



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Rebeca Mayara Padilha Rego**

**“Efeitos do exercício físico de moderada intensidade no estresse oxidativo e função intestinal de ratos wistar, pós desmame, com constipação induzida por dieta.”**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e medicina translacional.

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Nilton Carlos Machado

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Camila Renata Correa Camacho

**2024**

Rebeca Mayara Padilha Rego

Efeitos do exercício físico de moderada intensidade no estresse oxidativo e função intestinal de ratos wistar, pós desmame, com constipação induzida por dieta.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e medicina translacional.

Orientador: Prof.Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção  
Coorientador: Prof. Dr. Nilton Carlos Machado  
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Renata Correa Camacho

Botucatu  
2024



---

*“Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, o qual me concedeu essa benção e me ajudou em todos os momentos a conquistar o sonho de ser aprovada em um processo seletivo de doutorado e ter tido essa incrível vivencia, que me livrou de situações ruins, que me mostrou claramente sua presença comigo em várias situações, principalmente quando eu achava que não daria conta e que colocou anjos em meu caminho pra que me levassem a conquista tão importante. ”*

*“A minha família, que sempre me apoia mesmo sofrendo com a distancia e a preocupação com as viagens para visitá-los e compromissos da pós graduação, agradeço a paciência e a aceitação da minha ausência em respeito a busca do meu sonho, é uma conquista nossa! ”*

*“Dedico também a minhas muitas amigas as quais presenciaram meu crescimento profissional, ouviram e celebraram as minhas novas habilidades, sorriram comigo e me apoiaram quando chorei, vocês sabem que não foi fácil, mas a presença de vocês comigo me ajudou como vocês jamais poderão imaginar.”*

*“Assim como agradeço a confiança e o auxílio em termos de pesquisa, gostaria de dedicar esse trabalho ao Dr. Pedro, Dr. Nilton e a Dra Camil, que não só foram meus orientadores da pesquisa nesse período, mas sempre acreditaram e confiaram em mim, obrigada Dr. Pedro por mesmo nessa maravilhosa fase estar atento a mim, obrigada Dr. Nilton por ser essa figura tão importante pra mim, como um porto seguro, e obrigada professora Camila pela sua confiança, não me conhecia e mesmo assim me acolheu no seu ambulatório e me ajudou com a conquista desse sonho..”*

---



---

*Ao Dr. Pedro por podermos trabalhar novamente juntos agora no doutorado, e estar presente me auxiliando, com paciência, apesar das dificuldades que encontrei em uma pesquisa experimental jamais vivenciada.*

*Ao Dr. Nilton e a Dr. Mary pela ajuda que me deram pra desenvolver este trabalho, pelas orientações, correções e pelo ouvido atento! Eu agradeço muito a sensibilidade de vocês.*

*Á professora Camila me auxiliou durante todo o desenvolvimento do trabalho, que disponibilizou toda a equipe do laboratório REDOX para que eu pudesse desenvolver esse trabalho tão grande que sozinha seria inviável, me acolheram como parte da equipe durante todo esse processo, e foram fundamentais para que a pesquisa acontecesse, meu muito obrigada!*

*Um obrigada em especial a minhas amigas de trabalho que fiz durante esse período Cristina Gregolin, Gabriela Barbosa e Nubia Grandini, trabalhamos muito juntas e e nos divertimos muito também, obriada pela parceria.*

*Agradeço a universidade pela incrível experiência da pós-graduação, em um ambiente acadêmico preparado com uma organização excelente, docentes excepcionais e o favorecimento da experiência de uma pós-graduação de alta qualidade.*

*Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 88882.433196/2019-01 durante todo o período de pesquisa*

---



---

*“Ora, àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou pensamos, conforme o seu poder que opera em nós.”.*

**Efésios 1:20**

---



“Efeitos do exercício físico de moderada intensidade no estresse oxidativo e função intestinal de ratos wistar, pós desmame, com constipação induzida por dieta.”

Resumo.....	01
Abstract .....	02
1. Introdução.....	03
2. Objetivos .....	08
3. Materiais e Métodos.....	09
4. Resultados.....	21
5. Discussão .....	33
6. Conclusão .....	40
7. Referências .....	41

---

## **Resumo**

**Introdução:** A constipação funcional (CF) afeta cerca de 0,7% a 29,6% das crianças em todo o mundo. No Brasil 17,5% a 38,4% das crianças em idade escolar possuem esse diagnóstico. A constipação pode estar ligada a aumento da inflamação e produção de estresse oxidativo, uma vez que a retenção prolongada de fezes pode estimular alterações inflamatórias na mucosa do cólon, elevando a peroxidação lipídica dos ácidos graxos insaturados da membrana celular. **Objetivos:** Avaliar o efeito do exercício físico de intensidade moderada sobre a constipação intestinal, estresse oxidativo e perfil inflamatório em ratos wistar pós desmame. **Materiais e métodos:** Trata-se de um estudo experimental, com 40 ratos, o estudo foi dividido em fase de indução e fase de intervenção. Em primeiro momento os animais foram divididos em dois grupos com 20 animais cada, sendo um grupo controle e outro com ração controle mais 30% de sacarose, após a indução os animais foram redistribuídos nos grupos: ração controle + sedentários, ração controle+ exercício, ração reduzida em fibras alimentares + sedentário e ração reduzida em fibras alimentares+ exercício. O exercício escolhido foi o de corrida em esteira motorizada com moderada intensidade e os animais sedentários participaram do protocolo simulado. Os animais foram avaliados quanto a crescimento e produção fecal, e após a eutanásia foram coletados tecidos para análises de estresse oxidativo e inflamação bem como peso do intestino delgado e cólon cheios. **Resultados:** Os animais na fase de indução tiveram a indução da constipação bem sucedida, o exercício físico não alterou o peso fecal dos animais, mas aumentou a quantidade de pellets fecais do grupo ração reduzida em fibras alimentares que se exercitavam em comparação ao grupo sedentário com mesma ração. Não houve diferença no índice de adiposidade, observamos um menor peso do intestino delgado cheio de ratos sedentários com ração reduzida em fibras quando comparados aos sedentários ração controle e não houve diferença quanto ao peso do intestino grosso cheio em nenhum dos grupos. Identificamos menores níveis de MDA e catalase nos animais exercitados com ração reduzida em fibras alimentares. **Conclusão:** Neste modelo não foi possível inferir que o exercício físico de moderada intensidade melhore o quadro de constipação intestinal especificamente induzido por dieta nos parâmetros: produção fecal ou tenha capacidade de melhorar a absorção de água nas fezes. Há alterações em mecanismos inflamatórios e antioxidantes na dieta reduzida em fibras alimentares, que parecem ser atenuadas com a pratica de atividade física.

**Palavra-chave:** Ratos, constipação, exercício físico, fibras alimentares, pediatria.

## *Abstract*

**Introduction:** Functional constipation (CF) affects approximately 0.7% to 29.6% of children worldwide. In Brazil, 17.5% to 38.4% of school-age children have this diagnosis. Constipation may be linked to increased inflammation and production of oxidative stress, since prolonged stool retention can stimulate inflammatory changes in the colon mucosa, increasing lipid peroxidation of unsaturated fatty acids in the cell membrane. **Objectives:** To evaluate the effect of moderate intensity physical exercise on constipation, oxidative stress and inflammatory profile in post-weaning Wistar rats. **Materials and methods:** This are an experimental study, with 40 rats, the study was divided into an induction phase and an intervention phase. At first, the animals were divided into two groups with 20 animals each, one control group and the other with control food plus 30% sucrose. After induction, the animals were redistributed into groups: control food + sedentary, control food + exercise, reduced in dietary fiber + sedentary and ration reduced in dietary fiber + exercise. The exercise chosen was running on a motorized treadmill with moderate intensity, and the sedentary animals participated in the simulated protocol. The animals were evaluated for growth and fecal production, and after euthanasia, tissues were collected for analysis of oxidative stress and inflammation as well as full small intestine weight. **Results:** Animals in the induction phase had a successful induction of constipation, exercise did not change the fecal weight of the animals, but increased the physical number of fecal pellets in the diet group reduced in dietary fiber that exercised compared to the sedentary group with the same feed. There was no difference in the adiposity index, we observed a lower weight of the small intestine filled in sedentary rats with a diet reduced in fiber when compared to sedentary rats fed a control diet and there was no difference in the weight of the large intestine filled in any of the groups. We identified lower levels of MDA and catalase in animals exercised on a diet reduced in dietary fiber. **Conclusion:** This model was unable to infer that moderate-intensity physical exercise improves constipation specifically induced by diet in interruptions: fecal production or has the capacity to improve water absorption in feces. There are changes in inflammatory and antioxidant mechanisms in a diet reduced in dietary fiber, which appear to be attenuated with the practice of physical activity.

**Keywords:** Rats, constipation, physical exercise, dietary fiber, pediatrics.

## ***1. Introdução***

A constipação funcional (CF) afeta cerca de 0,7% a 29,6% de crianças em todo o mundo. No Brasil 17,5% a 38,4% das crianças em idade escolar possuem esse diagnóstico. A CF é um distúrbio caracterizado por evacuações infrequentes ( $\leq 2$  evacuações por semana), com sinais e sintomas bem definidos, como a redução do número de evacuações, esforço excessivo evacuatório, sensação de evacuação incompleta, tentativas de eliminação de fezes sem sucesso, necessidade de um grande tempo no vaso sanitário para o ato evacuatório e fezes com consistência endurecida ou volumosa.<sup>1,2,3</sup>

A fisiopatologia da CF é multifatorial e pode ser explicada pelo comportamento de retenção fecal, disfunções anorretais, dieta com baixa ingestão de fibras alimentares, inatividade física, predisposição genética e questões psicológicas. A permanência das fezes retidas por um longo período no reto propicia a maior absorção de líquidos, aumento do volume e da consistência fecal e conseqüentemente a complacência retal, o que leva a menor força de contração para a eliminação das fezes, gerando um conhecido ciclo de autoperpetuação.<sup>4</sup>

O diagnóstico da constipação funcional é eminentemente clínico e utiliza os critérios de Roma IV, os quais representam os principais sintomas presentes na constipação intestinal.<sup>5,6</sup> Devido às características multifatoriais da constipação, é fundamental a realização de tratamento multiprofissional.<sup>7</sup>

O primeiro passo no tratamento é a desimpactação fecal, por meio de agentes farmacológicos laxativos, seguida pela determinação de uma dose adequada de laxativos, para evitar o retorno do quadro inicial. O treinamento evacuatório é parte do tratamento, bem como orientações alimentares, para a ingestão adequada de fibras e água.<sup>8</sup>

A ingestão adequada de fibras é um importante aliado no tratamento das alterações intestinais, incluindo a constipação funcional, uma vez que as fibras são componentes vegetais que permanecem intactas no colón, não sendo digeridas, nem absorvidas, e sofrem fermentação parcial produzindo ácidos graxos de cadeia curta, hidrogênio, metano e dióxido de carbono. As fibras alimentares aumentam o volume das fezes, pois retém mais líquido, aceleram o trânsito colônico, alteram o pH das fezes e influenciam diretamente a microbiota intestinal, o que pode alterar a permeabilidade de membrana e influenciar em processos inflamatórios.<sup>9,10,11</sup>

As fibras do tipo solúveis podem exercer efeitos prébióticos. Quando em contato com líquidos, tornam-se viscosas e auxiliam na eliminação das fezes, bem como na redução de absorção de gordura e desaceleração da absorção de carboidratos. Porém, podem causar flatulências quando em contato com as bactérias do cólon, devido ao seu caráter fermentador. As fibras alimentares do tipo não solúvel possuem capacidade de melhorar o volume fecal e auxiliam na melhoria do trânsito intestinal.<sup>12</sup>

Estudos mostram que as crianças constipadas em idade escolar possuem menor consumo de alimentos como frutas e legumes e maior consumo de alimentos como pães, biscoitos e macarrão, ou seja, as crianças constipadas ingerem menos fibras alimentares que crianças não constipadas.<sup>11,13</sup> Desta forma, a ingestão adequada de fibras alimentares faz parte das recomendações das Sociedades Norte Americana e Europeia de Gastroenterologia Pediátrica (NASPGHAN e ESPGHAN) para o tratamento da constipação intestinal.<sup>14</sup>

A CF pode estar ligada ao aumento da inflamação e produção de estresse oxidativo. A retenção prolongada de fezes pode estimular alterações inflamatórias na mucosa do cólon, pois induz o aumento da peroxidação lipídica dos ácidos graxos insaturados da membrana celular, aumentando a presença de malondialdeído (MDA), causando danos a mucosa intestinal.<sup>15</sup>

Estudos experimentais em animais demonstraram que a constipação é acompanhada por

estresse oxidativo, com aumento do nível de malondialdeído (MDA), produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Alguns estudos também sugerem que a inflamação causada pela constipação tem sua ação não só restrita localmente, mas pode repercutir de forma sistêmica. As alterações inflamatórias podem ser agudas ou crônicas.<sup>16,17,18,19</sup> A inflamação aguda envolve a vasculatura local, o sistema imunológico e as células do local lesionado. A inflamação crônica se apresenta com dano tecidual e alteração das células imunológicas presentes no tecido, decorrente de processos inflamatórios.<sup>20,21</sup>

Frente aos impactos que a constipação causa em todo o organismo, percebemos a importância da investigação de novos métodos para o tratamento desta disfunção intestinal. Neste sentido, a prática do exercício físico pode ser considerada como uma modalidade de tratamento não farmacológico que pode auxiliar no tratamento da constipação. Sabemos que a prática de exercício físico resulta em múltiplos benefícios à saúde, incluindo bem-estar, melhora do humor, possível ação anti-inflamatória e eventos favoráveis para o equilíbrio metabólico.<sup>22,23,24</sup>

Estudos demonstram que a prática do exercício físico é capaz de reduzir o índice de adiposidade, responsável por manter altos níveis de inflamação no corpo. Os benefícios da prática do exercício físico na independência funcional e qualidade de vida superam o aumento da reação inflamatória pós-exercício, que ocorre em decorrência do processo de lesão celular muscular.<sup>20</sup> De acordo com Suzuki (2019), os mecanismos anti-inflamatórios do exercício físico estão ligados à supressão do recrutamento e da ativação de neutrófilos, monócitos e macrófagos que são fontes de mediadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio e à prevenção de danos teciduais induzidos pelo exercício.<sup>25</sup> Episódios de exercício agudos (5 dias consecutivos), de resistência prolongada e de alta intensidade, em humanos e em animais não

treinados, aumentam os biomarcadores de estresse oxidativo como o MDA e a carbonilação de proteínas, seja no sangue ou no tecido muscular. Entretanto, a atividade de enzimas antioxidantes aumenta na mesma medida e mantem a resistência ao dano por até 24 horas em exercícios agudos.<sup>26,27</sup>

A ação do exercício físico no aumento da motilidade gastrointestinal pode ser explicada pelo estresse mecânico do exercício em si, pela compressão do colón pela musculatura abdominal e pelo aumento da ingestão alimentar como resultado do aumento do gasto energético. Estes mecanismos e seus efeitos dentro de cada tipo de exercício ainda precisam ser melhor elucidados uma vez que podem, potencialmente, trazer efeitos benéficos ou maléficos para o trato gastrointestinal.<sup>28,29,30,31,32</sup> Não existe um consenso sobre qual a prescrição adequada de exercício para efeitos benéficos para o intestino, mas o que se sabe é que determinados padrões de exercício podem trazer efeitos maléficos. Durante o exercício físico, há um redirecionamento do fluxo sanguíneo para os músculos esqueléticos em atividade e conseqüentemente a diminuição da circulação sanguínea em nível intestinal. A perfusão sanguínea adequada é necessária para manter as funções gastrointestinais eficientes.<sup>33</sup>

Um estudo experimental, publicado em 2019, demonstrou que o intestino delgado é o principal órgão alvo da hipóxia tecidual induzida pelo exercício. Os animais que realizaram exercício de alta e moderada intensidade apresentaram maior redistribuição da hipóxia tecidual no intestino delgado.<sup>34</sup> Por outro lado, uma revisão sistemática com metanálise, publicada em 2019, avaliou a terapia por exercícios aeróbicos e anaeróbicos em pacientes adultos com constipação e sugeriu que o exercício pode ser uma opção de tratamento viável e eficaz para pacientes com constipação, demonstrando melhora nos sintomas tanto com o exercício aeróbico quanto anaeróbico.<sup>35</sup>

O exercício físico de alta intensidade está ligado a sintomas gastrointestinais como náuseas, diarreia até sangramento gastrointestinal. Atletas de alta intensidade apresentam

elevada prevalência da “colite isquêmica do corredor”. Isso por que o exercício prolongado de alta intensidade reduz o fluxo sanguíneo para o sistema gastrointestinal, e esta hipoperfusão leva a isquemia, aumento da permeabilidade intestinal, translocação bacteriana, elevação de oligossacarídeos, produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS). Já a atividade física moderada tem apresentado um possível efeito protetor em pacientes com doença péptica ulcerosa relacionado a melhora do sistema imunológico, redução da secreção ácida e melhora do quadro de bem estar geral dos pacientes.<sup>36,37</sup>

Outros estudos tem apontado o sedentarismo como um risco para o desenvolvimento da constipação em adultos e em crianças. Entretanto, as evidencias sobre a relação entre a prática de exercícios e a melhora da função intestinal não estão bem consolidadas e são necessários mais estudos para o entendimento do mecanismo de ação e a real efetividade desse possível método não farmacológico para o tratamento e profilaxia da constipação.<sup>38,39,40,41</sup>

Diante dos potenciais benefícios do exercício físico sobre a função intestinal em pacientes com constipação e das incertezas sobre os mecanismos fisiológicos que possam explicar a ação benéfica desta intervenção, nós decidimos avaliar os efeitos desta terapia sobre a função intestinal, através de modelo experimental em ratos pós-desmame, submetidos à dieta adequada ou pobre em fibras.

O modelo experimental proposto neste estudo terá como animal utilizado Rato Albino (*Rattus norvegicus*), do tipo Wistar, que é encontrado na literatura em diversos estudos experimentais. Sua escolha geralmente é devido a seu pequeno porte, baixo custo, fácil manuseio, alta reprodutibilidade e por possuírem estágios de maturação dos sistemas fisiológicos muito semelhantes ao dos humanos.<sup>42,43,44</sup> A indução da constipação nos animais será realizada a partir da adição de sacarose a ração, em modelo já validado para investigação experimental de constipação intestinal em ratos.<sup>44,45</sup>

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral:**

Avaliar o efeito do exercício físico de intensidade moderada sobre a constipação intestinal em ratos Wistar pós desmame.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Avaliar a factibilidade e reprodutibilidade do modelo experimental de constipação intestinal induzida por dieta com redução de fibras em ratos recém-desmamados;

- Avaliar os resultados de modelo experimental animal para constipação por meio da redução de fibras alimentares na dieta, em relação ao crescimento, função evacuatória e tempo de trânsito intestinal;

- Avaliar os resultados da intervenção exercício físico de moderada intensidade em relação ao crescimento e função evacuatória, comparando o grupo de animais submetidos ao modelo experimental de constipação induzida por dieta e um grupo de animais que receberam ração controle;

- Avaliar o estresse oxidativo intestinal por meio dos níveis de malondialdeído, carbonilação de proteínas, superóxido dismutase e catalase e sua relação com o exercício físico de moderada intensidade.

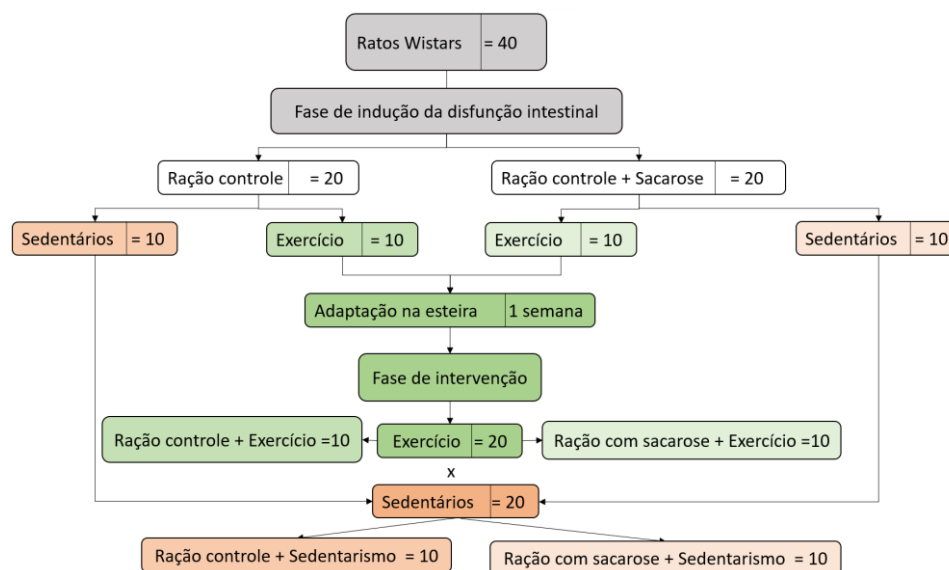
### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob protocolo SIPE-350/2019 CEUA-1352. Foi conduzido de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo ARRIVE Guideline, para estudos de experimentação animal, desenvolvido em acordo com as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e as recomendações do *Guide for the Care and Use of Experimental Animals*.<sup>46,47</sup>

#### **3.2 Desenho e cenário**

Trata-se de um estudo experimental, para avaliar os efeitos do exercício físico de moderada intensidade na função intestinal de ratos Wistar com 21 dias de vida (pós desmame) com constipação induzida por dieta. Os animais passaram por um período de 4 semanas em indução da disfunção intestinal e o treinamento físico teve a duração de 4 semanas (Figura 1). As variáveis analisadas foram colhidas antes e após o período de indução, durante a intervenção de exercício físico, e no momento da eutanásia. Este estudo foi realizado na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), São Paulo, Brasil. O período de coleta de dados foi de três meses.



**Figura 1 - Fluxograma do desenho do estudo.**

### 3.3 Animais, instalações e condição veterinária dos animais

Os animais utilizados nos ensaios foram Ratos Albinos (*Rattus norvegicus*) do tipo Wistar, machos, obtidos no Biotério Central do Campus de Botucatu da Unesp, com 21 dias de idade (período final da lactação – Pós desmame), ou seja, em período de crescimento rápido. Tiveram livre acesso a água e ração, sendo mantidos em gaiolas individuais com enriquecimento ambiental, temperatura ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade controladas ( $55 \pm 5\%$ ) e ciclo de iluminação claro-escuro invertido (12-12hs), de acordo com as recomendações do *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* e estiveram instalados na Unidade de Pesquisa experimental/UNIPLEX, UNESP – Faculdade de Medicina de Botucatu.

### ***3.4 Plano do estudo***

#### ***3.4.1 Fase de indução da constipação intestinal***

Os animais foram distribuídos em dois grupos iguais para a fase de indução. Informações referentes ao crescimento (peso dos animais e ingestão alimentar) e produção fecal (peso, quantidade de pellets e capacidade de reter água) foram colhidas semanalmente e serão descritos detalhadamente a seguir.

Na fase de indução, os animais, de 21 dias de vida (pós desmame), foram alocados em dois grupos após uma randomização estratificada com base na variável peso, para garantir a homogeneidade nesta fase do estudo, que teve duração 4 semanas:

- **Grupo controle:** composto por 20 animais, os quais receberam em sua totalidade a ração comercial Presence Labina®;

- **Grupo ração reduzida em fibras alimentares:** composto por 20 animais, os quais receberam 70% de ração comercial Presence Labina® para roedores, acrescida de 30% de sacarose da marca Dinâmica química contemporânea Ltda®.<sup>45</sup>

Após a constatação da alteração de algum parâmetro fecal para o tipo constipado como: redução do peso fecal e/ou aumento no tempo de trânsito colônico os animais foram submetidos a próxima fase do estudo (fase de intervenção).<sup>48</sup>

### 3.4.1.1 Ração

As informações nutricionais referentes a composição das rações estão descritas no Quadro 1. A adição de sacarose na ração resultou em um aumento calórico de 1200 kcal/kg, implicando em uma redução de fibras alimentares, lipídeos e proteína em 40% por kg de ração.

**Quadro 1. Composição nutricional das rações do estudo**

<b>Componentes</b>	<b>Ração Controle (g/kg)</b>	<b>Ração reduzida em fibras alimentares (g/kg)</b>
<b>Umidade</b>	125	87,5
<b>Proteína Bruta (proteína)</b>	230	161
<b>Extrato Etéreo (Lipídeos)</b>	0,4	0,28
<b>Matéria Mineral</b>	0,9	0,63
<b>Fibra Bruta</b>	0,5	0,35
<b>Cálcio (Mín.)</b>	12	8,4
<b>Cálcio (Máx.)</b>	13	9,1
<b>Fósforo (Mín.)</b>	8,5	5,95
<b>Sódio (Mín.)</b>	0,0027	0,00189
<b>Lisina (Mín.)</b>	0,0027	0,00189
<b>Metionina (Mín.)</b>	4	2,8
<b>Extrato não nitrogenado [Carboidratos (Sacarose)]</b>	-	300
<b>Valor calórico (kcal)</b>	646,52	1846,52

### 3.4.2 Fase de intervenção

A seleção dos animais para a divisão foi realizada por randomização estratificada com base nas variáveis: peso fecal, peso do animal e ingestão de ração, para garantir a homogeneidade nos grupos ao início da intervenção. Em sequência, os animais foram distribuídos novamente para a fase de intervenção. Informações referentes ao crescimento (peso dos animais e ingestão alimentar) e à produção fecal (peso e quantidade de pellets, capacidade de reter água) foram colhidas semanalmente.

Desta forma, os animais compuseram os seguintes grupos de estudo:

- **Grupo dieta controle + Sedentários (C+SED):** composto por 10 animais que se mantiveram recebendo a dieta controle e ficaram diariamente 15 minutos na esteira para ratos desligada;

- **Grupo dieta reduzida em fibras alimentares + Sedentários (RRF+SED):** composto por 10 animais que se mantiveram recebendo a dieta baixa em fibras alimentares e ficaram diariamente 15 minutos na esteira para ratos desligada.

- **Grupo ração controle + Exercício (C+EX):** composto por 10 animais que se mantiveram recebendo a dieta controle e ficaram diariamente 40 minutos na esteira para ratos na velocidade determinada pelo teste de esforço, representando um exercício físico moderado.

- **Grupo ração reduzida em fibras alimentares + Exercício (RRF+EX):** composto por 10 animais que se mantiveram recebendo a dieta baixa em fibras alimentares e ficaram diariamente 40 minutos na esteira para ratos na velocidade determinada pelo teste de esforço, representando um exercício físico moderado.

#### ***3.4.2.1 Exercício físico***

##### **A) Aclimação**

Antes de iniciar o teste físico, os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira ergométrica para ratos (modelo construído pelo Centro Tecnológico de Engenharia Clínica- UNESP de Botucatu-SP, Brasil). Esta adaptação consiste em caminhada de baixa intensidade, velocidade de 5 m/min, com duração de tempos de 10, 15, 20, 25 e 30 minutos do

1º ao 5º dia, respectivamente. Esta fase, adaptativa, tem como finalidade minimizar o estresse dos roedores ao meio ambiente (Quadro 2).

**Quadro 2. Aclimação à esteira ergométrica.**

<b>Dias</b>	<b>Velocidade (m/min)</b>	<b>Tempo (min)</b>
1º	5	10
2º	5	15
3º	5	20
4º	5	25
5º	5	30

### **B) Teste de esforço físico**

Os testes de esforço físico foram realizados com os ratos do grupo exercício, utilizando-se uma esteira para ratos construída pelo Centro Tecnológico de Engenharia Clínica - Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (Unesp) de Botucatu, São Paulo, Brasil. Realizamos um teste incremental com multiestágios, individualmente adaptado, a partir do teste anteriormente descrito por de Souza (2021). Após o período de adaptação, realiza-se o teste de capacidade máxima de corrida, que consiste em uma corrida na esteira iniciada à 6 m/min, incrementada em 3 m/min a cada 3 minutos, até que o animal atinja a exaustão. A exaustão foi determinada quando o animal se recusava a executar, mesmo após estimulação sonora ou tátil ou quando o animal se mostrava incapaz de coordenar passos. A velocidade/hora máxima atingida e o tempo de teste de cada animal foram coletados. A velocidade de treinamento foi definida em 40% da velocidade máxima atingida pelos animais.<sup>49</sup>

### **C) Protocolo de treinamento e simulado**

De acordo com o teste de esforço realizado, o protocolo definido foi um treinamento de intensidade moderada, com velocidade de 22 m/min, sem inclinação, ou seja 40% da capacidade máxima de esforço dos animais, com frequência de cinco dias de treinamento seguidos de dois dias de repouso, com duração de 40 minutos cada sessão de treinamento. O período de duração do protocolo foi de 4 semanas.<sup>50</sup>

O grupo dos animais sedentários foram submetidos ao protocolo de treinamento simulado. Foram colocados 5 vezes na semana na esteira para ratos, desligada, por um período de 15 minutos, com o intuito de provocar o mesmo estresse por manipulação ao qual os animais do grupo que realizou o treinamento foram expostos. O período de duração do protocolo simulado foi de 4 semanas.

Ao final da intervenção, os animais dos grupos exercício foram submetidos um teste de velocidade máxima na esteira, após a conclusão do período de treinamento.

### ***3.4.3 Eutanásia***

No 31º dia após o início da fase intervenção, os animais foram submetidos à eutanásia após 8 horas de jejum, por injeção intraperitoneal de tiopental sódico na dose de 120 mg/kg. Imediatamente após a eutanásia, o intestino delgado e intestino grosso foram retirados, a partir de laparotomia mediana. As amostras do intestino delgado cheio foram pesadas juntamente com seus conteúdos fecais e seu peso foi expresso em gramas. Após pesados, os órgãos foram abertos longitudinalmente e lavados com solução fisiológica e pesados novamente para a obtenção do segmento vazio. Alíquotas de intestino grosso foram coletadas e colocadas em tubos criogênicos, submetidas a congelamento rápido por nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer -80°, para análises de estresse oxidativo e inflamação.

### ***3.4.4 Processamento para análise de perfil oxidativo***

As amostras de intestino grosso foram determinadas em homogenato preparado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 (1:10; p/v) usando um homogeneizador de esferas (Bullet Blender®, Next Advance, Inc., NY, EUA). Os homogenatos foram centrifugados a  $800 \times g$  por 10 min a 4 °C (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburgo, Alemanha), e o sobrenadante foi obtido para medir o estado redox, atividade de enzimas antioxidantes e marcadores oxidativos.

Todas as análises foram normalizadas pelo teor de proteína total, que foi determinado por método colorimétrico (BioClin, Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil), e as leituras foram feitas em leitor de microplacas.<sup>51</sup>

### ***3.4.5 Avaliações***

#### ***3.4.5.1 Avaliações in vivo***

##### **A) Crescimento**

O crescimento dos animais foi avaliado mediante análise de peso corporal, ingestão de ração e eficiência alimentar.

- **Peso corporal:** a avaliação do peso corporal, expresso em gramas, foi realizada por método de pesagem em balança semi-analítica, realizada semanalmente.

- **Ingestão de ração:** a ingestão de ração foi medida semanalmente e de forma individual, mediante repesagem de resíduo alimentar em balança semi-analítica, expressa em gramas.

- **Eficiência alimentar:** A eficiência alimentar foi avaliada pela taxa de eficiência alimentar e pelo consumo calórico. A taxa de eficácia alimentar (TEA) é a relação entre o ganho de peso por quantidade de alimento consumido:  $TEA = (PF - PI) / TA$ ; em que PF é o peso final (g) do animal durante o período de acompanhamento, PI é o peso corporal do animal no início do experimento em gramas e TA é a quantidade total de alimento ingerido no período em gramas. O consumo calórico (CC) é a relação entre o ganho de peso e a quantidade de calorias ingeridas:  $CC = (PF - PI) / \text{kcal ingeridas}$ ; em que PF é o peso corporal (g) final do animal, PI é o peso corporal do animal (g) no início, em um período de análise de uma semana, e Kcal é o valor calórico da dieta ingerida. <sup>52</sup>

## **B) Avaliação da constipação intestinal**

- **Tempo de trânsito gastrointestinal:** nesta avaliação foi utilizado o corante vermelho carmim (Merck), que não pode ser absorvido pelo lúmen intestinal. Uma solução de 0,05 ml de vermelho carmim foi administrada por gavagem aos ratos. O tempo em que ocorreu a gavagem foi registrado. Após a gavagem, os grânulos fecais foram monitorados em intervalos de 10 min para a presença do vermelho carmim. O tempo total de trânsito gastrointestinal foi considerado em minutos como o intervalo entre a gavagem e o tempo da primeira visualização do corante vermelho carmim nas fezes. <sup>48,52</sup>

- **Peso fecal:** os pellets de fezes de cada animal foram coletados e armazenados de forma individual para a obtenção do dado referente ao peso fecal (peso fecal úmido) por meio de pesagem em balança semi-analítica. <sup>52</sup>

- **Quantidade de pellets de fezes:** a quantidade de pellets foi obtida por meio da contagem da produção dos pellets diários de forma individual dos animais.<sup>52</sup>

- **Conteúdo de água fecal:** A capacidade de reter água nas fezes foi realizada, conforme descrito por Enqi (2021). Após a coleta, pesagem e contagem, os pellets foram colocados em uma estufa a 60° C por 48 horas, posteriormente pesados novamente para a coleta de dado do peso fecal seco. A partir deste dado realizamos o cálculo do conteúdo de água fecal a partir da diferença entre o peso úmido e peso seco (Conteúdo de água fecal = diferença entre o peso úmido e peso seco = Peso fecal úmido - peso fecal seco).<sup>53</sup>

- **Taxa de Eficiência do Peso Fecal:** foi obtido por meio da relação entre o valor de peso em gramas de fezes úmidas/ grama de ração ingerida dos animais.<sup>45</sup>

As informações referentes ao crescimento (peso dos animais e ingestão alimentar) e à produção fecal (Peso e quantidade de pellets, Conteúdo de água fecal, Taxa de Eficiência do Peso Fecal) foram colhidas diariamente e expressas em dias e em semanas.

#### ***3.4.5.2 Avaliações após eutanásia***

##### **A) Índice de adiposidade**

Os depósitos de gordura epididimal, visceral e retroperitoneal foram dissecados dos animais. O índice de adiposidade é determinado a partir da soma dos depósitos, normalizados pelo peso corporal [(epididimal + retroperitoneal + visceral) / peso corporal x 100].<sup>54</sup>

## **B) Peso intestino delgado e intestino grosso cheios**

As amostras do intestino, cheias, foram pesadas juntamente com seus conteúdos fecais, e seu peso foi expresso em gramas. Após pesados, os órgãos foram abertos longitudinalmente e lavados com solução fisiológica e pesados novamente para a obtenção do valor do peso do segmento vazio.

### ***3.4.5.3 Avaliações do estresse oxidativo***

O estresse oxidativo foi avaliado pelas dosagens do produto de peroxidação lipídica (Malondialdeído (MDA) e carbonilação de proteínas. Foram avaliadas também as enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Todas essas aferições foram realizadas no sobrenadante do homogenato de tecido do intestino grosso.

#### **A) Malondialdeído (MDA)**

Para a quantificação de MDA, foram utilizados 250 µL de homogenato para 750 µL de ácido tricloroacético 10% para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm; por 5 minutos; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante removido. Adicionou-se ácido tiobarbitúrico (TBA) ao sobrenadante na proporção 1:1 e as amostras foram aquecidas por 45 minutos a 100° C. MDA reagiu com TBA na proporção 1:2 MDA-TBA, absorvido a 535 nm. Após o resfriamento, a leitura em 535 nm foi realizada na microplaca Spectra Max 190 leitor (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração de MDA foi obtida pelo coeficiente de extinção molar ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e a absorbância das amostras e o resultado final expresso em nmol/g de proteína.<sup>55</sup>

#### **B) Carbonilação de Proteínas**

A carbonilação de proteínas foi quantificada por um método adaptado de Mesquita et al. (2014). 100 µL de homogêneo para 100 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em 2 M HCl). As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, 50 µL de NaOH (6 M) foram adicionados e incubado novamente por 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm em um leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA) e o resultado obtido da absorbância das amostras e do molar coeficiente de extinção (22000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (31). Os resultados finais expressos em nmol/mg de proteína.<sup>56</sup>

### C) Enzimas antioxidantes

A análise de inflamação foi avaliada pelas dosagens dos níveis da atividade da superóxido dismutase (SOD) a atividade da catalase (CAT), em homogenato de tecido do intestino grosso.

- **Superóxido dismutase (SOD):** A atividade da Superóxido dismutase (SOD) foi medida com base na inibição da reação do radical superóxido com pirogalol por espectrofotometria a 420 nm. Uma unidade de atividade SOD (U) é definida como a quantidade da enzima que inibiu 50% da autoxidação do pirogalol, e os resultados foram expressos em U/mg proteína/minuto.<sup>57</sup>

- **Catalase (CAT):** A atividade da catalase (CAT) foi avaliada pela diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A quebra de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na mistura de reação foi medida espectrofotometricamente a 240 nm, e os resultados foram expressos como pmol/mg de proteína/minuto.<sup>58</sup>

### ***3.5. Métodos estatísticos***

O número amostral de 10 animais por grupo experimental foi estabelecido com base em um poder de teste de 90%, nível de significância de 5%, desvio-padrão máximo esperado de 8% e em uma diferença entre os grupos esperada de 15%. Este valor de diferença esperada entre os grupos foi estimado a partir de estudos prévios utilizando o mesmo modelo animal.<sup>45</sup> Assim, a amostra foi composta em sua totalidade por 40 ratos.

Os resultados obtidos foram expressos como média ( $\pm$  desvio padrão) ou mediana (mínimo e máximo), de acordo com o tipo de distribuição verificado pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos de tratamento, para variáveis numéricas contínuas, foram avaliadas estatisticamente pelos testes T student, Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey ou Gamma com pós-teste de Wald, de acordo com o padrão de normalidade. Foi estabelecido nível de significância de 5% e a análise foi realizada utilizando-se o SAS Analytics Software 9.4.

#### 4. Resultados

O estudo não apresentou mortalidade de nenhum animal durante todo o experimento. Foi possível atingir o objetivo de alterar a função intestinal dos animais para um padrão constipado na variável produção fecal. As fases de indução e a intervenção com o exercício ocorreram como o programado. Além disso, os animais não apresentaram nenhum sinal de estresse extremo como redução da ingestão alimentar, hábito de roer a gaiola repetidas vezes, comportamento furtivo ou agressivo e foram manejados adequadamente.

##### 4.1 Fase de indução da constipação

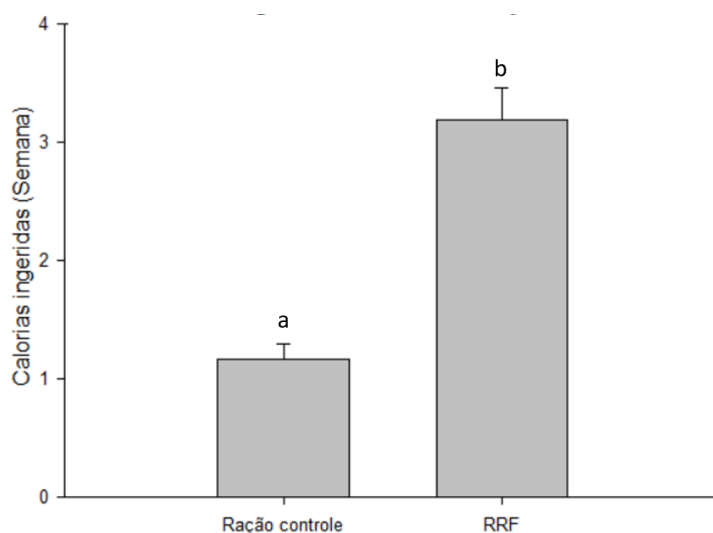
###### A) Crescimento

Após a fase de indução, observamos que, em relação ao crescimento dos animais, houve diferenças significativas entre os grupos controle e ração reduzida em fibras, conforme demonstrado na Tabela 1. Os animais do grupo ração reduzida em fibras alimentares apresentaram menor peso e menor ingestão de ração quando comparados ao grupo controle, sem alterações significativas quanto a taxa de eficiência alimentar. Apesar dos animais do grupo ração reduzida em fibras terem ingerido uma menor quantidade de ração, eles tiveram uma ingestão calórica significativamente maior que a do grupo controle (Figura 2).

**Tabela 1. Crescimento dos animais ao final da fase indução**

Variável	Controle		Ração reduzida em fibras alimentares		
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Valor P
Peso corporal (g)	279,09	16,92	263,69	22,26	P = < 0,05
Ingestão de ração (g)	184,11	16,81	170,62	16,92	P = < 0,05
Taxa de eficiência alimentar (%)	24,8	3,2	26,7	3,15	P = 0,074

Teste T: significância P = <0,05



A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um  $P < 0,05$  (Teste T de Student)

**Figura 2. Ingestão calórica ao final da fase de indução**

### **B) Avaliação da constipação intestinal**

Por meio da Tabela 2, podemos identificar diferença significativa na variável peso das fezes, demonstrando peso significativamente menor na produção de fezes dos animais com dieta reduzida em fibras alimentares quando comparado ao grupo controle. Evidenciamos, também, que a quantidade de água perdida nas fezes dos animais com ração reduzida em fibras alimentares e a taxa de eficiência fecal foram significativamente menores nos animais do grupo redução de fibras alimentares em relação ao grupo controle.

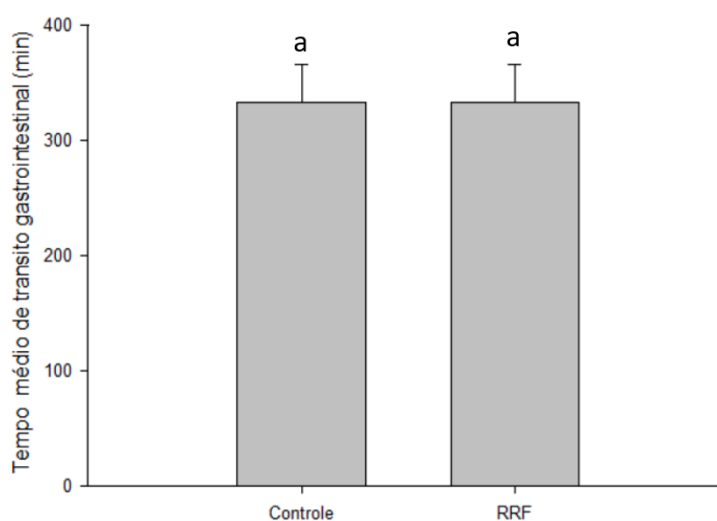
**Tabela 2. Dados referentes a produção fecal ao final da fase de indução.**

Variável	Controle		Ração reduzida em fibras alimentares		Valor P
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Peso das fezes (g)	9,34	0,69	6,53	0,61	$p = < 0,05$
Quantidade das fezes (g)	54,50	5,53	52,84	9,11	$p = 0,491$
Conteúdo de água fecal (g)	3,82	1,30	2,4	0,89	$p = < 0,05$
Taxa de eficiência fecal	0,36	0,03	0,27	0,02	$p = < 0,05$

Teste T: significância em  $P = < 0,05$

### C) Tempo de trânsito gastrointestinal

A ração reduzida em fibras alimentar não promoveu alterações significativas no tempo de trânsito gastrointestinal. O grupo controle apresentou um tempo de trânsito gastrointestinal médio de  $333,2 \pm 33,1$  min e o grupo submetido a dieta reduzida em fibras alimentares apresentou um tempo de trânsito gastrointestinal médio de  $343 \pm 49,1$  min, representados na Figura 3.



A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um  $P < 0,05$  (Teste T de Student)

**Figura 3. Tempo de trânsito gastrointestinal ao final da fase de indução**

## 4.2 Fase de intervenção (exercício físico)

### A) Crescimento

Por meio da Tabela 4, é possível observar que, ao final da fase de intervenção, não houve diferenças entre os grupos em relação ao peso, ingestão de ração e para a taxa de eficiência alimentar.

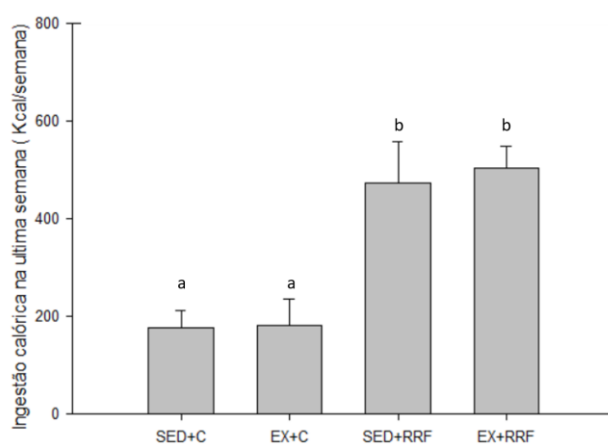
**Tabela 4. Crescimento dos animais ao final da fase de intervenção.**

Variável	Ração controle		Ração reduzida em fibras alimentares		Valor P*
	Sedentário	Exercício	Sedentário	Exercício	
	Média DP	Média DP	Média DP	Média DP	
<b>Peso (g)</b>	449,04 ±32,93	449,06 ±39,68	441,8 ±47,7	418,04 ±73,55	p = 0,513
<b>Ingestão de ração (g)</b>	39,22 ±7,45	38,92 ±3,53	35 ±3,94	37,50 ±8,80	p = 0,437
<b>Taxa de eficiência alimentar</b>	4,72 ± 3,31	4,013 ± 2,34	6,18 ± 2,50	6,54 ± 1,94 <sup>b</sup>	P = 0,145

\* ANOVA

## B) Análise de ingestão calórica

Os animais que receberam ração controle ingeriram significativamente menos calorias quando comparados aos animais com ração reduzida em fibras alimentares, independente da intervenção exercício (Figura 4).

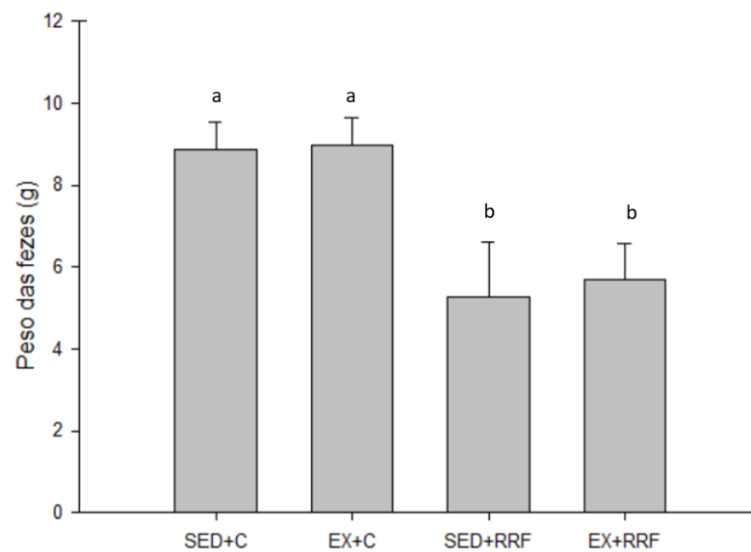


A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um P=<0,05. Testes ANOVA (P = <0,001) e Tukey.

**Figura 4. Ingestão calórica ao final da fase de intervenção**

### C) Avaliação do peso fecal

A Figura 5 representa o comportamento dos grupos em relação do peso das fezes, ao final da quarta semana de intervenção. Podemos observar peso fecal significativamente menor nos grupos ração reduzida em fibras alimentares em relação aos grupos ração controle, independentemente da intervenção exercício físico.

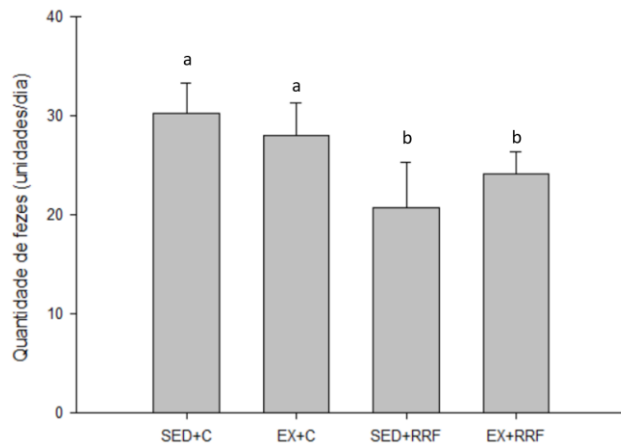


A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um  $P < 0,05$ . Testes ANOVA ( $P < 0,001$ ) e Tukey.

**Figura 5. Peso das fezes ao final da fase de intervenção.**

### D) Quantidade de fezes

De acordo com a Figura 6, pode-se observar produção significativamente menor de pellets fecais no grupo submetido à dieta com fibras reduzidas em relação ao grupo submetido à dieta controle, independentemente da intervenção exercício físico.

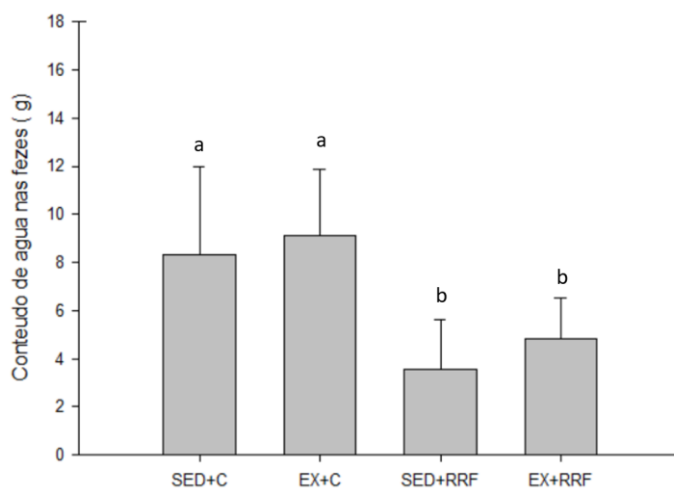


A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um  $P < 0,05$ . Testes ANOVA ( $P < 0,001$ ) e Tukey.

**Figura 6. Quantidade de pellets ao final da fase de intervenção.**

### E) Quantidade de água perdida nas fezes

A Figura 7 demonstra a quantidade de água perdida nas fezes após secagem na estufa, na última semana da intervenção. Podemos observar os animais submetidos à dieta com redução de fibras apresentaram quantidade de água perdida nas fezes significativamente menor do que os animais submetidos à dieta controle de forma independente do exercício físico.

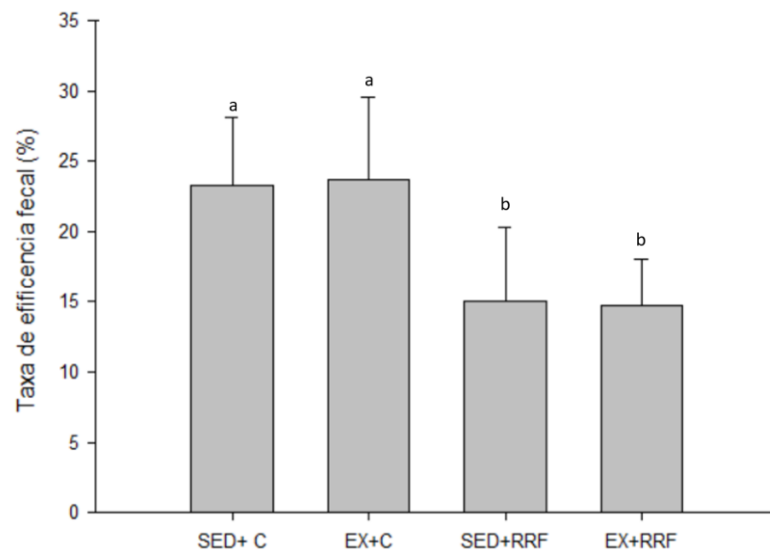


A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um  $P < 0,05$ . Testes ANOVA ( $P < 0,01$ ) e Tukey.

**Figura 7. Quantidade de água perdida nas fezes**

## F) Taxa de eficiência fecal

De acordo com o observado na Figura 8, ao final do período de intervenção, a taxa de eficiência fecal foi significativamente menor nos grupos submetidos à dieta com redução de fibras em relação aos grupos submetidos à dieta controle, independentemente da intervenção exercício físico.



A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um  $P < 0,05$ . Testes ANOVA ( $P < 0,001$ ) e Tukey.

**Figura 8. Taxa de eficiência fecal.**

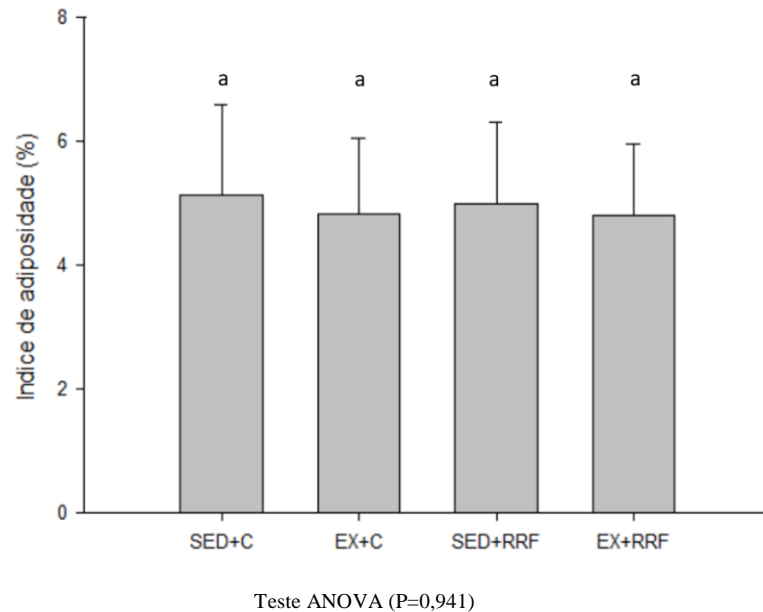
## G) Teste de esforço máximo final

Aos 95 dias de idade, não houve diferenças entre os grupos (EX+RRF:  $20,3 \pm 3,16$  m/min e EX+C:  $19,8 \pm 2,09$  m/min) no teste de velocidade máxima na esteira após o período de treinamento.

### 4.3 Avaliações após eutanásia

#### A) Índice de adiposidade

De acordo com a Figura 9, que representa o índice de adiposidade, observamos que não houve diferenças significativas do índice de adiposidade nas comparações entre os grupos.

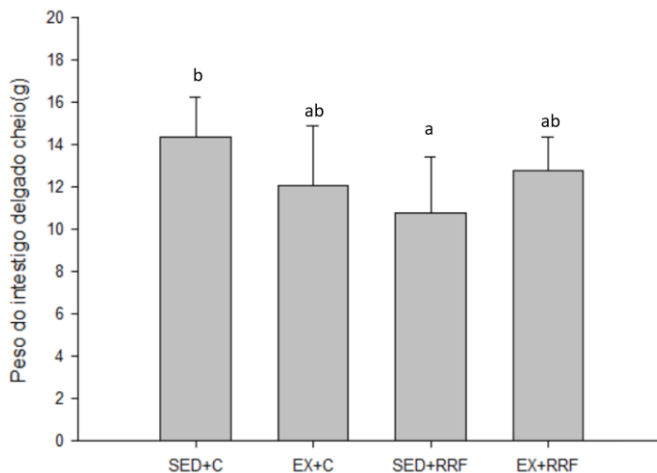


**Figura 9. Índice de adiposidade**

#### B) Peso do intestino delgado cheio

De acordo com o representado na Figura 10, o peso do intestino delgado cheio foi significativamente maior nos animais do grupo sedentário que receberam ração controle em relação aos sedentários que receberam ração com fibras reduzidas. Não houve diferenças significativas nas comparações entre os demais grupos. Nos animais submetidos a intervenção exercício físico, não houve diferenças significativas entre o peso do intestino delgado dos

animais com ração controle e com ração reduzida em fibras. Não houve diferenças estatisticamente significativas nas demais comparações entre grupos.

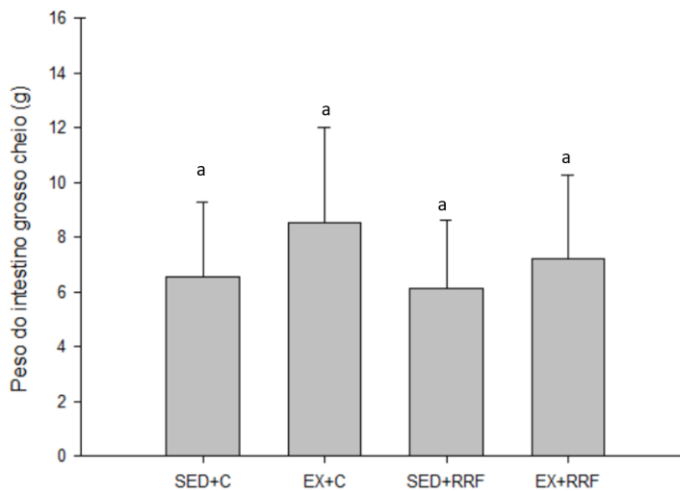


A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um  $P < 0,05$ . Teste Gama ( $P = 0,0409$ ) e Wald.

**Figura 10. Peso do intestino delgado cheio**

### C) Intestino grosso cheio

Na análise do peso do intestino grosso cheio, representado na Figura 11, não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre os grupos.



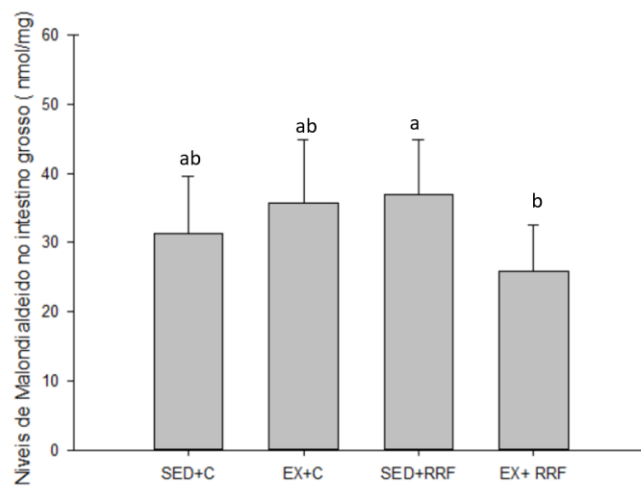
Teste Gama ( $P = 0,233$ )

**Figura 11. Peso do intestino grosso cheio**

#### 4.4. Avaliações do estresse oxidativo

##### A) Malondialdeído (MDA)

Por meio da análise da concentração de malonaldeído no tecido do intestino grosso, houve diferenças entre os animais que foram submetidos ao modelo de dieta com redução de fibra. Nestes animais, houve concentração significativamente menor nos animais submetidos a intervenção exercício físico em comparação aos animais sedentários. Não foram observadas diferenças significativas das concentrações de MDA nas demais comparações entre grupos.

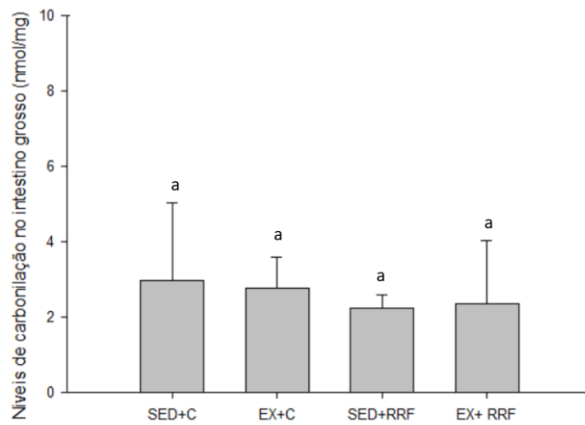


A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um  $P < 0,05$ . Teste ANOVA ( $P = 0,027$ ) e Tukey

**Figura 12. Níveis de concentração de MDA no tecido do intestino grosso**

##### B) Carbonilação de Proteínas

A análise dos níveis de carbonilação no tecido do intestino grosso não apresentou diferenças significativas entre os grupos. A representação dos resultados está apresentada na Figura 13.

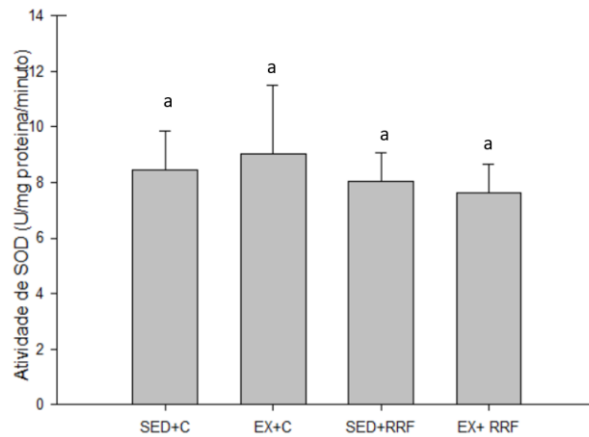


Teste AONOVA (P=0,773)

**Figura 13. Níveis de concentração de carbonilação no tecido do intestino grosso.**

### C) Superóxido dismutase (SOD)

De acordo com a representação da Figura 14, não houve diferenças significativas nas comparações entre os grupos em relação à atividade de superóxido dismutase analisada no tecido do intestino grosso nos animais.

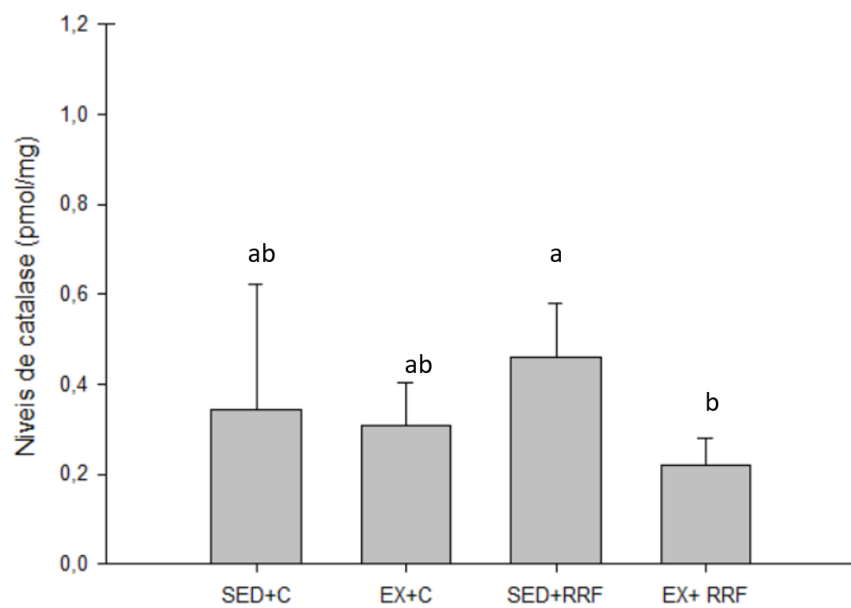


Teste AONOVA (P=0,270)

**Figura 14. Atividade de SOD no tecido do intestino.**

## D) Catalase

Em relação aos níveis de catalase nas amostras de intestino grosso, houve diferenças entre os animais que foram submetidos ao modelo de dieta com redução de fibra. Nestes animais, houve concentração significativamente menor nos animais submetidos a intervenção exercício físico em comparação aos animais sedentários. Não foram observadas diferenças significativas das concentrações de catalase nas demais comparações entre grupos (Figura 15).



A diferença entre os grupos está representada pelas letras <sup>a</sup> e <sup>b</sup>, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças significativas e grupos com letras diferentes apresentam um  $P < 0,05$ . Teste ANOVA ( $P = 0,002$ ) e Tukey

**Figura 15. Níveis de concentração de catalase no tecido do intestino.**

## **5. Discussão**

Atualmente existem alguns tipos de modelos experimentais em animais que buscam mimetizar a constipação intestinal, para melhor estudá-la. A constipação induzida por medicamentos é utilizada na maioria dos estudos. As drogas mais comumente descritas para a indução da constipação de forma aguda são o cloridato de loperamida e atropina-difenoxilato.<sup>59,60</sup>

Alguns medicamentos prescritos para adultos como antidepressivos ou opioides podem gerar como efeito colateral a diminuição do trânsito colônico. Entretanto, a constipação induzida por medicamentos foge da fisiopatologia da constipação funcional típica da população pediátrica. Portanto, para se obter um modelo de investigação experimental que simule mais adequadamente a constipação em crianças, deve-se utilizar cenários que cursem com fisiopatologias semelhantes às da CF como, por exemplo, por meio da alteração na ingestão alimentar, mais especificamente, na ingestão de fibras.<sup>59,61,62</sup>

O modelo desenvolvido em nosso estudo foi descrito anteriormente por Rezende & Machado, em 2006.<sup>45</sup> Este modelo propõe a indução experimental de constipação intestinal aguda em ratos, por meio da redução da ingestão de fibras alimentares na dieta, substituindo a ração padrão em 30% de sacarose. Em nosso estudo, este modelo foi reaplicado pela primeira vez, demonstrando-se factível, com baixo custo e alta replicabilidade. Nós obtivemos resultados semelhantes ao estudo original em relação à fase de indução de constipação intestinal. Apesar de a sacarose ser um carboidrato simples, de digestão rápida e de maior índice glicêmico, não houve maior ganho de peso nos animais que receberam dieta com substituição de fibras por sacarose. Pelo contrário, houve menor ganho de peso nos animais submetidos à essa dieta e menor ingestão de ração. Isso pode ter ocorrido em virtude do elevado valor calórico desta ração, levando mais precocemente à sensação de saciedade. Ainda na fase de indução, não

houve diferenças significativas entre os grupos que receberam ração controle e ração com redução de fibras em relação à taxa de eficiência alimentar, que é a relação da ingestão de ração e o ganho de peso ponderal, ou seja, em ambas as dietas, esse alimento foi convertido em massa corporal de forma semelhante. A ração reduzida em fibras alimentares possui um maior valor calórico que a ração controle, porém é pobre em fibras alimentares, nutrientes, proteína e gordura, e rica em carboidrato simples.<sup>45</sup>

Quanto à produção fecal na fase de indução, observamos que os animais que receberam ração reduzida em fibras alimentares produziram fezes com menor peso fecal, o que pode ser explicado pela menor umidade das fezes devido à redução de fibras alimentares, que são responsáveis por reter água no cólon e manter as fezes mais úmidas. Este fato é comprovado pelo conteúdo de água presente nas fezes, que foi significativamente menor nos animais do grupo ração reduzida em fibras alimentares, já que suas fezes são expelidas com pouca quantidade de água para ser perdida no processo de secagem na estufa. Esses resultados demonstram grande aproximação com o que encontramos nos sintomas apresentados por crianças e adolescentes com constipação funcional induzida por dieta, que comumente evacuam fezes ressecadas ou em cíbalos.<sup>8</sup>

A taxa de eficiência fecal nos mostra a capacidade do animal transformar o que ele ingere de ração em fezes. Durante a fase de indução, os animais do grupo ração reduzida em fibras alimentares apresentaram maior dificuldade em transformar a ração ingerida em fezes quando comparados ao grupo ração controle, com taxa de eficiência fecal significativamente menor. Isso pode ser explicado pela menor concentração de fibras alimentares, que prejudica a formação adequada do bolo fecal. Nossos resultados da fase de indução são bastante semelhantes aos obtidos por Zhiyong Li (2023) que realizou indução de constipação por ração

reduzida em fibras alimentares em animais e também identificou alterações nos parâmetros: redução da quantidade de fezes e quantidade de água fecal.<sup>63</sup>

Por outro lado, na análise do trânsito intestinal após a conclusão da fase de indução, identificamos que a redução de fibras alimentares não provocou alterações significativas no tempo de trânsito, sem promover, portanto, constipação de trânsito lento. A constipação desenvolvida no modelo experimental utilizado no presente estudo é decorrente da alteração na ração ingerida pelos animais, com redução de fibras, diminuição da umidade e da quantidade de água fecal, promovendo alteração na consistência das fezes. Por outro lado, a constipação intestinal é considerada uma doença multifatorial em crianças e adolescentes, que pode envolver aspectos comportamentais, psicológicos, dietéticos, genéticos e relacionados à motilidade intestinal.<sup>8</sup> Em nosso modelo, não conseguimos simular o papel destes outros fatores na fisiopatologia da constipação induzida nos animais. Nosso modelo foi embasado apenas no fator dieta pobre em fibras, ao qual a grande maioria dos pacientes pediátricos com constipação funcional estão sujeitos.<sup>11, 13</sup>

Após o período de treinamento físico moderado, os animais dos grupos submetidos à intervenção exercício físico apresentaram a mesma performance no teste de esforço máximo, independentemente do tipo de dieta e da presença ou não de constipação induzida. Ao término da intervenção exercício, os animais de todos os grupos não apresentaram diferenças significativas no peso, na ingestão de ração e na taxa de eficiência alimentar.

Ao final da fase de intervenção exercício físico, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos submetidos ao exercício físico e os grupos de animais sedentários para as variáveis relacionadas à função intestinal. Houve valores significativamente menores para o peso das fezes, quantidade de fezes, quantidade de água eliminada nas fezes e taxa de eficiência fecal para os animais que receberam dieta com redução de fibras nas comparações

com os animais que receberam dieta controle, demonstrando a manutenção das alterações funcionais compatíveis com constipação intestinal funcional nestes animais. Entretanto, isso ocorreu de forma independente, nos animais expostos ou não à intervenção exercício físico. Portanto, a intervenção proposta em nosso modelo, exercício físico de moderada intensidade por 4 semanas, não foi capaz de demonstrar influência sobre os aspectos funcionais intestinais em ratos com ou sem constipação induzida por dieta.

Nas análises pós-eutanásia, não identificamos alteração no índice de adiposidade em nenhum dos grupos, demonstrando que nem o exercício, nem a modificação dietética, alteraram de forma significativa a composição adiposa dos animais. Isso pode ser justificado pelo curto tempo de intervenção. O peso do intestino delgado cheio dos animais sedentários com ração reduzida em fibras alimentares foi significativamente menor que o grupo sedentário com ração controle. Isso pode ser explicado, apesar de não ter havido diferenças estatisticamente significativas, pela menor ingestão de ração pelos animais submetidos a dieta pobre em fibras, que também não retém tanta água no interior do lúmen intestinal, diminuindo o peso do intestino delgado. Chama a atenção que esta diferença significativa no peso do intestino delgado não se reproduziu entre os animais dos grupos ração controle versus ração com redução de fibras submetidos ao protocolo de exercício físico. Isso pode ser explicado, apesar de não ter havido diferenças estatisticamente significativas, pelos maiores valores médios de peso fecal e de retenção de água nas fezes apresentados pelos animais submetidos ao exercício em comparação aos grupos sedentários, o que pode indicar potencial influência positiva do exercício físico em aspectos funcionais intestinais.

Apesar da alteração referente ao conteúdo de água fecal encontrada nos animais com ração reduzida em fibras alimentares, não observamos diferenças referentes ao peso do intestino grosso entre os grupos. Sabemos que é no cólon que acontece a maior absorção de água das

fezes. Entretanto, em nosso estudo, apesar de termos evidenciado a presença de fezes mais leves e com menor conteúdo de água nos animais submetidos a dieta com redução de fibras, ao pesarmos o intestino grosso associado a seu conteúdo fecal, não identificamos diferenças significativas.

O malondialdeído (MDA) é um biomarcador secundário da peroxidação lipídica. A avaliação dos seus níveis é uma das melhores formas de se identificar lesão oxidativa. A catalase tem como função deteriorar o peróxido de hidrogênio que é tóxico para as células. A presença de níveis aumentados de catalase é um sinal indireto de aumento da presença de peróxido de hidrogênio e, portanto, de lesão oxidativa. Alguns estudos tem demonstrado um aumento de marcadores de estresse oxidativo como o MDA no tecido intestinal de animais submetidos a dietas pobres em fibras alimentares.<sup>64</sup> Há, também, evidências de que a constipação intestinal em crianças e adolescentes possa ser um potencial causador do estresse oxidativo, com aumento da produção de SOD e catalase.<sup>65, 66, 67</sup>

Nós identificamos diferenças significativas relacionadas aos biomarcadores de stress oxidativo MDA e catalase, nas amostras de cólon dos animais submetidos ao modelo experimental de constipação com redução de fibras na dieta. Nestes animais, com constipação induzida por dieta, a intervenção exercício físico esteve associada à menor produção de MDA e de catalase. Isso nos mostra que o exercício físico de moderada intensidade induziu melhora no perfil oxidativo frente ao quadro de constipação induzida por redução de fibras alimentares nos animais, demonstrando um potencial efeito benéfico desta intervenção.<sup>68, 69</sup>

Nosso estudo apresenta algumas limitações que merecem ser destacadas, incluindo a não aferição da quantidade de água ingerida pelos animais, do débito urinário e do tempo de trânsito intestinal após a intervenção. Isso pode ser justificado pelas dificuldades técnicas de aferição destas variáveis, devido as garrafas de água dos animais apresentarem vazamentos ao

longo do estudo, não foi possível quantificar a água dos animais de maneira fidedigna, portanto optamos por não utilizar esse dado, a estrutura que temos disponível para a coleta de urina não traz a possibilidade de manter os animais por muito tempo devido o fator estressante da estrutura, e obtivemos problemas para realizar as gavagens da última avaliação de tempo de trânsito dos animais. O tempo e a intensidade da intervenção exercício físico também podem ser pontos de debate. Nós optamos por exercícios de moderada intensidade pela possibilidade ser mais translacional posteriormente para a clínica e devido aos maiores riscos de efeitos negativos para o trato gastrointestinal em exercícios de alta intensidade.<sup>70</sup>

Por outro lado, são fortalezas deste estudo que merecem ser destacadas: Nós utilizamos um modelo de constipação intestinal relacionado à fisiopatologia mais comum desta condição em crianças, com redução da ingestão de fibras alimentares, sem uso de medicações obstipantes como utilizado na maioria dos estudos publicados em modelos animais.<sup>48, 63</sup> Pela primeira vez foi proposta uma intervenção terapêutica em animais submetidos a este modelo experimental da constipação induzida por dieta. Nosso estudo utilizou ratos recém-desmamados, simulando de forma mais adequada as condições da população pediátrica, iniciando o experimento com os animais possuindo 21 dias de vida, em fase de crescimento rápido. Além disso, nosso estudo obedeceu a metodologia experimental bastante regrada, baseada nos principais guias internacionais de experimentação animal com randomização e intervenções controladas.<sup>47,71</sup> A intensidade do exercício físico foi baseada em teste de esforço realizado previamente ao início da intervenção e foram avaliados desfechos funcionais intestinais e laboratoriais do microambiente colônico.

## **6. Conclusão**

Podemos concluir que o modelo animal de constipação induzida por dieta utilizado em nosso estudo é factível, de baixo custo e alta replicabilidade. Este modelo animal é capaz de promover alterações funcionais intestinais compatíveis com constipação em ratos recém-desmamados.

A intervenção exercício físico de moderada intensidade por 4 semanas não foi capaz de demonstrar impacto funcional intestinal nos animais submetidos ao modelo de constipação induzida por dieta e nos animais que receberam ração controle.

O exercício físico de moderada intensidade induziu melhora no perfil oxidativo nas amostras de cólon dos animais que foram submetidos ao modelo de constipação induzida por dieta, demonstrando um potencial efeito benéfico desta intervenção. Este potencial benefício e o papel fisiopatológico desta intervenção estimula a realização de novas pesquisas experimentais.

## 7. Referencias

1. Van den Berg M. M., Benninga M. A., Di Lorenzo C. Epidemiology of childhood constipation: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2006 Oct;101(10):2401-9. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00771. x. PMID: 17032205.
2. Bigélli R. H. M., Fernandes M. I. M., Galvão L. C. Constipação intestinal na criança. *Medicina (Ribeirão Preto)* [Internet]. 30 de junho de 2004 [citado 13 de novembro de 2023];37(1/2):65-7. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/473>
3. Ho J. M. D., How C. H. Chronic constipation in infants and children. *Singapore Medical Journal*. 2020 Feb;61(2):63-68. DOI: 10.11622/smedj.2020014. PMID: 32152637; PMCID: PMC7052003. Tran, 2023
4. Tran D. L., Sintusek P. Functional constipation in children: What physicians should know. *World J Gastroenterol*. 2023 Feb 28;29(8):1261-1288. doi: 10.3748/wjg.v29.i8.1261. PMID: 36925458; PMCID: PMC10011959.
5. Baaleman, D. F., Di Lorenzo, C., Benninga, M. A. et al. The Effects of the Rome IV Criteria on Pediatric Gastrointestinal Practice. *Curr Gastroenterol Rep* 22, 21 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11894-020-00760-8>
6. Hyams J. S, Di Lorenzo C., Saps M., Shulman R. J., Staiano A., van Tilburg M. Functional Disorders: Children and Adolescents. *Gastroenterology*. 2016 Feb 15: S0016-5085(16)00181-5. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.015. Epub ahead of print. PMID: 27144632.
7. Gontard V.A., Hussong J., Yang S. S., Chase J., Franco I., Wright A. Neurodevelopmental disorders and incontinence in children and adolescents: Attention-defcti/hyperactivity disorder, autismo spectrum disorder, and intelectual disability – A consensus document of the international children’s continence Society. *Neurology and urodynamics*, 2022; 41:102-114
8. Vriesman, M.H., Koppen, I.J.N., Camilleri, M. et al. Management of functional constipation in children and adults. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 21–39 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0222-y>Cummings 1991
9. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1991 Jun;70(6):443-59. doi: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb02739. x. PMID: 1938669.

10. Tomlin J, Read NW (1988) The relation between bacterial degradation of viscous polysaccharides and stool output in human beings. *Br J Nutr* 60:467–475
11. Sharma, A., & Rao, S. (2016). Constipation: Pathophysiology and Current Therapeutic Approaches. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 59–74. doi:10.1007/164\_2016\_111
12. Salvatore S, Battigaglia MS, Murone E, Dozio E, Pensabene L, Agosti M. Dietary Fibers in Healthy Children and in Pediatric Gastrointestinal Disorders: A Practical Guide. *Nutrients*. 2023 May 6;15(9):2208. doi: 10.3390/nu15092208. PMID: 37432354; PMCID: PMC10180776.
13. Inan, M., Aydiner, C. Y., Tokuc, B., Aksu, B., Ayvaz, S., Ayhan, S., ... Basaran, U. N. (2007). Factors associated with childhood constipation. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 43(10), 700–706. doi:10.1111/j.1440-1754.2007.01165.x
14. Tabbers MM, DiLorenzo C, Berger MY, Faure C, Langendam MW, Nurko S, Staiano A, Vandenplas Y, Benninga MA; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition; North American Society for Pediatric Gastroenterology. Evaluation and treatment of functional constipation in infants and children: evidence-based recommendations from ESPGHAN and NASPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Feb;58(2):258-74. doi: 10.1097/MPG.0000000000000266. PMID: 24345831.
15. Yi X, Zhou K, Jiang P, Deng N, Peng X, Tan Z. Brain-bacteria-gut axis and oxidative stress mediated by intestinal mucosal microbiota might be an important mechanism for constipation in mice. *3 Biotech*. 2023 Jun;13(6):192. doi: 10.1007/s13205-023-03580-5. Epub 2023 May 15. PMID: 37205176; PMCID: PMC10185723
16. Lee HJ, Choi EJ, Park S, Lee JJ. Laxative and antioxidant effects of ramie (*Boehmeria nivea* L.) leaf extract in experimental constipated rats. *Food Sci Nutr*. 2020 May 7;8(7):3389-3401. doi: 10.1002/fsn3.1619. PMID: 32724603; PMCID: PMC7382170.
17. Hajji N, Wannes D, Jabri MA, Rtibi K, Tounsi H, Abdellaoui A, Sebai H. Purgative/laxative actions of *Globularia alypum* aqueous extract on gastrointestinal-physiological function and against loperamide-induced constipation coupled to oxidative stress and inflammation in rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2020 Aug;32(8):e13858. doi: 10.1111/nmo.13858. Epub 2020 Apr 26. PMID: 32337785. ZANF 2021

18. Zhang X, Li N, Chen Q, Qin H. Fecal Microbiota Transplantation Modulates the Gut Flora Favoring Patients With Functional Constipation. *Front Microbiol.* 2021 Oct 7; 12:700718. doi: 10.3389/fmicb.2021.700718. PMID: 34690948; PMCID: PMC8529243.
19. Shatri H, Faisal E, Abdullah M, Syam AF, Utari AP, Muzellina VN, Nursyirwan SA, Lamuri A. Depression Symptoms and Inflammation in Chronic Functional Constipation Patients. *Acta Med Indones.* 2023 Jan;55(1):33-39. PMID: 36999263.
20. Metsios GS, Moe RH, Kitas GD. Exercise and inflammation. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2020 Apr;34(2):101504. doi: 10.1016/j.berh.2020.101504. Epub 2020 Apr 2. PMID: 32249021.
21. Docherty, S., Harley, R., McAuley, J.J. et al. The effect of exercise on cytokines: implications for musculoskeletal health: a narrative review. *BMC Sports Sci Med Rehabil* 14, 5 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13102-022-00397-2>
22. Nieman DC, Wentz LM. The compelling link between physical activity and the body's defense system. *J Sport Health Sci.* 2019 May;8(3):201-217. doi: 10.1016/j.jshs.2018.09.009. Epub 2018 Nov 16. PMID: 31193280; PMCID: PMC6523821.
23. Schuch FB, Vancampfort D. Physical activity, exercise, and mental disorders: it is time to move on. *Trends Psychiatry Psychother.* 2021 Jul-Sep;43(3):177-184. doi: 10.47626/2237-6089-2021-0237. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33890431; PMCID: PMC8638711
24. Klaus W. Lange, Yukiko Nakamura, Andreas Reissmann, Sport and physical exercise in sustainable mental health care of common mental disorders: Lessons from the COVID-19 pandemic, *Sports Medicine and Health Science*, Volume 5, Issue 2, 2023, Pages 151-155, ISSN 2666-3376,
25. Suzuki K. Chronic Inflammation as an Immunological Abnormality and Effectiveness of Exercise. *Biomolecules.* 2019 Jun 7;9(6):223. doi: 10.3390/biom9060223. PMID: 31181700; PMCID: PMC6628010.
26. Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *J Sport Health Sci.* 2020 Sep;9(5):415-425. doi: 10.1016/j.jshs.2020.04.001. Epub 2020 May 4. PMID: 32380253; PMCID: PMC7498668.

27. Tryfidou DV, McClean C, Nikolaidis MG, Davison GW. DNA Damage Following Acute Aerobic Exercise: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Med.* 2020 Jan;50(1):103-127. doi: 10.1007/s40279-019-01181-y. Erratum in: *Sports Med.* 2019 Oct 1;: PMID: 31529301; PMCID: PMC6942015.
28. Oettlé GJ. Effect of moderate exercise on bowel habit. *Gut.* 1991 Aug;32(8):941-4. doi: 10.1136/gut.32.8.941. PMID: 1885077; PMCID: PMC1378967.
29. Koffler KH, Menkes A, Redmond RA, Whitehead WE, Pratley RE, Hurley BF. Strength training accelerates gastrointestinal transit in middle-aged and older men. *Med Sci Sports Exerc.* 1992 Apr;24(4):415-9. PMID: 1560736.
30. Moses, FM O efeito do exercício no trato gastrointestinal. *Sports Med* 9, 159–172 (1990). <https://doi.org/10.2165/00007256-199009030-00004>
31. Song BK, Kim YS, Kim HS, Oh JW, Lee O, Kim JS. Combined exercise improves gastrointestinal motility in psychiatric in patients. *World J Clin Cases.* 2018 Aug 16;6(8):207-213. doi: 10.12998/wjcc. v6.i8.207. PMID: 30148149; PMCID: PMC6107534.
32. Camilleri M. Management Options for Irritable Bowel Syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2018 Dec;93(12):1858-1872. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.04.032. PMID: 30522596; PMCID: PMC6314474.
33. Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, Bittinger K, Chen J, Laughlin A, Grunberg S, Baldassano RN, Lewis JD, Li H, Thom SR, Bushman FD, Vinogradov SA, Wu GD. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology.* 2014 Nov;147(5):1055-63.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.020. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25046162; PMCID: PMC4252572.
34. Wu D, Cao W, Xiang D, Hu YP, Luo B, Chen P. Exercise induces tissue hypoxia and HIF-1 $\alpha$  redistribution in the small intestine. *J Sport Health Sci.* 2020 Jan;9(1):82-89. doi: 10.1016/j.jshs.2019.05.002. Epub 2019 May 9. PMID: 31921483; PMCID: PMC6943782.
35. Ruitong Gao, Yujia Tao, Changli Zhou, Jinwei Li, Xige Wang, Lei Chen, Feng Li & Lirong Guo (2019) Exercise therapy in patients with constipation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 54:2, 169-177, DOI: 10.1080/00365521.2019.1568544

36. Bilski et al. Physical Exercise in Prevention of Gastrointestinal Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, Vol. 24, No. 18
37. Hoffman-Goetz L, Pervaiz N, Guan J. Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF-alpha in intestinal lymphocytes. *Brain Behav Immun*. 2009 May;23(4):498-506. doi: 10.1016/j.bbi.2009.01.015. Epub 2009 Feb 4. PMID: 19486647.
38. Serrano Falcón B, Álvarez Sánchez Á, Diaz-Rubio M, Rey E. Prevalence and factors associated with faecal impaction in the Spanish old population. *Age Ageing*. 2017 Jan 12;46(1):119-124. doi: 10.1093/ageing/afw166. PMID: 28181648.
39. Seidenfaden S, Ormarsson OT, Lund SH, Bjornsson ES. Physical activity may decrease the likelihood of children developing constipation. *Acta Paediatr*. 2018 Jan;107(1):151-155. doi: 10.1111/apa.14067. Epub 2017 Sep 27. PMID: 28898506.
40. Asakura K, Masayasu S and Sasaki S. Risk factors for constipation in Japanese child . *Asia Pac J Clin Nutr* 2017;26(1):118-129
41. Tuteja AK, Talley NJ, Joos SK, Woehl JV, Hickam DH. Is constipation associated with decreased physical activity in normally active subjects? *Am J Gastroenterol*. 2005 Jan;100(1):124-9. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.40516. x. PMID: 15654791.
42. Santos A. B., Santos J. A., Silva A. I., Novaes L. C. M. G., Pereira K. N. F., Souza S. L., Leandro C. V. G, Castro. R. M. Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos wistar. *RESBCAL*, São Paulo, v.1 n.1, p. 121-129, 2012
43. SOUZA, J. S. Efeitos da adição do abacate na alimentação de ratos Wistar. *Caderno de Ciências Biológicas e da Saúde*, n.01, 2013.
44. Assis V. L. Ensaio farmacológicos pré-clínicos no trato digestório com um produto fitoterápico. Universidade Federal da Paraíba,2012
45. Rezende, C. M. T. F., Machado, N. C., Efeito do exercício e de fibras alimentares na produção e eliminação fecal de ratos em crescimento. *Revista Paulista de Pediatria*. V. 24, n. 4, p 351-355, 2006
46. Resolução Normativa CONCEA nº 22, de 25.06.2015. Disponível em [https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros\\_atos/resolucoes/migracao/Resolucao\\_Normativa\\_CONCEA\\_n\\_22\\_de\\_25062015.html](https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_22_de_25062015.html)
47. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F,

- Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020 Jul 14;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410. PMID: 32663219; PMCID: PMC7360023.
48. Kakino, M., Tazawa, S., Maruyama, H., Tsuruma, K., Araki, Y., Shimazawa, M., & Hara, H. (2010). Laxative effects of agarwood on low-fiber diet-induced constipation in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 1-8.
49. de Souza, SLB, Mota, GAF, Gregolin, CS et al. O treinamento físico atenua a cardiomiopatia cirrótica. *J. de Cardiovasc. Trad. Res.* 14, 674–684 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12265-020-09997-0>
50. Wang R, Tian H, Guo D, Tian Q, Yao T, Kong X. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. *J Sport Health Sci.* 2020 May;9(3):211-227. doi: 10.1016/j.jshs.2019.09.008. Epub 2019 Oct 28. PMID: 32444146; PMCID: PMC7242221.
51. Beretta, G. et al. Total antioxidant performance: A validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. [s.l.], v. 354, p. 290–298, 2006.
52. Nery C da S, Pinheiro IL, Muniz G de S, Vasconcelos DAA de, França SP de, Nascimento E do. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. *Rev Bras Med Esporte* [Internet]. 2011Jan;17(1):49–55. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1517-86922011000100010>
53. Li J, Sun Y, Wang R, Ma S, Shi L, Wang K, Zhang H, Wang T, Liu L. Seasonal differences in intestinal flora are related to rats' intestinal water metabolism. *Front Microbiol.* 2023 Feb 24;14:1109696. doi: 10.3389/fmicb.2023.1109696. PMID: 36910220; PMCID: PMC9999011.
54. Martins F, Campos DHS, Pagan LU, Martinez PF, Okoshi K, Okoshi MP, et al.. High-fat Diet Promotes Cardiac Remodeling in an Experimental Model of Obesity. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2015Nov;105(5):479–86. Available from: <https://doi.org/10.5935/abc.20150095>
55. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation, Editor(s): Sidney Fleischer, Lester Packer, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Volume 52, 1978, Pages 302-310, ISSN 0076-6879, ISBN 9780121819521, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).

56. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem.* 2014 Aug 1; 458:69-71. doi: 10.1016/j.ab.2014.04.034. Epub 2014 May 6. PMID: 24814294.
57. Loven DP, Schedl HP, Oberley LW, Wilson HD, Bruch L, Niehaus CL. Superoxide dismutase activity in the intestine of the streptozotocin-diabetic rat. *Endocrinology.* 1982 Sep;111(3):737-42. doi: 10.1210/endo-111-3-737. PMID: 7049672.
58. Ferro, C. de O., Chagas, V. L. A., Oliveira, M. F. de., Oliveira, P. L. de., & Schanaider, A.. (2010). Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. *Revista Do Colégio Brasileiro De Cirurgiões*, 37(1), 31–38.2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-69912010000100008>
59. Inatomi T, Honma M. Effects of probiotics on loperamide-induced constipation in rats. *Sci Rep.* 2021 Dec 16;11(1):24098. doi: 10.1038/s41598-021-02931-7. PMID: 34916548; PMCID: PMC8677781.
60. Wang YB, Ling J, Zhang WZ, Li G, Qiu W, Zheng JH, Zhao XH. Effect of bisacodyl on rats with slow transit constipation. *Braz J Med Biol Res.* 2018;51(7):e7372. doi: 10.1590/1414-431x20187372. Epub 2018 May 28. PMID: 29846410; PMCID: PMC5995042.
61. Harada Y., Iizuka S., Saegusa Y, Mogami S., Fujitsuka N., Hattori T. Mashiningan Improves Opioid-Induced Constipation. *J Pharmacol Exp Ther* 362:78–84, July 2017
62. Kraychete, D. C., Garcia, J. B. S., Siqueira, J. T. T. de., & .. (2014). Recommendations for the use of opioids in Brazil: Part IV. Adverse opioid effects. *Revista Dor*, 15(3), 215–223. 2014 <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20140047>
63. Li Z, Li X, Tang S, Gao Q, Li C, Chen P, Yue X, Fu R, Huang X, Zhang Y, Yang H, Yang B. *Moringa oleifera* Lam. Leaf improves constipation of rats induced by low-fiber-diet: A proteomics study. *J Ethnopharmacol.* 2024 Jan 10;318(Pt A):116936. doi: 10.1016/j.jep.2023.116936. Epub 2023 Jul 23. PMID: 37487963.
64. Jin S, Wijerathne CUB, Au-Yeung KKW, Lei H, Yang C, O K. Effects of high- and low-fiber diets on intestinal oxidative stress in growing-finishing pigs. *J Anim Sci.* 2022 Nov 1;100(11): skac306. doi: 10.1093/jas/skac306. PMID: 36104002; PMCID: PMC9667964.)
65. Grzybowska-Chlebowczyk U, Wysocka-Wojakiewicz P, Jasielska M, Cukrowska B, Więcek S, Książewska M, Chudek J. Oxidative and Antioxidative Stress Status in

- Children with Inflammatory Bowel Disease as a Result of a Chronic Inflammatory Process. *Mediators Inflamm.* 2018 Jun 11;2018:4120973. doi: 10.1155/2018/4120973. PMID: 30116148; PMCID: PMC6079420.
66. Zhou JF, Lou JG, Zhou SL, Wang JY. Potential oxidative stress in children with chronic constipation. *World J Gastroenterol.* 2005 Jan 21;11(3):368-71. doi: 10.3748/wjg.v11.i3.368. PMID: 15637746; PMCID: PMC4205339.
67. Wang JY, Wang YL, Zhou SL, Zhou JF. May chronic childhood constipation cause oxidative stress and potential free radical damage to children? *Biomed Environ Sci.* 2004 Sep;17(3):266-72. PMID: 15602823
68. França B. K., Alves M. R. M, Souto F. M. S., Tiziane L., R. F Boaventura, Adriana Guimarães, Antonio Alves, Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos, *GE Jornal Português de Gastreenterologia*, Volume 20, Issue 5, 2013, Pages 199-206, ISSN 0872-8178, <https://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>.
69. Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. de C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista De Nutrição*, 23(4), 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
70. Bonomini-Gnutzmann R, Plaza-Díaz J, Jorquera-Aguilera C, Rodríguez-Rodríguez A, Rodríguez-Rodríguez F. Effect of Intensity and Duration of Exercise on Gut Microbiota in Humans: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Aug 3;19(15):9518. doi: 10.3390/ijerph19159518. PMID: 35954878; PMCID: PMC9368618.
71. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition, National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. ISBN-13: 978-0-309-15400-0 ISBN-10: 0-309-15400-6