

JULIANA BUENO DE NOVAIS

Efeitos do transplante de microbiota intestinal de mulheres obesas submetidas à cirurgia bariátrica e exercício físico em camundongos: potenciais mecanismos

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011, a versão original está disponível na biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2025

JULIANA BUENO DE NOVAIS

Efeitos do transplante de microbiota intestinal de mulheres obesas submetidas à cirurgia bariátrica e exercício físico em camundongos: potenciais mecanismos

Tese apresentada à da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientadora: Prof. Dra. Fabiana Braga Benatti

SÃO PAULO
2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Novais, Juliana Bueno de

Efeitos do transplante de microbiota intestinal de mulheres obesas submetidas à cirurgia bariátrica e exercício físico em camundongos : potenciais mecanismos / Juliana Bueno de Novais; Fabiana Braga Benatti, orientador. -- São Paulo, 2025.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2025.

1.Cirurgia bariátrica 2.Exercício físico 3.Microbiota gastrointestinal 4.Obesidade 5.Modelos animais I.Benatti, Fabiana Braga, orient. II.Título

USP/FM/DBD-235/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos e proteção, por me guiar e sustentar nos momentos de incerteza.

Agradeço aos meus pais, Rosana e Novais, meus maiores incentivadores e melhor rede de apoio, por estarem sempre presentes, pelas palavras de encorajamento, por tantas refeições preparadas com zelo para me poupar tempo, por cuidarem tão bem do meu filho para que eu pudesse me dedicar a esse projeto. Sem vocês, eu nada seria.

Ao meu marido Paulo, pelo amor, companheirismo, generosidade, cuidado e dedicação dispendidos a mim e à nossa família.

Ao meu irmão Rodrigo, meus cunhados Larissa, Fernanda e Douglas, meus sogros Rita e Julio, pela amizade, por tornarem a caminhada mais leve, por se fazerem sempre presentes.

À minha sócia Raquel, pela compreensão e paciência com a minha ausência, pela amizade e palavras de incentivo e pela dedicação à nossa clínica, nossos clientes e pacientes.

À minha orientadora Dra. Fabiana Braga Benatti, pela oportunidade de desenvolver esse projeto, por todo apoio, ajuda, dedicação e por contribuir grandemente para meu crescimento pessoal, intelectual e acadêmico.

À toda a equipe do biotério da FMUSP, por toda a ajuda no decorrer do projeto, pelos conselhos e ensinamentos, sempre com bom humor e boa vontade.

Às técnicas de laboratório Viviane, Elaine e Margarete, pelo apoio, disponibilidade e orientação nas análises desse trabalho.

Ao Professor Dr. Guilherme Giannini Artioli, à Dra. Carolina Nicoletti Ferreira Fino, à Dra. Penélope Lacrísio dos Reis Menta e aos alunos Lucas e Rita de Cássia, pelas contribuições, ensinamentos, apoio e ajuda.

A todos os colegas do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Aplicada e Nutrição e em especial aos integrantes do “Poop Group”, Alisson e Marina, por todo o suporte, amizade, parceria e contribuição.

A Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por toda a infraestrutura, suporte e incentivo para o desenvolvimento da pesquisa científica de qualidade.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AKT	Serine-threonine kinase
AMPK	Protena quinase ativada por AMP
AS	AKT substrato
AUC	Area Under the Curve
CB	Cirurgia Bariátrica
CEUA	Comissão de ética em uso de animais
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DKK1	Dickkopf-1
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EUA	Estados Unidos da América
FIAF	Fator adiposo induzido pelo jejum
FMD	Flow-Mediated Dilation
FMT	Transplante de microbiota fecal
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GPR	Receptor Acoplado a Proteína G
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H&E	Hematoxilina e eosina
HOMA	Homeostase Model Assessment
IL	Interleucina
IRS	Insulin Receptor substrat
IMC	Índice de Massa Corporal
LPL	Lipoproteína lipase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MI	Microbiota Intestinal
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTUs	Operational Taxonomic Units
Ph	potencial Hidrogeniônico
PCR	Ponto de Compensação Respiratória
P1NP	Pró-colágeno tipo I N-pro-peptídeo
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
RNA	Ribonucleic Acid
RYGB	Roux-en-Y Gastric Bypass
SPF	Specific Pathogen Free
TMAO	Trimethylamine N-Oxide
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
OGTT	Teste Oral de Tolerância à Glicose
TLR-4	Toll Like Receptor-4
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alterações induzidas pela cirurgia bariátrica associada ou não ao exercício físico	13
Figura 2	Desenho Experimental.....	25
Figura 3	Crescimento ponderal dos animais dos grupos mRGYB, mRGYB+TF, mCTRL e mPDR entre os tempos 8SEM e 16SEM.....	33
Figura 4	Resposta glicêmica durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT) dos grupos mRGYB, mRGYB+TF, mCTRL e mPDR nos tempos 8SEM (A) e 16SEM (B). Área glicêmica abaixo da curva (AUC glicose) dos grupos (C) e respectivos deltas de mudanças (SEM 16 – SEM 8) (D).....	35
Figura 5	Graficos como média e desvio padrão da expressão tecidual das proteínas AKT e AS160 totais e fosforiladas em músculo esquelético nos grupos mRYGB, mRYGB+TF e mCTRL. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as variáveis analisadas ($p>0,05$).....	36
Figura 6	Graficos da expressão gênica de marcadores inflamatórios IL-6, IL-10, TNF- α e IL-1 β no tecido adiposo nos grupos mRYGB, mRYGB+TF e mCTRL. Dados baseados no Fold Change. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as variáveis analisadas ($p>0,05$).....	36
Figura 7	Fotomicrografias das principais características histológicas identificadas no grupo mRYGB, camundongo. A); B) Intestino Delgado. Infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (asterisco); 50 μ m; H&E. C) Intestino delgado. Achatamento de vilosidades (cabeça de seta); 50 μ m; H&E.....	37
Figura 8	Fotomicrografias das principais características histológicas identificadas no grupo mRYGB + TF, camundongo. A) e B) Intestino delgado. Hiperplasia da placa de peyer, focal (asterisco); 100 μ m; 50 μ m. C). Intestino delgado. Infiltrado inflamatório focal, discreto (cabeça de seta). 50 μ m; H&E	37
Figura 9	Fotomicrografias das principais características histológicas identificadas no grupo mCTRL, camundongo. A) Intestino delgado normal, 100x; H&E B) e C) Intestino delgado. Áreas de necrose apical de vilosidade (cabeça de seta) e áreas focais de achatamento de vilosidades (asterisco), 100x, H&E.....	39
Figura 10	Diagrama de Venn para o número total de gêneros entre FMT e amostras de fezes, em que T1 representa o momento 8SEM (pré transplante de microbiota) e T2 representa o momento 16SEM (pós transplante de microbiota).....	39
Figura 11	Medidas de α -diversidade nos grupos mRGYB + TF, mRGYB e mCTRL. T1 representa as amostras coletadas na 8SEM e T2 representa as amostras coletadas na 16SEM. Dados expressos como média e desvio padrão. * significam mudanças significativas ao longo dos pontos de tempo, dentro de cada grupo ($p<0,05$, calculadas por meio do teste de Wilcoxon ou Mann-Whitney, respectivamente). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Os pontos marrons representam a diversidade α - correspondente calculada na amostra de FMT.....	40

Figura 12	Diversidade beta baseada em PCoA das distâncias de Aitchison. As cores e trajetórias destacam as mudanças ao longo do tempo para cada indivíduo, enquanto os grupos são diferenciados pelos formatos dos pontos. Os resultados da PERMANOVA (para as amostras de T1 e T2) são apresentados no subtítulo. O eixo x foi truncado na parte central para melhorar a visualização das amostras de FMT, localizadas no lado esquerdo do gráfico. de todas as amostras. Quadrados em cores claras representam as amostras no momento basal (SEM8), triângulos em cores escuras representam as amostras no tempo SEM16. Pontos pretos representam as amostras originais utilizadas no transplante de microbiota fecal (FMT).....	42
Figura 13	Valores médios em escala centrada log-ratio (CLR $\pm$ intervalo de confiança de 95%) para os gêneros diferencialmente abundantes (DA) entre e/ou dentro dos GRUPOS antes (T1) e após 16 semanas (T2) do transplante fecal. Os asteriscos indicam mudanças significativas ao longo do tempo, dentro de cada grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os GRUPOS. Os pontos marrons representam os valores de CLR correspondentes calculados na amostra de FMT. a) Gêneros cujos valores de CLR no baseline (T1) foram significativamente menores do que os valores correspondentes em T2 em um ou mais grupos. b) Gêneros cujos valores de CLR no baseline (T1) foram significativamente maiores do que os valores correspondentes em T2 em um ou mais grupos.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados como média±desvio padrão. Legenda: AUC: Área abaixo da curva. * significa mPDR # mCTRL, mRYGB+TF e mRYGB (comparações entre grupos, $p<0,05$; calculado por meio da análise de modelo mistos de medidas repetidas).....	33
Tabela 2	Dados como média±desvio padrão, valor de P entre os grupos ou de interação grupo x tempo (calculado por meio da análise de modelo mistos de medidas repetidas). Dados com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes ($p<0,05$). Legenda: AUC: Área abaixo da curva.....	34
Tabela 3	Dados como média±desvio padrão, valor de P entre os grupos (calculado por meio da análise de modelo mistos de medidas repetidas). Dados com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes ($p<0,05$).....	37
Tabela 4	Morfometria das vilosidades e criptas intestinais dos diferentes grupos experimentais. Dados das médias ± desvio padrão para a altura e largura das vilosidades, profundidade das criptas e razão vilosidade/crípta (V/C) no intestino delgado dos animais dos grupos mCTRL, mRYGB e mRYGB+TF. Há diferença significativa entre os grupos para os valores de altura e largura de vilosidades e profundidade de cripta, enquanto razão v/c não apresentou diferenças estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	37
Tabela 5	Dados de escore inflamatório médio e desvio padrão. Escore de 0 a 5, sendo 0 correspondente a nenhuma alteração e 5 alteração inflamatória severa. Comparação entre grupos mCTRL, mRYGB e mRYGB+TF.....	38
Tabela 6	Dados expressos como média ± desvio-padrão. As comparações intragrupo e intergrupo foram calculadas utilizando, respectivamente, os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney. # indica $p\leq 0,05$ para comparações intragrupo.....	40
Tabela 7	Características com abundância diferencial para os contrastes envolvendo os grupos mRYGB e mRYBG+TF. Um valor negativo (marrom) indica que a característica está menos abundante no grupo indicado à esquerda do contraste em comparação ao outro grupo; um valor positivo (verde) indica que a característica está mais abundante no grupo à esquerda do contraste. Um quadrado vermelho ao redor de uma célula indica que o valor de p ajustado (correção de Benjamini-Hochberg) é menor que 0,1 para essa característica, naquela comparação específica.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Epidemiologia da obesidade	15
3.2 Obesidade e comorbidades	15
3.3 Cirurgia bariátrica e atividade física	16
3.4 Microbiota intestinal	18
3.5 Microbiota intestinal e obesidade.....	19
3.6 Microbiota intestinal, cirurgia bariátrica e atividade física.....	21
4 MÉTODOS	22
4.1 Animais experimentais e delineamento do estudo.....	22
4.2 Processamento e transplante de fezes	24
4.3 Avaliação da diversidade da microbiota intestinal	24
4.4 Teste de tolerância à glicose.....	26
4.5 Análise da concentração fecal de ácidos graxos de cadeia curta.....	26
4.6 Eutanásia e coleta de material biológico.....	27
4.7 Análise de insulina e marcadores inflamatórios.....	27
4.7.1 Nível de insulina sérica	27
4.7.2 Concentração de citocinas plasmáticas.....	28
4.8 Análise de composição corporal.....	28
4.9 Análise de músculo esquelético e tecido adiposo.....	29
4.9.1 Avaliação da expressão de genes e proteínas relacionadas à inflamação e às vias de sinalização da insulina.....	31
4.10 Avaliação morfológica e histológica do intestino.....	31
5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	32
6 RESULTADOS	32
7 DISCUSSÃO.....	44
8 CONCLUSÃO	49
9 REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Novais J B. Efeitos do transplante de microbiota intestinal de mulheres obesas submetidas à cirurgia bariátrica e exercício físico em camundongos: potenciais mecanismos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

A obesidade configura-se atualmente como um dos principais desafios de saúde pública em escala global. Nesse cenário, tanto a prática regular de atividade física quanto as cirurgias bariátricas são estratégias consolidadas para a redução de peso corporal. Sabe-se que a cirurgia bariátrica, em particular, promove alterações significativas na composição e diversidade da microbiota intestinal. Diversos estudos já evidenciaram a inter-relação entre a microbiota intestinal, a obesidade e comorbidades associadas, como a síndrome metabólica. O presente trabalho trata-se de um estudo de prova de conceito, inserido em uma linha de investigação que busca aprofundar o conhecimento acerca dos possíveis efeitos benéficos do exercício físico em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, utilizando abordagens moleculares e a análise de mecanismos fisiológicos subjacentes. Este estudo tem como objetivo avaliar a resposta metabólica de camundongos obesos submetidos ao transplante de microbiota intestinal oriunda de pacientes com obesidade após cirurgia bariátrica, com e sem a associação de treinamento físico, visando entender a adaptação e o papel da microbiota no metabolismo do indivíduo. Para tal, trinta e seis camundongos receberam dieta hiperlipídica por 8 semanas, tempo suficiente para o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina, e 12 camundongos receberam dieta padrão. Após esse período, os animais com dieta hiperlipídica foram randomizados em três grupos, recebendo: mRGYB (transplante de fezes coletadas de pacientes 9 meses após cirurgia bariátrica); mRGYB+TF (transplante de fezes coletadas de pacientes 9 meses após cirurgia bariátrica + treinamento físico); e mCTRL (transplante fecal de mulheres eutróficas). Os 12 animais com dieta padrão compuseram o grupo mPDR, sem transplante fecal. Antes e depois do transplante, os animais foram avaliados quanto ao peso corporal, tolerância à glicose, diversidade e composição da microbiota intestinal. Apenas após o transplante, os animais foram avaliados quanto à adiposidade, insulinemia de jejum e inflamação sistêmica. Além disso, tecido adiposo foi coletado para a avaliação da expressão gênica de citocinas inflamatórias, músculo esquelético foi coletado para a avaliação da expressão de proteínas relacionadas à sinalização insulínica e intestino foi coletado para avaliação morfológica. Os dados indicam efeito do treinamento físico na modulação da microbiota intestinal, redução da insulinemia de jejum, redução da inflamação e melhor morfologia funcional do intestino. Entretanto, não foram observadas alterações significativas no ganho de peso, adiposidade, marcadores inflamatórios ou concentração fecal de AGCC. Portanto concluímos que o exercício físico parece modular aspectos metabólicos transferíveis por meio de transplante fecal, de forma independente da cirurgia bariátrica, sugerindo papel relevante na melhoria da homeostase da glicose, mesmo sem efeitos aparentes sobre composição corporal ou inflamação sistêmica, possivelmente mediada por alterações morfológicas no intestino.

Descritores: Cirurgia bariátrica; Exercício físico; Microbiota gastrointestinal; Obesidade; Modelos animais.

ABSTRACT

Novais J.B. Effects of intestinal microbiota transplantation from obese women submitted to bariatric surgery and physical exercise in mice: potential mechanisms [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

Obesity currently represents one of the major public health challenges worldwide. In this context, both regular physical activity and bariatric surgery are well-established strategies for reducing body weight. Bariatric surgery, in particular, is well known to induce significant changes in the composition and diversity of the gut microbiota. Several studies have demonstrated the interrelationship between gut microbiota, obesity, and related comorbidities, such as metabolic syndrome. The present work is a proof-of-concept study that is part of a broader line of investigation aiming to deepen our understanding of the potential benefits of physical exercise in patients undergoing bariatric surgery, through molecular approaches and the analysis of underlying physiological mechanisms. This study aimed to evaluate the metabolic response of obese mice subjected to fecal microbiota transplantation (FMT) from female patients with obesity who had undergone bariatric surgery, with or without the addition of physical training. The goal was to investigate how the transplanted microbiota adapts to the new host and its role in metabolic regulation. To this end, thirty-six mice were fed a high-fat diet for eight weeks, a sufficient period for the development of obesity and insulin resistance, while twelve mice were kept on a standard diet. After this period, the high-fat-fed animals were randomized into three groups: mRYGB (receiving fecal matter from patients nine months post-bariatric surgery), mRYGB+TF (receiving fecal matter from the same patients plus physical training), and mCTRL (receiving fecal matter from eutrophic women). The twelve animals on a standard diet formed the mPDR group and did not undergo fecal transplantation. Before and after the fecal transplant, animals were evaluated for body weight, glucose tolerance, and gut microbiota diversity and composition. Only after the FMT, animals were further assessed for adiposity, fasting insulinemia, and systemic inflammation. In addition, adipose tissue was collected for the evaluation of inflammatory cytokine gene expression, skeletal muscle was collected for the evaluation of proteins related to insulin signaling, and intestinal tissue was collected for morphological analysis. The data indicate an effect of exercise training on gut microbiota modulation, reduction of fasting insulinemia, reduction of inflammation, and improved intestinal functional morphology. However, no significant changes were observed in body weight gain, adiposity, inflammatory markers, or fecal SCFA concentration. Therefore, we conclude that exercise training appears to modulate transferable metabolic aspects through fecal microbiota transplant, independently of bariatric surgery, suggesting a relevant role in improving glucose homeostasis, even in the absence of apparent effects on body composition or systemic inflammation, possibly mediated by morphological changes in the intestine.

Keywords: Bariatric surgery; Exercise; Gastrointestinal microbiota; Obesity; Animal models.

1 INTRODUÇÃO

O sobrepeso e a obesidade já são considerados uma pandemia global e figuram entre os principais desafios de saúde pública contemporâneos, dificultando a prevenção de doenças crônicas e comprometendo a saúde a longo prazo mundialmente¹. Nas últimas três décadas, fatores como crescimento econômico acelerado, industrialização, mecanização dos transportes, urbanização, adoção de um estilo de vida cada vez mais sedentário e a transição para padrões alimentares baseados em produtos ultraprocessados e dietas hipercalóricas têm impulsionado, em diversos países, um aumento significativo na prevalência da obesidade¹. De fato, a prevalência global de obesidade quase triplicou desde 1975. Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos apresentavam excesso de peso. Destes, mais de 650 milhões eram obesos ($\text{IMC} > 30 \text{ Kg/m}^2$)². De maneira ainda mais preocupante, estimativas indicam que a quantidade de pessoas com obesidade mórbida ($\text{IMC} > 40 \text{ Kg/m}^2$) tenha aumentado em até cinco vezes nos últimos 15 anos^{3,4}. No Brasil, dados recentes revelam que 54% da população acima dos 18 anos apresentam sobrepeso, e a obesidade já afeta 18,9% da população adulta, configurando um cenário alarmante para a saúde pública do país⁵.

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, sendo uma doença complexa, multifatorial, com origens genéticas, comportamentais, socioeconômicas e ambientais, que aumenta o risco de morbimortalidade^{1,6}, por doenças cardiovasculares, a saber, hipertensão arterial, doença coronariana, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial, diferentes tipos de câncer e outras doenças⁷⁻¹¹. A obesidade também é um forte desencadeador de diabetes mellitus, especialmente a do tipo 2, caracterizada por resistência à insulina, hiperinsulinemia e hiperglicemia, em consequência da falha das células beta em produzir insulina no pâncreas¹¹, aumentando assim os custos com a saúde pública e prejudicando a qualidade de vida, principalmente para os indivíduos com obesidade mórbida ($\text{IMC} > 40 \text{ Kg/m}^2$)¹².

Embora estratégias de tratamento comportamental, dietético e medicamentoso sejam amplamente implementadas, a cirurgia bariátrica é considerada hoje o principal tratamento para pacientes com obesidade grave¹³. De fato, a cirurgia bariátrica é efetiva na perda de peso corporal substancial (até 40% do peso corporal inicial)¹⁴ e melhora de diversas comorbidades associadas à obesidade, como resistência à insulina, diabetes mellitus (DM2), síndrome metabólica^{15,16}, hipertensão, inflamação^{17,18}, função endotelial¹⁹, dislipidemias e disfunção autonômica²⁰ até 12 meses após a cirurgia. Contudo, estudos com seguimentos mais longos (>12 meses pós-cirúrgicos), demonstram efeitos benéficos menos consistentes²¹. Isso sugere que a perda de peso e gordura corporais por si só pode não ser suficiente para melhorar o perfil cardiometabólico desses pacientes em longo prazo.

Nesse sentido, a prática de atividade física emerge como uma ferramenta terapêutica potencialmente interessante para o quadro clínico pós-cirúrgico do paciente obeso. Diversos são os efeitos benéficos da prática regular de exercícios físicos sobre os variados fatores de risco cardiovascular, como a diminuição da gordura abdominal visceral, de marcadores inflamatórios, além da melhora do perfil lipídico, da tolerância à glicose, da função endotelial, da capacidade cardiorrespiratória, da função autonômica e preservação de massa magra²⁰⁻²⁵, sendo capaz de reduzir o risco de mortalidade cardiovascular, independente do peso corporal e do IMC. Assim, a prática de exercícios físicos pode ser encarada como uma estratégia fundamental para pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, uma vez que os diversos efeitos protetores do procedimento parecem ser transitórios na ausência de mudanças do estilo de vida^{26, 27}.

Corroborando essa hipótese, em publicação na prestigiada revista científica “*Journal of the American College of Cardiology*”²⁶, nosso grupo observou que apesar da expressiva perda de peso e gordura corporais, as melhoras de diversos parâmetros cardiometabólicos observadas 3 meses após a cirurgia bariátrica em humanos, a saber, sensibilidade à insulina (avaliada por meio do teste de tolerância oral à glicose, que permitiu a avaliação da resposta insulínica - *area under the curve* [AUC] da insulina - em resposta a uma carga de glicose), função endotelial (avaliada por meio da dilatação mediada por fluxo, do inglês *flow-mediated dilation* [FMD]), e inflamação sistêmica (avaliada por meio das concentrações sanguíneas de citocinas anti- [e.g., IL-10] e pró-inflamatórias [e.g., TNF- α]), tenderam a regredir a níveis basais em até nove meses após o procedimento. Notavelmente, a adoção de um programa estruturado de exercícios físicos foi capaz de prevenir essa reversão dos benefícios metabólicos (Figura 1)²⁶.

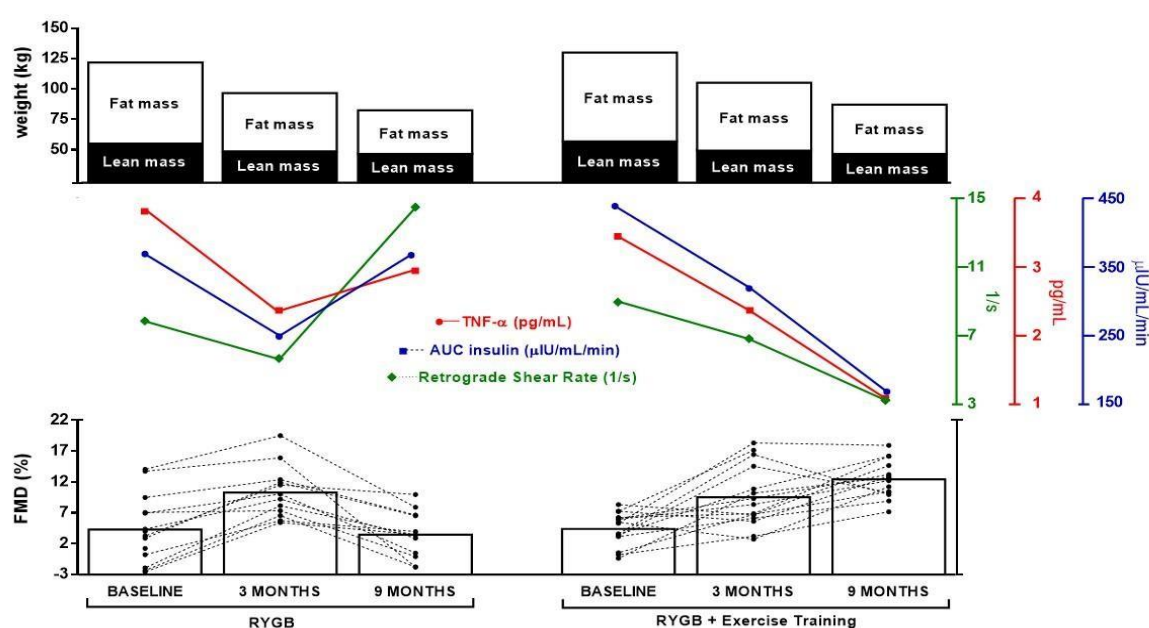


Figura 1. A figura. As alterações induzidas pela cirurgia (RYGB) associada ou não ao exercício físico (RYGB + Exercise Training) na função endotelial, sensibilidade à insulina e inflamação sistêmica, e independentes da perda de peso e gordura corporais²⁶.

Estes não são os primeiros dados que demonstram alterações de marcadores cardiometabólicos independentemente da perda de peso e gordura corporais em resposta à cirurgia bariátrica. A resistência à insulina e até mesmo o DM2 parecem ser benéficamente impactados de forma imediata após este tipo de cirurgia, na ausência de qualquer perda de peso^{28,29}. Isso sugere que outros fatores sejam responsáveis por estes efeitos.

Diversos estudos sugerem que alterações na diversidade da microbiota intestinal estão intimamente ligadas à obesidade e comorbidades associadas³⁰. Isso, pois a microbiota intestinal de indivíduos com obesidade parece, por exemplo, favorecer o armazenamento de energia proveniente da dieta na forma de gordura e a inflamação sistêmica³¹. Notavelmente, a cirurgia bariátrica parece exercer grande impacto na diversidade da microbiota, de modo que a composição do pós-operatória se aproxima daquela observada em pacientes com menos obesidade ou eutróficos^{12,32}. De forma importante, essas alterações parecem estar associadas às melhoras significativas na sensibilidade à insulina, e DM2 observadas após a cirurgia bariátrica³²⁻³⁸.

De forma interessante, dados recentes sugerem que o exercício físico também leva ao aumento da diversidade da microbiota intestinal. Estaki et al. demonstraram que a capacidade aeróbia estava positivamente correlacionada à maior diversidade da microbiota intestinal em adultos saudáveis³⁷. Além disso, Allen et al. demonstraram que seis semanas de exercício aeróbio, a depender da modalidade, levaram à alteração da diversidade da microbiota intestinal em pacientes obesos, tornando-a similar àquela de pacientes eutróficos³⁹. Nesse contexto, é possível especular que tal efeito poderia, mesmo que parcialmente, justificar o efeito cardiometabólico protetor promovido pelo treinamento físico observado nessas pacientes³⁷. Contudo, não há até o momento estudos experimentais que comprovem os benefícios do treinamento físico sobre a diversidade da microbiota intestinal de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica e sua implicação no metabolismo.

Buscando preencher essa lacuna, este estudo é uma prova de conceito em modelo animal utilizando amostras coletadas em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, no qual as participantes com alto grau de obesidade foram submetidas à cirurgia bariátrica pela técnica de derivação gastrointestinal e reconstrução em Y de Roux e então randomizadas em dois grupos: grupo submetido ao programa de treinamento físico após a cirurgia bariátrica e grupo não submetido ao treinamento físico após a cirurgia bariátrica. No período basal, três meses após a cirurgia bariátrica e seis meses após o treinamento físico (9 MESES), as voluntárias realizaram avaliações da diversidade da microbiota intestinal, composição corporal, sensibilidade à insulina, avaliação da capacidade física (condicionamento aeróbio e força muscular), nível de atividade física (por meio de acelerômetro), inflamação sistêmica, e avaliação nutricional. Assim, no

presente estudo utilizamos as amostras de microbiota intestinal dessas pacientes no momento 9 MESES em transplantes em camundongos obesos a fim de elucidar se a microbiota intestinal dos indivíduos do primeiro estudo é capaz de promover, em modelo animal, os benefícios cardiometabólicos conquistados por essas pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar se possíveis alterações na microbiota intestinal induzidas pelo treinamento físico em mulheres obesas submetidas à cirurgia bariátrica estão, de fato, associadas a fatores de risco cardiometabólicos, por meio de um ensaio experimental que envolverá o transplante de fezes das participantes do estudo em camundongos obesos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modular a microbiota intestinal de camundongos obesos após transplante fecal humano.
- Comparar os efeitos do transplante fecal de pacientes submetidas à cirurgia bariátrica, fisicamente ativas versus sedentárias, sobre a diversidade e composição da microbiota intestinal dos camundongos receptores.
- Investigar o impacto do transplante fecal sobre parâmetros metabólicos e na morfologia intestinal dos camundongos receptores.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Epidemiologia da obesidade

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como um acúmulo excessivo de gordura corporal, classificada usualmente pelo índice de massa corporal (IMC), que consiste na medição da altura e peso corporal do indivíduo pela fórmula: $\text{peso}/(\text{altura})^2$. Assim, a obesidade pode ser definida como $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ e a obesidade mórbida é definida como um $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ou maior que 35 kg/m^2 , incluindo fatores de risco cardiometabólico². Reflexo de mudanças em padrões comportamentais tais como redução dos níveis de atividades físicas e aumento do consumo de alimentos ricos em gorduras e carboidratos³⁸, a obesidade tem atingido proporções epidêmicas desde a década de 80³⁹. Em 2015 estimou-se que aproximadamente 1,6 bilhões de adultos ao redor do mundo apresentavam sobrepeso e, pelo menos, 400 milhões

estavam obesos. No Brasil, segundo a última pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), em 2024 a prevalência de sobrepeso e obesidade na população adulta era da ordem de 61% e 24%, respectivamente⁴⁰. Com base nesses números divulgados pela VIGITEL, que vêm aumentando desde 2006, a World Obesity Federation estima que o Brasil deverá ter, até 2030, quase 30% de sua população adulta com obesidade, se tornando a quarta nação com maior número absoluto de pessoas com excesso de peso no mundo, atrás somente dos Estados Unidos, China e Índia⁴¹.

3.2 Obesidade e comorbidades

A obesidade é definida pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (definição da OMS) e ocorre em decorrência de um desbalanço energético. De forma simplificada, quando o gasto energético é menor que o consumo, a energia excedente é estocada, em sua maioria, na forma de triglicerídeos contidos no tecido adiposo³⁸, entretanto, a fisiopatologia da obesidade parece ser multifatorial e resultado de uma complexa relação entre fatores biológicos, psicossociais e comportamentais⁴².

É amplamente conhecido que a obesidade eleva o risco de incidência de várias enfermidades, e as agrava, como diabetes tipo 2, doenças cardiopulmonares, dislipidemia, hipertensão arterial, osteoartrite, apneia do sono e alguns tipos de neoplasias, que resultam na redução da expectativa de vida^{43,44}. Nos últimos anos, vimos a obesidade como o segundo principal fator de risco, depois do fator etário, para complicações e mortalidade em pacientes com COVID-19⁴⁵. Esses fatores explicam a grande preocupação médica em relação à expansão da obesidade, observado o ônus elevado que esta condição gera ao sistema público de saúde, tornando urgente medidas de prevenção e tratamento desta condição clínica⁴⁵.

3.3 Cirurgia bariátrica e atividade física

Tratamentos para a obesidade visam gerar déficit energético suficiente para promover duradoura perda de peso e redução dos riscos e comorbidades associados. Abordagens não cirúrgicas incluem dietas de baixa caloria, alterações comportamentais, programas de atividade física e agentes farmacológicos⁴⁶. Bons resultados podem ser alcançados com acompanhamento profissional e um grande comprometimento do paciente com uma mudança permanente de estilo de vida, entretanto, na maioria dos casos, os tratamentos clínicos são pouco eficientes no longo prazo, culminam no reganho de peso e podem implicar na piora do estado psicológico pela sensação de fracasso por parte do paciente⁴⁷.

A abordagem cirúrgica tem se consolidado ao longo dos anos como um método importante e eficaz para o tratamento de paciente com obesidade severa, quando o tratamento clínico como dieta hipocalórica, exercício físico e terapia farmacológica, são insuficientes em promover uma redução significativa do peso corporal⁴⁷.

A cirurgia bariátrica promove a redução do consumo calórico através de uma modificação anatômica do trato gastrointestinal. Dentre as várias técnicas desenvolvidas, a gastroplastia com derivação em Y de Roux (ou *bypass* gástrico - RYGB) consolidou-se ao longo do tempo, sendo atualmente considerado o procedimento “padrão ouro” e o mais realizado no Brasil nas últimas décadas^{12,13}. O procedimento consiste na criação de uma pequena bolsa gástrica, com capacidade entre 15 a 30 ml, a partir do fundo do estômago. A porção distal do estômago e o intestino delgado proximal são desviados por meio da fixação da extremidade distal do jejuno médio à bolsa gástrica proximal, seguida de reconexão de ductos biliar e pancreático em um ponto específico do intestino delgado. Essa cirurgia provoca alterações na exposição ao ácido no estômago e no intestino delgado proximal, restringe a quantidade e os tipos de alimentos que podem ser ingeridos sem ocasional desconforto, induz um grau moderado de má absorção de nutrientes devido ao encurtamento funcional do intestino delgado e pode levar à redução da motilidade intestinal. Em conjunto, esses efeitos resultam em uma maior redução do peso corporal comparado a outras abordagens cirúrgicas^{13,15,48}.

Buchwald demonstrou em uma revisão sistemática e meta-análise que, após o *bypass* gástrico, 95% dos pacientes com hipercolesterolemia, 87% dos pacientes com hipertensão, e 95% dos pacientes com apneia obstrutiva do sono apresentaram melhora ou completa resolução da condição, além de prover grande impacto positivo na qualidade de vida desses pacientes¹⁵. Em um estudo que acompanhou pacientes submetidos à cirurgia bariátrica durante 10 anos, L. Sjöström observou importante redução dos índices de doença cardiovascular, câncer e mortalidade em geral, quando comparado ao grupo submetido ao tratamento clínico para obesidade¹⁶.

Apesar da melhora metabólica observada em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, a sensibilidade à insulina desses indivíduos permanece menor do que a de indivíduos eutróficos e metabolicamente saudáveis, mesmo passados meses do procedimento cirúrgico e após uma redução massiva de peso^{49,50}; este mesmo padrão é observado em estudos utilizando modelo animal⁵¹. Um número significativo de pacientes bariátricos apresenta reganho de peso e até recorrência de comorbidades à longo prazo⁵². Redução de densidade óssea e de massa muscular (sarcopenia) também são comumente observadas, e podem ser ainda mais relevantes em pacientes idosos, implicando em redução da mobilidade, piora em quadros de osteoporose, e consequentemente, declínio na qualidade de vida⁵⁰.

Atividade física é uma ferramenta não farmacológica capaz de aumentar a expressão e atividade de enzimas oxidativas e induz mudanças bioquímicas e morfológicas que resultam em melhora metabólica²⁹. Embora o exercício físico de maneira isolada não seja capaz de levar a diminuição substancial de peso corporal, há cada vez mais evidência de que um programa de atividade física tem o potencial não apenas de melhorar alguns dos benefícios da cirurgia bariátrica, destacando-se como uma importante ferramenta na manutenção dos ganhos cardiometabólicos resultantes do procedimento, mas também reduzir alguns dos seus efeitos indesejados^{26,27,50-53}.

Nesse sentido, o Grupo de Pesquisa em Fisiologia Aplicada e Nutrição da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, se empenha em elucidar os potenciais benefícios do exercício físico a saúde de pacientes submetidas a cirurgia bariátrica. Em resultados já publicados, o Grupo foi capaz de demonstrar que um programa de atividade física aliado à cirurgia bariátrica promove melhora da função endotelial²⁶, aumento na sensibilidade à insulina⁵³, redução da perda de massa óssea²⁷ redução da inflamação sistêmica através da regulação de marcadores pró e anti-inflamatórios (citocinas, IL-1 β e TNF- α)²⁶. Assim, a manutenção dos resultados clínicos da cirurgia bariátrica a longo prazo parece ser dependente de mudanças do estilo de vida⁵⁴.

3.4 Microbiota intestinal

O corpo humano é habitado por uma extensa rede de organismos microbianos considerados essenciais para a manutenção das funções vitais e que está, de maneira complexa e dinâmica, envolvida em diversos processos fisiológicos, como a digestão, o metabolismo, a proteção contra patógenos e a modulação do sistema imunológico^{55,58,59}. O número de micro-organismos no corpo humano chega a ser da mesma ordem que o número de células humanas e, em sua maioria, encontram-se no trato gastrointestinal^{56,57}.

A microbiota intestinal (MI) de um indivíduo é formada logo no nascimento, proveniente da microbiota materna, e o acompanhará por toda vida; sua composição inicial pode ser influenciada por fatores como meio de nascimento (parto vaginal ou cesariana) e a forma de alimentação (amamentação ou fórmula), é mais suscetível a variações durante a primeira infância, tornando-se mais estável a partir de 2 a 3 anos de idade, quando pode ser comparada à microbiota do indivíduo adulto⁶⁰. Trata-se de um ecossistema altamente complexo que coexiste de maneira comensal e simbiótica com o hospedeiro⁵⁹ e sua dinâmica é fortemente influenciada por fatores como enfermidades, dieta, hábitos e exposição a antibióticos ao longo da vida⁵⁸.

A MI humana é composta por 5 filos: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, e Verrucomicrobia, sendo que Bacteroidetes e Firmicutes (Gram-positivas) correspondem a 90% do total de bactérias³². Mais especificamente, na maioria dos adultos saudáveis, a distribuição da microbiota é composta por: Bacteroidetes (23%), bactérias Gram-negativas anaeróbias, que compreende os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*; Firmicutes (64%), bactérias Gram-positivas, que inclui *Bacilli*, *Clostridia* e *Mollicutes* (substancialmente *Streptococcus* e *Clostridium*); Proteobacteria (8%), bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*; Fusobacteria, Verrucomicrobia e Actinobacteria (3%) que incluem espécies como *Bifidobacterium*^{39,55}.

Ao longo das últimas décadas, diversos estudos têm apontado um importante papel da MI tanto no status de saúde do hospedeiro quanto em diversas patologias; e, de fato, há evidências do envolvimento da microbiota intestinal na etiologia da obesidade e comorbidades relacionadas^{32,61-63}.

3.5 Microbiota intestinal e obesidade

Diversos trabalhos têm tentado esclarecer a complexa dinâmica entre a estrutura microbiana e a adiposidade do hospedeiro⁶⁴. É sabido que o hospedeiro e os microorganismos que formam a MI co-evoluíram para se beneficiar mutuamente³², e nesse contexto, a dieta consumida pelo hospedeiro provê nutrientes e energia para ambos. A microbiota intestinal é capaz de metabolizar componentes da dieta, como fibras e oligossacarídeos, que, de outra maneira, não poderiam ser digeridos, convertendo-os através da fermentação em monossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), predominantemente acetato, butirato e propionato, podendo, assim, serem rapidamente absorvidos pela mucosa intestinal e transformados em lipídios pelo fígado⁶⁴. Evidências científicas apontam que estes produtos da metabolização microbiana estão envolvidos na patogênese da obesidade, uma vez que uma microbiota com maior capacidade de extrair e armazenar energia fornecida pela alimentação pode estar associada à tendência de depósito de gordura e obesidade, especialmente em indivíduos com desequilíbrios metabólicos quando em comparação a indivíduos magros.^{32,57,65}

Entre os principais AGCCs, o acetato e o propionato são majoritariamente produzidos pelo filo *Bacteroidetes*, enquanto as principais espécies produtoras de butirato pertencem a um grupo de Firmicutes³². Diversos estudos demonstram a rápida resposta da MI a alterações no padrão da dieta, favorecendo determinados gêneros de bactérias. Nesse sentido, a ingestão de carboidratos não digeríveis fermentáveis, como em dietas com alto teor de fibras, estimula o crescimento de bactérias produtoras de butirato e, conseqüentemente, elevam os níveis

plasmáticos dessa substância.⁶³ Curiosamente, publicações mais antigas sugerem que níveis elevados de butirato no plasma parecem exercer um efeito positivo na atividade mitocondrial, além de prevenir a endotoxemia, melhorar a sensibilidade à insulina, reforçar a função da barreira intestinal, proteger contra o ganho de peso e aumentar o gasto energético em modelos animais de obesidade induzida por dieta^{66,67,70}. Por sua vez, o propionato tem a capacidade de inibir a síntese de colesterol, reduzir a expressão de resistina pelos adipócitos e estimular a produção de leptina, um hormônio que regula a sensação de saciedade. No entanto, dietas ricas em gordura favorecem o crescimento de bactérias fermentadoras, como o *Clostridium* spp e algumas Bacterioidetes produtoras majoritariamente de acetato. O acetato tem um maior potencial obesogênico, pois atua no fígado como substrato para a lipogênese e síntese de colesterol, e nos tecidos periféricos favorecendo o armazenamento de gordura^{64,67}.

De fato, múltiplos mecanismos independentes e inter-relacionados têm sido identificados em relação ao envolvimento da MI na patogênese da obesidade. Ainda em relação à dieta, a ingestão de altos níveis de gordura saturada, açúcares e pobres em fibras estão associadas a uma microbiota menos diversa e com perfil pró-inflamatório, com redução de bactérias benéficas e aumento de gram-negativas^{32,65,70}. A disbiose intestinal observada na obesidade favorece a quebra da barreira epitelial intestinal, resulta em um aumento da permeabilidade da parede intestinal, facilitando a translocação bacteriana e uma maior absorção de lipopolissacarídeos (LPS), produto da lise de bactérias gram-negativas, e consequente levando à endotoxemia metabólica, que contribui para a ativação de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6, promovendo inflamação crônica, resistência à insulina e agravando o quadro metabólico^{65,68,69}.

A microbiota intestinal não apenas responde à dieta, mas também influencia o comportamento alimentar por meio de sinalizações para centros hipotalâmicos responsáveis pelo controle do apetite^{66,70}. A MI pode suprimir a expressão do fator adiposo induzido pelo jejum (*fasting-induced adipose factor* – FIAF), reduzindo a inibição da lipoproteína lipase (LPL) e, como consequência, ocorre um aumento da atividade da LPL, promovendo maior captação de ácidos graxos e acúmulo de triacilgliceróis nos adipócitos.⁷⁰ Esse eixo de comunicação, chamado de eixo intestino-cérebro (Gut-Brain Axis), também é mediado por metabólitos bacterianos, uma vez que os AGCC podem ativar receptores acoplados à proteína G, como o GPR41 e GPR43, promovendo a liberação de hormônios intestinais, como o peptídeo YY e o GLP-1 (glucagon-like peptide-1), que regulam a motilidade intestinal e contribui para a sensação de saciedade, e cuja secreção frequentemente está reduzida em indivíduos obesos e com diabetes tipo 2, o que compromete a regulação da glicemia e o controle do apetite.^{66,71} Outro componente deste eixo é a leptina, um hormônio produzido principalmente pelos adipócitos e que atua no hipotálamo regulando a saciedade e o gasto energético. A leptina inibe neuropeptídeos que estimulam o

apetite (como NPY e AgRP) e ativa aqueles que promovem a saciedade (como POMC), reduzindo a ingestão alimentar. Apesar dos altos níveis circulantes de leptina em indivíduos com obesidade, a resistência à leptina é comum, o que compromete sua ação e contribui para o ganho de peso persistente⁶⁷.

Destaca-se também a influência direta da microbiota sobre as vias insulínicas. A disbiose associada à obesidade e ao consumo de dietas ricas em gordura promove endotoxemia metabólica, com ativação do TLR4 e inibição da fosforilação de IRS-1, comprometendo a via PI3K/Akt responsável pela captação de glicose nos tecidos periféricos^{68,114}. A redução de bactérias produtoras de butirato e propionato agrava esse quadro, uma vez que esses AGCC ativam receptores GPR^{41/43}, estimulam AMPK e promovem a secreção de GLP-1, todos fundamentais para a sensibilidade insulínica e homeostase glicêmica^{39,121}. No fígado, a resistência insulínica seletiva resultante da disbiose mantém a lipogênese ativa via SREBP-1c, mas falha em suprimir a secreção de VLDL, contribuindo para hipertrigliceridemia e esteatose hepática¹³⁰. Por outro lado, espécies como *Akkermansia muciniphila* e Christensenellaceae reforçam a barreira intestinal, reduzem inflamação e favorecem a sinalização adequada da insulina^{115,116}. Ensaios recentes ainda mostram que a transferência de microbiota de indivíduos fisicamente ativos melhora a tolerância à glicose em camundongos receptores, reforçando o papel causal da microbiota nas vias insulínicas¹¹⁷.

Notavelmente, a microbiota intestinal também atua por mecanismos epigenéticos, modulando a expressão gênica do hospedeiro. Há evidências de que os metabólitos bacterianos influenciam a metilação do DNA e a regulação de microRNAs, afetando a expressão de genes ligados à lipogênese e à sensibilidade à insulina⁷² e também por inibirem enzimas chamadas histona desacetilases (HDAC), promovendo a acetilação de histonas e facilitando a transcrição de genes envolvidos no metabolismo energético e na resposta inflamatória⁷³. Essas alterações epigenéticas podem ocorrer ainda durante o desenvolvimento fetal, influenciadas pela microbiota materna e dieta, sendo até mesmo transmissíveis entre gerações⁷². Assim, compreender a interação entre dieta, microbiota e metabolismo é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes no combate à obesidade e suas comorbidades.⁷⁴

3.6 Microbiota, cirurgia bariátrica e exercício físico

A cirurgia bariátrica, como abordado anteriormente, é considerada um tratamento eficaz contra a obesidade e doenças relacionadas^{15,46}, e implica em importantes alterações estruturais e funcionais do trato digestivo. E indivíduos obesos submetidos ao RYGB, melhorias metabólicas podem ser observadas já na primeira semana após o procedimento, antecedendo uma perda de

peso significativa⁷⁵. Tais efeitos precoces e independentes da perda ponderal podem estar associados a rápidas alterações na composição da MI. Estudos demonstram que a cirurgia bariátrica altera significativamente a composição da microbiota, resultando em aumento da proporção de Bacteroidetes acompanhado de uma redução proporcional nos níveis de Firmicutes⁵⁷, promovendo maior diversidade microbiana; e tais mudanças parecem contribuir para a perda de peso, redução da inflamação sistêmica e melhora na sensibilidade à insulina dos pacientes^{65,76}. Para além da resposta da MI à restrição dietética imposta pelo procedimento cirúrgico, uma das hipóteses para essas alterações observadas é que no RYGB a transposição do intestino delgado leva à uma realocação dos micro-organismos desta região para o cólon, o que, por consequência, modifica o ecossistema intestinal e sua composição microbiana, e impacta funções digestivas e metabólicas⁷⁵. A redução da acidez gástrica e o trânsito mais rápido devido à modificação do comprimento do intestino delgado também parecem favorecer o crescimento de anaeróbios facultativos, que fermentam carboidratos complexos; acompanhado de redução acentuada de Firmicutes, especialmente de microrganismos envolvidos na fermentação de polissacarídeos e extração de energia em indivíduos obesos⁷⁶.

Alterações na composição da microbiota intestinal também podem contribuir para uma maior liberação hormonal, como já abordado anteriormente. A fermentação aumentada de oligossacarídeos está associada à maior produção dos hormônios intestinais GLP-1 e PYY, que contribuem para a saciedade e secreção de insulina.⁷⁷ A produção intestinal de ácido gama-aminobutírico (GABA) por microrganismos intestinais também foi observada após o RYGB, estimulando também a secreção de GLP-1 e PYY⁷⁸.

Apesar dos efeitos benéficos, o RYGB também pode induzir alterações desfavoráveis, como o aumento de bactérias potencialmente patogênicas (*Escherichia coli*) e a redução de espécies benéficas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*⁷⁹.

Pesquisas sugerem que a atividade física interfere na microbiota intestinal através da fisiologia digestiva, acelerando o trânsito gastrointestinal, e também através de seus efeitos antiinflamatórios⁷⁸⁻⁸³. Estudos realizados em humanos e em modelo animal já demonstraram que a atividade física impacta positivamente a microbiota intestinal, levando à maior diversidade de microbiota e alterando a proporção Firmicutes/Bacteroidetes, que por sua vez, corroboram com a manutenção do peso e melhora das comorbidades associadas à obesidade^{78,82}. Essas descobertas apontam para a complexidade das interações entre a microbiota intestinal e o metabolismo humano, oferecendo novas perspectivas para o entendimento e possível tratamento da obesidade e doenças metabólicas associadas.

As evidências de que pacientes bariátricos que mantêm uma rotina de atividade física tem os benefícios da cirurgia aumentados e ainda sustentados a longo prazo tem levado nosso grupo de pesquisa à olhar para sua possível implicação junto a microbiota intestinal desses pacientes.

Muitos processos fisiológicos relacionados à obesidade podem ser mais facilmente estudados em roedores uma vez que esses animais respondem rapidamente a alterações no balanço energético^{84,85}, e não esbarram em algumas limitações clínicas e éticas do estudo do tecido adiposo em humanos. Portanto, esse estudo visa explorar em modelo animal o papel da microbiota intestinal e o efeito do exercício físico combinado à cirurgia bariátrica.

4 MÉTODOS

4.1 Animais experimentais e delineamento do estudo

Conduzimos um ensaio experimental de prova de conceito, no qual foram utilizados 48 camundongos C57BL6 SPF, fêmeas, desmamadas, provenientes do biotério da FMUSP, por se tratar de uma linhagem de camundongos comumente utilizada em estudos de obesidade e resistência à insulina induzidas por dieta⁵⁶. Este ensaio experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob protocolo n° 1778/2022.

Ao chegarem ao Biotério da FMUSP, os animais passaram por um período de aclimação de uma semana, recebendo dieta padrão e água *ad libitum*. Após a primeira semana, 36 animais foram submetidos a uma dieta hipercalórica, manufaturada pela Rhostrer Indústria e Comércio LTDA (Araçoiaba da Serra, São Paulo) por um período de 8 semanas, tempo suficiente para que desenvolvessem obesidade e resistência insulínica⁸⁵. Paralelamente, 12 animais permaneceram recebendo a dieta padrão (mPDR), com o objetivo de estabelecer um grupo para comparação, assegurando a verificação do ganho de peso superior nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e o desenvolvimento de resistência à insulina. Ademais, todos os animais receberam água *ad libitum* e ficaram alocados em micro-isoladores no biotério da FMUSP, evitando possíveis contaminações de microbiota entre os grupos.

Para este estudo, recorreremos à um banco de amostras do Laboratório de Fisiologia Aplicada e Nutrição da FMUSP. Selecionamos amostras fecais de pacientes do HCFMUSP, com obesidade, do gênero feminino, 9 meses após serem submetidas à cirurgia bariátrica pela técnica de derivação gastrointestinal e reconstrução em Y de Roux (RGYB); pacientes que, além do procedimento cirúrgico, participaram de um programa de treinamento físico com seis meses de duração (RGYB+TF) e de mulheres eutróficas (CTRL). Foi realizado pool com as amostras fecais

de cada um dos grupos, parte deste pool foi armazenado em microtubos contendo solução estabilizante estéril para posterior análise da diversidade da microbiota intestinal, e parte em tubos com solução salina e 10% de glicerol para posterior processamento e utilização para o transplante de fezes. As amostras foram aliquotadas e acondicionadas em freezer a -80°C até utilização.

Após as 8 semanas recebendo dieta hipercalórica (8SEM), os animais obesos foram randomizados em três grupos experimentais: mRGYB – grupo que recebeu o transplante de pool de fezes das pacientes do grupo RGYB; mRGYB+TF - grupo que recebeu o transplante de pool de fezes das pacientes do grupo RGYB+TF e mCTRL - grupo controle, que recebeu transplante do pool de fezes coletadas de mulheres eutróficas. Oito semanas após o transplante (16 SEM), os animais foram avaliados quanto à sensibilidade à insulina por meio dos testes de tolerância à glicose (OGTT) e diversidade da microbiota intestinal. Subsequentemente, foram sacrificados para coleta de material biológico. Foram coletados *pads* de gordura visceral para análise de adiposidade e expressão de genes relacionados à inflamação; sangue para as análises de inflamação sistêmica e insulinemia; biópsias intestinais para avaliação morfológica, músculo esquelético para análise de proteínas relacionados à inflamação e sensibilidade à insulina (Figura 2).

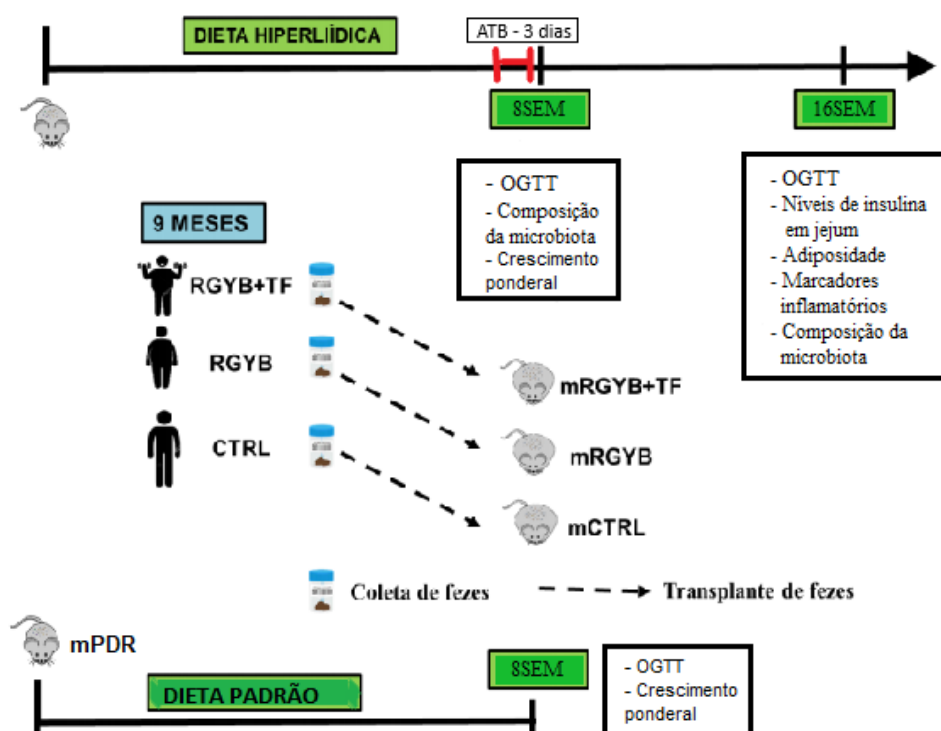


Figura 2. Desenho experimental

4.2 Processamento e transplante de fezes

As amostras de fezes, selecionadas do um banco de amostras, foram combinadas em pools de fezes por grupo (RGYB, RGBY+TF, CTRL). O pool referente à cada grupo foi então homogeneizado em solução salina estéril acrescida de 10% de glicerol e filtrados em peneira de aço inox, de modo a gerar uma pasta fecal que foi aliquoteada em microtubos de 2ml e mantidos em freezer a -80°C para posterior utilização⁵⁶. Durante 3 dias antes do início do transplante de fezes, os animais receberam um mix de 5 antibióticos (gentamicina, ampicilina, metronidazol, neomicina e vancomicina) (sigma M3761, A0166, N6386, v2002) administrados na água de beber, de modo a reduzir a microbiota existente e garantir a recolonização com a microbiota transplantada⁵⁷. A partir do 4º dia, os animais passaram a receber gavagem oral com 0,1 ml da pasta fecal bissemanalmente⁵⁷.

4.3 Avaliação da diversidade da microbiota intestinal

A avaliação da diversidade da microbiota intestinal foi realizada nos momentos 8SEM e 16SEM, conforme descrito abaixo.

Sequenciamento de última geração

A identificação de bactérias foi conduzida por meio de sequenciamento de última geração das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. As bibliotecas foram preparadas de acordo com um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). A amplificação foi realizada com primers para a região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F com sequência (CCTACGGGGRSGCAGCAG), e 806R com sequência (GGACTACHVGGGTWTCTAAT)^{86,87}. As bibliotecas foram então sequenciadas utilizando o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). As sequências foram analisadas por meio do pipeline Sentinel, no qual os arquivos fastq são avaliados quanto à qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8⁸⁸. A seguir, os arquivos fastq foram submetidos à trimagem de primers e sequências com baixa qualidade (Phred < 20). O software proprietário 41 (Empresa Neopropecta) utilizado para tal finalidade, foi construído em Python v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto BioPython⁸⁹. Para dados paired-end, dois pares de arquivos (R1 e R2) foram unidos em um só arquivo usando pandaseq v.2.11,⁹⁰ antes da etapa de trimagem. Clusters com abundância menor do que 5 foram removidos das análises, por geralmente estarem relacionadas a sequências quimeras⁹¹. As identificações taxonômicas foram realizadas por meio do algoritmo blastn v.2.6.0+⁹², tendo como referência um banco de dados proprietário ou público. Quanto à definição de uma espécie, dentre os 20 hits retornados para cada cluster, uma instrução em

Python avalia se um dos três quesitos seriam atendidos pelos hits: 1) maior bit-score; 2) menor e-value; e 3) taxonomias com maior representação. As espécies são definidas utilizando 99% de identidade.

Análise dos resultados do sequenciamento

Após o sequenciamento, as sequências geradas pela plataforma Ion PGM Torrent foram filtradas por meio do software Torrent Browser, com o objetivo de remover leituras policlonais ou de baixa qualidade. Os arquivos resultantes foram processados no software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME), versão 1.9.1, sendo descartadas as sequências com comprimento inferior a 50 pares de bases. Utilizando o algoritmo UCLUST, as leituras remanescentes foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (Operational Taxonomic Units – OTUs), com base em 97% de similaridade. A classificação taxonômica das OTUs foi realizada no próprio QIIME, tendo como referência o banco de dados Ribosomal Database Project. Como resultado, foram geradas árvores filogenéticas no formato padrão Newick, por meio de ferramentas contidas no pacote QIIME. Para avaliar a diversidade da microbiota em cada amostra, foram calculados os índices α de diversidade, como o índice de diversidade de Shannon⁹³ e as espécies observadas (i.e., OTUs observados). Para avaliar as comunidades microbiais ao nível OTU, índices β de diversidade foram calculados com base na matriz de distância UniFrac⁹⁴ e nas matrizes de dissimilaridade Bray-Curtis⁹⁵. Também demonstramos as similaridades ou dissimilaridades entre as amostras analisadas através da análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na matriz de distância UniFrac. Além disso, o experimento como um todo foi analisado utilizando uma abordagem de modelo de regressão de efeitos mistos. Os animais foram usados como efeito aleatório, enquanto os momentos de avaliação (8 SEM e 16 SEM), grupos (mRYGB + TF; mRYGB e mCTRL) e as interações entre grupos e momentos de avaliação foram usados como efeitos fixos. Também foram realizadas comparações relevantes entre momentos de avaliação ou entre grupos, que foram avaliadas individualmente por uma coleção de métodos de análise de abundância diferencial: Maaslin2⁹⁶, linDA⁹⁷, ANCOMBC⁹⁸, edgeR⁹⁹, DESeq2¹⁰⁰, limma¹⁰¹ e ALDEx2¹⁰². Considerando que cada método possui seus pontos fortes e limitações, e que alguns deles não são capazes de controlar adequadamente o número de falsas descobertas, foram consideradas apenas as descobertas identificadas simultaneamente por três ou mais métodos, utilizando o pacote benchdamic¹⁰³ a fim de tornar os resultados mais robustos. Assim, reportamos as seguintes métricas: riqueza absoluta dos gêneros, diversidade filogenética, diversidade de Shannon, uniformidade de Pielou e Simpson e dominância relativa.

4.4 Teste de tolerância à glicose

Para avaliação da resistência a ação da insulina, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose nos momentos 8SEM e 16SEM. Os animais foram deixados em jejum durante 4 horas antes do desafio com glicose. Por meio de corte na extremidade da cauda do animal foi efetuada uma primeira coleta de sangue para a dosagem de glicemia, o que equivale ao tempo zero (t₀) do teste. Em seguida, foi realizada gavagem oral de uma solução glicosada a 50% na dosagem de 1g/Kg de peso corporal, com posteriores coletas de amostras sanguíneas nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos, para as dosagens de glicose. Os valores de glicemia foram mensurados usando monitor de glicose (AccuCheck Performa, Roche). As áreas totais abaixo da curva de insulina e glicose foram calculadas por meio do modelo trapezóide.

4.5 Análise da concentração fecal dos ácidos graxos de cadeia curta

As amostras fecais dos animais coletas em 16SEM e armazenadas em tubos estéreis, foram analisadas para concentrações de ácidos graxos de cadeia curta. Para a análise, 100mg de pool de fezes de cada grupo experimental foram homogeneizadas com 0,5 ml de ácido sulfúrico 0,15 mM, centrifugadas ($14.000 \times g$, 5 minutos), e 1 mL do sobrenadante armazenado. Os sobrenadantes foram diluídos 1:1 com água MilliQ, filtrados em Millex® (0,45 µm) e então injetados em um cromatógrafo de gás Agilent (modelo HP-6890, Santa Clara, Califórnia, EUA), equipado com um detector de massa seletivo Agilent (modelo HP-5975) usando uma coluna capilar DB-WAX (60 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 µm) sob as seguintes condições: temperatura do injetor = 220°C, coluna = 35°C, 2°C/min, 38°C; 10°C/min, 75°C; 35°C/min, 120°C (1 min); 10°C/min, 170°C (2 min); 40°C/min, 170°C (2 min) e detector = 250°C. O hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/min. As curvas analíticas foram construídas utilizando a solução de estoque dos ácidos de interesse: ácidos acético, propiônico e butírico. As amostras foram analisadas em duplicata e os dados expressos em mmol/g.

4.6 Eutanásia e Coleta de material biológico

No momento 16SEM, após jejum de 4 horas, os animais foram eutanasiados. Para tal, administrou-se uma solução estéril de cetamina (100 mg/mL; Dopalen, Ceva Saúde Animal) na dose de 300 mg/kg e xilazina (20 mg/mL; Anasedan, Ceva Saúde Animal) na dose de 30 mg/kg, injetadas na cavidade peritoneal, no quadrante inferior direito do abdômen. Imediatamente após o efeito anestésico, procedeu-se à coleta de sangue por punção cardíaca, resultando em óbito

por exsanguinação. Confirmado o óbito, foram coletados tecido adiposo visceral e subcutâneo, músculos sóleo e gastrocnêmio, e segmentos de alça intestinal.

4.7 Análise de insulina e marcadores inflamatórios séricos

As amostras de plasma foram coletadas em tubos contendo EDTA e centrifugadas a 1.000 g, a 4 °C, por 15 min. O plasma foi separado e armazenado a –80 °C até o momento da análise. Antes dos ensaios, as amostras foram descongeladas e centrifugadas novamente a 1.000 g, em temperatura ambiente, por 10 min.

4.7.1 Nível de insulina sérica

Para a análise de insulina por quimioluminescência, cerca de 5 µL de plasma foram processados utilizando o kit comercial Mouse Insulin Chemoluminescence ELISA (Crystal Chem, Illinois, EUA). Em placa de 96 poços, adicionou-se 95 µL de diluente e 5 µL de amostra, com incubação por 2 h a 4 °C, seguida de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução conjugada, incubados por 30 min à temperatura ambiente, e novamente lavados. Adicionou-se então 100 µL de solução substrato, com incubação de 40 min, seguida de adição de 100 µL de solução de parada. A leitura foi realizada no espectrofotômetro SpectraMax 190® (Molecular Devices), nos comprimentos de onda de 450/630 nm. A partir dos valores de glicemia e insulinemia de jejum, foi calculado o índice *Homeostase Model Assessement* (HOMA - IR), que estimam a sensibilidade à insulina e a função das células beta, respectivamente¹⁰⁴.

4.7.2 Concentração citocinas plasmáticas

As concentrações plasmáticas de IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-10 foram determinadas utilizando o kit MILLIPLEX® Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore, Missouri, EUA), conforme instruções do fabricante. Inicialmente, adicionaram-se 200 µL de *Wash Buffer* em cada poço da placa de 96 poços, seguido de agitação em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital) por 10 min a temperatura ambiente (20–25 °C). O tampão foi descartado e o resíduo removido invertendo a placa sobre papel absorvente. Em seguida, foram pipetados: 25 µL de padrão nos poços correspondentes (usando *Assay Buffer* para o controle 0 pg/mL), 25 µL de *Assay Buffer* nas amostras, 25 µL de *Serum Matrix* nos poços de branco e padrões, e 25 µL de amostra diluída (1:1 em *Assay Buffer*) nos poços correspondentes.

Após homogeneização, foram adicionados 25 µL de microesferas magnéticas (*Mixed Beads*), com agitação do frasco imediatamente antes da pipetagem. A placa foi selada, envolta

em papel alumínio e incubada em agitador por 2 h. Após incubação, o conteúdo foi removido e a placa lavada duas vezes em lavadora magnética (Bio-Plex PRO II Wash Station).

Foram então adicionados 25 µL de anticorpos de detecção previamente equilibrados à temperatura ambiente, com incubação de 1 h, seguida da adição de 25 µL de estreptavidina-ficoeritrina, incubando-se por mais 30 min. Após nova lavagem (2×), foram adicionados 150 µL de *Sheath Fluid PLUS* para leitura no analisador MAGPIX® (Luminex Corp., Austin, TX, EUA). Nesse sistema, um LED verde (525 nm) identifica as microesferas e um LED vermelho (635 nm) quantifica os biomarcadores, com captura das imagens por câmera CCD (*charge-coupled device*). Os dados de intensidade de fluorescência mediana (*Median Fluorescent Intensity*, MFI) foram obtidos no software xPONENT® 4.2 e analisados no Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore), aplicando curva padrão ajustada por modelo logístico de 5 parâmetros. As concentrações finais foram corrigidas pelo fator de diluição.

4.8 Análise de composição corporal

Após o sacrifício, os *pads* de tecido adiposo subcutâneo e visceral foram coletados e pesados em balança eletrônica de precisão (Marte auw220d) para a aferição da adiposidade: peso dos pads de gordura/massa corporal (g/g de peso corporal).

4.9 Análises do músculo esquelético e tecido adiposo

Imediatamente após o sacrifício, os músculos sóleo e gastrocnêmio, e os pads de tecido adiposo visceral foram coletados para as análises descritas abaixo.

4.9.1 Avaliação da expressão de genes e proteínas relacionadas à inflamação e às vias de sinalização da insulina

A expressão de genes relacionados à inflamação foi avaliada em cerca de 100 mg de tecido adiposo visceral por meio da quantificação dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) dos genes, IL-1β, TNF, IL-6 e IL10, utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR). As sequências dos oligonucleotídeos dos primers utilizados foram:

- **IL1β**: Forward: 5'-TGGACCTTCCAGGATGAGGACA-3'; Reverse: 5'-GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3';
- **TNF**: Forward: 5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT-3'; Reverse: 5'-GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG-3';

- **IL6:** Forward: 5'-TACCACTTCACAAGTCGGAGGC-3'; Reverse: 5'-CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC-3';
- **IL10:** Forward: 5'-CGGGAAGACAATAACTGCACCC-3'; Reverse: 5'-CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC-3'.

Para isso, foi realizada a extração de RNA das amostras utilizando o RNeasy Lipid tissue mini kit (Qiagen). Aproximadamente 100 mg de cada amostra de tecido adiposo foi macerada e homogeneizada em 1 ml de Reagente de Lise QIAzol, usando um misturador mecânico, em seguida foi adicionado 200 µl de cloroforme, seguido de vigorosa agitação por 15 segundos; as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 2–3 minutos e então centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, adicionada de 1 volume de etanol 70% e homogeneizada com vortex. 700 µl da amostra foi então transferida para a coluna de centrifugação RNeasy Mini em um tubo de coleta de 2 ml e centrifugada à temperatura ambiente por 15 segundos a ≥ 8000 x g, descartando-se o líquido coletado. Em seguida 700 µl de Buffer RW1 foi adicionado a cada coluna RNeasy e centrifugado por 15 segundos a ≥ 8000 x g, o fluido coletado foi novamente descartado. Foi adicionado 500 µl de Buffer RPE à cada coluna RNeasy e novamente centrifugado por 15 segundos a ≥ 8000 x g, descartando-se o fluido coletado. 500 µl de Buffer RPE foi adicionado a cada coluna RNeasy e centrifugado por mais 2 minutos a ≥ 8000 x g. Por fim, cada coluna RNeasy foi colocada em um novo tubo de 1,5 ml, adicionado 30–50 µl de água livre de RNase e centrifugada por 1 minuto a ≥ 8000 x g. O volume resultante foi avaliado por NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific) para garantir a qualidade do RNA obtido, considerando como ideal o índice de pureza próximo a 2,0, e a integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose. As amostras contendo RNA foram armazenadas em freezer -80°C até sua utilização.

O cDNA para o qPCR foi obtido utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Conforme orientações do fabricante, foi pipetado 10 µL de master mix 2X de RT (contendo SYBR Green e oligo DTs) em cada poço de uma placa de reação de 96 poços, em seguida foi adicionado 10 µL de cada amostra de RNA em cada poço, seguido de breve centrifugação para que o conteúdo se concentrasse no fundo e levada ao termociclador (Rotor Gene Q, Qiagen), programado como descrito abaixo:

Passo	Temperatura	Tempo
1	25°C	10 minutos
2	37°C	120 minutos
3	85°C	5 minutos
4	4°C	Manter (Hold)

Os valores de ciclo de quantificação (Cq) e ΔCq foram calculados para cada gene de interesse da seguinte maneira: Cq do gene de interesse – Cq do gene controle. Para este trabalho usamos a β -actina como gene de referência¹⁰⁵, a sequência de oligonucleotídeos dos primers utilizados foram: Forward 5' CCT TCT TGG GTA TGG AAT CCT GT 3' e Reverse 5' CAC TGT GTT GGC ATA GAG GTC TTT AC 3'. Mudanças relativas nas expressões dos genes de interesse (Δ - ΔCq) foram calculadas pela subtração do ΔCq médio do grupo controle (CTRL) do ΔCq de cada amostra. Finalmente a mudança relativa de expressão (Fold change) foi obtida pelo cálculo $2^{-(\Delta-\Delta Cq)}$.

A expressão das proteínas AS160 total, pAS160 (Thr 642), AKT total e pAKT (Thr 308) foi avaliada em aproximadamente 30mg de tecido muscular esquelético por meio da técnica de Western Blotting. Inicialmente, as amostras dos músculos sóleo e gastrocnêmio foram maceradas com auxílio de um *pellet pestle* e lisadas em tampão RIPA suplementado com coquetel de inibidores de protease e fosfatase, sendo posteriormente centrifugadas a 15.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para quantificação proteica pelo método de Bradford (Bio-Rad). Em seguida, 40 μ g de proteína foram carregados em géis de poliacrilamida a 4–20% com gel de empilhamento a 4% para eletroforese.

Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando tampão de transferência contendo 10% de metanol, e a transferência foi monitorada com coloração com Ponceau S a 0,5%. As membranas foram bloqueadas por 1 hora com solução de BSA a 5% em TBS-T, sendo então incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários diluídos em BSA 5% nas seguintes concentrações:

- anti-AS160 1:1000 (Cell Signaling Technology #2670),
- anti-Phospho-AS160 (Ser588) 1:1000 (CST #8730),
- anti-AKT 1:1000 (CST #9272),
- anti-Phospho-AKT (Ser473) 1:1000 (CST #9271),
- anti-GAPDH 1:1000 (CST #2118).

As membranas foram então incubadas com anticorpos secundários conjugados à peroxidase (anticorpo policlonal de cabra anti-coelho; 1:10000) por 1 hora. As bandas proteicas foram visualizadas por quimioluminescência (SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific®), detectadas por GENESYS, quantificadas por densitometria (ImageJ®) e normalizadas com base na expressão do gene de referência GAPDH.

4.9 Avaliação morfológica do intestino

Amostras de jejuno e intestino grosso (composto por ceco e cólon) foram preparados em formato de *Swiss-roll*, de forma a permite a avaliação histológica de toda a extensão da mucosa em um único corte, colocadas em cassetes, fixadas em Formol tamponado durante 48 horas e estocadas em álcool 70% a 4°C até o processamento, quando foram embebidas em parafina para a montagem de blocos histológicos. Os blocos foram seccionados em micrótomo para confecção das lâminas histológicas e corados com hematoxilina-eosina. Foram avaliados profundidade das criptas, altura e largura das vilosidades e celularidade de cada amostra. Para padronização da análise, foram avaliadas 10 criptas e 10 vilosidades de cada amostra, sendo as mensurações realizadas por dois patologistas em um sistema de avaliação duplo-cego, onde os patologistas não tinham conhecimento da distribuição em grupos dos animais. As alterações morfológicas relacionadas à processo inflamatório, como presença de infiltrado linfoplasmocitário, edema e hiperplasia de placas de Peyer foram avaliadas e classificadas de acordo com a intensidade e extensão das alterações^{106,107}. A graduação foi definida da seguinte maneira: 0 - sem alteração; 1 - mínima; 2 - discreta; 3 – moderada; 4 - acentuada; 5 – severa, possibilitando sua quantificação.

5.Tratamento estatístico

Antes da análise inferencial, verificamos a presença de outliers e testamos a esferecidade, homocedasticidade e normalidade dos dados. Tendo garantido os pressupostos fundamentais para a análise da variância, empregamos o Mixed Model (SAS®) para análises de medidas repetidas para as variáveis avaliadas nos momentos 8SEM e 16SEM e, quando pertinente, post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Os grupos e os períodos foram considerados fatores fixos e os animais, definidos como fatores aleatórios. Para as variáveis avaliadas somente no momento 16SEM, a análise de ANOVA 1-way foi utilizada, com os grupos considerados como fatores fixos e os animais fatores aleatórios. Para a avaliação de mudanças na diversidade da microbiota intestinal entre os grupos, a análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) foi realizada no software QIIME (versão 1.9.1). Todas as análises foram conduzidas de acordo com o princípio da intenção de tratamento. Todos os dados foram expressos em média $\pm$ desvio ou erro padrão. Para as principais variáveis dependentes, foram calculados também intervalos de confiança de 95%. O nível de significância adotado para rejeitar a hipótese nula foi de $p \leq 0,05$.

6. Resultados

Ao longo do protocolo, um (1) animal veio à óbito horas depois do primeiro OGTT na 8SEM, ou seja, pouco depois da randomização. Dessa forma, a amostra final foi composta por 35 camundongos C57BL6 SPF, fêmeas, alocadas da seguinte forma: 11 animais no grupo mRKYB + TF, 12 animais no grupo mRKYB e 12 animais no grupo mCTRL. Além dos 12 animais mantidos com dieta padrão para fins comparativos.

Na tabela 1 são apresentadas as características de todos os grupos na SEM 8, antes do início do transplante fecal.

Variáveis	mRKYB + TF (n= 11)	mRKYB (n= 12)	mCTRL (n=12)	mPDR (n=12)
Peso corporal (g)	25,4±2,8	25,2±4,4	24,73±4,00	20,9±1,1*
Glicemia de jejum (mg/dL)	169,5±17,7	161,5±14,3	175,17±19,31	150,3±20,4
AUC glicose (md/dL/h)	468,7±101,5	425,3±71,6	427,32 ± 42,08	356,1±28,5*

Tabela 1: Dados como média±desvio padrão. Legenda: AUC: Área abaixo da curva. * significa mPDR # mCTRL, mRKYB+TF e mRKYB (comparações entre grupos, $p<0,05$; calculado por meio da análise de modelo mistos de medidas repetidas).

A Figura 3 mostra o crescimento ponderal dos animais ao longo do período de transplante fecal (entre 8SEM e 16SEM).

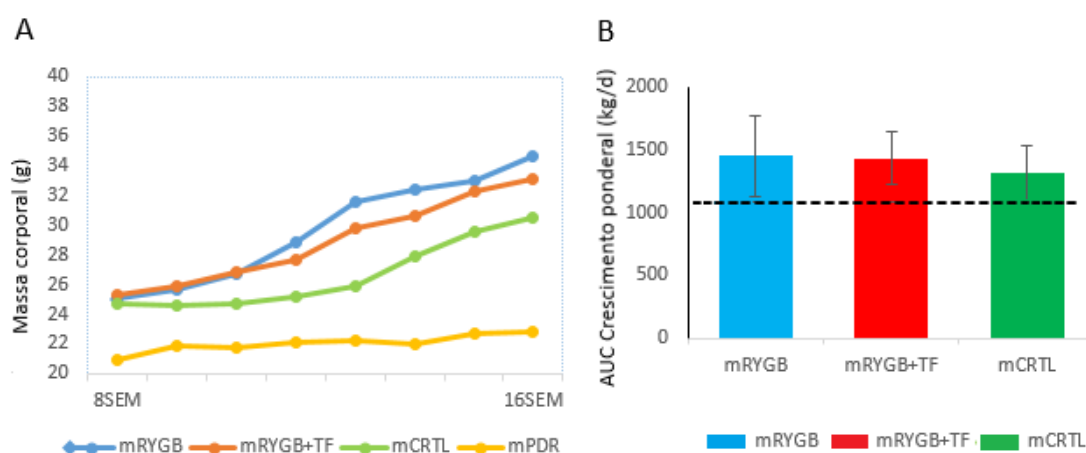


Figura 3. Crescimento ponderal dos animais dos grupos mRKYB, mRKYB+TF, mCTRL e mPDR entre os tempos 8SEM e 16SEM (A). A área abaixo da curva de crescimento ponderal calculada está representada no painel B. A área tracejada representa os dados do grupo mPDR.

Como esperado, o grupo mPDR apresentou peso corporal menor que todos os outros grupos no início do período de transplante (SEM 8; comparações entre grupos; $p<0,05$). Os grupos transplantados apresentavam parâmetros glicêmicos semelhantes entre si na 8SEM ($p<0,05$, comparações entre grupos), porém significativamente superiores ao grupo mPDR, confirmando o desenvolvimento de resistência insulínica. O ganho de peso corporal foi similar

entre a 8SEM e a 16SEM, não havendo diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$, comparações entre grupos).

Na Tabela 2 e na Figura 4, são apresentados adiposidade, marcadores inflamatórios séricos e os índices de sensibilidade à insulina derivados dos valores de jejum e do Teste Oral de Tolerância à Glicose (OGTT) dos grupos antes (8SEM, quando cabível) e após o transplante de fezes (16SEM).

Tabela 2: Dados como média±desvio padrão, valor de P entre os grupos ou de interação grupo x tempo (calculado

Variáveis	mRYGB + TF (n= 11)	mRYGB (n= 12)	mCTRL (n=12)	Valor P
Marcadores inflamatórios (16SEM)				
TNF α (pg/mL)	1,33±0,80 ^a	1,74±2,21 ^a	1,75 ± 1,58 ^a	0,813
IL-6 (pg/mL)	18,5±19,1 ^a	14,6±14,7 ^a	11,16 ± 9,04 ^a	0,529
IL-1 β (pg/mL)	17,5±32,9 ^a	4,49±8,71 ^a	3,50 ± 7,94 ^a	0,198
IL-10 (pg/mL)	37,0±41,5 ^a	13,4±12,0 ^a	19,62±35,87 ^a	0,220
Glicemia de jejum (mg/dL)				0,558
8SEM	169,5±17,7 ^a	161,5±14,3 ^a	175,17±19,31 ^a	(Grupo*Tempo)
16SEM	200,2±21,8 ^b	186,0±19,9 ^b	192,83±28,29 ^b	
AUC glicemia (mg/dL/h)				0,598
8SEM	468,7±101,5 ^a	425,3±71,6 ^a	427,3 ± 42,1 ^a	(Grupo*Tempo)
16SEM	470,1±66,7 ^a	448,8±44,4 ^a	441,9 ± 45,3 ^a	
Delta da AUC glicemia (mg/dL/h)	4,0±129,4 ^a	23,5±85,3 ^a	14,2 ± 47,9 ^a	0,774
Insulinemia de jejum (μ U/mL) (16SEM)	1.06±0.50 ^{ab}	2,30±1,46 ^b	1.36±0.89 ^a	0,002
HOMA-IR (16SEM)	0,52±0,21 ^a	1,05±0,63 ^a	0,64 ± 0,45 ^a	0,003
Adiposidade (g gordura/g peso corporal)	0,028±0,006 ^a	0,033±0,015 ^a	0,028 ± 0,005 ^a	0,782

por meio da análise de modelo mistos de medidas repetidas). Dados com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes ($p<0,05$). Legenda: AUC: Área abaixo da curva.

Não houve diferença entre os grupos em relação às concentrações de marcadores inflamatórios na 16SEM (comparações entre grupos, $p>0,05$). Em relação à glicemia de jejum, todos os grupos apresentaram aumento da 8SEM para a 16SEM de forma similar (comparação intragrupos, $p<0,05$). Quanto à área sob a curva glicêmica obtida no OGTT, não houve alterações significativas entre os tempos dentro de cada grupo ($p>0,05$), tampouco diferenças no delta de mudança dessa variável entre os grupos ($p>0,05$). No entanto, o grupo mRYGB apresentou valores mais elevados de insulina em jejum e HOMA-IR quando comparado aos grupos mRYGB+TF e mCTRL (comparação entre grupos $p\leq 0,05$). Por fim, a adiposidade relativa ao peso corporal foi semelhante entre os grupos na 16SEM.

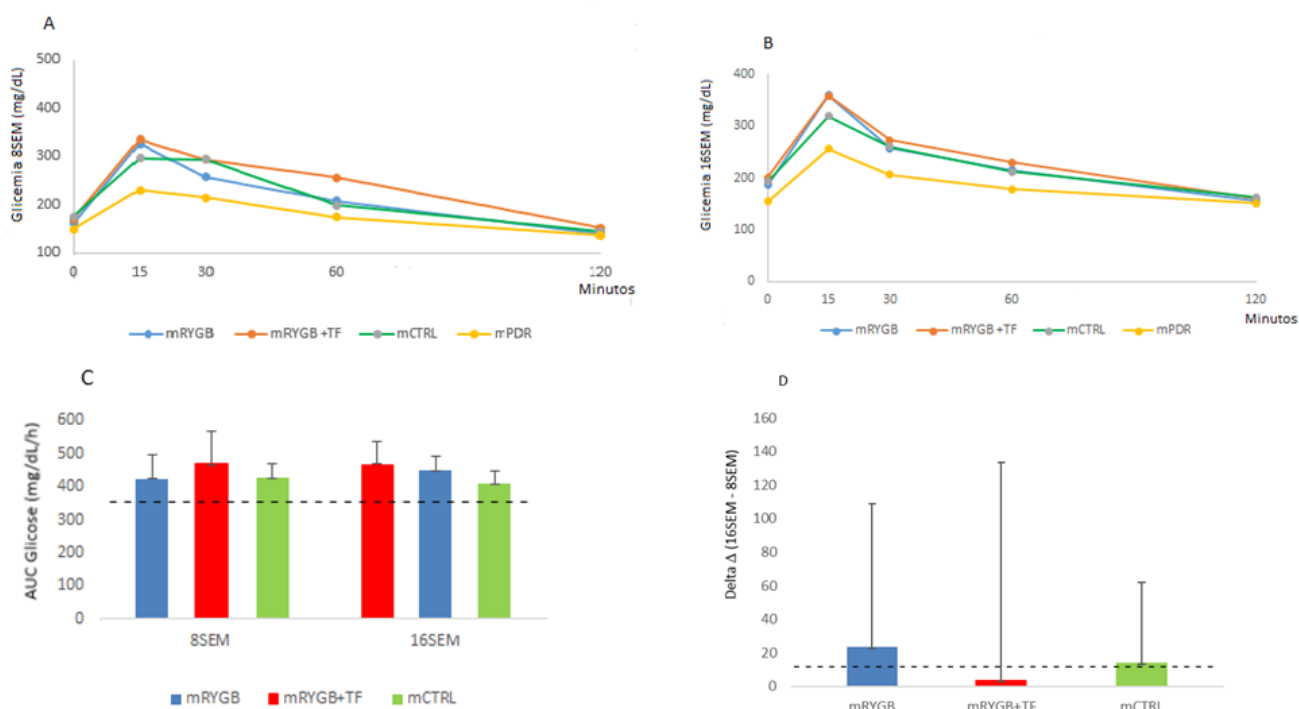


Figura 4. Resposta glicêmica durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT) dos grupos mRYGB, mRYGB+TF, mCTRL e mPDR nos tempos SEM 8 (A) e SEM 16 (B). Área glicêmica abaixo da curva (AUC glicose) dos grupos (C) e respectivos deltas de mudanças (SEM 16 – SEM 8) (D). Legenda: AUC - área sob a curva. As linhas tracejadas representam os dados do grupo mPDR.

Na Figura 5 estão a representação gráfica das proteínas relacionadas à via de sinalização insulínica no musculo esquelético por meio de Western Blotting e na Figura 6, os marcadores inflamatórios obtidos das análises de tecido adiposo (16SEM; comparações entre grupos; $p < 0,05$), onde não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

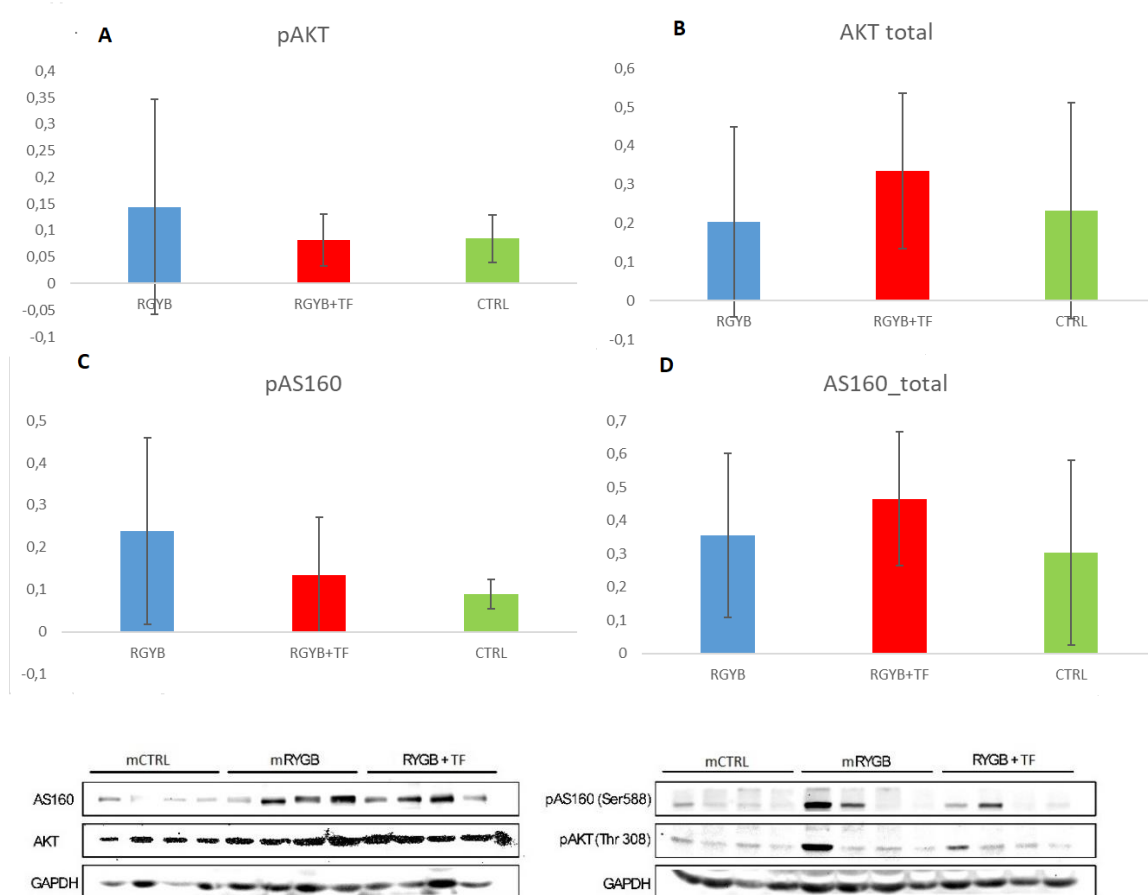


Figura 5. Graficos como média e desvio padrão da expressão tecidual das proteínas AKT e AS160 totais e fosforiladas em músculo esquelético nos grupos mRYGB, mRYGB+TF e mCTRL. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as variáveis analisadas ($p>0,05$).

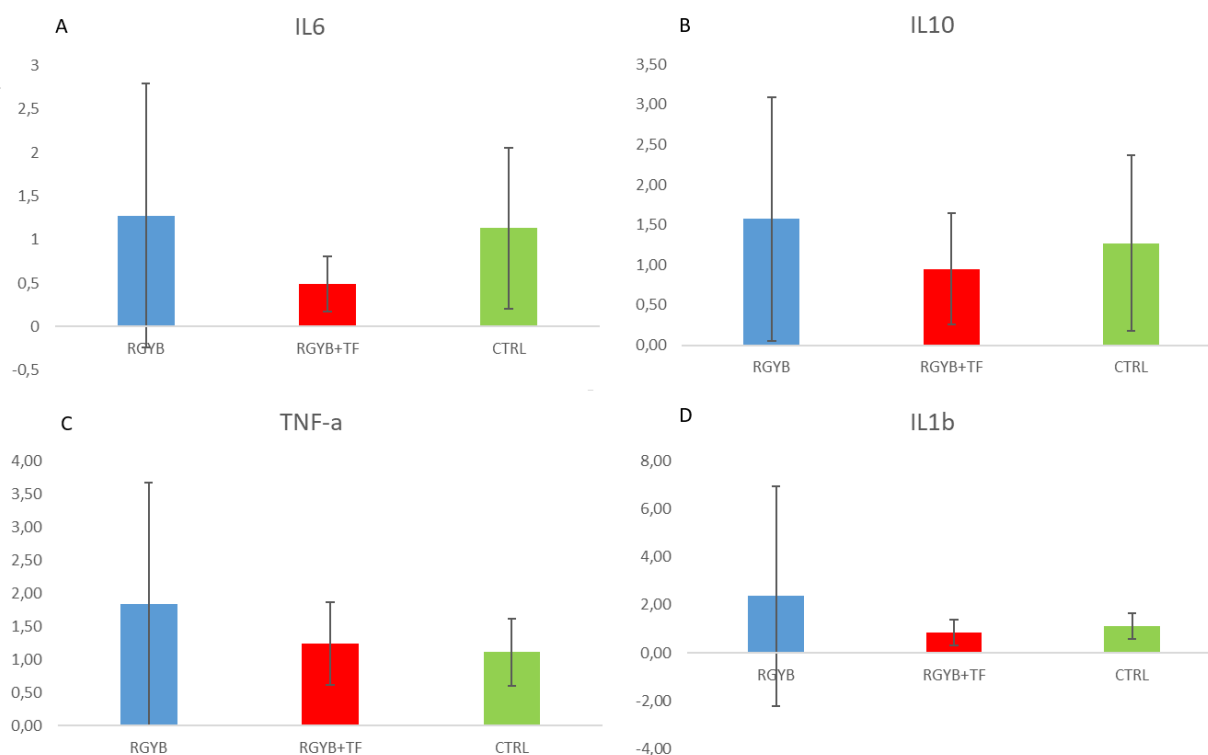


Figura 6. Graficos da expressão gênica de marcadores inflamatórios IL-6, IL-10, TNF- α e IL-1 β no tecido adiposo nos grupos mRYGB, mRYGB+TF e mCTRL. Dados baseados no Fold Change. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as variáveis analisadas ($p>0,05$).

Na Tabela 3, são apresentados os dados da concentração de ácidos graxos de cadeia curta, avaliados nas fezes dos animais na SEM16.

Variáveis	mRYGB + TF (n= 11)	mRYGB (n= 12)	mCTRL (n=12)	Valor P
Ácido acético (mmol/L)	4,29±0,94	3,70±1,18	4.07±2.44	0.69
Ácido propiônico (mmol/L)	1,35±0,46	1,14±0,38	0.57±0.41	0.88
Ácido butírico (mmol/L)	0,61±0,23	0,54±0,28	1.37±0.79	0.55

Tabela 3. Dados como média±desvio padrão, valor de P entre os grupos (calculado por meio da análise de modelo mistos de medidas repetidas). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para a concentração de AGCC ($p < 0,05$).

Não houve diferença entre os grupos para as variáveis ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico (comparações intragrupos, $p > 0,05$). De modo geral, os dados mostram apenas um efeito do treinamento físico, mas não da cirurgia bariátrica, na insulinemia de jejum. Ademais, nenhum efeito no ganho de peso, na adiposidade, nos marcadores inflamatórios ou na concentração de AGCC nas fezes dos animais foi observado.

A análise histológica dos tecidos avaliados revelou uma quantidade expressiva e predominante de necrose intestinal segmentar e apical de vilosidade intestinal em múltiplos focos ou em porções extensas do segmento, de intensidade moderada a severa, sem distinção entre os grupos experimentais. O impacto inflamatório observado era predominantemente discreto, com múltiplos sítios de infiltrado inflamatório linfoplasmocítico e, ocasionalmente, áreas de edema de lâmina própria ou submucosa.

O padrão inflamatório discreto, limitado a infiltração celular e sem outras alterações associadas, sugere que inflamação e agentes etiológicos de natureza biológica são pouco prováveis como percursos da lesão necrótica. Dessa forma, as características histopatológicas observadas indicam necrose tecidual secundária a processos de natureza isquêmica^{108,109}, possivelmente provocado pelo choque hipovolêmico resultante da coleta expressiva de sangue realizada imediatamente após anestesia. Portanto, uma vez que esses achados não se relacionam com as intervenções experimentais efetuadas nesses grupos, as lesões por necrose tecidual foram excluídas de nossa análise, assim, nos ativemos unicamente às alterações de caráter inflamatório.

Na tabela 4 demonstramos os parâmetros morfológicos de altura e largura de vilo, profundidade de cripta e razão vilosidade/cripta avaliados em cada grupo (16SEM, comparação entre grupos, $p > 0,05$).

Variáveis	mRYGB + TF (n= 11)	mRYGB (n= 12)	mCTRL (n=12)	Valor P
Altura da Vilosidade (μm)	268.975 ± 65.639 ^a	234,70 ± 76,76 ^a	336.996 ± 74.992 ^b	0.0066
Largura da Vilosidade (μm)	66,45 ± 12,75 ^a	74,51 ± 12,55 ^a	84.366 ± 7.248 ^b	0.0003
Profundidade da Cripta (μm)	67.984 ± 6.264 ^a	65,85 ± 9,01 ^a	77.18±10.66 ^b	0.0100
Razão Vilosidade/Cripta	3,98 ± 0,93 ^b	3,59 ± 0,89 ^a	4,53 ± 1,13 ^b	0.0882

Tabela 4. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais dos diferentes grupos experimentais. Dados das médias $\pm$ desvio padrão para a altura e largura das vilosidades, profundidade das criptas e razão vilosidade/cripta (V/C) no intestino delgado dos animais dos grupos mCTRL, mRYGB e mRYGB+TF. Há diferença significativa entre os grupos para os valores de altura e largura de vilosidades e profundidade de cripta, enquanto razão v/c não apresentou diferenças estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Apresentado na tabela 5 estão os dados de escore médio de alterações inflamatórias observadas no intestino delgado (ID) e intestino grosso (IG) dos camundongos dos grupos experimentais. Os escores variam de 0 (sem alterações) a 5 (inflamação severa).

Variáveis	mRYGB + TF (n= 11)	mRYGB (n= 12)	mCTRL (n=12)	Valor P
Intestino delgado	$1,55 \pm 1,13^{ab}$	$2,36 \pm 1,69^a$	$0,75 \pm 0,45^b$	0,028
Intestino grosso	$0,55 \pm 0,69^{ab}$	$1,0 \pm 1,0^a$	$0,08 \pm 0,29^b$	0,007

Tabela 5. Dados de escore inflamatório médio e desvio padrão. Escore de 0 a 5, sendo 0 correspondente a nenhuma alteração e 5 alteração inflamatória severa. Comparação entre grupos mCTRL, mRYGB e mRYGB+TF.

Observou-se aumento significativo na altura e largura das vilosidades e na profundidade de cripta no grupo mCTRL em relação aos grupos mRYGB e mRYGB+TF, indicando uma adaptação morfofuncional benéfica do intestino delgado nesse grupo. Em relação aos parâmetros inflamatórios, observou-se que o grupo mCTRL apresentou menores escores de inflamação no intestino delgado (ID) e no intestino grosso (IG) em comparação ao grupo mRYGB ($p<0,05$). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os demais grupos mRYGB e mRYGB+TF para ambos os parâmetros ($p>0,05$). O grupo mCTRL também não diferiu do grupo mRYGB+TF quanto à inflamação ID e IG ($p>0,05$). Abaixo as imagens exemplificam as principais alterações anatomopatológicas encontradas em cada grupo experimental.

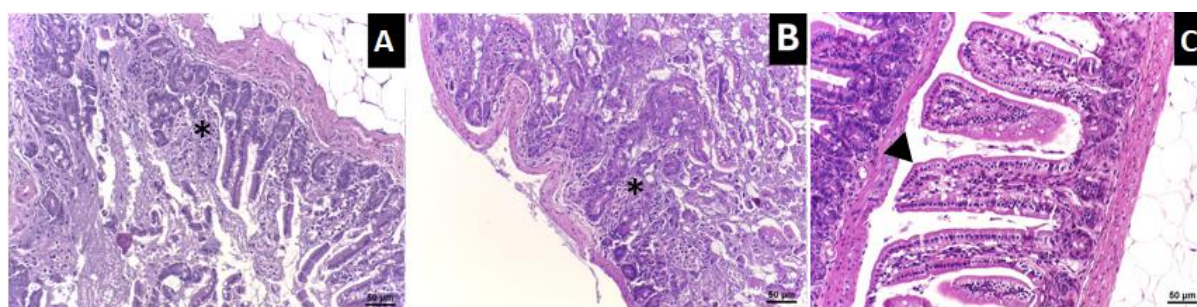


Figura 7. Fotomicrografias das principais características histológicas identificadas no grupo mRYGB, camundongo. A); B) Intestino Delgado. Infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (asterisco); 50 μ m; H&E. C) Intestino delgado. Achatamento de vilosidades (cabeça de seta); 50 μ m; H&E.

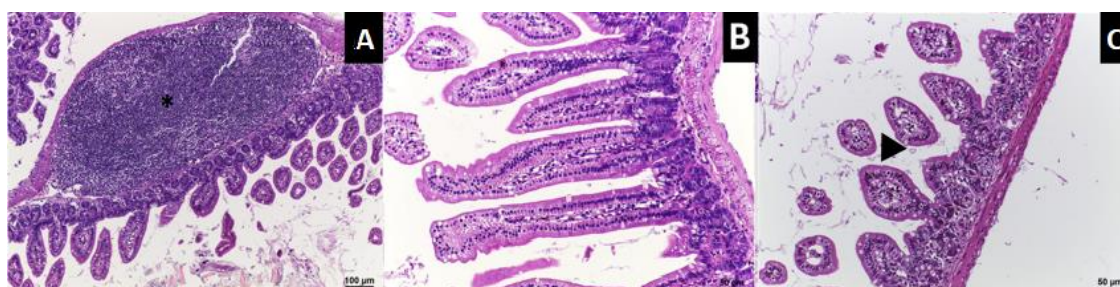


Figura 8. Fotomicrografias das principais características histológicas identificadas no grupo mRYGB + TF, camundongo. A) Intestino delgado. Hiperplasia da placa de peyer, focal (asterisco); 100 µm; B) e C). Intestino delgado. Infiltrado inflamatório focal, discreto (cabeça de seta). 100 µm e 50 µm; H&E SS

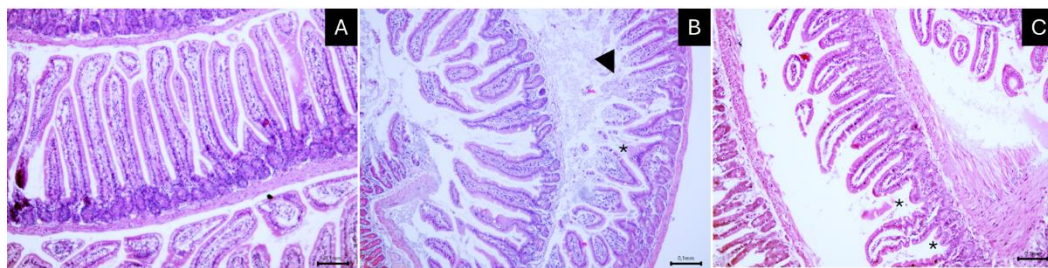


Figura 9. Fotomicrografias das principais características histológicas identificadas no grupo mCTRL, camundongo. A) Intestino delgado normal, 100x; H&E B) e C) Intestino delgado. Áreas de necrose apical de vilosidade (cabeça de seta) e áreas focais de achatamento de vilosidades (asterísco), 100x, H&E.

Por fim, abaixo apresentamos os dados de composição e diversidade da microbiota intestinal nos períodos 8SEM e 16SEM dos grupos mRKYB, mRKYB+TF e mCTRL. No nível de gênero, o FMT e as amostras de fezes de camundongos (8SEM e 16SEM) incluíram um total de 278 gêneros distribuídos conforme demonstrado na Figura 10.

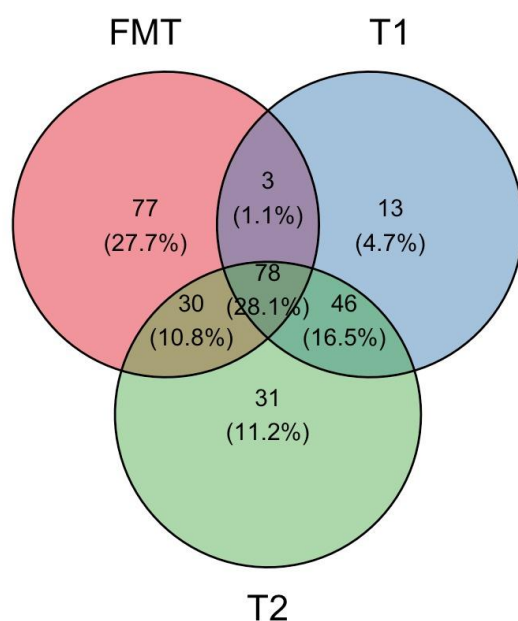


Figura 10. Diagrama de Venn para o número total de gêneros entre FMT e amostras de fezes, em que T1 representa o momento 8SEM (pré transplante de microbiota) e T2 representa o momento 16SEM (pós transplante de microbiota).

No período 8SEM, as amostras de fezes humanas e de camundongos compartilharam 81 gêneros, representando 43,1% e 57,8% dos gêneros nas fezes humanas e de camundongos, respectivamente. No período 16SEM, compartilharam 108 gêneros, correspondendo a 57,4% e 58,3% dos gêneros nas fezes humanas e de camundongos, respectivamente. As amostras de fezes de camundongos 8SEM e 16SEM compartilharam 124 gêneros, representando 88,5% e 67% das fezes de camundongos PRE- e POST-FMT, respectivamente. Importante ressaltar que 15,9% dos gêneros identificados nas fezes dos participantes humanos foram transmitidos aos

camundongos receptores, representando 16,2% dos gêneros encontrados nas fezes dos camundongos no período após FMT.

A diversidade da comunidade microbiana ao longo da intervenção foi avaliada por meio das análises de diversidade alfa (α) e beta (β). A diversidade alfa representa a variabilidade microbiana dentro de cada amostra individual, refletindo tanto a riqueza (número de espécies presentes) quanto a uniformidade (distribuição relativa das espécies). Os índices de diversidade alfa fornecem uma medida da heterogeneidade geral da comunidade microbiana. Neste estudo, foram calculadas diferentes métricas de diversidade ecológica, incluindo riqueza absoluta, diversidade filogenética, uniformidade e dominância. Tabela 6 e na Figura 11 são apresentadas as diversas métricas de diversidade alfa, a saber, riqueza absoluta dos gêneros, diversidade filogenética, diversidade de Shannon (ou índice de Shannon), uniformidade de Pielou e Simpson e dominância relativa.

	mRYGB +TF (n= 11)	mRYGB (n= 12)	mCTRL (n=12)
Índice de Shannon			
8SEM	2.93±0.21	2.71±0.36	2.94±0.21
16SEM	2.93±0.24	3.03±0.17 [#]	2.88±0.41
Índice de Pielou			
8SEM	0.65±0.04	0.62±0.08	0.65±0.04
16SEM	0.66±0.05	0.67±0.03 [#]	0.63±0.09

Tabela 6. Dados expressos como média $\pm$ desvio-padrão. As comparações intragrupo e intergrupo foram calculadas utilizando, respectivamente, os testes de Wilcoxon ou Mann-Whitney. # indica $p \leq 0,05$ para comparações intragrupo.

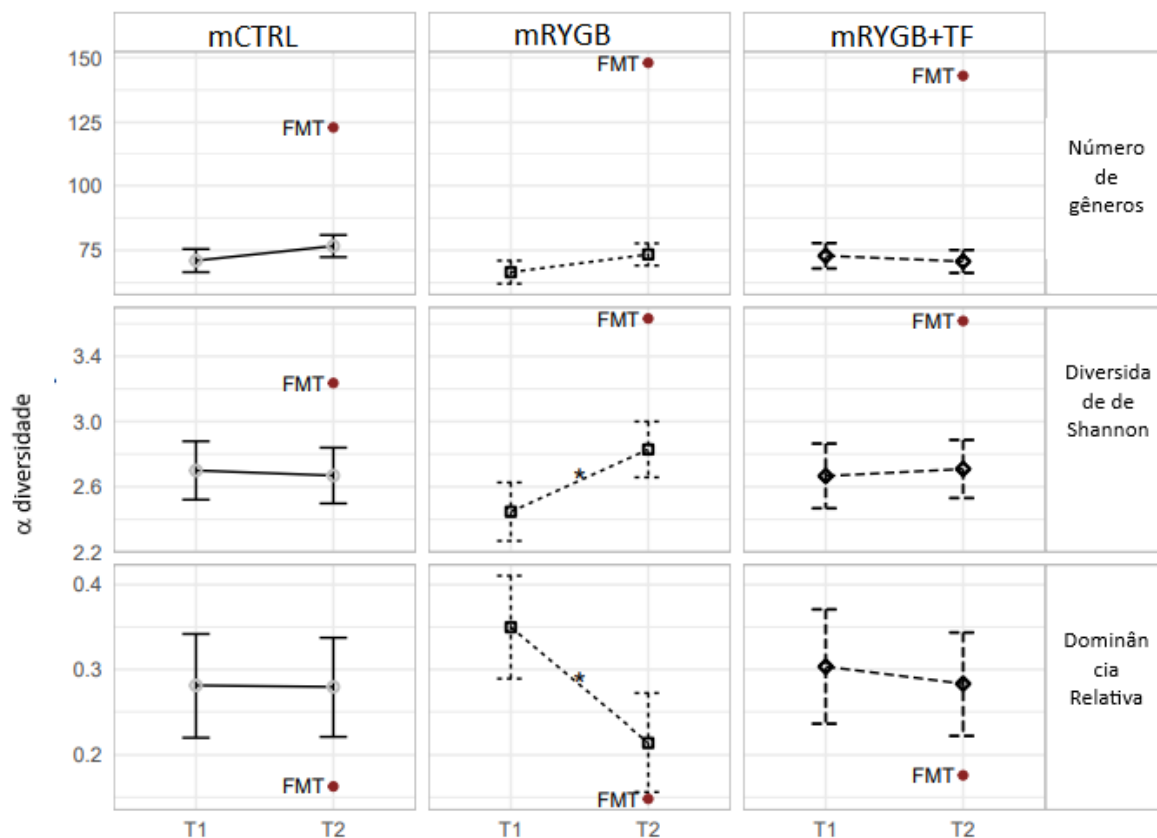


Figura 11. Medidas de α -diversidade nos grupos mRGYB + TF, mRGYB e mCTRL. T1 representa as amostras coletadas na 8SEM e T2 representa as amostras coletadas na 16SEM. Dados expressos como média e desvio padrão. * significam mudanças significativas ao longo dos pontos de tempo, dentro de cada grupo ($p < 0,05$, calculadas por meio do teste de Wilcoxon ou Mann-Whitney, respectivamente). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Os pontos marrons representam a diversidade α - correspondente calculada na amostra de FMT.

Diferenças significativas foram observadas entre a 8SEM e a 16SEM no grupo mRYGB em relação a α -diversidade (*Shannon*) e uniformidade (*Pielou*) ($p < 0,05$), além de redução na dominância relativa e na razão F/B. Nos grupos mRYGB+TF e mCTRL não foram detectadas alterações significativas, tampouco diferenças entre os grupos para esses parâmetros.

A diversidade entre as amostras foi avaliada por meio da diversidade beta (β), que quantifica a dissimilaridade entre comunidades microbianas, considerando tanto a presença/ausência quanto a abundância relativa das espécies. Para essa análise, os dados foram inicialmente transformados utilizando o método Centered-Log-Ratio (CLR), seguido do cálculo da distância euclidiana sobre os dados transformados — combinação que resulta na chamada distância de Aitchison. Essa abordagem baseia-se na premissa de que os dados de sequenciamento são composicionais, ou seja, representam proporções relativas influenciadas pela profundidade de leitura, exigindo, portanto, transformação apropriada para análises comparativas válidas. A visualização das diferenças de diversidade β foi realizada por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA), uma técnica de redução de dimensionalidade que permite representar graficamente as amostras em um espaço bi ou tridimensional, no qual a proximidade ou afastamento entre os pontos reflete o grau de semelhança ou dissimilaridade em suas composições microbianas. Do ponto de vista estatístico, a significância das diferenças entre grupos pode ser estimada por meio da PERMANOVA (Análise Multivariada de Variância por Permutação), um método que avalia as distâncias entre os pontos de coleta considerando o efeito individual de cada sujeito. A Figura 12 mostra a beta diversidade ao longo do tempo nas amostras humanas utilizadas para o transplante fecal (FMT) e as demais amostras.

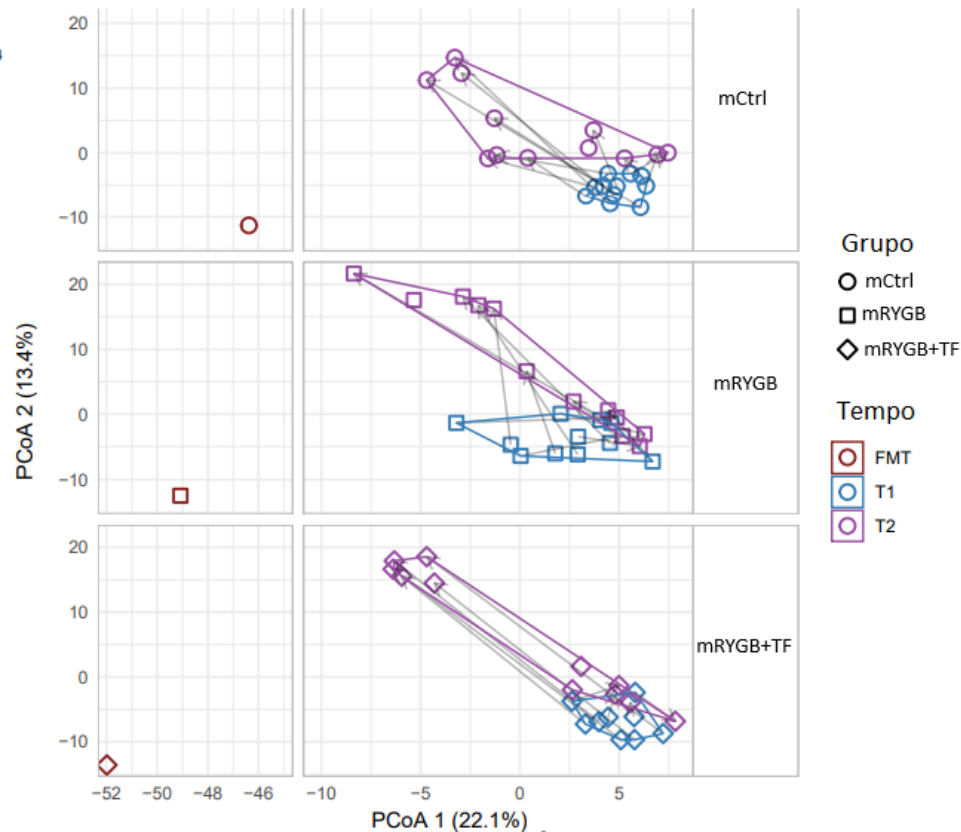


Figura 12. Diversidade beta baseada em PCoA das distâncias de Aitchison. As cores e trajetórias destacam as mudanças ao longo do tempo para cada indivíduo, enquanto os grupos são diferenciados pelos formatos dos pontos. Os resultados da PERMANOVA (para as amostras de T1 e T2) são apresentados no subtítulo. O eixo x foi truncado na parte central para melhorar a visualização das amostras de FMT, localizadas no lado esquerdo do gráfico de todas as amostras. Quadrados em cores claras representam as amostras no momento basal (SEM8), triângulos em cores escuras representam as amostras no tempo SEM16. Pontos pretos representam as amostras originais utilizadas no transplante de microbiota fecal (FMT).

Todos os grupos apresentaram diversidade β semelhante no momento 8SEM, apesar de uma tendência a valores diferentes entre mRYGB+TF e mRYGB ($p=0,051$). Após o FMT, foram observadas alterações significativas na diversidade β dentro de todos os três grupos ($p<0,05$) e, no momento 16SEM, mRYGB+TF e mRYGB apresentaram diversidade β semelhante ($p=0,264$), mas ambos diferiram do grupo mCTRL (diferenças entre grupos, $p<0,05$).

Os efeitos temporais dentro e entre os grupos foram avaliados utilizando modelos lineares mistos generalizados (glmmTMB), com interceptos aleatórios para considerar a variabilidade entre indivíduos e contrastes pareados ajustados pelo método de Sidak. Além da significância estatística ($p < 0,05$), foram aplicados critérios de relevância biológica: todo o intervalo de confiança de 95% deveria excluir diferenças menores que 0 unidade na razão logarítmica centralizada (CLR). A lista de contrastes e os contrastes significativos estão resumidos na Tabela 7 e representados graficamente na Figura 13.

Gênero	Contraste	95% IC	Interpretação	Valor P	Valor q
Akkermansia	mRYGB T1 - mRYGB T2	3.54 (2.54, 4.53)	mRYGB: T2 < T1	< 0.05	< 0.05
Aminipila	mRYGBTF T1 - mRYGBTF	3.09 (2.28, 3.91)	mRYGBTF: T2 < T1	< 0.05	< 0.05
Anaerofilum	mRYGB T1 - mRYGB T2	-2.68 (-3.41, -1.96)	mRYGB: T2 > T1	< 0.05	< 0.05

Anaerotruncus	mCTRL T1 - mCTRL T2	1.55 (1.19, 1.9)	mCTRL: T2 < T1	< 0.05	< 0.05
Butyricicoccus	mRYGB T1 - mRYGB T2	3.44 (2.52, 4.36)	mRYGB: T2 < T1	< 0.05	< 0.05
Butyricimonas	mCTRL - mCTRL T2	-5.32 (-5.89, -4.74)	mCTRL: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Butyricimonas	mRYGB T1 - mRYGB T2	-7.27 (-7.85, -6.7)	mRYGB: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Butyricimonas	mRYGBTF T1 - mRYGBTF T2	-6.99 (-7.6, -6.37)	mRYGBTF: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Christensenella	mRYGB T1 - mRYGB T2	-2.19 (-2.8, -1.58)	mRYGB: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Collinsella	mCTRL T1 - mCTRL T2	-1.95 (-2.48, -1.41)	mCTRL: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Desulfovibrio	mRYGB T1 - mRYGB T2	-3.23 (-4.08, -2.38)	mRYGB: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Enterocloster	mRYGB T1 - mRYGB T2	-3.57 (-4.57, -2.58)	mRYGB: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Holdemania	mCTRL T1 - mCTRL T2	-3.83 (-4.56, -3.1)	mCTRL: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Massiliimalia	mCTRL T1 - mCTRL T2	-4.07 (-4.91, -3.23)	mCTRL: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Massiliimalia	mRYGBTF T1 - mRYGBTF T2	-3.39 (-4.29, -2.49)	mRYGBTF: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Muriventricola	mRYGBTF T1 - mRYGBTF T2	-3.36 (-4.07, -2.65)	mRYGBTF: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Odoribacter	mRYGBTF T1 - mRYGBTF T2	-4.52 (-5.51, -3.53)	mRYGBTF: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Olsenella	mRYGB T1 - mRYGB T2	2.77 (1.98, 3.55)	mRYGB: T2 < T1	< 0.05	< 0.05
Paludihabitans	mRYGBTF T1 - mRYGBTF T2	3.59 (2.68, 4.5)	mRYGBTF: T2 < T1	< 0.05	< 0.05
Roseburia	mRYGBTF T1 - mRYGBTF T2	-4.66 (-5.92, -3.4)	mRYGBTF: T2 > T1	< 0.05	< 0.05
Ruthenibacterium	mRYGBTF T1 - mRYGBTF T2	2.32 (1.69, 2.95)	mRYGBTF: T2 < T1	< 0.05	< 0.05

Tabela 7: Características com abundância diferencial para os contrastes significativos ($p < 0.05$) envolvendo os grupos mRYGB, mRYGB+TF e mCTRL no tempos pré (T1) e 16 semanas pós (T2) FMT.

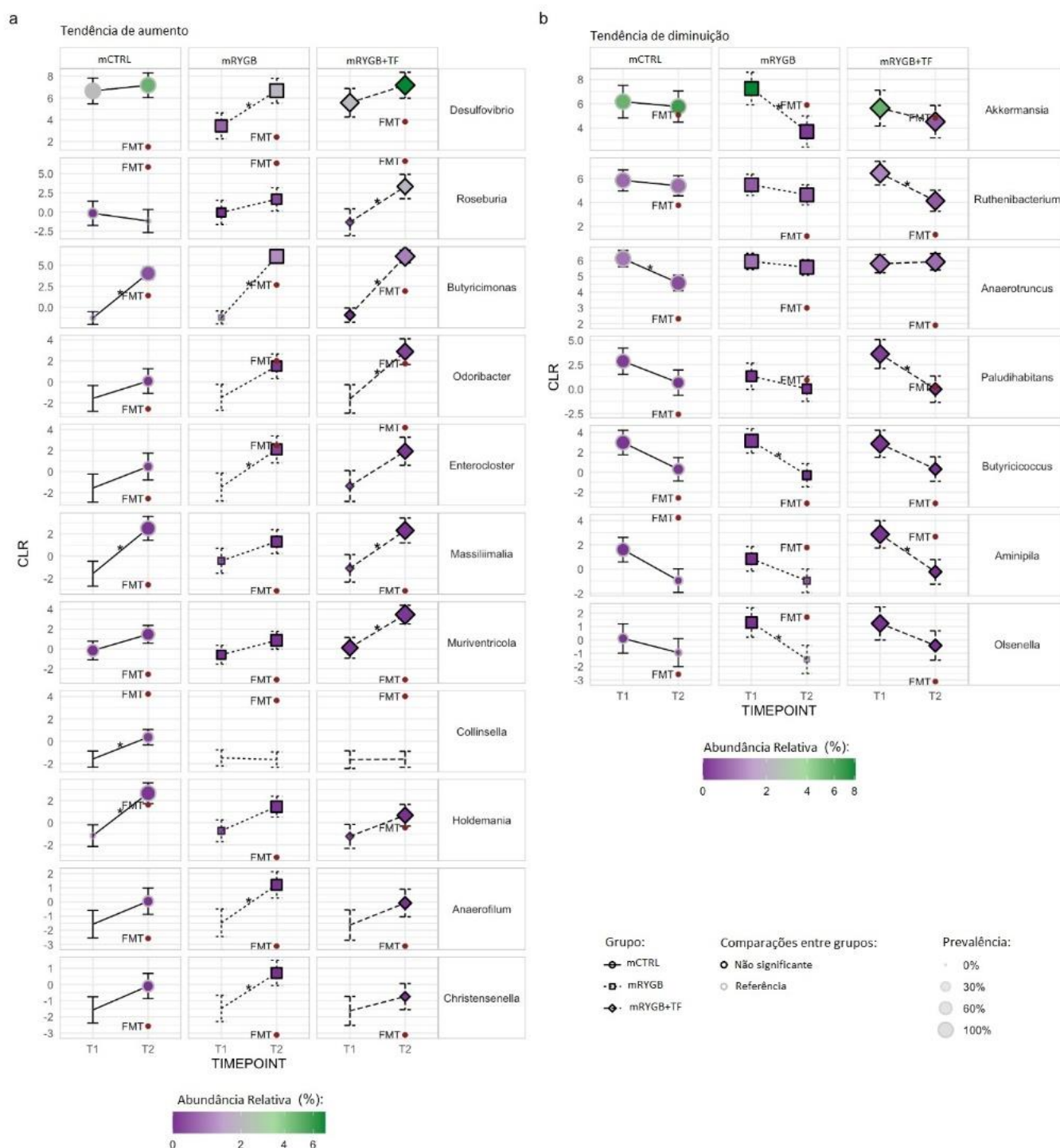


Figura 13. Valores médios em escala centrada log-ratio (CLR $\pm$ intervalo de confiança de 95%) para os gêneros diferencialmente abundantes (DA) entre e/ou dentro dos GRUPOS antes (T1) e após 16 semanas (T2) do transplante fecal. Os asteriscos indicam mudanças significativas ao longo do tempo, dentro de cada grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os GRUPOS. Os pontos marrons representam os valores de CLR correspondentes calculados na amostra de FMT. a) Gêneros cujos valores de CLR no baseline (T1) foram significativamente menores do que os valores correspondentes em T2 em um ou mais grupos. b) Gêneros cujos valores de CLR no baseline (T1) foram significativamente maiores do que os valores correspondentes em T2 em um ou mais grupos.

A análise de abundância diferencial entre os grupos não mostrou diferenças nem na 8SEM nem no momento 16SEM. A análise de abundância diferencial intragrupos mostrou um aumento no gênero *Butyricimonas* (filó *Bacteroidota*) em todos os três grupos. Além disso, o grupo mRYGB

apresentou apenas uma redução no filo *Saccharibacteria*, nos gêneros *Butyricoccus* e *Solibaculum*, e aumentos nos gêneros *Christensenella* e *Anaerofilum* (filo *Bacillota*). O grupo mRYGB+TF apresentou apenas uma redução no gênero *Aminipila* (filo *Bacillota*) e aumentos nos gêneros *Muriventricola* (filo *Bacillota*) e *Odoribacter* (filo *Bacteroidota*), enquanto tanto mRYGB+TF quanto mCTRL apresentaram aumento no gênero *Massiliimalia* (filo *Bacillota*). Por fim, o grupo mCTRL apresentou apenas uma redução em *Anaerotruncus* e um aumento em *Holdemania* (filo *Bacillota*).

7. Discussão

Membros do nosso grupo desenvolveram recentemente um ensaio clínico controlado e randomizado a fim de avaliar os efeitos do exercício físico na composição e diversidade da microbiota intestinal, no qual mulheres com obesidade grave foram alocadas em dois grupos: aquelas submetidas exclusivamente à cirurgia bariátrica do tipo bypass gástrico em Y-de-Roux (RYGB) e aquelas submetidas à cirurgia associada a um programa de treinamento físico supervisionado (RYGB+TF). Um grupo adicional de mulheres eutróficas foi incluído como controle saudável (CTRL). O protocolo de exercício consistiu exclusivamente em treinamento aeróbico contínuo em esteira, realizado três vezes por semana, com duração de 40 a 60 minutos por sessão, ao longo de seis meses, em intensidade prescrita individualmente a partir de teste cardiopulmonar. Os resultados reportados desse ensaio clínico indicam que a cirurgia bariátrica exerceu efeito positivo sobre a microbiota intestinal, aumentando a riqueza bacteriana, enquanto o exercício físico potencializou esses efeitos, promovendo maior uniformidade e diversidade de Shannon. Além disso, o exercício modulou gêneros específicos, atenuando o aumento de *Escherichia/Shigella* e a queda de *Anaerostipes*, o que sugere preservação de microrganismos produtores de AGCC e redução de bactérias endotoxigênicas. Do ponto de vista metabólico, os efeitos do exercício foram discretos, com redução de triglicerídeos, aumento de HDL e diminuição de marcadores inflamatórios, sem impacto robusto no controle glicêmico pós-prandial.

Como seguimento desse ensaio clínico, desenvolvemos esse estudo de prova de conceito a fim de avaliarmos se os benefícios metabólicos conferidos pela cirurgia bariátrica e pelo exercício físico ao hospedeiro são mediados por fatores presentes nas fezes e elucidar o papel da microbiota intestinal nas funções metabólicas do indivíduo. Os resultados do presente estudo devem ser interpretados em conjunto com os dados clínicos previamente descritos, permitindo uma análise translacional mais abrangente.

Estudos prévios já demonstraram que o transplante fecal (FMT) pode modular marcadores inflamatórios, adiposidade e sensibilidade à insulina, tanto em modelos animais obesos que

receberam microbiota de indivíduos magros saudáveis, quanto no sentido inverso, com animais eutróficos desenvolvendo alterações metabólicas após receberem microbiota de indivíduos obesos^{57,62,68,70,84}. Liou et al. demonstraram que camundongos germ-free que receberam FMT de animais submetidos à cirurgia bariátrica apresentaram mudanças positivas na composição da microbiota, além de redução significativa no peso corporal e na adiposidade¹¹⁰. No entanto, até o presente momento, este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos do exercício físico em mulheres submetidas à cirurgia bariátrica através do FMT em camundongos obesos.

Ao transplantar a microbiota dessas doadoras humanas para camundongos obesos, observamos que parte dos gêneros bacterianos presentes nas fezes das doadoras humanas foi efetivamente transmitida para os camundongos receptores. No geral, 15,9% dos gêneros identificados nas amostras de FMT foram transmitidos aos camundongos receptores, representando 16,2% dos gêneros encontrados nas fezes dos animais no período 16SEM, embora a colonização tenha sido parcial, o valor está alinhado com o resultado descrito por Anhê et. al., que descreveu porcentagem semelhante de colonização no transplante de microbiota de paciente bariátrica em camundongos¹¹⁸. Portanto nossas análises indicam que a intervenção por transplante fecal foi efetiva em modular a microbiota dos animais experimentais, como evidenciado pelas diferenças significativas nos perfis microbianos entre os tempos 8SEM e 16SEM, pelas métricas de diversidade alfa, beta e abundância relativa. No entanto, na comparação entre grupos, apenas o grupo mCTRL manteve um perfil distinto em relação aos grupos mRYGB e mRYGB+TF, que apresentaram maior proximidade entre si no período final. A análise de abundância diferencial mostrou padrões específicos em cada grupo e diferenças relevantes foram identificadas. Em todos os grupos observou-se aumento do gênero *Butyricimonas*, comumente associado à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)⁶⁷ e à saúde intestinal¹¹⁴. No grupo mRYGB, observou-se redução de gêneros como *Butyricicoccus* e *Solibaculum*, além de aumento de *Christensenella* e *Anaerofilum*, microrganismos previamente associados ao metabolismo energético e à composição corporal¹¹⁶. Já no grupo mRYGB+TF, observou-se redução de *Aminipila* e aumento de *Muriventricola* e *Odoribacter*, gêneros produtores de AGCC e moduladores do metabolismo de ácidos biliares¹²¹, enquanto tanto mRYGB+TF quanto mCTRL apresentaram aumento de *Massiliimalia*. Por fim, o grupo mCTRL exibiu redução de *Anaerotruncus* e aumento de *Holdemania*, ambos também pertencentes ao filo Bacillota. Esses achados reforçam que, embora não tenham sido observadas mudanças metabólicas robustas, o transplante de microbiota modulou a abundância relativa de gêneros bacterianos potencialmente relevantes para o metabolismo do hospedeiro, assim como Estaki et al. já haviam demonstrado que maior aptidão física correlaciona-se com maior diversidade alfa e maior abundância de bactérias produtoras de AGCC, além de funções metagenômicas distintas,

associadas à saúde metabólica³⁷. Allen et al. relataram que o exercício aeróbico supervisionado aumentou a abundância de *Odoribacter*, *Faecalibacterium* e *Roseburia*, além de promover maior capacidade da microbiota em degradar polissacarídeos e produzir AGCC, induzindo mudanças funcionais independentemente da dieta ou perda de peso³⁹.

No aspecto metabólico, como esperado, os animais do grupo mPDR apresentaram menor peso corporal no início do período de transplante (16SEM), enquanto os grupos receptores de microbiota (mRYGB, mRYGB+TF e mCTRL) mostraram parâmetros glicêmicos semelhantes entre si, porém significativamente superiores ao grupo mPDR, confirmando o desenvolvimento de resistência insulínica nos grupos com animais obesos. Destacamos que, neste modelo, a microbiota fecal isoladamente não foi capaz de modular o balanço energético de maneira substancial uma vez que nos grupos receptores de microbiota não observamos diferenças significativas no ganho de peso corporal ou na adiposidade na comparação entre os grupos ao longo da intervenção. Destacamos ainda que esse dado está em concordância com o ensaio clínico.

Em relação ao metabolismo da glicose, observamos aumento progressivo da glicemia de jejum entre a 8SEM e a 16SEM os três grupos experimentais, além da manutenção da intolerância à glicose evidenciada pelo teste oral de tolerância à glicose (OGTT), sem diferenças significativas entre grupos. Contudo, destacamos que o grupo mRYGB apresentou valores mais elevados de insulina de jejum e HOMA-IR quando comparado aos grupos mRYGB+TF e mCTRL, indicando um perfil mais resistente à insulina neste grupo. Estudos prévios, como o de Ross et al., demonstraram que aumento da atividade física promoveu melhora significativa em gordura abdominal e resistência insulínica, mesmo sem emagrecimento expressivo em participantes humanos²⁴, bem como o de Zoll et al, que reportaram melhora na regulação da glicose em camundongos que receberam transplante de microbiota proveniente de animais submetidos a treinamento físico, mesmo sem apresentar alterações significativas na composição corporal, e ainda, que a melhora foi mais evidente nos receptores alimentados com dieta padrão¹¹⁷.

Ressaltamos que esses achados sugerem que o exercício físico beneficiou mais a sensibilidade hepática do que a periférica à insulina¹²⁹, em consonância com o ensaio clínico, em que maiores reduções nos triglicerídeos plasmáticos foram observadas em RYGB+TF em comparação a RYGB, e com evidências prévias de que a melhora da sensibilidade insulínica hepática reduz a secreção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL-triglicerídeos) e a lipogênese hepática de novo¹³⁰. Efeito que pode ser em parte atribuído ao aumento da produção e sinalização de incretinas, como GLP-1, estimuladas pelos AGCC via FFAR2/3⁷². Além disso, a microbiota exerce papel central na programação epigenética de múltiplos tecidos do hospedeiro,

podendo modular a expressão gênica em fígado, tecido adiposo e íleo de forma dependente da dieta ⁷³.

Ademais, nossos resultados indicam também que o FMT isoladamente não foi capaz de promover melhora substancial em parâmetros como marcadores inflamatórios séricos ou teciduais, corroborando mais uma vez com os dados clínicos prévios do nosso grupo, que demonstraram efeitos modestos da atividade física sobre o perfil metabólico de pacientes bariátricas fisicamente ativas em comparação com pacientes sedentárias, reforçando a hipótese de que outros fatores derivados da microbiota podem ser mediadores dos efeitos metabólicos observados. Tampouco observamos diferenças significativas nos níveis fecais de AGCC entre grupos receptores. Importante destacar que, mesmo que não tenhamos detectado diferenças nos níveis fecais de AGCC, esse resultado deve ser interpretado com cautela. Embora muitos estudos clínicos usem AGCC fecais como representação do metabolismo microbiano, estima-se que mais de 95% dos AGCC produzidos no cólon sejam rapidamente absorvidos localmente, de modo que as concentrações fecais não refletem a produção real^{120, 121}. Assim, é possível que a atividade fermentativa, com produção de butirato, tenha sido mais intensa no grupo mRYGB+TF sem que isso fosse captado nas fezes.

Alterações na morfologia intestinal, entretanto, podem desempenhar um papel relevante na interação entre microbiota e metabolismo, visto que os camundongos que receberam FMT de pacientes bariátricas treinadas exibiram razão vilo/crípta e escores histológicos de jejuno e cólon/ceco comparáveis aos observados em camundongos que receberam FMT de participantes magras saudáveis, além de menores escores histológicos de cólon/ceco em comparação com aqueles que receberam FMT de pacientes bariátricas sedentárias. A razão vilo/crípta é considerada um marcador-chave da saúde intestinal, associada à eficiência absorptiva e ao equilíbrio proliferativo da mucosa intestinal^{122 - 124}, em que valores mais elevados sugerem maior eficiência na absorção de nutrientes, enquanto valores reduzidos indicam atrofia das vilosidades, hiperproliferação ou aumento da inflamação, condições que podem comprometer a função de barreira intestinal e estão associadas à resistência à insulina¹²⁵.

Quando olhamos para literatura, há forte evidências da ligação entre permeabilidade intestinal e resistência insulina⁷¹. Cani et al demonstraram a importância da barreira intestinal e redução do LPS na melhora metabólica em humanos⁶⁸; Li et al. demonstraram que camundongos diabéticos apresentaram diminuição da razão vilo/crípta e da espessura da mucosa, alterações que foram revertidas após oito semanas de treinamento físico¹²⁶. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente o butirato, destacam-se como mediadores centrais nesse contexto, influenciando diretamente a integridade da barreira intestinal, a secreção de incretinas (GLP-1, PYY) e a sensibilidade à insulina por meio da ativação dos receptores FFAR2/3^{67,68}. Além disso,

os AGCC regulam a expressão de proteínas de junção estreita, como occludina, claudinas e ZO-1, que controlam a permeabilidade paracelular e protegem contra a translocação de endotoxinas. A redução dessas proteínas está associada à ativação de vias inflamatórias sistêmicas via TLR4, contribuindo para resistência insulínica e disfunção metabólica.

As alterações na microbiota dos camundongos receptores podem justificar esses resultados histológicos. O grupo mRYGB apresentou reduções em *Akkermansia*, um gênero tipicamente associado à melhora da homeostase glicêmica, à integridade da barreira intestinal e à redução da inflamação por meio da via de degradação de mucina¹²¹, além de diminuição de *Butyricoccus* e *Olsenella*, ambos gêneros fermentadores de fibras associados à produção de butirato¹²⁷ o que pode justificar a menor sensibilidade hepática à insulina e os desfechos menos favoráveis de morfologia intestinal observados em mRYGB, em comparação com mRYGB+TF e mCTRL. Por outro lado, mRYGB+TF mostrou aumento de *Roseburia* e *Muriventricola*, ambos produtores de butirato por fermentação de carboidratos¹²⁷, além de *Odoribacter*, um gênero envolvido no metabolismo de ácidos biliares e na produção de AGCC¹²⁶. Finalmente, mCTRL apresentou redução de *Anaerotruncus*, um gênero associado à disbiose e à homeostase glicêmica prejudicada em camundongos¹²⁸, o que corrobora com os parâmetros de morfologia intestinal mais favoráveis em comparação com os outros grupos.

Curiosamente observou-se aumento da diversidade alfa no grupo mRYGB, mas não em mRYGB+TF ou mCTRL. Embora inesperado, esse achado encontra respaldo em alguns estudos que também não encontraram associação entre melhora no controle metabólico em pacientes bariátricos e diversidade bacteriana¹¹⁸. Além disso, Anhê et al. relataram que camundongos que receberam FMT de pacientes bariátricos não apresentaram aumento de diversidade alfa, apesar de melhoras no controle glicêmico¹¹⁸. Assim, são necessários estudos futuros para esclarecer melhor o papel da diversidade alfa da microbiota intestinal na saúde metabólica.

Apesar dos resultados interessantes, este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos achados. Uma vez que conduzimos o experimento utilizando animais SPF, era esperado que o grau de colonização sofresse pressão biológica da MI residente, ainda que a depleção parcial pelo uso de antibióticos de amplo espectro permita um maior engajamento do FMT, conforme apontado por Porcari et al.¹¹². Os resultados deste estudo apontam para uma colonização adaptativa, ou seja, a microbiota atingiu um novo estado de equilíbrio compatível com o ambiente intestinal murinho. Pontuamos ainda que os animais dos grupos experimentais mRYGB, mRYGB+TF e mCTRL foram mantidos com dieta hipercalórica durante todo o período experimental, fator que, segundo alguns autores, exerce maior impacto na modulação da microbiota intestinal do que outros fatores, como a prática de atividade física ou mesmo o transplante de microbiota fecal^{113,114}, e pode ter limitado a

plasticidade da microbiota. No entanto, esse resultado é comparável ao de estudos prévios que realizaram FMT de pacientes submetidos a diferentes tipos de cirurgia bariátrica em camundongos germ-free, relatando eficiência de colonização entre 7 e 20%, a qual esteve associada a melhorias metabólicas e de morfologia intestinal¹¹⁹. Assim, acreditamos que essa limitação não tenha comprometido significativamente os resultados, embora seja possível que os efeitos pudessem ser mais pronunciados em condições germ-free. Estudos futuros avaliando o FMT de pacientes bariátricos treinados em modelos germ-free são, portanto, necessários para confirmar nossos achados. Evidenciamos ainda que, embora o modelo murino seja amplamente utilizado para estudos de FMT, diferenças anatômicas, imunológicas e dietéticas entre humanos e roedores permanecem como um fator limitante à transposição direta dos achados. Outras limitações incluem o período de jejum realizado pelos animais do momento da coleta de tecido para análise das proteínas ligadas à via de sinalização insulínica, que pode ter mascarado esse dado; a ausência de análises de ácidos biliares e de outros metabólitos, como a trimetilamina fecal (TMA), associados à saúde metabólica do hospedeiro¹³¹, além da falta de avaliação da função de barreira intestinal nos camundongos receptores, que poderia ajudar a explicar os resultados obtidos e merece investigação em trabalhos futuros.

Em conjunto, nosso estudo demonstra que os efeitos metabólicos positivos podem até certo ponto ser transferidos por via FMT, reforçando o envolvimento da microbiota intestinal como mediadora de processos metabólicos. Adicionalmente, o estudo reforça a ideia de que o sucesso do FMT está intimamente ligado a múltiplos fatores, a começar pelas características do doador, neste caso, mulheres de meia-idade, com obesidade severa e baixo nível de escolaridade e status socioeconômico. Fatores relacionados ao receptor, como composição basal da microbiota do receptor e condições inflamatórias do hospedeiro também precisam ser levadas em conta ao analisar os resultados¹¹¹; assim, o nível de colonização e os resultados produzidos poderiam ser diferentes com a utilização de animais germ-free¹¹⁷ ou ainda com um número amostral maior ou seguimento mais longo de estudo.

8. Conclusão

Este estudo de prova de conceito demonstrou que a microbiota intestinal modulada por cirurgia bariátrica e exercício físico possui propriedades funcionais capazes de influenciar, ainda que parcialmente, o metabolismo do hospedeiro por meio de transplante fecal (FMT). A transferência de assinaturas microbianas específicas para camundongos obesos resultou em alterações na composição bacteriana, na morfologia intestinal e em parâmetros relacionados à sensibilidade insulínica, especialmente hepática, mesmo na ausência de mudanças expressivas em peso corporal ou adiposidade. Os dados obtidos reforçam a hipótese de que a microbiota

intestinal atua como mediadora dos efeitos metabólicos de intervenções terapêuticas, e que o exercício físico pode potencializar os benefícios induzidos pela cirurgia bariátrica, promovendo maior abundância de microrganismos fermentadores de fibras e produtores de AGCC. Embora os efeitos observados tenham sido sutis, eles foram consistentes com achados clínicos e experimentais prévios, sugerindo que a modulação funcional da microbiota pode ser mais relevante do que alterações taxonômicas isoladas e somam-se às evidências já existentes sobre os efeitos benéficos do exercício em pacientes pós-bariátricos, reforçando a importância clínica dessa ferramenta não cirúrgica e não farmacológica nesta população.

Acreditamos que os dados oriundos deste estudo ajudam a elucidar o papel da microbiota nas funções metabólicas do indivíduo e poderão expandir as evidências para um conceito emergente, denominado como “*risk factor gap*”¹³², o qual descreve que os benefícios do exercício físico no risco de doenças cardiovasculares excedem em mais de 50% do esperado por mudanças em fatores de risco cardiovascular tais como peso corporal e adiposidade¹¹⁹, ao desvendar mais um potencial mecanismo de ação do exercício físico. Além disso, nossos dados adicionam de maneira significativa à literatura ao destacar a importância de ações terapêuticas interdisciplinares para o tratamento da obesidade mórbida. Por fim, ensejamos a necessidade de mais estudos a fim de aprofundar o conhecimento sobre o potencial “cross-talk” entre a microbiota intestinal e as diversas vias metabólicas, além de pesquisas com a utilização de probióticos que também possam exercer efeitos cardiometabólicos benéficos em pacientes bariátricos.

9. REFERÊNCIAS

1. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2015;33(7):673-89.
2. World Health Organization. Obesity and overweight. 16 February 2018. [Http://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/obesity-and-overweight](http://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/obesity-and-overweight). Acesso em: 27 de janeiro de 2019.
3. Sturm R. Increases in morbid obesity in the USA: 2000-2005. *Public Health* 2007;121:492-4.
4. Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med*. 2012; 42(6):563–70.
5. Brasil, Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
6. Apovian CM. Obesity: Definition, Comorbidities, Causes, and Burden. *Am J Manag Care*. 2016;22:S176-S185.
7. Lavie JC, De Schutter A, Parto P, et al. Obesity and Prevalence of Cardiovascular Diseases and Prognosis – the Obesity Paradox Updated. *Prog Cardiovasc Dis*. 2016;58(5):537-47.
8. Alpert MA, Lavie CJ, Agrawal H, Kumar A, Kumar SA. Cardiac effects of obesity: pathophysiologic, clinical and prognostic consequences: a review. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2016;36:1-11.
9. Lavie CJ, Alpert MA, Arena R, Mehra MR, Milani RV, Ventura HO. Impact of obesity and the obesity paradox on prevalence and prognosis in heart failure. *JACC Heart Fail*. 2013;1:93-102.
10. Ackerman SE, Blackburn OA, Marchildon F, Cohen P. Impact of obesity and the obesity paradox on and Cancer. *Curr Obes Rep*. 2017;6(2):195-203.
11. Berger NA. Obesity and cancer pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1311:57-76
12. Cătoi AF, Pârvu A, Mureșan A, Busetto L. Metabolic Mechanisms in Obesity and Type 2 Diabetes: Insights from Bariatric/Metabolic Surgery. *Obes Facts*. 2015;8(6):350-63.
13. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, et al. Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012;366:1577-85.
14. Bond DS, Phelan S, Wolfe LG, et al. Becoming physically active after bariatric surgery is associated with improved weight loss and health-related quality of life. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:78-83.
15. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2009;122:248-56 e5.
16. Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004;351:2683-93.
17. Mallipedhi A, Prior SL, Barry JD, Caplin S, Baxter JN, Stephens JW. Changes in inflammatory markers after sleeve gastrectomy in patients with impaired glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Surg Obes Relat Dis* 2014;10:1123-8.
18. Arismendi E, Rivas E, Agusti A, et al. The systemic inflammome of severe obesity before and after bariatric surgery. *PLoS One* 2014;9:e107859.
19. Lupoli R, Di Minno MN, Guidone C, et al. Effects of bariatric surgery on markers of subclinical atherosclerosis and endothelial function: a meta-analysis of literature studies. *Int J Obes (Lond)* 2016;40:395-402.
20. Maser RE, Lenhard MJ, Irgau I, Wynn GM. Impact of surgically induced weight loss on cardiovascular autonomic function: one-year follow-up. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:364-9.
21. Tschoner A, Sturm W, Gelsinger C, et al. Long-term effects of weight loss after bariatric surgery on functional and structural markers of atherosclerosis. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:1960-5.
22. Ross R, Janiszewski PM. Is weight loss the optimal target for obesity-related cardiovascular disease risk reduction? *Can J Cardiol* 2008;24 Suppl D:25D-31D.

23. Ross R, Janssen I, Dawson J, et al. Exercise-induced reduction in obesity and insulin resistance in women: a randomized controlled trial. *Obes Res* 2004;12:789-98.
24. Ross R, Lam M, Blair SN, et al. Trial of prevention and reduction of obesity through active living in clinical settings: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2012;172:414-24.
25. Pugh CJ, Spring VS, Kemp GJ, et al. Exercise training reverses endothelial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;307:H1298-306.
26. Dantas WS, Gil S, Murai IH, et al. Reversal of improved endothelial after bariatric surgery is mitigated by exercise training. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Oct 30;72(18):2278-2279
27. Murai IH, Roschel H, Dantas WS, Gil S, Merege-Filho CAA, de Cleva R, de Sá-Pinto AL, Lima F, Santo MA, Benatti FB, Kirwan JP, Pereira RMR, Gualano B. Exercise mitigates bone loss in women with severe obesity after Roux-en-Y Gastric Bypass: A Randomized Controlled Trial. *JCEM* 2019. Oct 1;104(10):4639-4650. doi: 10.1210/jc.2019-00074..
28. Marcon ER, Baglioni S, Bittencourt L, Lopes CL, Neumann CR, Trindade MR. What Is the Best Treatment before bariatric Surgery? Exercise, Exercise and Group Therapy, or Conventional Waiting: a Randomized Controlled Trial. *Obes Surg* 2017;27:763-73.
29. Votruba SB, Horvitz MA, Schoeller DA. The role of exercise in the treatment of obesity. *Nutrition* 2000;16:179-88.
30. Magouliotis DE, Tasiopoulou VS, Sioka E, Chatedaki C, Zacharoulis D. Impact of Bariatric Surgery on Metabolic and Gut Microbiota Profile: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obes Surg*. 2017;27:1345–1357.
31. Sachdev P, Reece L, Thomson M, et al. Intra-gastric balloon as an adjunct to lifestyle programme in severely obese adolescents: impact on biomedical outcomes and skeletal health. *Int J Obes (Lond)* 2018;42:115-8.
32. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006. 444:1022-3.
33. Flint HJ. Obesity and the gut microbiota. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45 Suppl:S128-32.
34. Liu R, Hong J, Xu X, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med*. 2017;23(7):859-868.
35. Aron-Wisnewsky J, Clement K. The effects of gastrointestinal surgery on gut microbiota: potential contribution to improved insulin sensitivity. *Curr Atheroscler Rep* 2014;16:454.
36. Peck BCE, Seeley RJ. How does 'metabolic surgery' work its magic? New evidence for gut microbiota. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2018;25:81-6.
37. Estaki M, Pither J, Baumeister P, et al. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome*. 2016 Aug 8;4(1):42.
38. Clément, K., Ferré, P.. Genetics and the Pathophysiology of Obesity. *Pediatric research*, v. 53, n. 5, p. 721-724, 2003.
39. Allen JM, Mailing LJ, Niemi GM, et al. Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Med Sci Sports Exerc* 2018;50:747-57.
40. Brasil, Ministério da Saúde. *Vigitel Brasil 2023: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2024.
41. World Obesity Federation 2022. *World Obesity Atlas 2022*. *World-Obesity-Atlas-2022-updated.pdf* (worldobesity.org). Acesso em 21 de dezembro 2022.
42. Skelton JA, Irby MB, Grzywacz JG, Miller G. Etiologies of obesity in children: nature and nurture. *Pediatr Clin North Am*. 2011;58(6):1333-1354
43. Haslam, D. W.. James W. P.. Obesity. *Lancet*. v. 366, p. 1197 – 1209, 2005.
44. Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference, 1991. *Am J Clin Nutr* 1992 Feb;55(2 Suppl):615S-619S.
45. Ahmed Abdalazim Dafallah Albashi. The potential impacts of obesity on COVID-19. *Clin Med (Lond)* 2020 Jul;20(4):e109-e113.

46. Demaria, E. J.. Bariatric Surgery for Morbid Obesity, *N Engl J Med*, v. 356, p. 2176-2183, 2007.
47. North American Association for the Study of Obesity and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Practical Guide: Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. Bethesda, Md: National Institutes of Health; 2000. NIH publication 00-4084.
48. Schauer, P. R. *et al.*. Effect of laparoscopic Roux en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus, *Ann Surg*, v. 238, p. 467–485, 2003.
49. Lima, M. M. *et al.*. Acute effect of roux-en-y gastric bypass on whole-body insulin sensitivity; Clinical trial demonstrates exercise following, *J Clin Endocrinol Metab*, v. 95, p. 3871–3875, 2010.
50. Coen PM, Menshikova EV, Distefano G, Zheng D, Tanner CJ, Standley RA, *et al.* Exercise and weight loss improve muscle mitochondrial respiration, lipid partitioning, and insulin sensitivity after gastric bypass surgery. *Diabetes*. 2015; 64(11):3737–50.
51. Kindel, T. L. *et al.*. Sleeve Gastrectomy in obese, Zucker rats restores cardiac function and geometry towards a lean phenotype independent of weight-loss., *Journal of Cardiac Failure*, 2019.
52. Adams TD. *et al.* Weight and metabolic outcomes 12 years after gastric bypass. *N. Engl. J. Med*. 2018; 378(1):93–6.
53. Dantas *et al.*, Exercise-Induced Increases in Insulin Sensitivity After Bariatric Surgery Are Mediated By Muscle Extracellular Matrix Remodeling. *Diabetes*. 2020 Aug;69(8):1675-1691
54. Gualano B. *et al.* Exercise is Key to Sustaining Metabolic Gains After Bariatric Surgery *Exerc Sport Sci Ver*. 2021 Jul 1;49(3):197-204.
55. Kobyliak *et al.*. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. *Nutrition Journal*. 2016. 15:43.
56. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016 Aug 19;14(8):e1002533
57. Bokoliya SC, Dorsett Y, *et. al.* Procedures for Fecal Microbiota Transplantation in Murine Microbiome Studies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Sep 21;11:711055
58. Clavel T, Desmarchelier C, Haller D, *et al.* Intestinal microbiota in metabolic diseases: from bacterial community structure and functions to species of pathophysiological relevance. *Gut Microbes*. 2014 Jul 1;5(4):544-51.
59. Bajzer M & Seeley RJ. Obesity and gut flora. 2006. *Nature* 444, 1009–1010.
60. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5(7):e177.
61. Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, *et al.* Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients*. 2019 Nov 7;11(11):2690.
62. Olga Castaner *et al.* The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review. *International Journal of Endocrinology* 2018:1-9.
63. Baothman O. A., Zamzami M. A., *et al.* The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes, *Lipids in Health and Disease*, vol. 15, no. 1, p. 108, 2016.
64. Duncan, S. H., Lobley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P., & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity*, 32(11), 1720–1724. doi:10.1038/ijo.2008.155
65. Chakraborti CK. New-found link between microbiota and obesity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2015;6(4):110–119.
66. Cani P. D, Osto M., *et al.*, Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity, *Gut Microbes*, 2012. vol. 3, no. 4, pp. 279–288.
67. Den Besten G, *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. 2013;54(9):2325–2340.
68. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(10):577–591.
69. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470–1481.

70. Bajzer M, Seeley RJ. Obesity and gut flora. *Nature*. 2006;444(7122):1009–1010.
71. Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JBL, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*. 2010;53(4):606–613. doi:10.1007/s00125-010-1662-7.
72. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein–coupled receptor FFAR2. *Diabetes*. 2012;61(2):364–371.
73. Krautkramer KA, Kreznar JH, Romano KA, et al. Diet–microbiota interactions mediate global epigenetic programming in multiple host tissues. *Mol Cell*. 2016;64(5):982–992
74. O'Hagan HM, Wang W, Sen S, et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG islands. *Cancer Cell*. 2011;20(5):606–619.
75. Amabebe, E., Robert, F. O., Agbalalah, T., & Orubu, E. S. F. (2020). Microbial dysbiosis-induced obesity: role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *British Journal of Nutrition*, 123(10), 1127–1137. doi:10.1017/S0007114520000380
76. Ahn CH, Buse JB. Management of endocrine disease: how low should we go with glucose and HbA1c levels? *Eur J Endocrinol*. 2011;164(4):529–537.
77. Zhang, H.; DiBaise, J.K.; et al.. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 2365–2370.
78. Gentile J.K.A, Oliveira K.D., et al.. The intestinal microbiome in patients undergoing bariatric surgery: a systematic review. *Arq bras cir dig*. 2022 dec 19;35:e1707.
79. Allen, J.M, Mailing, L.J, Niemi, G.M, et al.. Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Med Sci Sports Exerc*. 2018 Apr;50(4):747-757.
80. Greiner TU, Bäckhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(4):117–123.
81. Lips MA, de Groot GH, van Klinken JB, et al. Calorie restriction and Roux-en-Y gastric bypass have comparable effects on postprandial gut hormone responses. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(6):1200–1206.
82. Furet JP, Kong LC, Tap J, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery–induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*. 2010;59(12):3049–3057.
83. Motiani KK, Collado MC, Eskelinen JJ, et al.. Exercise Training Modulates Gut Microbiota Profile and Improves Endotoxemia. *Med Sci Sports Exerc*. 2020 Jan;52(1):94-104.
84. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*. 2014;63(12):1913–1920.
85. De Wilde J, Smit E, Mohren R, Boekschoten MV, de Groot P, van den Berg SA, et al. An 8-week high-fat diet induces obesity and insulin resistance with small changes in the muscle transcriptome of C57BL/6J mice. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2010;3(6):280–291. doi:10.1159/000308466.
86. Zoll J, Read MN, Heywood SE, Estevez E, et al.. Fecal microbiota transplantation from high caloric-fed donors alters glucose metabolism in recipient mice, independently of adiposity or exercise status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020 Jul 1;319(1):E203-E216
87. Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009;4(10):e7401.
88. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 2012;6(8):1621–1624. doi:10.1038/ismej.2012.8.
89. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
90. Cock PJ, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, Dalke A, Friedberg I, Hamelryck T, Kauff F, Wilczynski B, de Hoon MJ. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1422-3.
91. Masella AP, Bartram AK, Truszkowski JM, Brown DG, Neufeld JD. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13:31.

92. Smyth RP, Schlub TE, Grimm A, Venturi V, Chopra A, Mallal S, Davenport MP, Mak J. Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. *Gene*. 2010;469(1-2):45-51.
93. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.
94. Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Labs Tech. J*. 1948; 27:379–423
95. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol*. 2005;71(12):8228–8235.
96. Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr*. 1957;27:325–349.
97. Mallick H, Rahnavard A, McIver LJ, Ma S, Zhang Y, Nguyen LH, Tickle TL, Weingart G, Ren B, Schwager EH, Chatterjee S, Thompson KN, Wilkinson JE, Subramanian A, Lu Y, Waldron L, Paulson JN, Franzosa EA, Bravo HC, Huttenhower C. Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. *PLoS Comput Biol*. 2021;17(11):e1009442.
98. Zhou H, He K, Chen J, Zhang X. LinDA: linear models for differential abundance analysis of microbiome compositional data. *Genome Biol*. 2022;23(1):95.
99. Lin H, Peddada SD. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun*. 2020;11(1):3514.
100. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139-40.
101. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
102. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):e47.
103. Fernandes AD, Macklaim JM, Linn TG, Reid G, Gloor GB. ANOVA-like differential expression (ALDEx) analysis for mixed population RNA-Seq. *PLoS One*. 2013 Jul 2;8(7):e67019.
104. Calgaro M, Romualdi C, Risso D, Vitulo N. benchdamic: benchmarking of differential abundance methods for microbiome data. *Bioinformatics*. 2023;39(1):btac778.
105. Matthews D.R. *et al*. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
106. Zhang WX, Fan J, Ma J, Rao YS, Zhang L, Yan YE. Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR normalization in three types of rat adipose tissue. *Int J Mol Sci*. 2016 Jun 22;17(6):968. doi:10.3390/ijms17060968. PMID: 27338366; PMCID: PMC4926500.
107. Rogers, A. B.; Dintzis, R. Z. Hepatobiliary system. In: Treuting, P. M.; Dintzis, S. M.; Montine, K. S. Comparative anatomy and histology: a mouse, rat and human atlas. 2nd ed., Academic Press, 2017.
108. Ward, J. M.; Cherian, S.; Linden, M. A. Hematopoietic and lymphoid tissues. In: Treuting, P. M.; Dintzis, S. M.; Montine, K. S. Comparative anatomy and histology: a mouse, rat and human atlas. 2nd ed., Academic Press, 2017.
109. Costa, C. J. S et al. Histological Alterations in the Internal Organs of Wistar Han Rats (*Rattus norvegicus*) Euthanized by Five Different Methods. *J Am Assoc Lab Anim Sci.*, 2023. 10.30802/AALAS-JAALAS-23-000007.
110. Percy, D. H.; Barthold, S. W. Pathology of laboratory rodents and rabbits. 3rd ed., Blackwell, 2007.
111. Liou AP, Paziuk M, Luevano JM Jr, et al. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med*. 2013;5(178):178ra41.
112. Porcari S et al. Key determinants of success in fecal microbiota transplantation: From microbiome to clinic. *Cell Host Microbe*. 2023;31(5):712–733.
113. Rodriguez DM, Kasahara K, Floess C, Vega NM, Donia MS, Nadell CD, et al. Basal diet determines long-term composition of the gut microbiome and mouse phenotype. *Nat Microbiol*. 2023;8(2):250–64. doi:10.1038/s41564-022-01268-2.

114. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1716–24.e1–2. doi:10.1053/j.gastro.2009.08.042.
115. Al Bander Z, Nitert MD, Mousa A, Naderpoor N. The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020; 17(20):7618. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207618>
116. Dao MC et al. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2016;65(3):426–436.
117. Waters JL, Ley RE. The human gut bacteria *Christensenellaceae* are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol*. 2019;17(1):83. doi:10.1186/s12915-019-0699-4.
- Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999;22:1462-70.
118. Zoll J et al. Fecal microbiota transplantation from exercise-trained mice improves glucose regulation in sedentary mice. *Med Sci Sports Exerc*. 2020;52(1):94–104.
119. Anhê FF, Zlitni S, Zhang SY, Choi BS, Chen CY, Foley KP, Barra NG, Surette MG, Biertho L, Richard D, Tchernof A, Lam TKT, Marette A, Schertzer J. Human gut microbiota after bariatric surgery alters intestinal morphology and glucose absorption in mice independently of obesity. *Gut*. 2023 Mar;72(3):460-471. doi: 10.1136/gutjnl-2022-328185.
120. Sakata T. Fecal SCFA as biomarkers—interpretation caveats. *Anim Sci J / Nutr Rev*. 2019.
121. Von Engelhardt W et al. Absorption of short-chain fatty acids in the hindgut of mammals. *J Anim Sci*. 1989
122. Zhang X, Li J, Wang J, et al. Akkermansia muciniphila: A promising probiotic to regulate glucose metabolism and gut barrier integrity. *Gut Microbes*. 2024;16(1):2273756. doi:10.1080/19490976.2023.2273756
123. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. *Am J Anat*. 1974;141(4):537-61. doi:10.1002/aja.1001410407.
124. Drozdowski LA, Thomson AB. Intestinal mucosal adaptation. *World J Gastroenterol*. 2006;12(29):4614-27. doi:10.3748/wjg.v12.i29.4614
125. Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C. Mend your fences: The epithelial barrier and its relationship with mucosal immunity in inflammatory bowel disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;4(1):33-46. doi:10.1016/j.jcmgh.2017.03.007
126. Wang Y, Zhang C, Li X, et al. Intestinal villus/crypt alterations and impaired barrier function contribute to insulin resistance in obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2025;16:1523490. doi:10.3389/fendo.2025.1523490
127. Li X, Yang J, Xu J, et al. Exercise training improves intestinal morphology and barrier function in diabetic mice via gut microbiota modulation. *Nutrients*. 2022;14(21):4558. doi:10.3390/nu14214558
128. Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*. 2017;15:73. doi:10.1186/s12967-017-1175-y
129. Bender JM, Cox LM, Gonzalez A, et al. Dysbiosis-associated taxa in metabolic disorders: Evidence from mouse models and human studies. *Cell Rep Med*. 2024;5(6):101234. doi:10.1016/j.xcrm.2024.101234
130. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(1):E15–E26. doi:10.1152/ajpendo.00645.2007
131. Sparks JD, Sparks CE, Adeli K. Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(9):2104-12. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241463
132. Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(12): 693-706. doi:10.1038/nrcardio.2017.100

133. Green DJ, O'Driscoll G, Joyner MJ, Cable NT. Exercise and cardiovascular risk reduction: time to update the rationale for exercise? *J Appl Physiol* (1985). 2008 Aug;105(2):766-8. doi: 10.1152/japplphysiol.01028.2007.