



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E
TECNOLOGIAS**

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO
FÍSICO NA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS
COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

RAFAEL MAIA TADELLE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E
TECNOLOGIAS**

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO
FÍSICO NA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS
COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

RAFAEL MAIA TADELLE

Orientador: Prof. Doutor Alexandre Gabarra de Oliveira

Dissertação/tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento Humano e Tecnologias.

**Rio Claro – SP
2021**

T121c Tadelle, Rafael Maia
Comparação do efeito de diferentes intensidades de exercício físico na microbiota intestinal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Rafael Maia Tadelle. -- Rio Claro, 2021
56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Alexandre Gabarra de Oliveira

1. Microbiota Intestinal. 2. Treinamento Intervalado. 3. Treinamento Contínuo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: COMPARAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO NA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

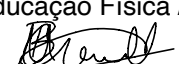
AUTOR: RAFAEL MAIA TADELLE

ORIENTADOR: ALEXANDRE GABARRA DE OLIVEIRA

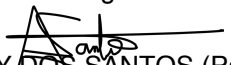
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em DESENVOLVIMENTO HUMANO E TECNOLOGIAS, área: Tecnologias nas Dinâmicas Corporais pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ALEXANDRE GABARRA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Educação Física / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. BRUNO DE MELO CARVALHO (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Biológicas / Universidade de Pernambuco - Recife / PE



Prof. Dr. ANDREY DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas / SP

Rio Claro, 28 de julho de 2021

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram durante o processo e em especial à memória de minha avó, que descansa em paz, embora saiba que estará sempre ao meu lado. Estou cumprindo com o combinado, sempre dando o meu melhor em tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guardar a minha vida e guiar durante as várias viagens, muitas vezes perigosas, sob chuva e em longas distâncias. Também por me direcionar neste caminho glorioso.

Ao Alexandre Gabarra de Oliveira, meu orientador, que aceitou o desafio de educar e pacientemente guiar um completo desconhecido durante todos os processos desse estudo, sempre de bom humor e atencioso, do jeito acelerado e cafeinado de sempre.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Lívia, Hiago, Thiago, Irineu, Luiza, e todos os outros que possibilitaram os experimentos durante todas as etapas, sempre dispostos a ajudar

Ao Prof. Dr. Mario Saad, Chefe responsável pelo Laboratório de Investigação Crônica de Resistência a Insulina (UNICAMP), por abrir as portas para uso do material disponível em seu laboratório, bem como os profissionais que se fazem presentes nos experimentos diários, em especial a Dr. Heloisa Balan, por me transmitir todo conhecimento quando solicitado, sempre com riqueza nas informações, também ao Dr. Andrey dos Santos e à mestre Dioze Guadagnini.

A minha família e minha companheira pelo apoio e compreensão nas várias ausências em vários dias e finais de semana.

Agradeço também a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse estudo.

RESUMO

Em se tratando de microbiota intestinal, atualmente associado ao desempenho em exercícios e melhor absorção de nutrientes pelo intestino, há um crescente interesse sobre qual o efeito do exercício sobre a composição da microbiota intestinal, visto que certos tipos de bactérias são aumentados em determinados filós pós-períodos de treinamentos contínuos e intervalados e por apresentar melhora no rendimento quando em execução dos exercícios. A microbiota é formada principalmente por dois filós conhecidos como *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, sendo sua proporção muito importante para uma Eubiose, além de fungos, vírus e outros organismos. Paralelamente, torna-se cada vez mais evidente que o exercício físico pode ser uma terapia útil para melhorar as proporções de cada filo em decorrência de uma má alimentação, uma vez que é capaz de modular o perfil da microbiota. Evidências recentes demonstram efeitos benéficos do exercício físico (agudo e crônico) no rendimento em atividades. Entretanto, permanece ainda incerto qual estímulo é mais eficaz para promover uma alteração positiva, e se o exercício é capaz de criar uma microbiota única. Assim, nesse projeto, investigamos o efeito da dieta hiperlipídica e do exercício físico crônico sobre a alteração da estrutura da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Microbiota. Treinamento Intervalado. Treinamento contínuo.

ABSTRACT

In the case of microbiota, currently associated with exercise performance and protection against unrestrained absorption of nutrients from the intestine, there is a growing interest in the effect of exercise on the composition of the intestinal microbiota, since certain types of bacteria are increased in certain phyla post periods of continuous and interval training, and to improve performance when performing exercises. The microbiota is basically formed by two phyla known as *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, its proportion being very important for an Eubiose. At the same time, it becomes increasingly evident that physical exercise can be a useful therapy to improve the proportions of each phylum due to poor nutrition, since it is able to stimulate the growth of certain types of bacteria and decrease of others. Recent evidence demonstrates the beneficial effects of physical exercise (acute and chronic) on performance in activities. However, it remains unclear which stimulus is most effective in promoting a positive change, and whether exercise is capable of creating a unique microbiota. Thus, in this project, we will investigate the effect of the high-fat diet and chronic physical exercise on the alteration of the intestinal microbiota structure.

Keywords: Microbiota. Interval Training. Continuous training.

LISTA DE SIGLAS

AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
Bcl	Linfoma de célula B
DH	Dieta hiperlipídica
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EC	Exercício Contínuo
EI	Exercício Intermitente
GLUT 4	Proteína transportadora de glicose tipo 4
GTT	Teste de tolerância a glicose
IL	Inter leucina
iGTT	Teste de tolerância a glicose intraperitoneal
ITT	Teste de tolerância a insulina
MFEL	Máxima fase estável de lactato
RI	Resistência à Insulina
SED	Sedentário
TNF – α	Fator de necrose tumoral alfa
TJ	Tight-junction
ZO - 1	Ocludina zonula – 1

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Corte Transverso de intestino, mostrando sua estrutura típica. p.9
- Figura 2.** A abundância relativa dos principais filos microbianos em diferentes categorias de IMC. p.12
- Figura 3.** Desenho experimental. p. 18
- Figura 4.** Variação do peso corporal. p. 22
- Figura 5.** Glicemia em jejum. p. 23
- Figura 6.** Teste de tolerância a glicose. p. 23
- Figura 7.** Teste de tolerância a insulina. p. 24
- Figura 8.** Peso corporal final. p. 25
- Figura 9.** Glicemia em jejum. p. 26
- Figura 10.** Teste de tolerância a glicose. p. 27
- Figura 11.** Teste de tolerância a insulina. p. 27
- Figura 12.** Diferenciação entre gênero das microbiotas em diferentes alimentações p. 28
- Figura 13.** Diferenciação entre espécies das microbiotas em diferentes alimentações p. 30
- Figura 14.** Diferenciação do filo entre exercício intermitente e sedentários. p. 32
- Figura 15.** Diferenciação dos gêneros de bactérias entre exercício intermitente e sedentários p. 33
- Figura 16.** Diferenciação das espécies de bactérias entre exercício intermitente e sedentários. p. 36
- Figura 17.** Diferenciação dos gêneros de bactérias entre exercício contínuo e sedentários. p. 39
- Figura 18.** Diferenciação dos gêneros de bactérias entre exercício contínuo e sedentários. p. 40

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 INTESTINO	8
1.2 MICROBIOTA	10
1.3 O EXERCÍCIO COMO MODULADOR DA MICROBIOTA INTESTINAL	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVOS GERAIS	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIAS E MÉTODOS	17
4.1 Caracterização do modelo experimental de dieta hiperlipídica. ...	22
4.2 Efeitos dos dois tipos de exercício físico no peso e sensibilidade à insulina.	24
4.3 Efeitos do exercício físico intervalado na composição da microbiota intestinal.....	28
4.4 Efeitos do exercício físico contínuo na composição da microbiota intestinal.....	38
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERENCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O intestino adulto abriga uma série de microrganismos, dentre eles bactérias denominada microbiota intestinal, que vem sendo considerada como um órgão, pertencente aos sistemas do organismo humano, com capacidade de comunicação entre sistemas e também é capaz de exercer funções endócrinas [1]. Está diretamente ligada ao estilo de vida, bem como nutrição e sua necessidade energética. Uma alimentação balanceada é capaz de alterar a composição estrutural desse organismo secundário, regulando as abundâncias de cada grupo de bactéria em diferentes níveis taxonômicos. A prática de exercícios físicos também é capaz de modular essa composição devido ao nível de stress metabólico causado durante e após a execução, desta maneira, a microbiota se modula de maneira a suportar e abastecer as necessidades oferecidas à cada diferente estímulo de exercício físico gerado [2].

1.1 INTESTINO

A Função do sistema digestivo é a de prover nutrientes para o corpo. O alimento, passado pela boca é direcionado pelo esôfago até o estômago, em seguida para o intestino, delgado e grosso, e por fim, esvaziado pelo ânus. Durante esse processo, enzimas digestivas produzidas pelas glândulas gastrointestinais atuam sobre o alimento, quebrando-o em pequenas em pequenas substâncias químicas, passíveis de absorção pelas células do intestino e transferidas para o sistema circulatório, para ser encaminhado ao resto do corpo. Sendo assim, é possível classificar a função do intestino em quatro etapas: condução da mistura de alimento e conteúdo gastrointestinal; produção de secreções digestivas; digestão do alimento; e absorção de nutrientes [3].

Figura 1 - Corte Transverso de intestino, mostrando sua estrutura típica.

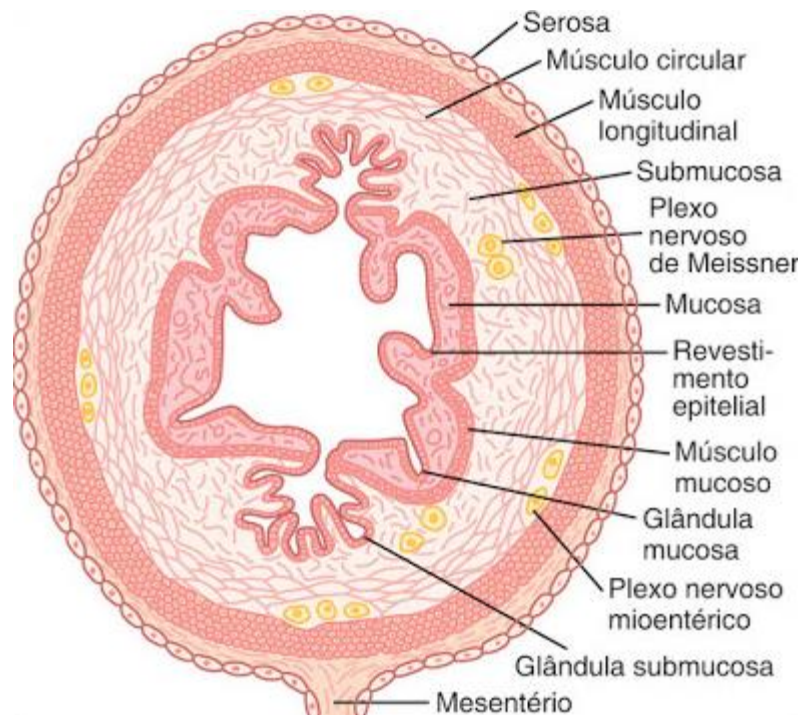


Figura 1. Corte Transverso de intestino, mostrando sua estrutura típica, (figura 30-2, p. 399, Guyton, 2008)

Na figura 1 é apresentado um corte transverso de intestino, onde é possível notar que sua estrutura típica é composta por uma parte externa de músculo liso disposto em duas camadas, sendo elas, capa longitudinal e circular, responsáveis pelos movimentos de peristaltismo que permitem a condução e mistura do quimo. Na parte interna, há um revestimento de mucosa, coberta em sua maior parte por epitélio[3].

As glândulas mucosas são responsáveis por secretar secreções digestivas, que atingem as camadas mais profundas da mucosa. Os movimentos de condução são controlados via sistema simpático e parassimpático, que por meio do nervo vago e pela parte sacral da medula inervam, em sua maior parte, o plexo mioentérico. Sendo assim em atividade parassimpática os músculos são estimulados a realizar maior número de contrações, aumentando a velocidade de condução e, conseqüentemente, diminuindo o tempo de trânsito intestinal. Já com predominância de atividade simpática ocorre exatamente o oposto, ou seja, há redução no nível de atividade do intestino [3].

Em sua porção final, intestino grosso, é secretada somente uma substância, o muco. Sua mucosa é revestida de células produtoras de muco que apresentam como funções a proteção contra as enzimas digestivas oriundas do intestino delgado, além de lubrificar a passagem das fezes desde a passagem ileocecal até o ânus. Diferente do de sua porção anterior, o intestino grosso possui maior número de vilosidades, o que aumenta a área de contato com o material intestinal, possibilitando maior absorção de nutrientes e água. Na extremidade dessas vilosidades, existem pequenas estruturas similares a sua forma, denominada microvilosidades. Sua estrutura é composta basicamente de células epiteliais e enterócitos, que unidos compõe uma barreira impermeável. A integridade do epitélio intestinal é determinada por um complexo altamente dinâmico, que forma um tipo de adesão entre as células conhecida como junção apertada ou “*tight-junction*” (TJ). Mais especificamente, esse tipo de adesão depende da disposição das proteínas de adesão, com destaque para a claudina, ocludinas e ocludina-zonula-1 (ZO-1). Essa barreira possui permeabilidade seletiva, ou seja, controla os nutrientes que são absorvidos. Dentre suas funções, as claudinas e ocludinas são responsáveis por unir as células, e a ZO-1, um pouco mais afastada, tem as funções de suporte e sustentação dessa união [4-6].

Em um intestino íntegro, onde essa união entre as células está preservada, há um controle minucioso na entrada de nutrientes. Contudo, existe a possibilidade de enfraquecimento desse sistema, situação em que a integridade dessa barreira é comprometida, possibilitando assim um aumento na absorção de nutriente e permitindo também a passagem de outros componentes indesejáveis presentes no intestino, como: patógenos, hormônios, toxinas, partículas maiores entre outros. Tal situação parece ser um dos eventos chave no processo inflamatório subclínico e crônico presente em condições patológicas, como resistência à insulina e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) [7-25].

1.2 MICROBIOTA

A curiosidade sobre a composição da microbiota humana iniciou-se com estudos voltados à estruturação e função das bactérias presentes na boca, como em contribuições de escritores pioneiros no assunto [26-31]. Ao passar dos anos, de forma a construir um caminho, a estrutura de bactérias ao longo de todo sistema digestivo foi estudada, até que na década de 70 Breznak e Pankratz realizaram um

dos primeiros estudos especificamente a respeito da microbiota intestinal, a partir de cupins de madeira, sugerindo que as bactérias seriam parte do ecossistema intestinal, ou seja, apontando que suas características seriam importantes para o funcionamento fisiológico desse órgão, e possivelmente para a saúde global do hospedeiro [32].

A microbiota intestinal humana é o órgão mais populoso de todo o organismo, onde só no cólon residem mais de 70% de todos os microrganismos que compõe o trato gastrointestinal [33, 34]. Taxonomicamente falando, encontram-se presente no intestino basicamente os filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Fusobacteria* [33, 35-38]. Além disso, cabe destacar que 99% das espécies atualmente identificadas pertencem aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, que juntos representam 70% da composição da microbiota [33, 39].

Esse ecossistema, se beneficia do ambiente em que se encontra ao mesmo tempo que colabora, indiretamente, com o indivíduo, no entanto, o balanço e controle da abundância dessas bactérias é de suma importância, sendo assim, o equilíbrio é vital para sobrevivência de ambos [33]. Tal equilíbrio vem sendo denominado como eubiose, um termo traduzido do grego onde “*eu*” significa “bem, bom” e “*bios + osis*” significaria “modo de viver”, fazendo que sua interpretação final seja “bom modo de viver”, sendo seu contrário equivalente conhecido por disbiose, entendido por desequilíbrio [33, 40].

Para determinar parâmetros que poderiam servir de base à esse equilíbrio, estudos foram conduzidos de maneira a mapear a distribuição das bactérias e seus respectivos filos, como o de Koliada e colaboradores [41] que realizaram um experimento direcionado a descobrir como se distribuíam as bactérias presentes na microbiota em diferentes composições corporais em Ucrânicos com idade entre 20 e 60 anos de idade, utilizando como parâmetro de divisão sua composição corporal, excluindo-se os indivíduos considerados saudáveis de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo experimento, ou seja, sem históricos de doenças oncológicas e endócrinas, anorexia, distúrbios psiquiátricos e doenças crônicas (Figura 2).

FIGURA 2 - A abundância relativa dos principais filos microbianos em diferentes categorias de IMC.

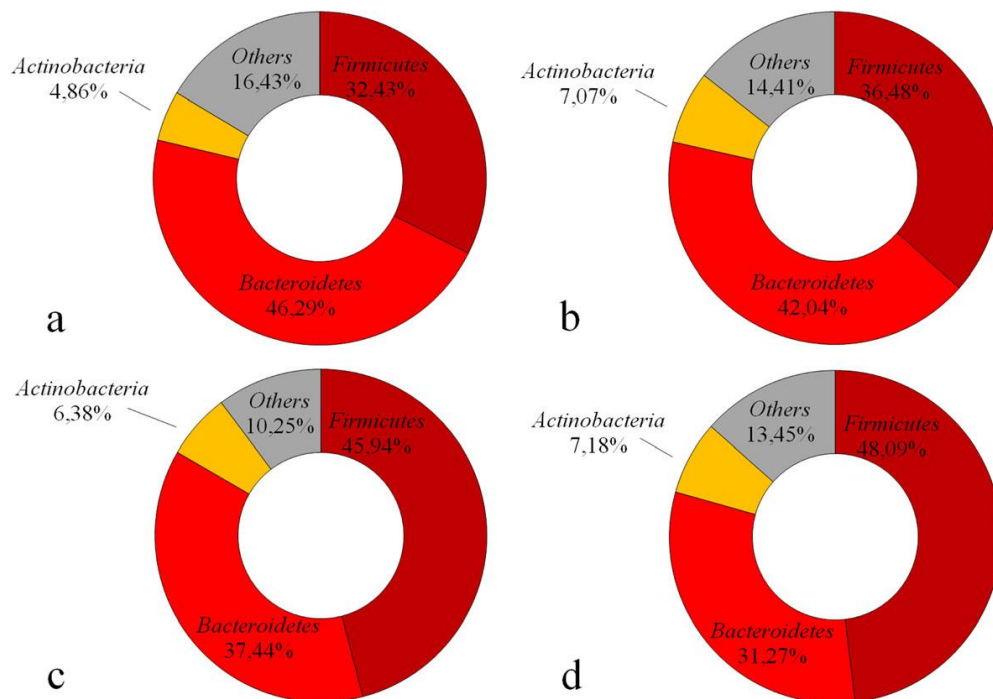


Figura 2. (a IMC < 18.5, b IMC 18.5–24.9, c IMC 25–29.9 and d IMC ≥ 30) FONTE: Koliada, Syzenko (2017)

Há hoje consenso na literatura de que a microbiota tem uma função muito importante para homeostase humana [41-43]. Estudos de metagenômica confirmam que indivíduos obesos possuem a microbiota intestinal mais eficiente comparados a indivíduos magros em relação a absorção de energia proveniente do alimento, ou seja, mesmo em dieta energeticamente similar, obesos são capazes de extrair mais energia o que certamente potencializa o ganho de peso [41, 44, 45].

Estudos anteriores realizados em animais contribuem com algumas informações sobre esse fenômeno: aumento da ingestão calórica de polissacarídeos não digeríveis, combinado com o efeito da lipogênese hepática via resposta da proteína de ligação de carboidratos e esteróis [46]; captação celular aumentada de ácidos graxos e armazenamento de triglicerídeos em adipócitos via supressão da expressão intestinal do fator de adipócito induzido (Fiaf) pelo jejum, que é um inibidor de lipoproteína lipase (LPL) circulante [47]; supressão da oxidação de ácidos graxos do músculo esquelético através de uma via metabólica envolvendo fosforilação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) [42]; e a interação entre os produtos dos ácidos graxos produzidos da fermentação microbiana de polissacarídeos e o receptor 41 acoplado à proteína G (GPR41),

resultando em aumento dos níveis de hormônio derivado de células enteroendócrinas PYY [43], portanto, reduzindo a motilidade intestinal, subsequentemente aumentando o tempo de trânsito e a taxa de absorção e ácidos graxos de cadeia curta [41, 48-50].

As bactérias presentes na microbiota intestinal, em sua maioria, são classificadas como gram-positivas, mais relevantes no filo Firmicutes e gram-negativas abundantes no filo Bacteroidetes [41, 51]. Neste contexto é possível comparar a composição da microbiota intestinal entre o modelo animal e humano, uma vez que os resultados em pesquisa apontam as proporções de Firmicutes/Bacteroidetes semelhantes em situações de obesidade, sendo aumentado para Firmicutes e diminuído para Bacteroidetes [52-60].

As bactérias gram-negativas são caracterizadas por seus envelopes celulares compostos por fina parede celular peptidoglicana impressada entre uma membrana celular citoplasmática interna e uma membrana externa bacteriana composta por lipopolissacarídeo. Já as bactérias gram-positivas, por possuir uma camada peptidoglicana mais espessa e não possuírem grandes quantidades de lipopolissacarídeo na membrana externa, elas absorvem a mancha cristal violeta quando exposta às etapas do teste gram [61].

Ambas têm sua importância dentro do ecossistema, exercendo funções muito importante para integridade do intestino, como a produção de ácido graxos de cadeia curta (AGCC) pela fermentação microbiana de carboidratos não digeríveis no cólon, com destaque para acetato, propionato, butirato e valerato [62, 63], sendo esses relevantes, entre outras funções, para a manutenção da parede intestinal através da produção de mucinas presentes no muco intestinal, e compostos que auxiliam na construção das TJ. A produção de AGCC é diferente para cada grupo, sendo as gram-positivas basicamente pela via do Acetyl-CoA, e gram-negativas divididas por 3 vias, sendo Glutarato, Aminobutirato e Lisina [62-66].

Neste contexto, o AGCC, mais especificamente o butirato, é capaz de induzir o aumento do metabolismo das bactérias oxidativas, o que além de controlar o incremento de sua quantidade, gera um estado de hipóxia, que em contra partida estimula a expressão das proteínas de adesão ZO-1, claudinas e ocludinas [62].

De modo a demonstrar uma de suas importâncias Kuwahara [67], relator de uma possível existência de um eixo de comunicação entre cérebro e intestino, teve em seus resultados a indicação de que os AGCC podem modular a secreção de

neurotransmissores, como os neuropeptídeos YY e servir como energia para os neurônios. Além disso, a liberação de propionato e acetato inibem a produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α).[9, 35, 68-70].

Embora necessária para manutenção do funcionamento fisiológico do sistema imune [71, 72], alguns estudos apontaram a microbiota intestinal, em estado de disbiose, como fator desencadeador de vários distúrbios metabólicos como: alergias alimentares, hipercolesterolemia, DM2, resistência a insulina (RI) e infecções gastrointestinais [37, 73, 74].

De forma a manter a microbiota em eubiose, alguns estudos tem buscado maneiras de restaurar os padrões de sobrevivência desse ecossistema com o uso de fármacos e/ou intervenções nutricionais [75-89]. Além disso, tem se tornado cada vez mais consistente que o exercício físico, também seja capaz de alterar a microbiota intestinal [37].

1.3 O EXERCÍCIO COMO MODULADOR DA MICROBIOTA INTESTINAL

Há um enorme consenso na literatura de que a microbiota intestinal pode ser modulada, através de dieta [90-93], antibióticos [94, 95], patógenos [96] e estilo de vida [97].

Nesse contexto, Matsumoto, um dos pioneiros nessa área de estudo, testou os efeitos do exercício contínuo sobre a microbiota de animais obesos, onde a prática de exercícios foi capaz de alterar a composição da microbiota e as proporções de n-butirato nas fezes e no ceco, levando a acreditar que houve uma maior liberação de AGCC e consequentemente de mucina [98]. Além disso, alguns benefícios do exercício físico como a manutenção da saúde e homeostase energética têm sido correlacionado com aumentos na diversidade microbiana [6, 99-102].

Uma intensidade controlada de exercício físico foi capaz de promover efeitos benéficos para a saúde gastrointestinal de animais obesos, incluindo a redução na inflamação e no trânsito intestinal, o que em contrapartida diminui o contato do cólon com agente promotores de câncer, sendo dessa forma também um agente de profilaxia [37]. Além disso, há evidências de que o exercício físico quando combinado com dieta hipocalórica parece promover alterações ainda mais pronunciadas em relação a manutenção do equilíbrio entre bactérias com perfil positivo e negativo [37, 88, 89, 98, 103].

O exercício físico, praticado 30 minutos por dia, 5 dias na semana durante 4 semanas correndo na máxima fase estável de lactato (MFEL), ou seja, no limiar aeróbico, foi capaz de melhorar as proporções de Firmicutes principalmente os *Lactobacillus*, cujo os substratos têm relação com a produção de mucinas, além de diminuir as concentrações de *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*. Neste contexto, exercício aeróbico combinado à dieta hipocalórica também induziu alterações positivas em relação as proporções de *Firmicutes* [37, 101, 104].

Capaz de atenuar os mediadores inflamatórios, aumentar enzimas antioxidantes e também diminuir a expressão de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) nos linfócitos intestinais [6, 105, 106], a prática regular de exercício físico parece ter também efeito direto em algumas espécies de bactérias como, por exemplo, na diminuição de *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides/Prevotella* e *Methanobrevibacter*, classificadas como gram-negativas e no aumento das gram-positivas, como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium leptu* [58, 60, 101, 103, 107].

Estudar microbiomas humanos pode ser uma maneira de identificar características de um indivíduo saudável ou doente, ligando-os às características de sua microbiota [108-111]. O microbioma de atletas, por exemplo, é composto por uma microbiota distinta, onde sua composição contém maior abundância de Veillonellaceae, Bacteroides, Prevotella, Methanobrevibacter ou Akkermansia, quando comparado com sedentários ou mesmo com indivíduos ativos não atletas [112, 113]. Embora demonstrem que o exercício está associado a alterações na composição do microbioma, os efeitos desses gêneros microbianos no fenótipo permanecem ainda desconhecidos.

De forma a ampliar o conhecimento, um estudo recente constatou aumento significativo do gênero *Veillonella* em maratonistas, especificamente da *Veillonella atypica*. Ao comparar as amostras extraídas antes e depois da maratona esse grupo de bactérias se mostrou aumentado depois da maratona. Após o achado, ao isolar essas bactérias, constatou que *Veillonella Atypica* contribui na metabolização de Lactato, participa na produção de AGCC, acetato e propionato via *methylmalonyl-CoA*, levando a acreditar que pode ter um papel importante no rendimento do atleta, por contribuir indiretamente para o sistema aeróbico [111].

Anteriormente, a microbiota já teria sido citada como parte fundamental no rendimento de exercícios de longa duração e exaustão, onde, Hsu et al. [114] estudando natação até exaustão em animais com diferentes composições de

microbiotas, sendo elas: *Germ-free* (GF), apenas com *Bacteroides fragilis* (BF) e animais com microbiota convencional que foram criados com cuidados para que não tivessem exposição a bactérias patogênicas, como *Helicobacter pylori*, ou seja, animais livres de patógenos específicos (SPF), verificaram que a composição da microbiota intestinal está intimamente ligada ao desempenho em exercícios físicos. Além disso, os animais GF e BF, apresentaram diminuição acentuada de antioxidantes muito importantes como a glutathione peroxidase [115], responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, e da catalase que faz a decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) obtida através da respiração aeróbia [116, 117]. Embora os animais BF tenham tido melhor performance que os GF, os animais SPF demonstraram o melhor desempenho entre todos os grupos investigados, ou seja, a microbiota rica em diversidade parece estar intimamente ligada a capacidade de se exercitar e que possivelmente essa influência ocorra por intermédio de enzimas antioxidantes.

Dentre seus benefícios, foi sugerido que o exercício físico é capaz de promover alterações à microbiota intestinal criando um sistema protetor às alterações metabólicas causadas pela ingestão de dietas hiperlipídica. Ao usar modelos animais para investigar a influência do exercício físico sobre os linfócitos intestinais, observou-se que o exercício pode aumentar enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase e catalase), citocinas anti-inflamatórias (IL10) e proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) nos linfócitos intestinais além de atenuar TNF- α , proteínas pró-apoptóticas (caspase 3 e 7) e IL-17, sugerindo que o exercício físico também é capaz de alterar a imuno-responsividade intestinal [6, 100, 105, 106, 118-121].

Trabalhos como de Denou et. al. [122] defendem que o exercício físico pode alterar as proporções de *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, enquanto outros não observaram tais alterações [123, 124]. Essa divergência presente na literatura pode ter relação com o tipo de exercício físico utilizado nos diferentes estudos, ou seja, diferentes modalidades, intensidades ou volumes, podem resultar em distintas alterações da microbiota. Neste ponto levantou-se a hipótese da existência de diferenças entre tipos de estímulos de exercícios físicos, ou seja, a possibilidade do exercício contínuo ou intermitente poderem exercer influências desiguais sobre a composição da microbiota intestinal. Ou, por outro lado, a existência da hipótese do exercício físico ser capaz de construir uma assinatura de microbiota única [6].

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo principal comparar as alterações da microbiota intestinal em decorrência de exercício físico contínuo, realizado na MFEL, e do intervalado de alta intensidade (anaeróbico) de natação em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica em relação aos seus congêneres sedentários em mesmo regime alimentar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do exercício aeróbio contínuo na composição da microbiota intestinal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.
- Investigar o efeito do exercício físico intervalado de alta intensidade na composição da microbiota intestinal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

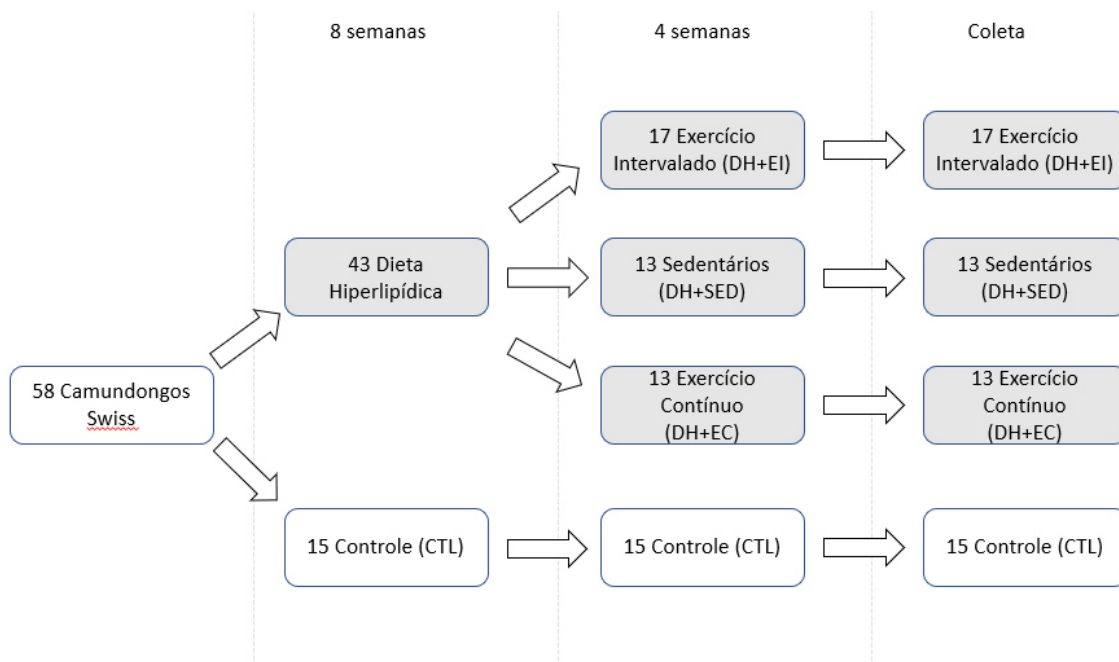
3. MATERIAS E MÉTODOS

Reagentes. Todos os reagentes de rotina do laboratório utilizados nos experimentos foram comprados da Sigma Chemical (St. Louis, MO).

Animais e desenho experimental. Para os experimentos do presente trabalho foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) do Instituto de Biotecnologia da UNESP Campus de Botucatu. Quando atingiram 6 semanas de idade os animais foram divididos em grupos: animais controle alimentados com dieta padrão para roedores e água *ad libitum* (CTL) ou animais alimentados com dieta hiperlipídica (a qual consiste em 55% das calorias provenientes de gordura, 29% de carboidrato e 16% de proteína) por 8 semanas [125]. Após esse período os animais alimentados com dieta hiperlipídica foram divididos em 3 subgrupos: sedentário (DH+SED), exercitados continuamente (DH+EC), animais exercitados de forma intervalada (DH+EI). Essa última etapa do protocolo teve a duração de 4 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas à temperatura ambiente de 22 graus Celsius e ciclo de claro/escuro de 12 em 12 horas, no biotério do prédio da Biodinâmica do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências da UNESP de Rio

Claro. A figura apresenta o esquema do desenho experimental utilizado nesse estudo.

Figura 3. Esquema do desenho experimental.



Protocolo de treinamento físico contínuo. Para adaptação ao exercício de natação, os animais foram inseridos ao meio líquido durante 10 minutos por 2 dias consecutivos. Os animais DH+EC, em grupo de cinco animais, nadaram em tanques de 35 cm de largura, 51 cm de comprimento, 32 cm de profundidade com água à 25 cm da capacidade total, com temperatura da água mantida em aproximadamente $32 \pm 2^\circ \text{C}$, por 1 hora, 5 dias por semana, durante 4 semanas, suportando uma carga que foi progressivamente aumentada de 1% a 4% do peso corporal, ajustada de acordo com o peso do animal na semana.

Protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT). Os animais foram adaptados ao meio líquido sem nenhuma sobrecarga antes de iniciar o protocolo de HIIT sendo 15min/dia por 3 dias. O tanque de plástico era formado por 35 cm de largura, 51 cm de comprimento, 32 cm de profundidade com água à 25 cm da capacidade total com a temperatura da água controlada a $32 \pm 2^\circ \text{C}$. O tempo máximo de nado foi determinado como sendo o período em que o animal não ficasse mais de 10cm submerso na água e incapaz de retornar para superfície para respirar após 5s. Nós conduzimos o máximo de séries possíveis para cada animal

(20s de exercício usando um incremento de 10% do peso corporal preso ao corpo como um colete com 10s de recuperação passiva), sendo 40 séries o limite máximo do treinamento, o protocolo de exercício foi realizado três vezes por semana durante 4 semanas. Os pesos foram anexados ao tórax adicionando 10% do peso corporal, e a cada semana foi aumentado 1%, terminando com 14% do peso corporal em 4 semanas. O exercício foi executado no período noturno em virtude de os roedores apresentarem hábitos noturnos (adaptado de [126]).

Teste de tolerância intraperitoneal à insulina. O teste foi realizado 12 horas após a execução do último treino dos respectivos protocolos de exercícios físicos. O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue equivaliu ao tempo 0 do teste. Após isso, a insulina (1,5U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica utilizando-se um monitor de glicose (Glucometer; Bayer).

Verificação do nível de glicose sanguínea e teste de tolerância à glicose. Depois de finalizados os protocolos, amostras sanguíneas foram coletadas da cauda aproximadamente 12 horas após. O nível de glicose sanguínea foi medido utilizando-se um monitor de glicose (Glucometer; Bayer). O teste de tolerância a glicose intraperitoneal (iGTT) foi realizado em jejum de 6 horas. Após coletar sangue de uma amostra não desafiada (tempo 0), uma solução de 20% de glicose (2.0g/kg peso corporal) foi administrada dentro da cavidade peritoneal. Para determinar a concentração da glicose sanguínea, amostras de sangue foram coletadas da cauda em 30, 60, 90 e 120 minutos e aferidas utilizando-se um glicosímetro (Glucometer; Bayer).

Extração de Tecidos. Após 12 horas da última seção de treinamento, os animais permaneceram em jejum por mais 12 horas antes da extração de tecidos. Eles foram anestesiados e a cavidade abdominal de cada um foi aberta para a coleta de fezes diretamente do cólon, que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer para posterior análise.

Perfil Metagenômico. O DNA foi extraído, de acordo com as instruções do

fabricante, usando o mini kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Preparo das bibliotecas

Para o preparo das bibliotecas foram necessários 12,5 ng de DNA por amostras, 5 mM de primers (ou iniciadores) específicos para a amplificação da região altamente conservada (V3 e V4) do gene 16S bacteriano e 12,5 uL do pré-mix 2x KAPA HIFI hotStart (Manufacturing, R&D Cape Town, South Africa).

Tabela 1. Sequência de primers para região V3/V4 do gene 16S

Região	Sequência 5' - 3'
3 – 341	<i>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</i> CCTACGGGNGGCWGCAG
4 – 785	<i>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</i> GA CTACHVGGGTATCTAAT CC

A sequência em itálico corresponde ao adaptador Nextera® transposase sequences A e B e a sequência em negrito correspondem aos iniciadores de ampla utilização 341F e 785F respectivamente.

Posteriormente foi utilizada para o preparo das bibliotecas com o kit Illumina Miseq DNA Sample Preparation v3 com código de barra para cada amostra. O sequenciamento foi realizado no equipamento Illumina Miseq do Laboratório de Genética Molecular coordenado pela Profa. Dra. Íscia Lopes-Cendes da FCM-Unicamp.

A composição taxonômica das comunidades bacterianas foi obtida pela análise da região V3 e V4 do gene 16S rRNA usando a plataforma Illumina® MiSeq. As construções das bibliotecas de sequenciamento do DNA foram realizadas segundo instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, USA) e seguiram o mesmo fluxo descrito por Caporaso et al. (2012). Usando leituras pareadas de 300 bp e reagentes MiSeq v3, as extremidades de cada leitura são sobrepostas para gerar leituras completas de alta qualidade da região V3 e V4. São geradas mais que 100.000 leituras por amostra, comumente reconhecidas como suficientes para pesquisas metagenômicas.

Análise de bioinformática.

As seguintes ferramentas foram utilizadas na análise:

- Avaliação de qualidade: FastQC
- Análise de microbioma: QIIME
- Identificação OTU (pick_open_reference_otus), com OTUs de referência Greengenes (versão 13.8)

As seguintes métricas foram utilizadas para a diversidade alfa:

- chao1

Estima a riqueza da contagem de dados

- observado_otus

Calcula o número de OTUs distintas entre os grupos

- PD_whole_tree

Métrica quantitativa para estimar a diversidade filogenética entre os grupos

As seguintes métricas foram utilizadas para a diversidade beta:

- weighted_unifrac

Métrica quantitativa que avalia as diferenças entre as comunidades devido à abundância taxonômica

- unweighted_unifrac

Métrica qualitativa avaliando as diferenças entre as comunidades devido a fatores diferentes da abundância taxonômica. Com base na presença / ausência de táxons em amostras.

Análise dos resultados. Os dados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística, os grupos foram comparados utilizando one-way ANOVA com o pós-teste Bonferroni. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo experimental de dieta hiperlipídica.

Passadas as 8 semanas de alimentação com dieta hiperlipídica ou ração padrão para roedores comparamos inicialmente a evolução do peso corporal dos animais. Nesse sentido, nossos resultados mostraram que após as 8 semanas houve ganho significativo de peso nos animais CTL e nos alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 4). Agora, ao realizarmos a comparação entre os grupos na 8ª semana pudemos constatar que os animais em dieta hiperlipídica tiveram um incremento de peso significativamente maior que seus congêneres alimentados com dieta padrão para roedores (Figura 4).

Figura 4 - Variação do peso corporal.

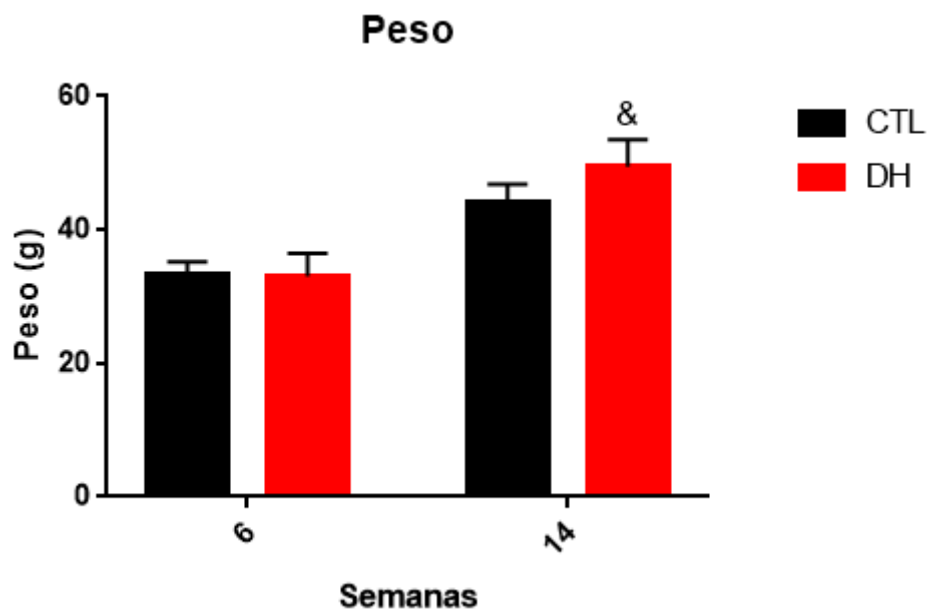


Figura 4. Variação do peso corporal. Variação do peso corporal no período entre 6 e 14 semanas de vida em animais CTL (n=15) e DH+SED (n=43). Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. ("&" = $p < 0,05$ vs. CTL)

Uma vez verificado o ganho de peso, seguimos as análises com a avaliação dos efeitos da dieta na sensibilidade à insulina através da glicemia de jejum e dos testes de tolerância à glicose e à insulina. Ao analisarmos os níveis de glicose sérica em jejum observamos que os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram valores expressivamente maiores que os do grupo CTL (Figura 5).

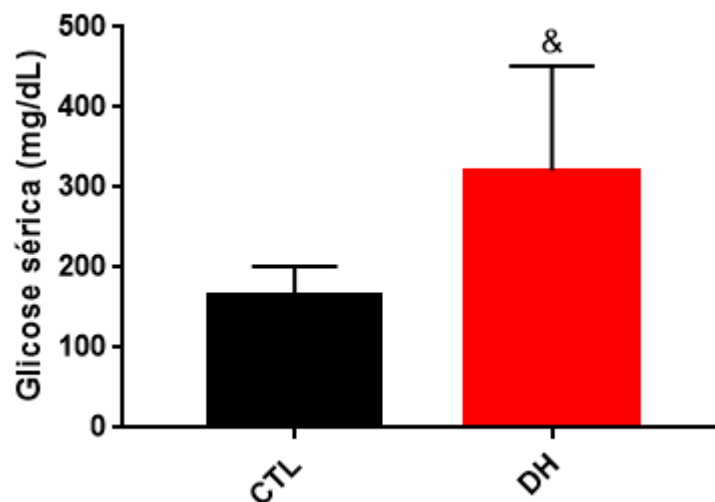
Figura 5 - Glicemia em jejum

Figura 5. Glicemia em jejum. Diferença das Glicemias em Jejum nos períodos antes do protocolo de treinamento onde os animais estavam com 14 semanas de vida em animais CTL (n=10), DH+SED (n=26). Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. ("&" = $p < 0,05$ vs. CTL).

Além disso, durante o teste de tolerância à glicose os animais DH apresentaram maiores níveis de glicose ao longo de todos os tempos de avaliação, resultando em maior área sob a curva, ou seja, importante incremento na intolerância à glicose (Figura 6A e B).

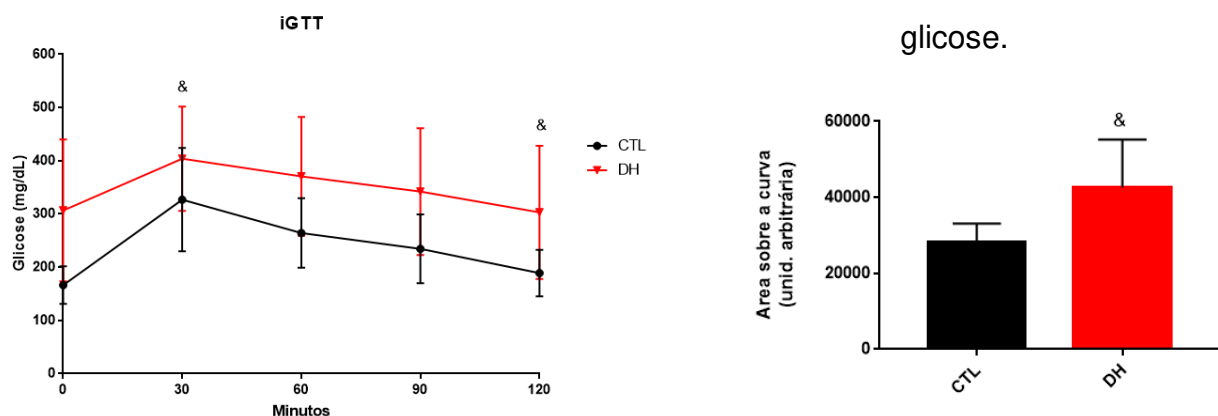
Figura 6 - Teste de tolerância a glicose.

Figura 6. Teste de tolerância a glicose. Variação das glicemias durante o teste de tolerância a glicose intraperitoneal (iGTT) e sua respectiva área sobre a curva antes do protocolo de treinamento onde os animais estavam com 14 semanas de vida em animais CTL (n=10), DH+SED (n=26). Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. ("&" = $p < 0,05$ vs. CTL).

Na mesma linha, ao injetarmos insulina no peritônio dos camundongos constatamos que os alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram valores de

glicemia maiores que seu congêneres magros ao longo de todos os pontos do teste o que resultou em maior área sob a curva e também nos valores obtidos com os cálculos das constantes de decaimento de glicose (kITT), ou seja, os animais obesos apresentaram aumento significativo da intolerância à insulina (Figura 7A-C).

Figura 7 - Teste de tolerância a insulina

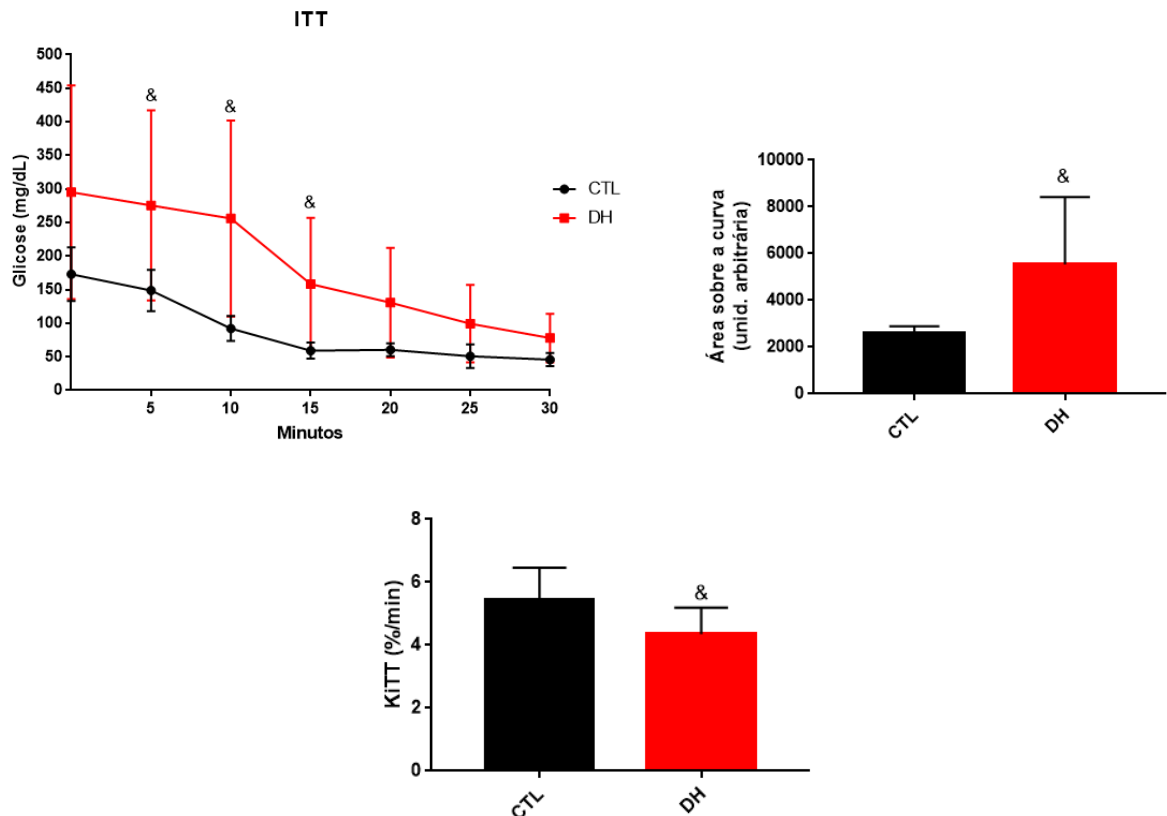


Figura 7. Teste de tolerância a insulina. Variação das glicemias durante o teste de tolerância insulina (ITT), sua respectiva área sobre a curva e variação do KITT antes do protocolo de treinamento onde os animais estavam com 14 semanas de vida em animais CTL (n=10), DH+SED (n=26). Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão. ("&" = p < 0,05 vs. CTL).

Assim, quando tomados em seu conjunto, os dados de glicemia, GTT e ITT indicam que os animais alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram resistência à insulina.

4.2 Efeitos dos dois tipos de exercício físico no peso e sensibilidade à insulina.

Uma vez verificado que a dieta hiperlipídica promoveu significativo ganho de peso e resistência à insulina, seguimos nosso estudo subdividindo os animais submetidos à dieta hiperlipídica em 3 novos grupos: sedentários (DH+SED),

treinados em exercício contínuo (DH+EC) e treinados em exercício intervalado de alta intensidade (DH+EI). Transcorridas 4 semanas nesses regimes de exercício físico realizamos nova bateria de testes nos animais para verificar os efeitos dos treinamentos no peso e na sensibilidade à insulina.

Figura 8 - Peso corporal final.

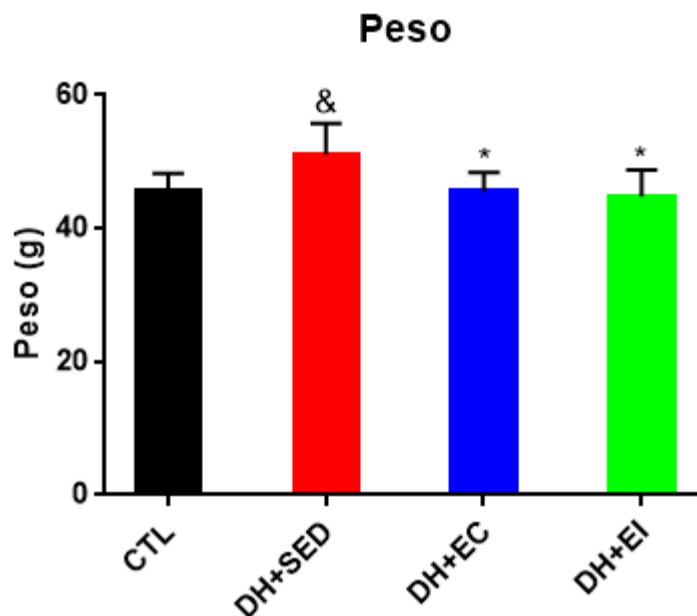


Figura 8. Peso corporal final. Peso corporal ao final dos protocolos de treinamento (18 semanas de vida) em animais CTL (n=15), DH+SED (n=13), DH+EC(n=13), DH+EI(n=17). Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão. (“&” = p < 0,05 vs. CTL; “*” = p < 0,05 vs. DH+SED).

A respeito do peso corporal, nossos resultados mostraram que os dois tipos de exercícios físicos resultaram em similar redução após 4 semanas, atingindo valores médios bem próximos aos observados no grupo CTL (Figura 8). Da mesma forma, ao avaliarmos a glicemia de jejum pudemos constatar que os animais dos grupos DH+EC e DH+EI apresentaram expressiva redução nesse parâmetro quando comparados com o grupo DH+SED, recuperando os níveis de glicemia apresentados pelos controles (Figura 9).

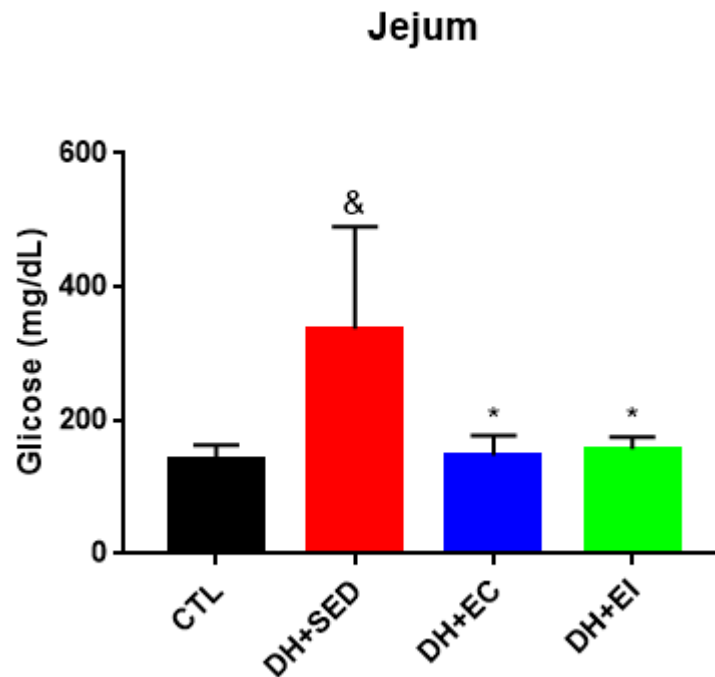
Figura 9 - Glicemia em jejum.

Figura 9. Glicemia em jejum. Diferença das Glicemias em Jejum ao final dos protocolos de treinamento (18 semanas de vida) em animais CTL (n=10), DH+SED (n=8), DH+EC (n=7) e DH+EI (n=11). Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. (“&” = p < 0,05 vs. CTL; “*” = p < 0,05 vs. DH+SED).

Em seguida investigamos os efeitos do treinamento exercício intervalado e alta intensidade e do treinamento contínuo moderado nas tolerâncias à glicose e à insulina. Após o desafio com glicose para a realização do GTT, observamos que os animais dos grupos DH+EC e DH+EI apresentaram menores valores de glicemia ao longo de todos os tempos avaliados, quando comparados com os animais sedentários sujeitos ao mesmo regime alimentar, o que resultou em menor área sob a curva, indicando assim que as duas formas de exercício resultaram similar atenuação da intolerância à glicose (Figura 10A e B). Quanto ao desafio com insulina, nossos resultados mostram o mesmo comportamento, ou seja, os dois tipos de exercício físico foram capazes de atenuar a intolerância à insulina em relação ao grupo DH+SED, como evidenciado pela menor área sob a curva (Figura 11A e B). Com os dados obtidos no ITT calculamos a taxa de decaimento da glicose (KITT), importante medida indireta de resistência à insulina, e verificamos que seu valor foi reestabelecido nos dois grupos de animais treinados (Figura 11C). Quando tomados em seu conjunto, esses resultados indicam que o treinamento intervalado de alta intensidade e o treinamento contínuo moderado têm efeitos similares sobre a sensibilidade à insulina de animais alimentados com dieta hiperlipídica.

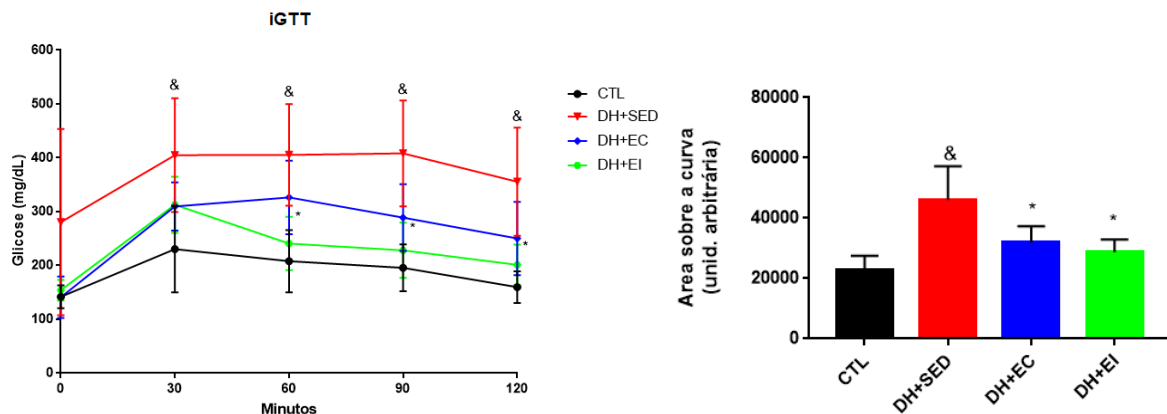
Figura 10 - Teste de tolerância a glicose.

Figura 10. Teste de tolerância a glicose. Variação das glicemias durante o teste de tolerância a glicose intraperitoneal (iGTT) e sua respectiva área sobre a curva ao final dos protocolos de treinamento (18 semanas de vida) em animais CTL (n=9), DH+SED (n=5), DH+EC(n=2) e DH+EI(n=6). Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. (“&” = $p < 0,05$ vs. CTL; “*” = $p < 0,05$ vs. DH+SED).

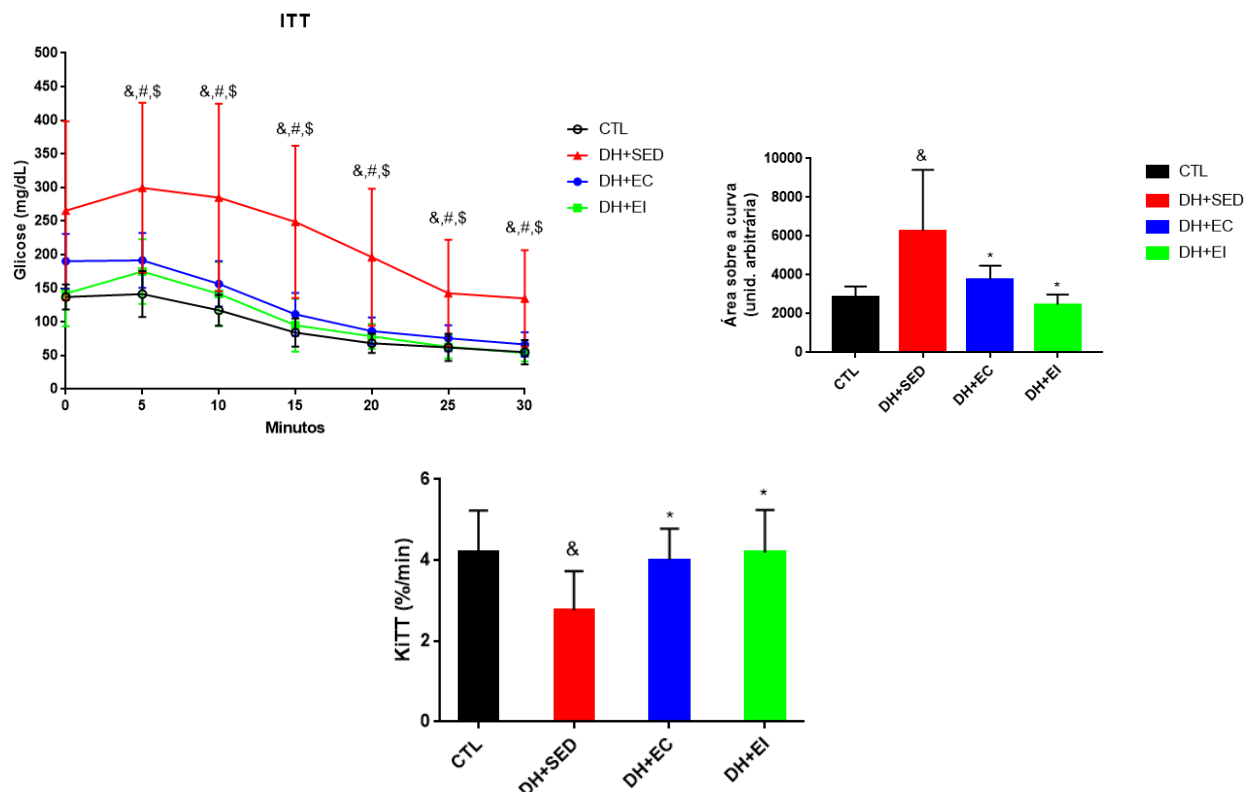
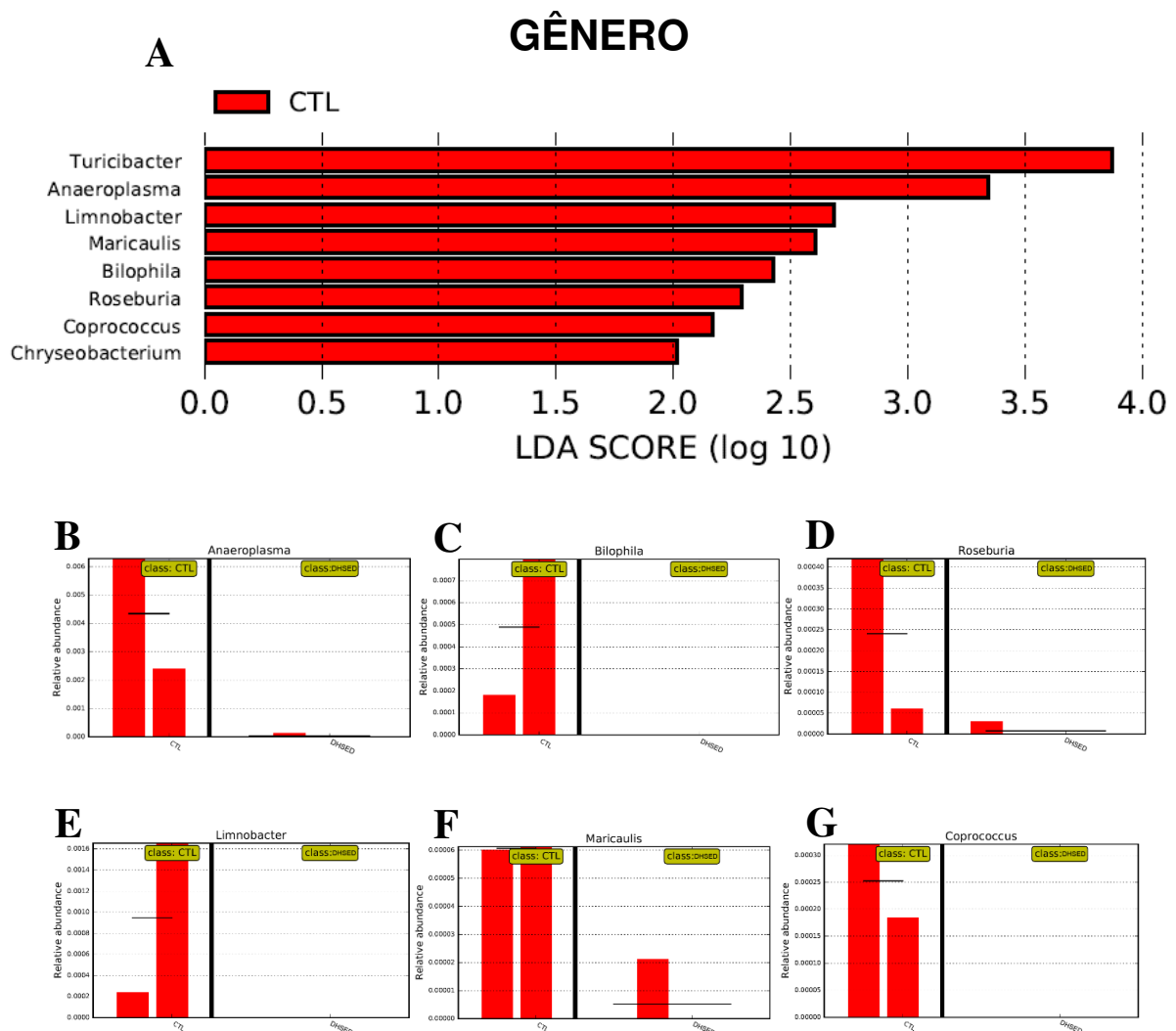
Figura 11 - Teste de tolerância a insulina.

Figura 11. Teste de tolerância a insulina. Variação das glicemias durante o teste de tolerância insulina (ITT), sua respectiva área sobre a curva e variação do KITT ao final dos protocolos de treinamento (18 semanas de vida) em animais CTL (n=14), DH+SED (n=10), DH+EC(n=12) e DH+EI(n=14). Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. (“&” = $p < 0,05$ vs. CTL; “*” = $p < 0,05$ vs. DH+SED; “#” = $p < 0,05$ vs. DH+EC; “\$” = $p < 0,05$ vs. DH+EI).

4.3 Efeitos do exercício físico intervalado na composição da microbiota intestinal.

Foram realizadas análises de metagenômica para especificar a composição da microbiota intestinal nos diferentes grupos estudados e como esperado os microbiomas dos grupos CTL e DH+SED se mostraram distintos. De forma mais específica, o grupo CTL apresentou maior abundância dos gêneros *Aneroplasma*, *Bilophila*, *Roseburia*, *Limnobacter*, *Maricaulis*, *Coprococcus*, *Chyseobacterium* e *Turicibacter* (Figura 12 A-I). Dentre esses gêneros que se destacaram em abundância para o grupo CTL, alguns não apresentaram nenhuma incidência no grupo DH+SED, são eles: *Bilophila*, *Limnobacter*, *Coprococcus*, *Chyseobacterium* e *Turicibacter* (figura 12C, E, G, H, I).

Figura 12 - Diferenciação dos gêneros de bactérias entre as microbiotas em diferentes alimentações.



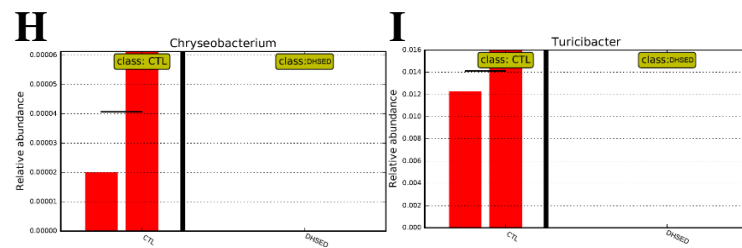


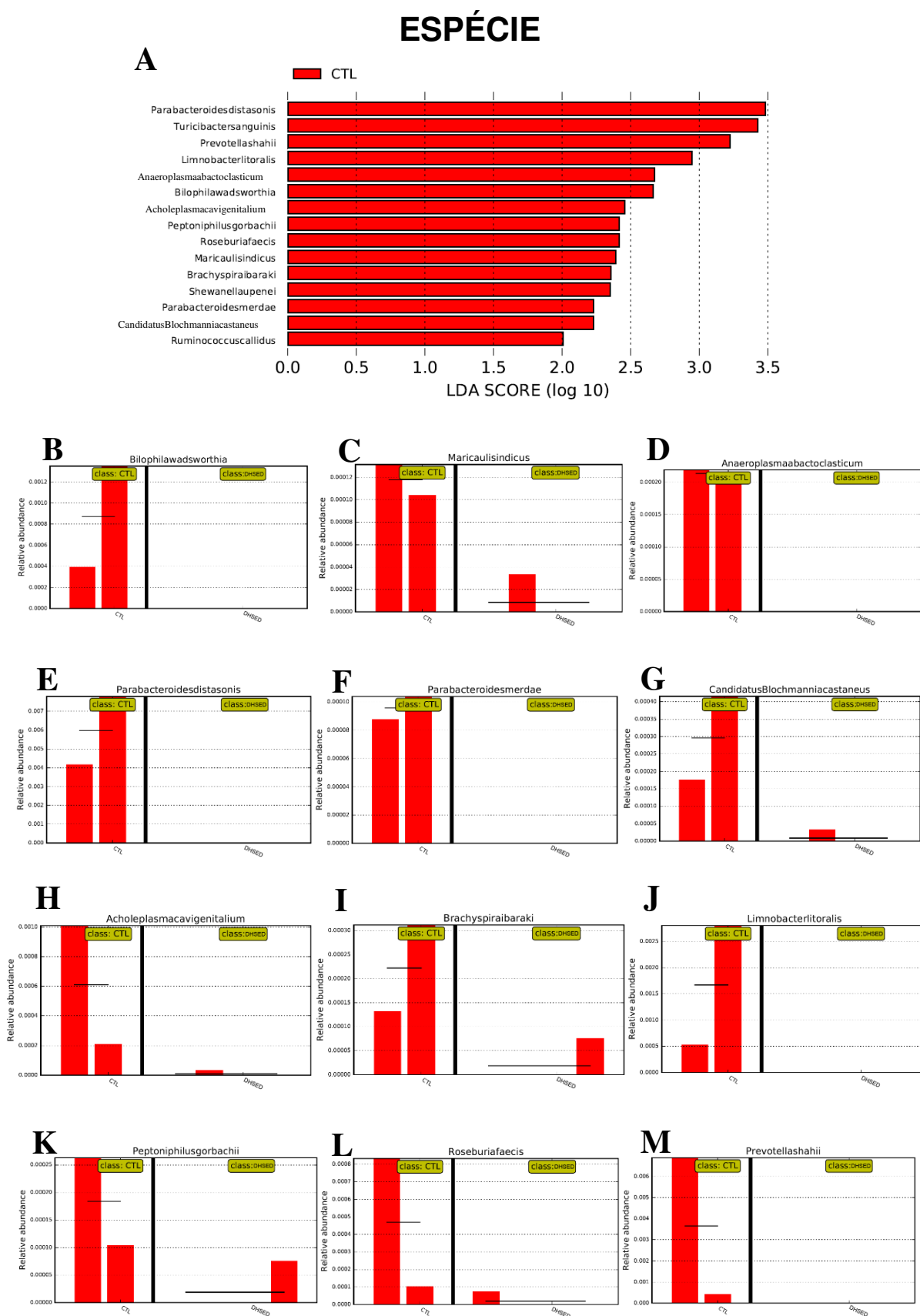
Figura 12. Diferenciação dos gêneros de bactérias entre as microbiotas em diferentes alimentações.

(A) Comparação de gêneros de bactérias através de LDA score os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (B) Comparação da abundância do gênero *Anaeroplasma* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (C) Comparação da abundância do gênero *Bilophila* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (D) Comparação da abundância do gênero *Roseburia* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (E) Comparação da abundância do gênero *Limnobacter* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (F) Comparação da abundância do gênero *Maricaulis* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (G) Comparação da abundância do gênero *Coproccoccus* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (H) Comparação da abundância do gênero *Chryseobacterium* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (I) Comparação da abundância do gênero *Turicibacter* entre os grupos CTL (n=2) e DH+SED (n=6) ao final do experimento. Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Ao avançarmos na taxonomia pudemos verificar a maior abundância, no grupo CTL, das espécies *Parabacteroides distasonis*, *Turicibacter sanguinis*, *Prevotella shahii*, *Limnobacter litoralis*, *Anaeroplasma abactoclasticum*, *Biphilowadsworthia*, *Acholeplasma cavigenitalium*, *Roseburia faecis*, *Maricaulis indicus*, *Brachyspiraibaraki*, *Shewanella penei*, *Parabacteroides merdae*, *CandidatusBlochmannia castaneus* e *Ruminococcus callidus*. (Figura 13 B-P)

Podemos também destacar as que as espécies *Parabacteroides distasonis*, *Turicibacter sanguinis*, *Prevotella shahii*, *Limnobacter litoralis*, *Anaeroplasma abactoclasticum*, *Biphilowadsworthia*, *Shewanella penei*, *Parabacteroides merdae*, *Ruminococcus callidus* estiveram ausentes no grupo DH+SED (Figura 13 B, D, E, F, J, M, N, O, P).

Figura 13 - Diferenciação das espécies de bactérias entre as microbiotas em diferentes alimentações.



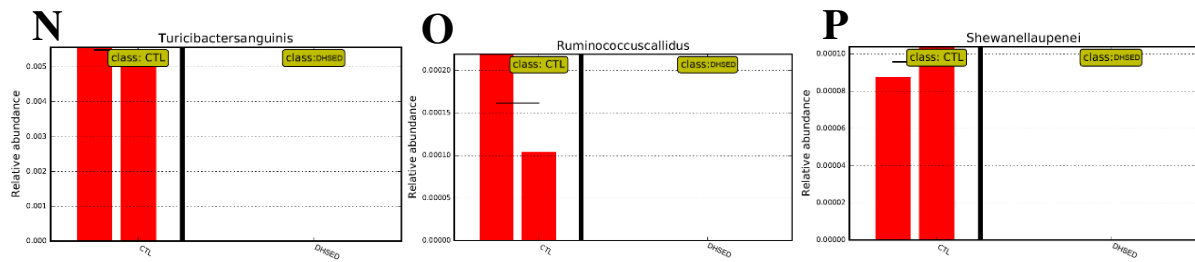


Figura 13. Diferenciação das espécies de bactérias entre as microbiotas em diferentes alimentações.

(A). Comparação das espécies de bactérias através de LDA score entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (B) Comparação da abundância da espécie *Bilophilawadsworthia* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (C) Comparação da abundância da espécie *Maricaulisindicus* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (D) Comparação da abundância da espécie *Anaeroplasmaabactoclasticum* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (E) Comparação da abundância da espécie *Parabacteroidesdistasonis* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (F) Comparação da abundância da espécie *Parabacteroidesmerdae* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (G) Comparação da abundância da espécie *CandidatusBlochmanniacastaneus* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (H) Comparação da abundância da espécie *Acholeplasmacavigenitalium* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (I) Comparação da abundância da espécie *Brachyspiraibaraki* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (J) Comparação da abundância da espécie *Limnobacterlitoralis* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (K) Comparação da abundância da espécie *Peptoniphilusgorbachii* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (L) Comparação da abundância da espécie *Roseburiafaecis* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (M) Comparação da abundância da espécie *Prevotellashahii* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (N) Comparação da abundância da espécie *Turicibactersanguinis* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (O) Comparação da abundância da espécie *Ruminococcuscallidus* entre os grupos CTL e DH+SED ao final do experimento. (P) Comparação da abundância da espécie *Shewanellaupenei* entre os grupos CTL (n=2) e DH+SED (n=6) ao final do experimento.

Após delinear as diferenças entre os microbiomas dos grupos CTL e DH+SED, investigamos as modificações que o treinamento intervalado de alta intensidade promoveu no microbioma de animais alimentados com dieta hiperlipídica. Nesse sentido, nossos resultados mostraram que o grupo DH+EI apresentou importante incremento na abundância do filo Verrucumicrobia, quando comparado com a microbiota do grupo DH+SED (Figura 14).

Figura 14 - Diferenciação do filo entre exercício intermitente e sedentários.

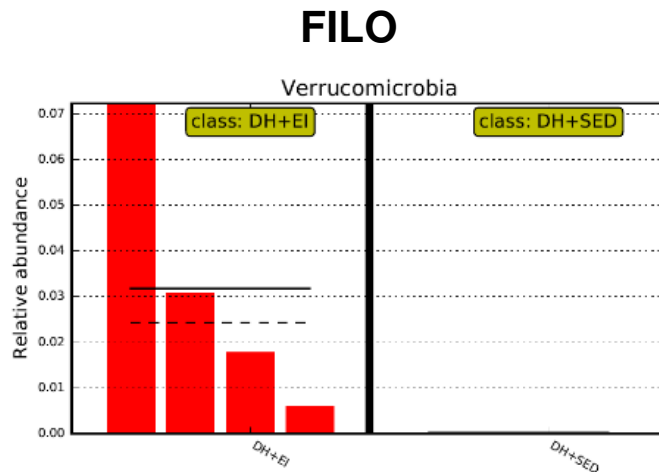
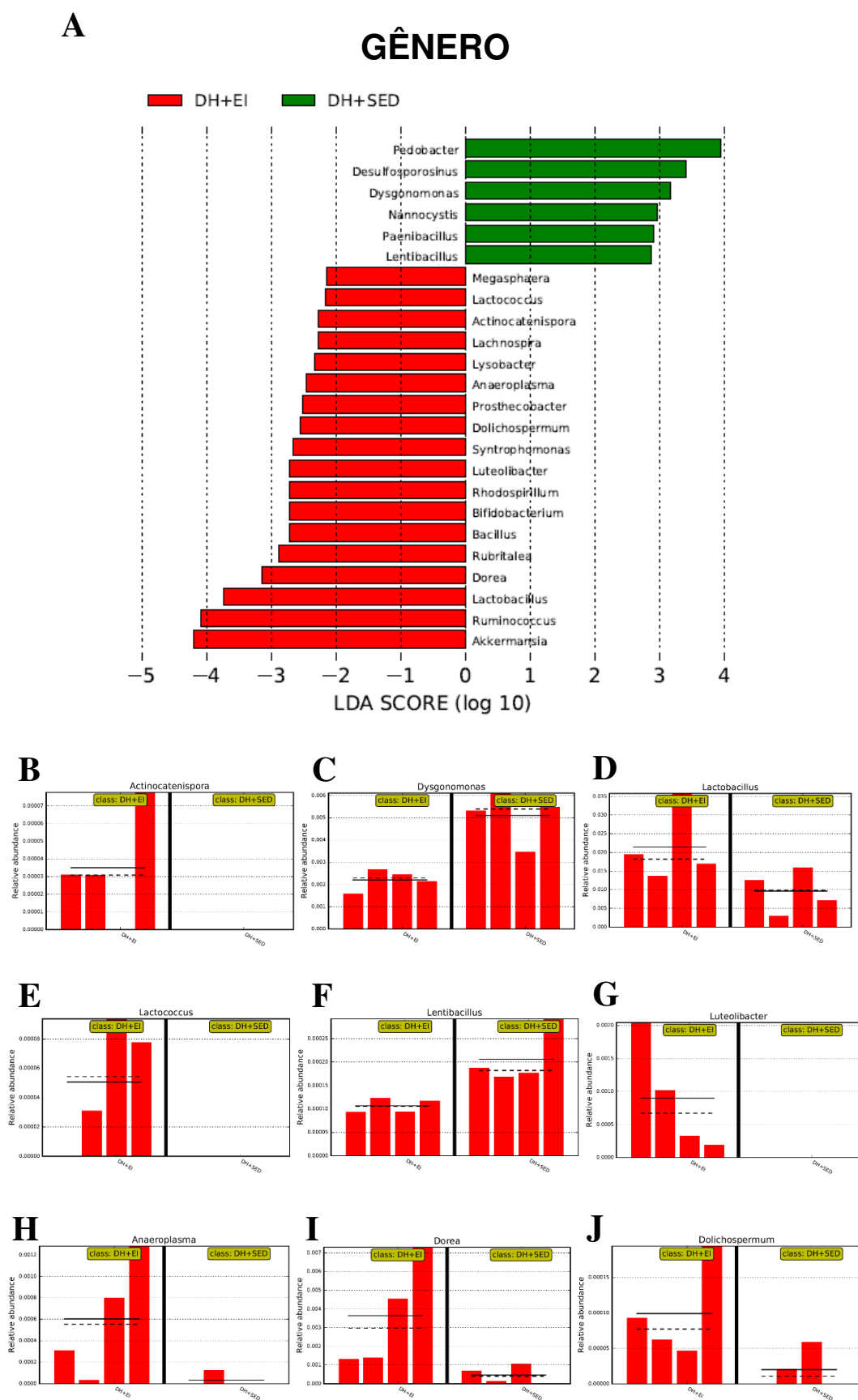


Figura 14. Diferenciação do filo entre exercício intermitente e sedentários. Comparação da composição dos filios das microbiotas entre os grupos DH+EI (n=4) e DH+SED (n=4) ao final do experimento. Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Embora tenha se mostrado diferente somente para um filo, o grupo DH+SED apresentou maior abundância dos gêneros *Pedobacter*, *Desulfosporosinus*, *Dysgonomonas*, *Nannocytis*, *Paenibacillus*, *Lentibacillus* (Figura 15 C, F, L, S, U, V). Enquanto para o grupo DH+EI os gêneros *Actinocatenispora*, *Lactococcus*, *Luteolibacter*, *Anaeroplasma*, *Dorea*, *Dolichospermum*, *Lachnospira*, *Bacillus*, *Lysobacter*, *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Megasphaera*, *Prostheco bacter*, *Rhodospirillum*, *Ruminococcus*, *Rubritalea*, *Syntrophomonas* destacaram-se por serem mais abundantes (Figura 15 B, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, T, W, X, Y). Vale ainda destacar que dentre eles, os gêneros *Actinocatenispora*, *Lactococcus*, *Luteolibacter*, *Akkermansia*, *Megasphaera*, *Rhodospirillum*, *Syntrophomonas* se mostraram ausentes para o grupo DH+SED (Figura 15 B, E, G, O, Q, T, Y).

Figura 15 - Diferenciação dos gêneros de bactérias entre exercício intermitente e sedentários.



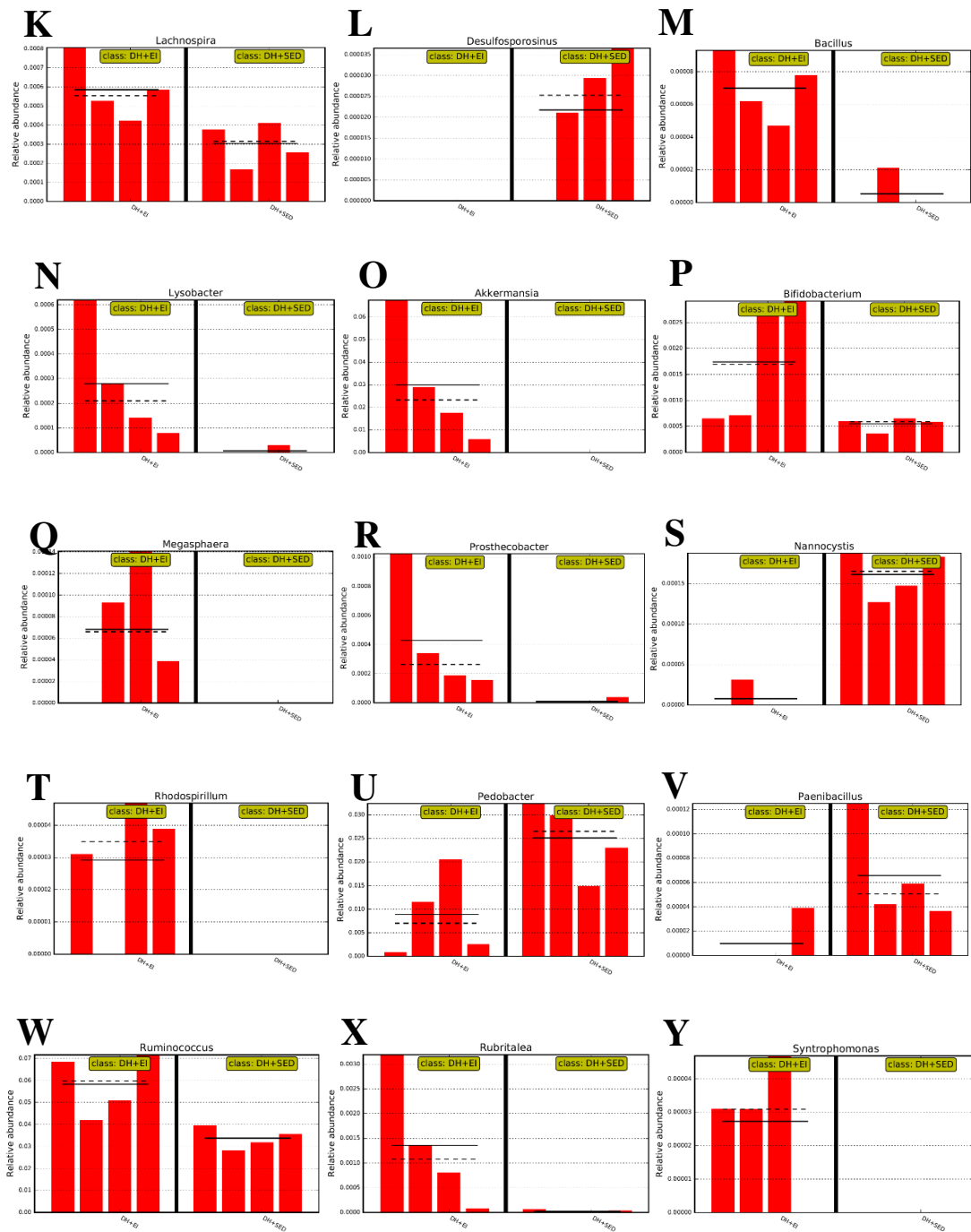


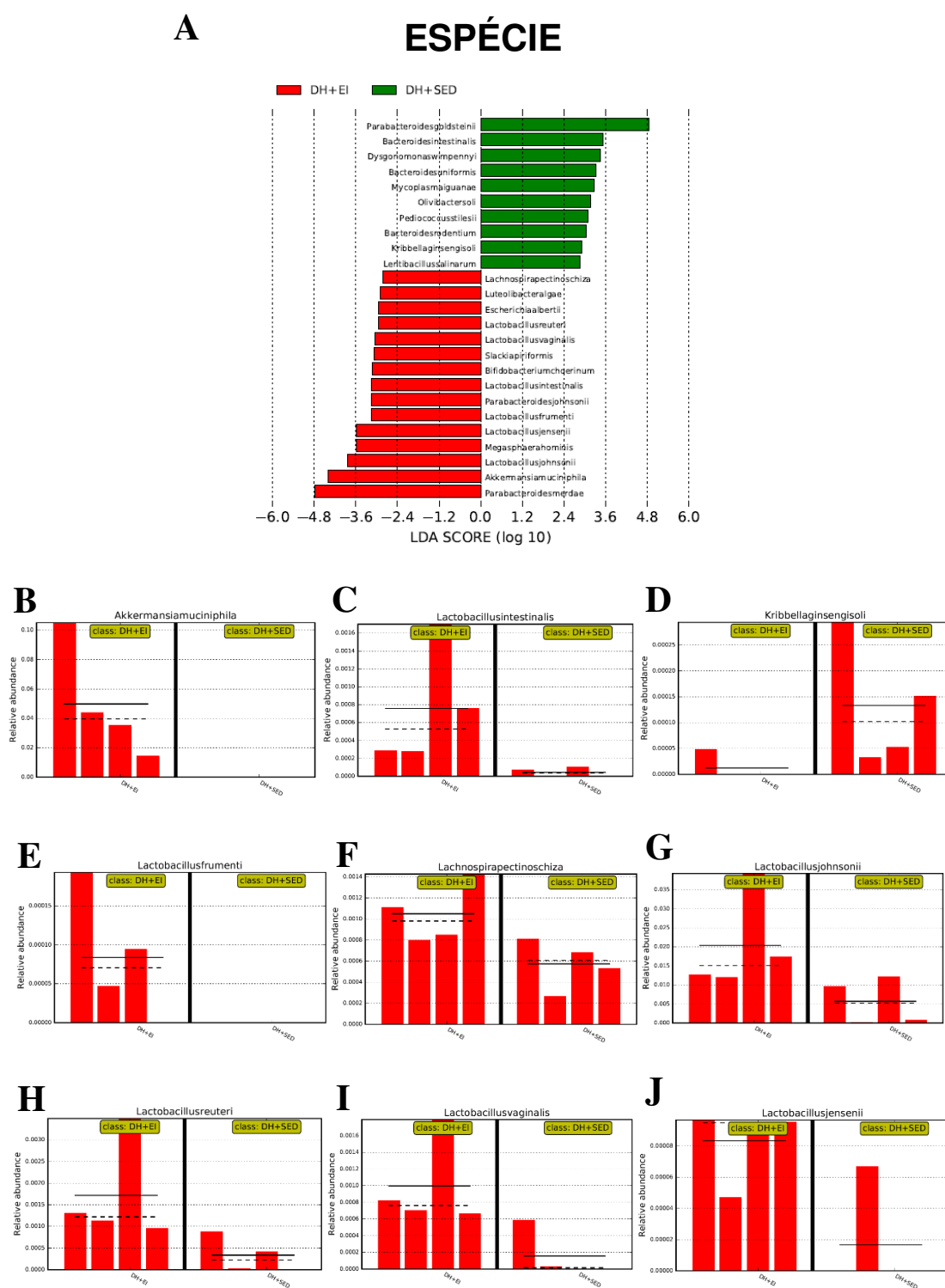
Figura 15. Diferenciação dos gêneros de bactérias entre exercício intermitente e sedentários.

(A). Comparação dos gêneros de bactérias através de LDA score entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (B) Comparação da abundância do gênero *Actinocatenispora* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (C) Comparação da abundância do gênero *Dysgonomonas* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (D) Comparação da abundância do gênero *Lactobacillus* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (E) Comparação da abundância do gênero *Lactococcus* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (F) Comparação da abundância do gênero *Lentibacillus* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (G) Comparação da abundância do gênero *Luteolibacter* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (H) Comparação da abundância do gênero *Anaeroplasma* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (I) Comparação da abundância do gênero *Dorea* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (J) Comparação da abundância do gênero *Dolichospermum* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final

do experimento. (K) Comparação da abundância do gênero *Lachnospira* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (L) Comparação da abundância do gênero *Desulfosporosinus* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (M) Comparação da abundância do gênero *Bacillus* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (N) Comparação da abundância do gênero *Lysobacter* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (O) Comparação da abundância do gênero *Akkermansia* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (P) Comparação da abundância do gênero *Bifidobacterium* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (Q) Comparação da abundância do gênero *Megasphaera* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (R) Comparação da abundância do gênero *Prostheco bacter* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (S) Comparação da abundância do gênero *Nannocytis* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (T) Comparação da abundância do gênero *Rhodospirillum* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (U) Comparação da abundância do gênero *Pedobacter* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (V) Comparação da abundância do gênero *Paenibacillus* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (W) Comparação da abundância do gênero *Ruminococcus* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (X) Comparação da abundância do gênero *Rubritalea* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (Y) Comparação da abundância do gênero *Syntrophomonas* entre os grupos DH+EI (n=4) e DH+SED (n=4) ao final do experimento. Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Avançando na taxonomia verificamos a maior abundância, no grupo DH+SED, das espécies *Kribbellagin sengisoli*, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides rodentium*, *Dysgonomona swimpennyi*, *Bacteroides uniformis*, *Lentibacillus salinarum*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Mycoplasma iguanae*, *Olivibacter soli*, *Pediococcus stilesii* (Figura 16 A, D, K, L, M, O, Q, S, U, W, Y). Enquanto no grupo submetido ao treinamento de alta intensidade as bactérias das espécies *Olivibacter soli*, *Pediococcus stilesii* (Figura 16 W, Y) não se mostraram presentes. Por sua vez, o grupo treinado mostrou diferença na abundância das seguintes espécies: *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus frumenti*, *Lachnospira pectinoschiza*, *Lactobacillus johnsonii*, *lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus jensenii*, *Bifidobacterium choeerinum*, *Escherichia albertii*, *Slackia piriformis*, *Megasphaera hominis*, *Luteolibacter algae*, *Parabacteroides johnsonii*, *Parabacteroides merdae* (Figura 16 A, B, C, E, F, G, H, I, J, N, P, R, T, V, X, Z), dentre elas, alguns não apresentaram nenhuma incidência no grupo DH+SED, como: *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus frumenti*, *Megasphaera hominis*, *Luteolibacter algae*, *Parabacteroides merdae* (Figura 16 B, E, T, V, Z).

Figura 16 - Diferenciação das espécies de bactérias entre exercício intermitente e sedentários.



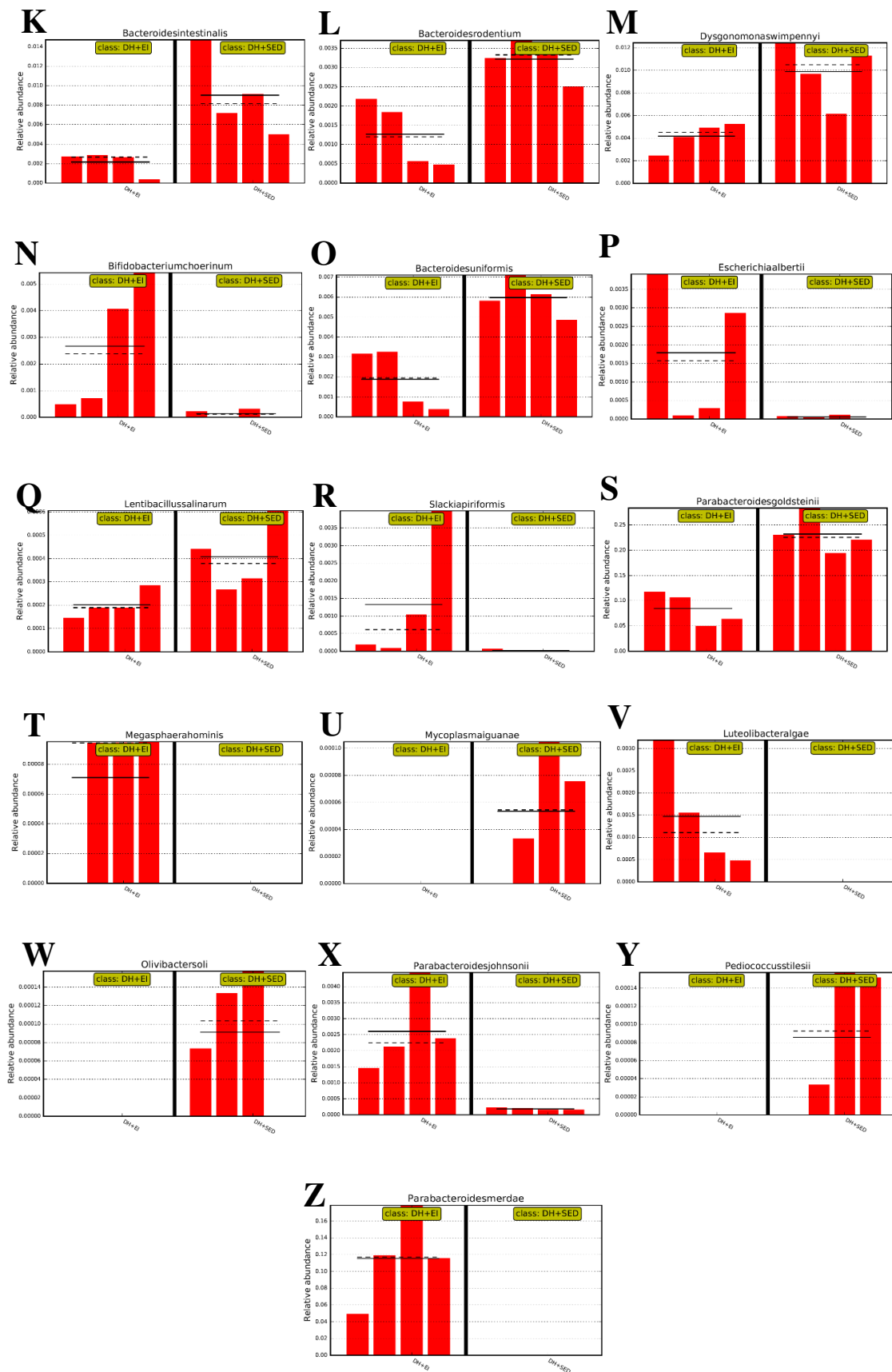


Figura 16. Diferenciação das espécies de bactérias entre exercício intermitente e sedentários. (A) Comparação das espécies de bactérias através de LDA score entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (B) Comparação da abundância da espécie *Akkermansiamuciniphila* entre os

grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (C) Comparação da abundância da espécie *Lactobacillusintestinalis* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (D) Comparação da abundância da espécie *Kribbellaginsengisoli* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (E) Comparação da abundância da espécie *Lactobacillusfrumenti* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (F) Comparação da abundância da espécie *Lachnospirapectinoschiza* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (G) Comparação da abundância da espécie *Lactobacillusjohnsonii* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (H) Comparação da abundância da espécie *lactobacillusreuteri* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (I) Comparação da abundância da espécie *Lactobacillusvaginalis* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (J) Comparação da abundância da espécie *Lactobacillusjensenii* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (K) Comparação da abundância da espécie *Bacteroidesintestinalis* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (L) Comparação da abundância da espécie *Bacteroidesrodentium* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (M) Comparação da abundância da espécie *Dysgonomonaswimpennyi* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (N) Comparação da abundância da espécie *Bifidobacteriumchoeerinum* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (O) Comparação da abundância da espécie *Bacteroidesuniformis* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (P) Comparação da abundância da espécie *Escherichiaalbertii* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (Q) Comparação da abundância da espécie *Lentibacillussalinarum* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (R) Comparação da abundância da espécie *Slackiapiiriformis* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (S) Comparação da abundância da espécie *Parabacteroidesgoldsteinii* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (T) Comparação da abundância da espécie *Megasphaerahominis* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (U) Comparação da abundância da espécie *Mycoplasmaiguanae* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (V) Comparação da abundância da espécie *Luteolibacteralgae* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (W) Comparação da abundância da espécie *Olivibactersoli* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (X) Comparação da abundância da espécie *Parabacteroidesjohnsonii* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (Y) Comparação da abundância da espécie *Pediococcusstilesii* entre os grupos DH+EI e DH+SED ao final do experimento. (Z) Comparação da abundância da espécie *Parabacteroidesmerdae* entre os grupos DH+EI (n=4) e DH+SED (n=4) ao final do experimento.

4.4 Efeitos do exercício físico contínuo na composição da microbiota intestinal.

Quando comparado os grupos DH+EC com DH+SED, foram observadas poucas alterações, sendo para os gêneros *Luteolibacter*, *Prostheco bacter*, *Anaeroplasma*, *Lysobacter*, mais presente no grupo DH+EC e com pouca incidência no DH+SED (Figura 17A).

Figura 17 - Diferenciação dos gêneros de bactérias entre exercício contínuo e sedentários.

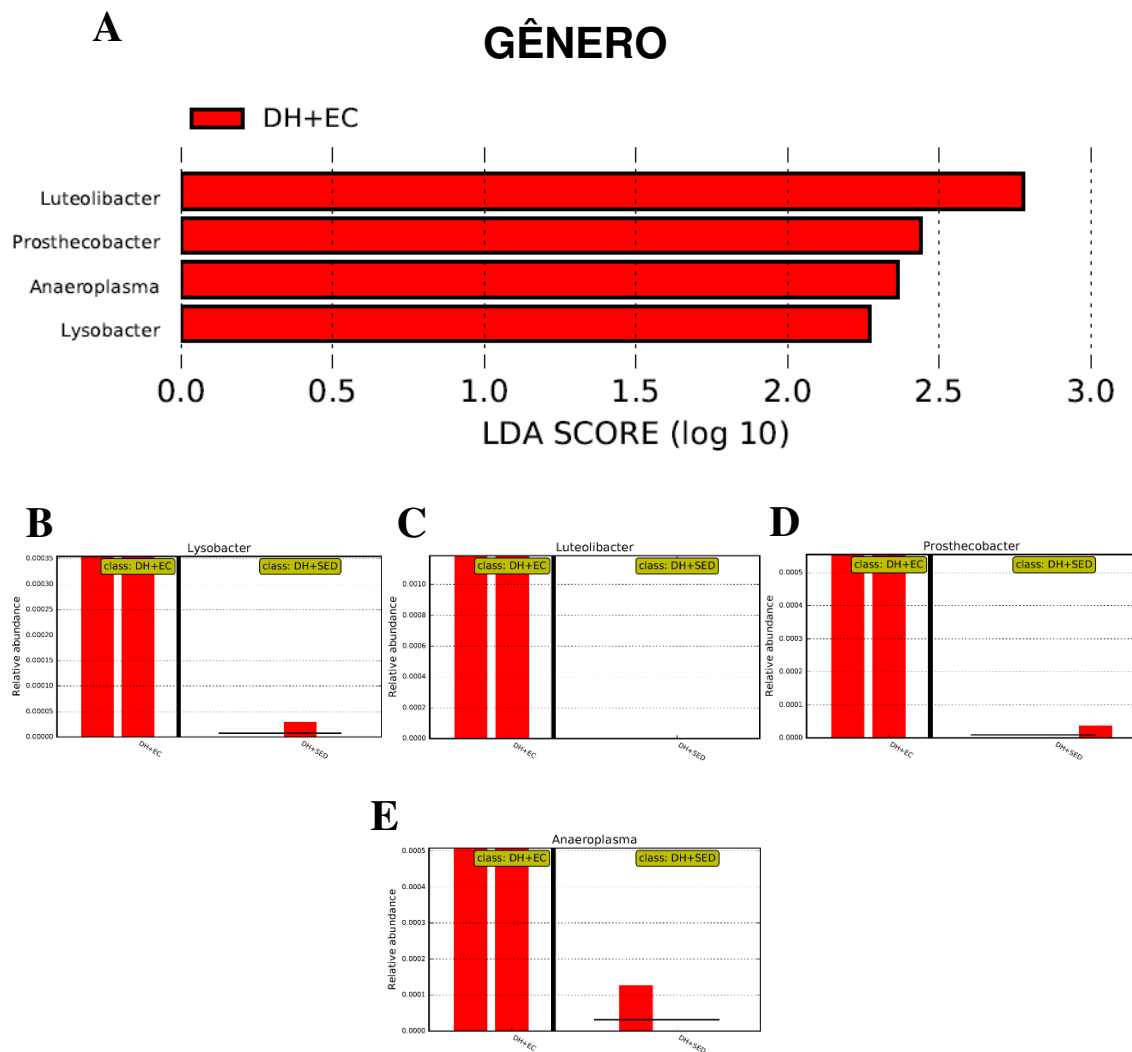


Figura 17. Diferenciação dos gêneros de bactérias entre exercício contínuo e sedentários.

(A) Comparação dos gêneros de bactérias através de LDA score entre os grupos DH+EC e DH+SED ao final do experimento. (B) Comparação da abundância do gênero *Lysobacter* entre os grupos DH+EC e DH+SED ao final do experimento. (C) Comparação da abundância do gênero *Luteolibacter* entre os grupos DH+EC e DH+SED ao final do experimento. (D) Comparação da abundância do gênero *Prosthecobacter* entre os grupos DH+EC e DH+SED ao final do experimento. (E) Comparação da abundância do gênero *Anaeroplasm* entre os grupos DH+EC (n=1* duplicado) e DH+SED (n=4) ao final do experimento. Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Contudo, tais alterações não atingiram significância estatística em virtude do n experimental do grupo DH+EC ser mínimo, levando também a não apresentação de diferenças nas abundâncias de bactérias entre grupos DH+EC e DH+EI.

Figura 18 - Diferenciação dos gêneros de bactérias entre exercício contínuo e sedentários.

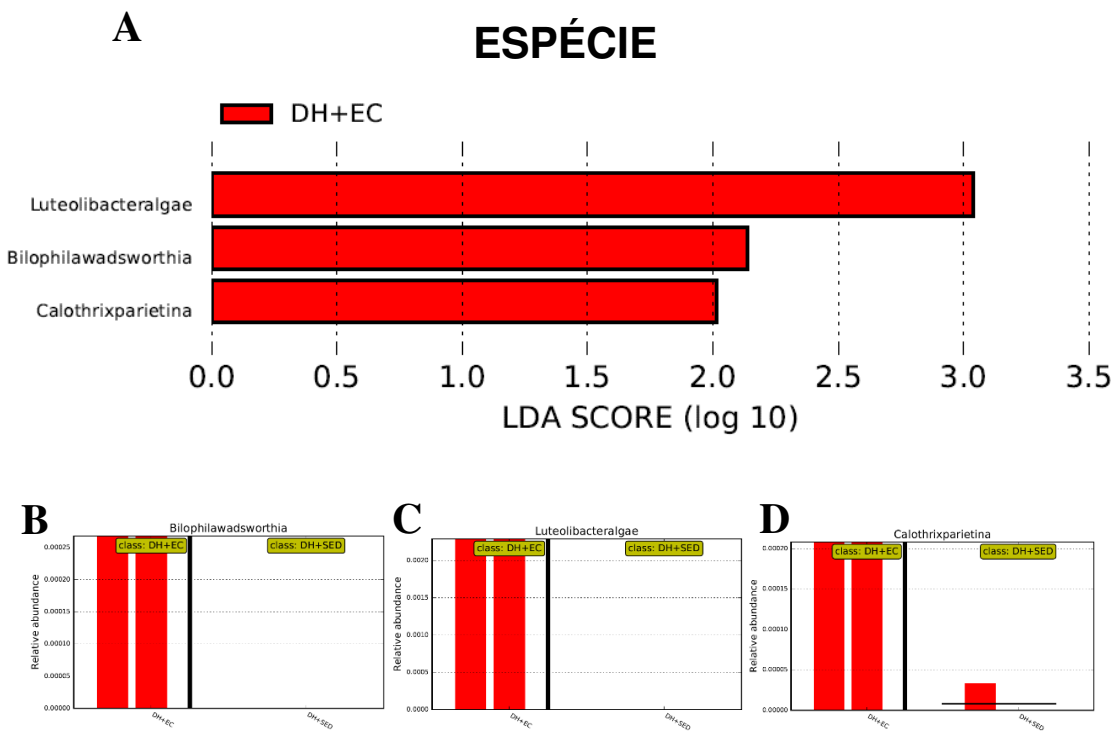


Figura 18. Diferenciação dos gêneros de bactérias entre exercício contínuo e sedentários.

(A) Comparação das espécies de bactérias através de LDA score entre os grupos DH+EC e DH+SED ao final do experimento. (B) Comparação da abundância da espécie *Bilophilawadsworthia* entre os grupos DH+EC e DH+SED ao final do experimento. (C) Comparação da abundância da espécie *Luteolibacterales* entre os grupos DH+EC e DH+SED ao final do experimento. (D) Comparação da abundância da espécie *Calothrixparietina* entre os grupos DH+EC (n=1* duplicado) e DH+SED (n=4) ao final do experimento. Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo verificamos que 4 semanas de treinamento com exercícios físicos intervalados de alta intensidade são suficientes para induzir alterações significativas na microbiota de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica quando comparados aos seus congêneres sedentários. E verificamos que o treinamento de intervalado de alta intensidade promove importante aumento na quantidade relativa de *Akkermansia muciniphila*. Além disso, nosso estudo também indica que 4 semanas de qualquer treinamento, seja moderado ou intenso, já é capaz de atenuar os efeitos da dieta rica em gordura saturada na sensibilidade à insulina.

Existem vários programas e protocolos de treinamento e exercícios físicos que visam cumprir o prometido em relação a composição corporal, porém os mistérios dos processos que acontecem no interior do nosso corpo vêm sendo descobertos aos poucos com o passar dos anos. O treinamento de alta intensidade e curta duração e o de baixa-média intensidade e longa duração são capazes de obter resultados em relação a composição corporal, de forma isolada ou combinados com dietas ou fármacos [127, 128], bem como em acentuar a sensibilidade a insulina e a tolerância a glicose, mesmo em experimentos onde as amostras apresentavam traços de DM2 ou até mesmo com essa disfunção totalmente estabelecida [129].

Em relação ao peso corporal, nossos resultados mostraram que os dois grupos treinados apresentaram resultados similares, ou seja, foram capazes de fazer com que os animais alimentados com dieta hiperlipídica atingissem valores médios semelhantes aos observados nos animais alimentados com ração padrão para roedores. Corroborando nossos resultados, Wang e colaboradores verificaram que 8 semanas dos dois tipos de treinamento resultaram em semelhante perda de peso [130]. Além disso, estudo anterior demonstrou que quando iniciados juntamente com a dieta hiperlipídica os dois treinamentos resultam em similar proteção contra o ganho de peso [131].

Embora as bactérias intestinais tenham sido exploradas por várias décadas, as investigações sobre o papel dos microrganismos que residem no intestino humano têm atraído muita atenção além das doenças infecciosas clássicas. Por exemplo, numerosos estudos relataram mudanças na microbiota intestinal durante

não apenas obesidade, diabetes e doenças hepáticas, mas também câncer e até mesmo em doenças neurodegenerativas [132-139]

Dentro do grupo sedentário (DH+SED), houve déficit em relação ao grupo CTL na abundância do Gênero de bactérias gram-negativas *Anaeroplasma* (figura 12B), que está ligada ao aumento de expressão da proteína transportadora de glicose tipo 4 (GLUT4) através do aumento da atividade da citrato sintase que é um marcador de atividade oxidativa muscular[140], sendo considerada um potencial tratamento contra a disbiose de diabéticos e ganho de peso [141]. Esse gênero de bactéria também se mostrou aumentado no grupo DH+EI (figura 15H), sugerindo assim um dos mecanismos de atuação desse modelo de treinamento no controle das comorbidades adquiridas pela obesidade. Também houve déficit no gênero *Bilophila* (figura 12C), que dentro das suas funcionalidades englobam quebra de ureia em amônia e bicarbonato, e algumas dessas bactérias são grandes produtoras de sulfeto de hidrogênio, um gás que já foi relacionado com distúrbios psicológicos como epilepsia [142]. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que classificavam o impacto de dietas do mediterrâneo na microbiota intestinal comparadas com consumo de fast-food, sugerindo que o aumento na abundância desse gênero pode estar relacionado com o padrão alimentares e os variados tipos de alimentos[143, 144].

Nesse contexto, as bactérias do gênero *Turicibacter* (figura 12I), são sugeridas como transportadoras de serotonina intestino-derivada [145, 146], o desequilíbrio desse neurotransmissor está também relacionado a distúrbios psicológicos.

Em contra partida o grupo de treinamento intervalado de alta intensidade foi capaz de recuperar a abundância desse gênero, indicando assim esse tipo de exercício como um potencial candidato a ser um adjuvante no tratamento e prevenção desses distúrbios.

Dentre as estruturas presente no intestino, a responsável pelo controle por sua integridade é denominada TJ. Na sua composição, participam as mucinas, que são substratos secretados por células epiteliais, em sua maioria, e estimulados pela presença de AGCC resultante da fermentação de carboidratos [62-66]. A integridade da barreira epitelial intestinal mantida pelas TJ é crucial para proteger o corpo contra estímulos de estresse relacionados à inflamação e infecção. A alteração da homeostase de TJ induz a patogênese de várias doenças e *vice-versa* [147].

Animais alimentados com dieta hiperlipídica já foram anteriormente observados com a estrutura das TJ alteradas [22, 147, 148]. A dieta rica em gordura causou supressão dos níveis de occludina, claudina-1, claudina-3 e JAM-1, juntamente com um nível aumentado de TNF- α plasmático na mucosa do intestino delgado de ratos [148]. Este tipo de alimentação também mudou a população bacteriana intestinal e integridade de TJ em camundongos [22].

Em colaboração com os resultados observados com os gêneros de bactérias anteriormente citado, o déficit da abundância das bactérias do gênero *Rosebúria* para o grupo DH+SED (figura 12D), sugere um enfraquecimento na permeabilidade intestinal, pois agem na fermentação do carboidrato, sendo consideradas produtoras de butirato, estimulante de secreção das mucinas que são pertencente ao processo de formação das TJ, sendo associada também com a redução da intolerância a glicose [149].

Nessa linha, as bactérias do gênero *Cropococcus* (figura 12G), que se mostram ausente para o grupo DH+SED, são auxiliares na produção de butirato indiretamente, pois são responsáveis pela liberação de ácido butírico, que contém anéis de butirato [150], evidenciando potencialmente um dos mecanismos que levam ao decréscimo de funcionalidade da microbiota em animais sedentários alimentados com dieta hiperlipídica.

Por volta do ano de 2013, foram realizados experimentos que descobriram e comprovaram a eficiência da bactéria *Akkermansia muciniphyla* no controle da DM2 e aumento de massa corporal [151], e em 2017, descobriu-se que a proteína, denominada AMUC_1100, presente em sua membrana seria capaz de potencializar seus benefícios [152].

Seguindo essa lógica, o resultado obtido em nosso experimento mostra que o protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade, foi capaz de atenuar e controlar tanto questões relacionadas a resistência à insulina como ao ganho de peso. Tais efeitos podem estar relacionados a essa bactéria, uma vez que os animais sujeitos a esse tipo de treinamento apresentaram abundância maior da bactéria *Akkermansia muciniphyla* (figura 15O). Em colaboração, recentemente, um estudo mostrou mais um mecanismo de atuação dessas bactérias, através de sua ação em uma proteína denominada P9, que age promovendo a termogênese no tecido adiposo marrom [153]. A *Akkermansia* também pode ser aumentada usando uma tratamento de células-tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais,

o que resultou em reparação da microbiota intestinal e também no aumento de mucinas como ocludinas, evidenciando assim efeitos positivos dessa bactéria na integridade da barreira intestinal [154].

Além disso, esse modelo de treinamento de alta intensidade parece apresentar um ambiente intestinal mais propício a apresentar TJ mais integras tendo em vista que resulta em aumento na abundância de bactérias dos gêneros *Lactococcus* (figura 15E), que possuem como produto final de seu processo de fermentação o ácido lático, que por sua vez é fermentado por bactérias do gênero *Lactobacillus* (figura 15D), também aumentada em decorrência desse tipo de treinamento, o que colabora para a produção de mucinas TJ[155].

De forma interessante, o treinamento intervalado de alta intensidade promoveu aumento da abundância de bactérias do gênero *Megasphaera* (figura 15Q) que também fazem parte do grupo de bactérias produtoras de mucinas, em específico, daquelas capazes de produzir butirato, acetato e propionato, como evidenciado em fermentação de até 97% do lactato em ruminantes[156-158], e em aves[159].

Nessa linha, outros gêneros que fazem parte da família *Lachnospiraceae* como o gênero *Dorea* (figura 15I) e *Lachnospira* (figura 15K), são também grandes produtores de mucinas como butirato e acetato, sugerindo uma melhora na estrutura da parede intestinal por conta das TJ, estando maior concentradas no grupo DH+EI.

O aumento da população de bactérias do gênero *Bifidobacterium* (figura 15P) no grupo DH+EI, sugere um acréscimo à saúde dos animais, pois essa bactéria já foi relacionada com tratamento da síndrome do intestino irritável [160], bem como no tratamento de diverticulite [161], além de auxiliar no funcionamento do sistema imunológico [162].

Estudo mostram que o aumento na abundância de bactérias *Bifidobacterium spp.* têm relevância muito importante na produção de mucinas, na manutenção da integridade das TJ, e na homeostase intestinal. Mais especificamente, o tratamento com prebióticos que induzem essa cepa foi capaz de aumentar a expressão de ZO-1, que em contrapartida, mostrou correlação negativa com os níveis plasmáticos de LPS sugerindo que o aumento específico de bifidobactérias impactou positivamente o desenvolvimento de endotoxemia metabólica[163]. Acreditamos que o aumento de *Bifidobacterium spp* observado em nossos animais também tenha atenuado a endotoxemia desses animais apesar de não termos aferido os níveis de LPS na

presente dissertação, pois pesquisas anteriores demonstraram que o exercício físico é capaz de reduzir significativamente os níveis circulantes de LPS em alimentador com dieta hiperlipídica [164-166].

Em se tratando do protocolo de treinamento contínuo (DH+EC) do presente estudo, os resultados são inconclusivos ou insuficientes para que haja uma comparação entre a composição das microbiotas, tendo em vista as intercorrências durante as fases de análises, se fazendo necessário um número maior de análises para se obter comparações fidedignas.

6. CONCLUSÃO

Quando tomados em conjunto os dados dessa pesquisa nos permitem concluir os seguintes pontos: os protocolos de treinamentos propostos, sendo contínuo e intermitente de alta intensidade, têm o mesmo grau de efeito em relação ao controle de peso e da sensibilidade a insulina e que o exercício intermitente promove alterações positivas na microbiota intestinal em comparação à do grupos sedentário, com destaque a essas alterações, pois possivelmente há a participação delas no tanto na melhora da sensibilidade à insulina e na redução do peso corporal.

7. REFERENCIAS

1. Donati Zeppa, S., et al., *Mutual Interactions among Exercise, Sport Supplements and Microbiota*. Nutrients, 2019. **12**(1).
2. Mohr, A.E., et al., *The athletic gut microbiota*. J Int Soc Sports Nutr, 2020. **17**(1): p. 24.
3. Guyton, A.C., *Fisiologia Humana*. Vol. 6ª Edição. 2008, Rio de Janeiro.
4. McNeil, E., C.T. Capaldo, and I.G. Macara, *Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells*. Molecular biology of the cell, 2006. **17**(4): p. 1922-1932.
5. Schlingmann, B., et al., *Regulation of claudin/zonula occludens-1 complexes by hetero-claudin interactions*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12276.
6. Campbell, S.C. and P.J. Wisniewski, 2nd, *Exercise is a Novel Promoter of Intestinal Health and Microbial Diversity*. Exerc Sport Sci Rev, 2017. **45**(1): p. 41-47.
7. Candela, M., et al., *Modulation of gut microbiota dysbioses in type 2 diabetic patients by macrobiotic Ma-Pi 2 diet*. Br J Nutr, 2016. **116**(1): p. 80-93.
8. Dandona, P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(8): p. 2907-10.
9. Duncan, S.H., et al., *Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(11): p. 1720-4.
10. Francino, M.P., *Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 1543.
11. Hotamisligil, G.S., *Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders*. Nature, 2017. **542**(7640): p. 177-185.
12. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
13. Liu, W.Y., et al., *Effect of aerobic exercise and low carbohydrate diet on pre-diabetic non-alcoholic fatty liver disease in postmenopausal women and middle aged men--the role of gut microbiota composition: study protocol for the AELC randomized controlled trial*. BMC Public Health, 2014. **14**: p. 48.
14. Pickup, J.C., *Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 813-23.
15. Pickup, J.C. and M.A. Crook, *Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?* Diabetologia, 1998. **41**(10): p. 1241-8.
16. Tuin, A., et al., *On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(2): p. G377-85.
17. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1785-8.
18. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
19. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
20. Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 941-6.
21. Pitocco, D., et al., *The role of gut microbiota in mediating obesity and diabetes mellitus*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020. **24**(3): p. 1548-1562.
22. Cani, P.D., 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): p. 1470-81.
23. Ding, S., et al., *High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12191.

24. Hamilton, M.K., et al., *Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015. **308**(10): p. G840-51.
25. Lam, Y.Y., et al., *Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34233.
26. Thonard, J.C. and H.W. Scherp, *Inhibition of a collagenase by the human gingival microbiota*. J Bacteriol, 1958. **76**(4): p. 355-8.
27. Crawford, J.J. and R.J. Shankle, *Application of newer methods to study the importance of root canal and oral microbiota in endodontics*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1961. **14**: p. 1109-23.
28. Parker, R.B. and M.L. Snyder, *Interactions of the oral microbiota. I. A system for the defined study of mixed cultures*. Proc Soc Exp Biol Med, 1961. **108**: p. 749-52.
29. Gibbons, R.J., et al., *The microbiota of the gingival crevice area of man. II. The predominant cultivable organisms*. Arch Oral Biol, 1963. **8**: p. 281-9.
30. Socransky, S.S., et al., *The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms*. Arch Oral Biol, 1963. **8**: p. 275-80.
31. De Araujo, W.C. and J.B. Macdonald, *The Gingival Crevice Microbiota in Five Preschool Children*. Arch Oral Biol, 1964. **9**: p. 227-8.
32. Breznak, J.A. and H.S. Pankratz, *In situ morphology of the gut microbiota of wood-eating termites [Reticulitermes flavipes (Kollar) and Coptotermes formosanus Shiraki]*. Appl Environ Microbiol, 1977. **33**(2): p. 406-26.
33. Iebba, V., et al., *Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota*. New Microbiol, 2016. **39**(1): p. 1-12.
34. Sartor, R.B., *Microbial influences in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 577-94.
35. Hold, G.L., *The gut microbiota, dietary extremes and exercise*. Gut, 2014. **63**(12): p. 1838-9.
36. Ruhlemann, M.C., et al., *Application of the distance-based F test in an mGWAS investigating beta diversity of intestinal microbiota identifies variants in SLC9A8 (NHE8) and three other loci*. Gut Microbes, 2017: p. 0.
37. Petriz, B.A., et al., *Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 511.
38. Zoetendal, E.G., M. Rajilic-Stojanovic, and W.M. de Vos, *High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota*. Gut, 2008. **57**(11): p. 1605-15.
39. Mariat, D., et al., *The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 123.
40. Gagliardi, A., et al., *Rebuilding the Gut Microbiota Ecosystem*. Int J Environ Res Public Health, 2018. **15**(8).
41. Koliada, A., et al., *Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population*. BMC Microbiol, 2017. **17**(1): p. 120.
42. Bakker, G.J., et al., *Gut Microbiota and Energy Expenditure in Health and Obesity*. J Clin Gastroenterol, 2015. **49 Suppl 1**: p. S13-9.
43. Gerard, P., *Gut microbiota and obesity*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(1): p. 147-62.
44. Krajmalnik-Brown, R., et al., *Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation*. Nutr Clin Pract, 2012. **27**(2): p. 201-14.
45. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
46. Hill, J.O., H.R. Wyatt, and J.C. Peters, *Energy balance and obesity*. Circulation, 2012. **126**(1): p. 126-32.
47. Apovian, C.M., *The Obesity Epidemic--Understanding the Disease and the Treatment*. N Engl J Med, 2016. **374**(2): p. 177-9.

48. 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): p. 2325-40.
49. Festi, D., et al., *Gut microbiota and metabolic syndrome*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(43): p. 16079-94.
50. Rial, S.A., et al., *Gut Microbiota and Metabolic Health: The Potential Beneficial Effects of a Medium Chain Triglyceride Diet in Obese Individuals*. Nutrients, 2016. **8**(5).
51. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
52. Barlow, G.M., A. Yu, and R. Mathur, *Role of the Gut Microbiome in Obesity and Diabetes Mellitus*. Nutr Clin Pract, 2015. **30**(6): p. 787-97.
53. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
54. Mathur, R. and G.M. Barlow, *Obesity and the microbiome*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2015. **9**(8): p. 1087-99.
55. Sweeney, T.E. and J.M. Morton, *The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss*. JAMA Surg, 2013. **148**(6): p. 563-9.
56. Lambert, J.E., et al., *Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice*. Appl Physiol Nutr Metab, 2015. **40**(7): p. 749-52.
57. Ley, R.E., *Obesity and the human microbiome*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(1): p. 5-11.
58. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
59. Raoult, D., *Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. **27**(8): p. 631-4.
60. Zhang, X., et al., *Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71108.
61. Salton, M.R.J. and K.S. Kim, *Structure*, in *Medical Microbiology*, th and S. Baron, Editors. 1996: Galveston (TX).
62. Ploger, S., et al., *Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1258**: p. 52-9.
63. Morrison, D.J. and T. Preston, *Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism*. Gut Microbes, 2016. **7**(3): p. 189-200.
64. Liu, Y., et al., *Gut Microbiome Fermentation Determines the Efficacy of Exercise for Diabetes Prevention*. Cell Metab, 2020. **31**(1): p. 77-91 e5.
65. Vital, M., A. Karch, and D.H. Pieper, *Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data*. mSystems, 2017. **2**(6).
66. Wong, J.M., et al., *Colonic health: fermentation and short chain fatty acids*. J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(3): p. 235-43.
67. Kuwahara, A., *Contributions of colonic short-chain Fatty Acid receptors in energy homeostasis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 144.
68. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Microbiota and diabetes: an evolving relationship*. Gut, 2014. **63**(9): p. 1513-21.
69. Weir, T.L., et al., *Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70803.
70. Basterfield, L. and J.C. Mathers, *Intestinal tumours, colonic butyrate and sleep in exercised Min mice*. Br J Nutr, 2010. **104**(3): p. 355-63.
71. Belkaid, Y. and T.W. Hand, *Role of the microbiota in immunity and inflammation*. Cell, 2014. **157**(1): p. 121-41.
72. Kamada, N., et al., *Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(5): p. 321-35.
73. Fei, N. and L. Zhao, *An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice*. ISME J, 2013. **7**(4): p. 880-4.

74. Xu, J., et al., *Intake of Blueberry Fermented by Lactobacillus plantarum Affects the Gut Microbiota of L-NAME Treated Rats*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. **2013**: p. 809128.
75. Chassaing, B., et al., *Gut microbiota drives metabolic disease in immunologically altered mice*. Adv Immunol, 2012. **116**: p. 93-112.
76. Fredborg, M., et al., *G protein-coupled receptor120 (GPR120) transcription in intestinal epithelial cells is significantly affected by bacteria belonging to the Bacteroides, Proteobacteria, and Firmicutes phyla*. J Anim Sci, 2012. **90 Suppl 4**: p. 10-2.
77. Bernstein, C.N., *Antibiotics, probiotics and prebiotics in IBD*. Nestle Nutr Inst Workshop Ser, 2014. **79**: p. 83-100.
78. Reichardt, F., et al., *Western diet induces colonic nitrergic myenteric neuropathy and dysmotility in mice via saturated fatty acid- and lipopolysaccharide-induced TLR4 signalling*. J Physiol, 2017. **595**(5): p. 1831-1846.
79. Mai, V., *Dietary modification of the intestinal microbiota*. Nutr Rev, 2004. **62**(6 Pt 1): p. 235-42.
80. Sanz, Y., I. Nadal, and E. Sanchez, *Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections*. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2007. **2**(2): p. 148-56.
81. Roberfroid, M., et al., *Prebiotic effects: metabolic and health benefits*. Br J Nutr, 2010. **104 Suppl 2**: p. S1-63.
82. Sprong, R.C., A.J. Schonewille, and R. van der Meer, *Dietary cheese whey protein protects rats against mild dextran sulfate sodium-induced colitis: role of mucin and microbiota*. J Dairy Sci, 2010. **93**(4): p. 1364-71.
83. Diamant, M., E.E. Blaak, and W.M. de Vos, *Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes?* Obes Rev, 2011. **12**(4): p. 272-81.
84. Aitoro, R., et al., *Gut Microbiota as a Target for Preventive and Therapeutic Intervention against Food Allergy*. Nutrients, 2017. **9**(7).
85. Bo, T., et al., *Relative variations of gut microbiota in disordered cholesterol metabolism caused by high-cholesterol diet and host genetics*. Microbiologyopen, 2017. **6**(4).
86. Joseph, J., et al., *Modified Mediterranean Diet for Enrichment of Short Chain Fatty Acids: Potential Adjunctive Therapeutic to Target Immune and Metabolic Dysfunction in Schizophrenia?* Front Neurosci, 2017. **11**: p. 155.
87. Canani, R.B., et al., *Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(12): p. 1519-28.
88. Aroniadis, O.C. and L.J. Brandt, *Fecal microbiota transplantation: past, present and future*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(1): p. 79-84.
89. Million, M. and D. Raoult, *The role of the manipulation of the gut microbiota in obesity*. Curr Infect Dis Rep, 2013. **15**(1): p. 25-30.
90. Murphy, E.F., et al., *Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models*. Gut, 2010. **59**(12): p. 1635-42.
91. Sheng, Y., et al., *Mulberry leaves ameliorate obesity through enhancing brown adipose tissue activity and modulating gut microbiota*. Food Funct, 2019.
92. Fabbiano, S., et al., *Functional Gut Microbiota Remodeling Contributes to the Caloric Restriction-Induced Metabolic Improvements*. Cell Metab, 2018. **28**(6): p. 907-921 e7.
93. Li, G., et al., *Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota*. Cell Metab, 2017. **26**(5): p. 801.
94. Ferrer, M., et al., *Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach*. Gut Microbes, 2014. **5**(1): p. 64-70.
95. Perez-Cobas, A.E., et al., *Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach*. Gut, 2013. **62**(11): p. 1591-601.
96. Nelson, A.M., et al., *Disruption of the human gut microbiota following Norovirus infection*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48224.

97. Santacruz, A., et al., *Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(10): p. 1906-15.
98. Matsumoto, M., et al., *Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum*. Biosci Biotechnol Biochem, 2008. **72**(2): p. 572-6.
99. Allen, J.M., et al., *Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice*. J Appl Physiol (1985), 2015. **118**(8): p. 1059-66.
100. Campbell, S.C., et al., *The Effect of Diet and Exercise on Intestinal Integrity and Microbial Diversity in Mice*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150502.
101. Evans, C.C., et al., *Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92193.
102. Mika, A., et al., *Exercise is More Effective at Altering Gut Microbial Composition and Producing Stable Changes in Lean Mass in Juvenile versus Adult Male F344 Rats*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125889.
103. Queipo-Ortuno, M.I., et al., *Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e65465.
104. Klaenhammer, T., et al., *Discovering lactic acid bacteria by genomics*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002. **82**(1-4): p. 29-58.
105. Hoffman-Goetz, L., N. Pervaiz, and J. Guan, *Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF-alpha in intestinal lymphocytes*. Brain Behav Immun, 2009. **23**(4): p. 498-506.
106. Packer, N. and L. Hoffman-Goetz, *Exercise training reduces inflammatory mediators in the intestinal tract of healthy older adult mice*. Can J Aging, 2012. **31**(2): p. 161-71.
107. Geurts, L., et al., *Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 149.
108. Ehrlich, S. and T. Consortium, *MetaHIT: The European Union Project on Metagenomics of the Human Intestinal Tract*. 2010. p. 307-316.
109. Rothschild, D., et al., *Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota*. Nature, 2018. **555**: p. 210.
110. Lax, S., et al., *Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment*. Science (New York, N.Y.), 2014. **345**: p. 1048-52.
111. Scheiman, J., et al., *Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism*. Nature Medicine, 2019. **25**(7): p. 1104-1109.
112. Clarke, S.F., et al., *Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity*. Gut, 2014. **63**(12): p. 1913.
113. Petersen, L.M., et al., *Community characteristics of the gut microbiomes of competitive cyclists*. Microbiome, 2017. **5**(1): p. 98.
114. Hsu, Y.J., et al., *Effect of intestinal microbiota on exercise performance in mice*. J Strength Cond Res, 2015. **29**(2): p. 552-8.
115. Deaton, C.M. and D.J. Marlin, *Exercise-associated oxidative stress*. Clinical Techniques in Equine Practice, 2003. **2**(3): p. 278-291.
116. Naziroglu, M., et al., *Oral vitamin C and E combination modulates blood lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in maximal exercising basketball players*. Cell Biochem Funct, 2010. **28**(4): p. 300-5.
117. Sen, C.K. and L. Packer, *Thiol homeostasis and supplements in physical exercise*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(2 Suppl): p. 653S-69S.
118. Hoffman-Goetz, L., et al., *Freewheel training decreases pro- and increases anti-inflammatory cytokine expression in mouse intestinal lymphocytes*. Brain Behav Immun, 2010. **24**(7): p. 1105-15.

119. Hoffman-Goetz, L. and J. Quadrilatero, *Treadmill exercise in mice increases intestinal lymphocyte loss via apoptosis*. *Acta Physiol Scand*, 2003. **179**(3): p. 289-97.
120. Hoffman-Goetz, L., P.A. Spagnuolo, and J. Guan, *Repeated exercise in mice alters expression of IL-10 and TNF-alpha in intestinal lymphocytes*. *Brain Behav Immun*, 2008. **22**(2): p. 195-9.
121. Spagnuolo, P.A. and L. Hoffman-Goetz, *Effect of dextran sulfate sodium and acute exercise on mouse intestinal inflammation and lymphocyte cytochrome c levels*. *J Sports Med Phys Fitness*, 2009. **49**(1): p. 112-21.
122. Denou, E., et al., *High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016. **310**(11): p. E982-93.
123. Kang, S.S., et al., *Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition*. *Mol Neurodegener*, 2014. **9**: p. 36.
124. Welly, R.J., et al., *Comparison of Diet versus Exercise on Metabolic Function and Gut Microbiota in Obese Rats*. *Med Sci Sports Exerc*, 2016. **48**(9): p. 1688-98.
125. CELESTRIN, C.P., *EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA EM RATOS WISTAR OBESOS* R.C.-S. Monografia de Mestrado do programa de Desenvolvimento Humano e Tecnologias - UNESP, Editor. 2018.
126. Pimenta, M., et al., *High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice*. *Life Sci*, 2015. **139**: p. 75-82.
127. Clark, J.E. and S. Welch, *Comparing effectiveness of fat burners and thermogenic supplements to diet and exercise for weight loss and cardiometabolic health: Systematic review and meta-analysis*. *Nutr Health*, 2021: p. 260106020982362.
128. Laurens, C., et al., *Influence of Acute and Chronic Exercise on Abdominal Fat Lipolysis: An Update*. *Front Physiol*, 2020. **11**: p. 575363.
129. Yuing, T., P.A. Lizana, and F.J. Berral, *[Effects of physical training in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review]*. *Rev Med Chil*, 2019. **147**(4): p. 480-489.
130. Wang, N., et al., *High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice*. *Life Sci*, 2017. **191**: p. 122-131.
131. Martinez-Huenchullan, S.F., et al., *Differential metabolic effects of constant moderate versus high intensity interval training in high-fat fed mice: possible role of muscle adiponectin*. *Physiol Rep*, 2018. **6**(4).
132. Bachmann, R., et al., *Novel insight into the role of microbiota in colorectal surgery*. *Gut*, 2017. **66**(4): p. 738-749.
133. Cremonesi, E., et al., *Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer*. *Gut*, 2018. **67**(11): p. 1984-1994.
134. Ferreira, R.M., et al., *Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota*. *Gut*, 2018. **67**(2): p. 226-236.
135. Ogino, S., et al., *Integrative analysis of exogenous, endogenous, tumour and immune factors for precision medicine*. *Gut*, 2018. **67**(6): p. 1168-1180.
136. Routy, B., et al., *The gut microbiota influences anticancer immunosurveillance and general health*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018. **15**(6): p. 382-396.
137. Shanahan, F., et al., *Feeding the microbiota: transducer of nutrient signals for the host*. *Gut*, 2017. **66**(9): p. 1709-1717.
138. Tilg, H., et al., *The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer*. *Cancer Cell*, 2018. **33**(6): p. 954-964.
139. Cani, P.D., *Human gut microbiome: hopes, threats and promises*. *Gut*, 2018. **67**(9): p. 1716-1725.
140. Alp, P.R., E.A. Newsholme, and V.A. Zammit, *Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates*. *Biochem J*, 1976. **154**(3): p. 689-700.

141. Dupuit, M., et al., *The TOTUM-63 Supplement and High-Intensity Interval Training Combination Limits Weight Gain, Improves Glycemic Control, and Influences the Composition of Gut Mucosa-Associated Bacteria in Rats on a High Fat Diet*. *Nutrients*, 2021. **13**(5).
142. Oleskin, A.V. and B.A. Shenderov, *Neuromodulatory effects and targets of the SCFAs and gasotransmitters produced by the human symbiotic microbiota*. *Microb Ecol Health Dis*, 2016. **27**: p. 30971.
143. David, L.A., et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. *Nature*, 2014. **505**(7484): p. 559-563.
144. Zhu, C., et al., *Human gut microbiome composition and tryptophan metabolites were changed differently by fast food and Mediterranean diet in 4 days: a pilot study*. *Nutr Res*, 2020. **77**: p. 62-72.
145. Fung, T.C., et al., *Intestinal serotonin and fluoxetine exposure modulate bacterial colonization in the gut*. *Nature Microbiology*, 2019. **4**(12): p. 2064-2073.
146. Yano, J.M., et al., *Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis*. *Cell*, 2015. **161**(2): p. 264-76.
147. Lee, B., K.M. Moon, and C.Y. Kim, *Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals*. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 2645465.
148. Suzuki, T. and H. Hara, *Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats*. *Nutr Metab (Lond)*, 2010. **7**: p. 19.
149. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. *Gut*, 2014. **63**(8): p. 1275-83.
150. Ai, D., et al., *Identifying Gut Microbiota Associated With Colorectal Cancer Using a Zero-Inflated Lognormal Model*. *Front Microbiol*, 2019. **10**: p. 826.
151. Cani, P.D., *Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome*. *Brief Funct Genomics*, 2013. **12**(4): p. 381-7.
152. Plovier, H., et al., *A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice*. *Nat Med*, 2017. **23**(1): p. 107-113.
153. Yoon, H.S., et al., **Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice*. *Nat Microbiol*, 2021.
154. Zhu, S., et al., *Combination of Mesenchymal Stem Cell and Endothelial Progenitor Cell Infusion Accelerates Injured Intestinal Repair by Regulating Gut Microbiota after Hematopoietic Cell Transplantation*. *Transplant Cell Ther*, 2021. **27**(2): p. 152 e1-152 e9.
155. Braat, H., et al., *A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. **4**(6): p. 754-9.
156. Counotte, G., et al., *Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981. **42**(4): p. 649-655.
157. Hashizume, K., et al., **Megasphaera elsdenii* JCM1772T Normalizes Hyperlactate Production in the Large Intestine of Fructooligosaccharide-Fed Rats by Stimulating Butyrate Production*. *The Journal of Nutrition*, 2003. **133**(10): p. 3187-3190.
158. Soto-Cruz, O., R. Chávez-Rivera, and G. Saucedo-Castañeda, *Stimulation of the *Megasphaera elsdenii*'s butyrate production in continuous culture by a yeast additive*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2001. **44**: p. 179-184.
159. Maki, J.J. and T. Looft, **Megasphaera stantonii* sp. nov., a butyrate-producing bacterium isolated from the cecum of a healthy chicken*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018. **68**(11): p. 3409-3415.
160. Guglielmetti, S., et al., *Randomised clinical trial: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life--a double-blind, placebo-controlled study*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011. **33**(10): p. 1123-32.

161. Gueimonde, M., et al., *Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(29): p. 3985-9.
162. Turróni, F., et al., *Bifidobacterium bifidum PRL2010 modulates the host innate immune response*. Appl Environ Microbiol, 2014. **80**(2): p. 730-40.
163. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability*. Gut, 2009. **58**(8): p. 1091-103.
164. LEITE, J.P., *O efeito do treinamento físico sobre a resistência à insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica: modulações de fatores inflamatórios sobre o tecido adiposo branco e marrom de ratos Wistar*, in Faculdade de Ciências Médicas. 2014, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/312926>. p. 113.
165. Oliveira, A.G., *Efeito do exercício físico agudo e crônico na expressão e ativação do TLR4 em roedores*, in Faculdade de Ciências Médicas. 2012, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/311238>. p. 58.
166. Oliveira, A.G., et al., *Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(12): p. 2545-56.