por outro lado foi eficiente em suprimir este gênero. Sanders sugere que bifidobactérias podem modular atividades de bactérias do cólon associadas à doença em animais (Sanders, 1993), ou seja, à medida que a população de bifidobactérias aumenta, diminui a população de espécies pertencentes ao gênero *Clostridium* (Hsu *et al.*, 2004; De La Serre *et al.*, 2010).

Em linhas gerais, o exercício físico intenso parece comprometer a função barreira intestinal, diminuir o trânsito intestinal e a proporção de espécies do gênero *Lactobacillus*, além de aumentar espécies do gênero *Clostridium*.

Em conclusão, o presente estudo forneceu o ineditismo de demonstrar que a suplementação com a bebida esportiva em exercício agudo acelerou o trânsito intestinal, e reestabeleceu a microbiota e a função barreira intestinal.

Limitações

Ratos Wistar não são bons corredores, dessa forma, sugerimos a futuros estudos utilizarem outras linhagens, como ratos Sprague-dawley. Para atingir as quantidades propostas de compostos fenólicos do suco de romã, proteína do soro de leite e probióticos tivemos que utilizar 2ml de bebida esportiva por dia, dessa forma, sugerimos a liofilização do suco de romã para diminuir o volume da bebida e ter a possibilidade de utilizar outras espécies de animais, como camundongos, que são melhores corredores.

Apoio: Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto n. 15/07299-7 e bolsa 15/13972-6.

Referências

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, n. 1, p. 70-6, Jul 15 1996. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660627> >.

CANNON, J. G. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. **News Physiol Sci**, v. 15, p. 298-303, Dec 2000. ISSN 0886-1714 (Print)

0886-1714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390930> >.

CASTELL, L. M.; NEWSHOLME, E. A. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition**, v. 13, n. 7-8, p. 738-42, Jul-Aug 1997. ISSN 0899-9007 (Print)

0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9263279> >.

CLARK, A.; MACH, N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 13, p. 43, 2016. ISSN 1550-2783 (Electronic)

1550-2783 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27924137> >.

COX, A. J. et al. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. **Br J Sports Med**, v. 44, n. 4, p. 222-6, Mar 2010. ISSN 1473-0480 (Electronic)

0306-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272539> >.

CRUM, E. M. et al. The effect of acute pomegranate extract supplementation on oxygen uptake in highly-trained cyclists during high-intensity exercise in a high altitude environment. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 14, p. 14, 2017. ISSN 1550-2783 (Electronic)

1550-2783 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28572749> >.

CRUZAT, V. F.; KRAUSE, M.; NEWSHOLME, P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 11, n. 1, p. 61, 2014. ISSN 1550-2783 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530736> >.

CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free

glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. **Cell Biochem Funct**, v. 28, n. 1, p. 24-30, Jan 2010. ISSN 1099-0844 (Electronic)

0263-6484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885855> >.

DE LA SERRE, C. B. et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 299, n. 2, p. G440-8, Aug 2010. ISSN 1522-1547 (Electronic)

0193-1857 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508158> >.

DRENTH, J. P. et al. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. **J Appl Physiol** (1985), v. 79, n. 5, p. 1497-503, Nov 1995. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8594005> >.

DROCHIOIU, G. et al. Ultrasound-based protein determination in maize seeds. **Ultrason Sonochem**, v. 29, p. 93-103, Mar 2016. ISSN 1873-2828 (Electronic)

1350-4177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26584989> >.

FANNING, A. S.; MITIC, L. L.; ANDERSON, J. M. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 6, p. 1337-45, Jun 1999. ISSN 1046-6673 (Print)

1046-6673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361874> >.

FUSTER-MUNOZ, E. et al. Effects of pomegranate juice in circulating parameters, cytokines, and oxidative stress markers in endurance-based athletes: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 32, n. 5, p. 539-45, May 2016. ISSN 1873-1244 (Electronic)

0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778544> >.

GARCIA-HERNANDEZ, V.; QUIROS, M.; NUSRAT, A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, May 10 2017. ISSN 1749-6632 (Electronic)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28493289> >.

GIL, M. I. et al. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 10, p. 4581-9, Oct 2000. ISSN 0021-8561 (Print)

0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11052704> >.

GLEESON, M. et al. Effects of a *Lactobacillus salivarius* probiotic intervention on infection, cold symptom duration and severity, and mucosal immunity in endurance athletes. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 22, n. 4, p. 235-42, Aug 2012. ISSN 1543-2742 (Electronic)

1526-484X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22645171> >.

GRACIOUS ROSS, R.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits--a preliminary study. **J Ethnopharmacol**, v. 78, n. 1, p. 85-7, Nov 2001. ISSN 0378-8741 (Print)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585693> >.

GUNZEL, D.; YU, A. S. Claudins and the modulation of tight junction permeability. **Physiol Rev**, v. 93, n. 2, p. 525-69, Apr 2013. ISSN 1522-1210 (Electronic)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23589827> >.

HSU, C. K. et al. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1523-8, Jun 2004. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173423> >.

KEITA, A. V.; SODERHOLM, J. D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, n. 7, p. 718-33, Jul 2010. ISSN 1365-2982 (Electronic)

1350-1925 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20377785> >.

LAMPRECHT, M.; FRAUWALLNER, A. Exercise, intestinal barrier dysfunction and probiotic supplementation. **Med Sport Sci**, v. 59, p. 47-56, 2012. ISSN 1662-2812 (Electronic)

0076-6070 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075554> >.

LI, N.; NEU, J. Glutamine deprivation alters intestinal tight junctions via a PI3-K/Akt mediated pathway in Caco-2 cells. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 4, p. 710-4, Apr 2009. ISSN 1541-6100 (Electronic)

0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211824> >.

LI, Q. et al. Altered distribution of tight junction proteins after intestinal ischaemia/reperfusion injury in rats. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 9B, p. 4061-76, Sep 2009. ISSN 1582-4934 (Electronic)

1582-1838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929946> >.

LOLLO, P. C. et al. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. **J Dairy Sci**, v. 95, n. 7, p. 3549-58, Jul 2012. ISSN 1525-3198 (Electronic)

0022-0302 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22720913> >.

LU, Z. et al. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 3, p. e24978, Jul 01 2013. ISSN 2168-8362 (Print)

2168-8362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478939> >.

MACKOS, A. R. et al. Probiotic *Lactobacillus reuteri* attenuates the stressor-enhanced severity of *Citrobacter rodentium* infection. **Infect Immun**, v. 81, n. 9, p. 3253-63, Sep 2013. ISSN 1098-5522 (Electronic)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23798531> >.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 6, p. 478-85, Jun 2004. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173836> >.

MUSCI, M.; YAO, S. Optimization and validation of Folin-Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. **Int J Food Sci Nutr**, p. 1-9, Apr 12 2017. ISSN 1465-3478 (Electronic)

0963-7486 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28399674> >.

NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. **Nutrition**, v. 13, n. 7-8, p. 728-730, Jul-Aug 1997. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <Go to ISI>://A1997XQ49600029 >.

NEWSHOLME, E. A.; PARRY-BILLINGS, M. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 14, n. 4 Suppl, p. 63S-67S, Jul-Aug 1990. ISSN 0148-6071 (Print)

0148-6071 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2205733> >.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 9, p. 2515s-2522s, Sep 2001. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <Go to ISI>://000170988500013 >.

NICHOLSON, J. K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1262-7, Jun 08 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674330> >.

NIEMAN, D. C. Immunonutrition support for athletes. **Nutr Rev**, v. 66, n. 6, p. 310-20, Jun 2008. ISSN 0029-6643 (Print)

0029-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522619> >.

NIEMAN, D. C.; PEDERSEN, B. K. Exercise and immune function. Recent developments. **Sports Med**, v. 27, n. 2, p. 73-80, Feb 1999. ISSN 0112-1642 (Print)

0112-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10091272> >.

NIESS, A. M.; SIMON, P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species. **Front Biosci**, v. 12, p. 4826-38, Sep 01 2007. ISSN 1093-9946 (Print)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569613> >.

OSTROWSKI, K. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol**, v. 515 (Pt 1), p. 287-91, Feb 15 1999. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925898> >.

PATEL, R. M. et al. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. **Am J Pathol**, v. 180, n. 2, p. 626-35, Feb 2012. ISSN 1525-2191 (Electronic)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155109> >.

PITHON-CURI, T. C. et al. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. **Cell Biochem Funct**, v. 20, n. 2, p. 81-6, Jun 2002. ISSN 0263-6484 (Print)

0263-6484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11979501> >.

PYNE, D. B. et al. Probiotics supplementation for athletes - clinical and physiological

effects. **Eur J Sport Sci**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2015. ISSN 1536-7290 (Electronic)

1536-7290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339255> >.

ROHDE, T.; MACLEAN, D. A.; PEDERSEN, B. K. Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 6, p. 856-62, Jun 1998. ISSN 0195-9131 (Print)

0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624643> >.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2S Suppl, p. 396S-402S, Feb 2000. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721914> >.

SANDERS, M. E. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures. **J Dairy Sci**, v. 76, n. 7, p. 1819-28, Jul 1993. ISSN 0022-0302 (Print)

0022-0302 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8345120> >.

SHARMA, P.; MCCLEES, S. F.; AFAQ, F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. **Molecules**, v. 22, n. 1, Jan 24 2017. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28125044> >.

SHING, C. M. et al. Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflammation and exercise performance in the heat. **Eur J Appl Physiol**, v. 114, n. 1, p. 93-103, Jan 2014. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24150782> >.

SIMREN, M. Physical activity and the gastrointestinal tract. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 10, p. 1053-6, Oct 2002. ISSN 0954-691X (Print)

0954-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12362093> >.

TOKES, A. M. et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. **Breast Cancer Res**, v. 7, n. 2, p. R296-305, 2005. ISSN 1465-542X (Electronic)

1465-5411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743508> >.

VALIMAKI, I. A. et al. Decreased training volume and increased carbohydrate intake

increases oxidized LDL levels. **Int J Sports Med**, v. 33, n. 4, p. 291-6, Apr 2012. ISSN 1439-3964 (Electronic)

0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22377944> >.

VAN NIEUWENHOVEN, M. A.; BROUNS, F.; BRUMMER, R. J. Gastrointestinal profile of symptomatic athletes at rest and during physical exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 91, n. 4, p. 429-34, Apr 2004. ISSN 1439-6319 (Print)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634826> >.

VAN WIJCK, K. et al. Exercise-induced splanchnic hypoperfusion results in gut dysfunction in healthy men. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22366, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811592> >.

VARGHESE, S. et al. The inhibitory effect of anti- tumor polysaccharide from Punica granatum on metastasis. **Int J Biol Macromol**, May 25 2017. ISSN 1879-0003 (Electronic)

0141-8130 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28552725> >.

WANG, B. et al. Glutamine and intestinal barrier function. **Amino Acids**, v. 47, n. 10, p. 2143-54, Oct 2015. ISSN 1438-2199 (Electronic)

0939-4451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24965526> >.

WEST, N. P. et al. Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals. **Clin Nutr**, v. 33, n. 4, p. 581-7, Aug 2014. ISSN 1532-1983 (Electronic)

0261-5614 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24268677> >.

WEST, N. P. et al. Lactobacillus fermentum (PCC(R)) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: a randomised control trial in athletes. **Nutr J**, v. 10, p. 30, Apr 11 2011. ISSN 1475-2891 (Electronic)

1475-2891 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21477383> >.

WITARD, O. C. et al. Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise. **Am J Clin Nutr**, v. 99, n. 1, p. 86-95, Jan 2014. ISSN 1938-3207 (Electronic)

0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24257722> >.

3 CONCLUSÃO GERAL

A suplementação de ratos Wistar com a bebida esportiva adicionada de concentrado protéico do soro do leite, probiótico e suco de romã (*Punica granatum*, L.) acelerou o trânsito intestinal, reestabeleceu a microbiota e a função barreira intestinal, prejudicadas pelo exercício agudo intenso.

REFERÊNCIAS

- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**. v.239, n.292, p.70-76, 1996.
- BORGES, P. F. Z.; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N.; JACOBUCCI, H. B. Produção de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal Food Technology**. v.4, n.1, p.1-8, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Determinação de Nitrogênio Total em leite e derivados lácteos pelo método de Micro-Kjedahl. MET POA/11/02/01, 2013. Disponível em <www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iaq/met-poa-11-02-proteinas.pdf>. Acesso em: 15/04/2016.
- CARMO, M. C. L. Efeitos da Suplementação com Extrato de Polpa de Romã Sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo Induzidos por Natação Exhaustiva em Ratos. Dissertação. Programa de Mestrado em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo. 2014.
- CASTELL L.M.; NEWSHOLME, E.A. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition**. v.13, p.738-742, 1997.
- CHAVES, F. M., ANTUNES, A. E. C., SILVA, F. G. D., PENA, F. L., BEZERRA, R. M. N. Evaluation of antimicrobial and antioxidante activity of bioactive compounds presente in vegetables and spices consumed in Brazil. In: Oxygen Club of California World Congress 2014, 2014, Davis, California. *Oxygen Club of California World Congress 2014*, 2014.p. 77.
- CLANCY, R. L., GLEESON, M., COX, A., CALLISTER, R., DORRINGTON, M., D'ESTE, D., PANG, G., PYNE, D., FRICKER, P., HENRIKSSON, A. Reversal in fatigued athletes of a defect in interferon g secretion after administration of Lactobacillus acidophilus. **Br J Sports Med**. v. 40, p. 351-354, 2006.
- CÓRDOVA, A.; NAVAS, F. J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo

exercício: papel dos antioxidantes. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 6, n.5, p. 204-8, 2000.

COX, A.J.; PYNE, D.B.; SAUNDERS, P.U. et al. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. **Br. J. Sports. Med.** v.44, n.4, p.222-226, 2010.

CRUM, E. M. et al. The effect of acute pomegranate extract supplementation on oxygen uptake in highly-trained cyclists during high-intensity exercise in a high altitude environment. **J IntSoc Sports Nutr**, v. 14, p. 14, 2017.

CRUZAT, V. F.; KRAUSE, M.; NEWSHOLME, P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. **J IntSoc Sports Nutr**, v. 11, n. 1, p. 61, 2014.

ENGELS, R.C. JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of DNA in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Anal. Biochem.** v.88, p.475-484, 1978.

FANNING, A.S.; MITIC, L.L.; ANDERSON, J.M. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.10, n.6, p.1337-1345, 1999.

FUSTER-MUNOZ, E. et al. Effects of pomegranate juice in circulating parameters, cytokines, and oxidative stress markers in endurance-based athletes: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 32, n. 5, p. 539-45, May 2016.

GIL, M. I. et al. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 10, p. 4581-9, Oct 2000.

GIL, S.M.; YAZAKI, E.; EVANS, D.F. Aetiology of running-related gastrointestinal dysfunction. How far is the finishing line? **Sports Med.** v.26, p.365-378, 1998.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; OLIVEIRA, M.;TAULER, P. Daily probiotic's (*Lactobacillus casei* Shirota) reduction of infection incidence in athletes. **Int J Sports NutrExercMetab.** n.21, p.55-64, 2011.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C; OLIVEIRA, M. et al. Effects of a *Lactobacillus salivarius* probiotic intervention on infection, cold symptom duration and severity, and

mucosal immunity in endurance athletes. **Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.**, v.22, n.4, p.235-242, 2012.

GUNZEL, D.; YU, A.S. Claudins and the modulation of tight junction permeability. **Physiol. Rev.**, v.93, n.2, p.525-569, 2013.

GUO, X.; XIA, X.; TANG, R. et al. Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Letters in Applied Microbiology**. v.47, p.367-373, 2008.

HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B.K. Exercise and the immune system: a model of the immune system: a model of the stress response? **Immunol Today**. v.15, n.8, p.382-387, 1994.

JARDINI, F.A., FILHO, J.M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43, n.1, p.137-147, 2007.

KAPLAN, M.; HAYEK, T. Pomegranate juice supplementation to Atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. **The Journal of Nutrition**. p.2062-2069, 2009.

KEITA, A.V. SÖDERHOLM, J.D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. **Neurogastroenterol Motil**. v.22, n.7, p.718-733, 2010.

KREIDER R.B. Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. **Sports Med**. v.27, n.2, p.97-110, 1999.

KUMAR, C.S.V.S.; REDDY, K.K.; BOOBALAN, G. et al. Immunomodulatory effects of *Bifidobacterium bifidum* 231 on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Research in Veterinary Science**. v.110, p.40-46, 2017.

LAMPRECHT, M.; FRAUWALLNER, A. Exercise, intestinal dysfunction and probiotic supplementation. **Acute Topics in Sports Nutrition**. v. 59, p.47-56, 2012.

LIU, H.Y.; XU, W.T. et al. The effect of genetically modified *Lactobacillus plantarum* 590 on the gut health of sprague-dawley rats. **Life**. v.64, n.7, p.617-627, 2012.

LI, N.; NEU, J. Glutamine deprivation alters intestinal tight junctions via a PI3-K/Akt

mediated pathway in Caco-2 cells. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 4, p. 710-4, Apr 2009.

LU, Z. et al. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 3, p. e24978, Jul 01 2013.

MACPHERSON, A.J; HARRIS, N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat Rev Immunol**. v.4, n.6, p.478-485, 2004.

MULLER, R.C.S.; OLIVEIRA, P.S.; DANTAS, K.G.F. et al. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Meliponafasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apismellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**. v. 35, n. 9, p. 1728-1732, 2012.

NEWSHOLME, E. A., PARRY-BILLINGS, D. P. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. v.14, n. 4, p. 63s-67s. 1990.

NEWSHOLME, P. Why is l-glutamine metabolism important to cells of the immune system IN heath postinjury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**. v.15, p.2515-2522, 2001.

NEWSHOLME, E. A., CALDER, P. C. The proposed role of glutamine in some cells of th immune system and speculative consequences for the whole animal. **Nutrition**. v.13, n.7-8, p.728-730, 1997.

NIEMAN, D.C.; DUMKE, C.L. et al. Muscle damage is linked to cytokine changes following a 160-km race. **Brain Behav Immun**. v.19, n.5, p.398-403, 2005.

NIEMAN, D.C. Immunonutrition support for athletes. **Nutr Rev**. v.66, n.6, p.310-320, 2008.

PEINNEQUIM A.; MOURET, C.; BIROT, O. et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. **BMC Immunology**. v.5, p.1-10, 2004.

PYNE, D.B.; WEST, N.P.; COX, A.J.; CRIPPS, A.W. Probiotics supplementation for athletes- Clinical and physiological effects. **European Journal of Sport Science**, v. 15, p. 1-9, 2014.

ROHDE, T.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. **Medicine and Science in**

Sports and Exercise. v.30, n.6, p.856-862, 1998.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition, Bethesda**, v.130, n.2, p.396-402, 2000.

ROSS, R.G.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. Immunomodulatory activity of Punicagranatum in rabbits – a preliminary study. **J. Ethnopharmacol., Orlando**, v.78, n.1, p.85-87, 2001.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.42, n.1, jan./mar., 2006.

SIMREN, M. Physical activity and the gastrointestinal tract. **Eur. J. GastroenterolHepatol.** v.14, p.1053-1056, 2002.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology.** p.152-178, 1999.

SHARMA, P.; MCCLEES, S. F.; AFAQ, F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. **Molecules**, v. 22, n. 1, Jan 24 2017.

SHING, C.M.; PEAKE, J.M.; LIM, C.L. et al. Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflammation and exercise performance in the heat. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.114, n.1, p.93-103, 2014.

SOUZA, D.O.; PEREIRA, M.S.L.; MUSSULINI, B.H.M et al. Título: Perfil da captação de glutamato em fatias de glioblastoma humano. In: Salão de Iniciação Científica, 21., 2009. Porto Alegre. *Livro de resumos.* UFRGS, 2009.

VÄLIMÄKI, I.A.; VUORIMAA, T.; AHOTUPA, M. et al. Decreased training volume and increased carbohydrate intake increases oxidized LDL levels. **Int. J. Sports Med.** v.33, n.4, p.291-296, 2012.

VAN NIEUWENHOVEN, M.A.; BROUNS, F.; BRUMMER, R.J. Gastrointestinal profile of symptomatic athletes at rest and during physical exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.91, p.429-434, 2004.

VAN WIJCK, K.; LENAERTS, K.; VAN LOON, L.J., et al. Exercise-induced splanchnic

hypoperfusion results in gut dysfunction in healthy men. **PLoS One**, v.6, n.7, p.223-266, 2011.

NOSRATOLA, D.V.; JUN, Y.; ARDESHIR, R. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. **Nephrol. Dial. Transplant**. v.27, p.2686-2693, 2012.

WEST, N.P.; PNE, D.B; CRIPPS, A.W. et al. Lactobacillus fermentum (PCC®) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: a randomised control trial in athletes. **Nutr. J.** v.11, p.10-30, 2011.

WEST, N.P.; HORNB, P.L.; PYNE, D.B. et al. Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals. **Clinical Nutrition**. v.33, n.4, p.581-587, 2014.

WITARD, O.C; JACKMAN, S.R. et al. Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise. **Am. J. Clin. Nutr** . v.99, n.1, p.86-95, 2014.

WANG, B., WU, G., ZHOU, Z., DAI, Z., SUN, Y., JI, Y., LI, W., WANG, W., LIU, C., HAN, F., WU, Z. Glutamine and intestinal barrier function. **Amino acids**. v.47, n.10, p.2143-2154, 2014.

ANEXOS

ANEXO 1



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Avaliação do efeito de uma nova bebida esportiva contendo probiótico, isolado proteico do soro de leite, polpa de romã (*Punica granatum* L.) no desempenho, resposta imune e microbiota de ratos Wistar, registrada com o nº **4150-1**, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes / Fernanda Machado Chaves, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **11 de maio de 2016**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2015-01/06/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	A partir de 11/05/2016 a 01/06/2017
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	24
Peso / Idade:	08 semanas / 250g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 11 de maio de 2016.


Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.