

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO AGUDO OU CRÔNICO SOBRE A  
MICROBIOTA INTESTINAL DE EQUINOS COM  
SOBREPESO**

**Thayná Da Cruz Paduan Silva**

**Médica Veterinária**

**2025**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO AGUDO OU CRÔNICO SOBRE A  
MICROBIOTA INTESTINAL DE EQUINOS COM  
SOBREPESO**

**Discente: Thayná Da Cruz Paduan Silva**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araujo Valadão**

**Coorientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias

**2025**

S586e

Silva, Thayná Da Cruz Paduan

Efeitos do exercício agudo ou crônico sobre a microbiota intestinal de equinos com sobrepeso / Thayná Da Cruz Paduan Silva. -- , 2025  
98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal,

Orientador: Carlos Augusto Araujo Valadão

Coorientador: Guilherme de Camargo Ferraz

1. Microbiota. 2. Equinos. 3. Fezes. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** EFEITOS DO EXERCÍCIO AGUDO OU CRÔNICO SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL DE EQUINOS COM SOBREPESO

**AUTORA:** THAYNÁ DA CRUZ PADUAN SILVA

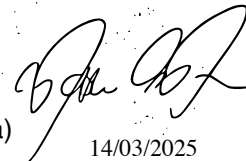
**ORIENTADOR:** CARLOS AUGUSTO ARAÚJO VALADÃO

**COORIENTADOR:** GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ (Participação Virtual)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal

Ph.D. MARCIO CARVALHO DA COSTA (Participação Virtual)  
Département de Biomédecine Vétérinaire / Université de Montréal (Canadá)



14/03/2025

Prof. Dr. JOSÉ CORRÊA DE LACERDA NETO (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de março de 2025

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Thayná Da Cruz Paduan Silva**, nascida em Piraí, Rio de Janeiro, filha de Leopoldo de Sousa e Silva e Michele da Cruz Paduan Silva. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela UNIFEOB – São João da Boa Vista, em 2020. Em 2022, concluiu a Pós-Graduação em Clínica e Cirurgia de Equinos pelo IBVET. De 2020 a 2022, realizou Residência em Anestesiologia e Clínica Cirúrgica de Grandes Animais na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Atualmente, é mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na UNESP – Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Araujo Valadão e coorientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Michele da Cruz Paduan Silva e Leopoldo de Sousa e Silva, e à minha irmã, Ynnajara Allanda Silva, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, incentivando meus sonhos e me fortalecendo nos desafios, tanto pessoais quanto profissionais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Araujo Valadão, minha profunda gratidão pelas valiosas orientações, pelo apoio contínuo e pela amizade ao longo dessa trajetória. Suas palavras, conselhos e dedicação foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, agradeço imensamente pelas contribuições essenciais a este trabalho, e por acreditar em mim e no projeto desde o início.

Ao Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino – LAFEQ, por me acolherem como parte da equipe, mesmo tendo chegado de maneira inesperada. A experiência proporcionada foi enriquecedora e decisiva para minha formação.

Ao Laboratório Multiusuário de Sequenciamento do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, especialmente a Pamela Aparecida e Camila Cesário, por toda paciência e ensinamentos sobre microbiota, bioinformática e técnicas laboratoriais. O apoio de vocês foi essencial para a concretização deste projeto.

Ao Deco, por toda ajuda ao longo das aulas e experimentos, especialmente no manejo dos animais.

Aos amigos de Jaboticabal, pela companhia em todos os momentos, pelo apoio, pelas conversas e pelos laços de amizade que tornaram essa caminhada mais leve e significativa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - 2023/10337-4.

## Sumário

<b>CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO 1 – Considerações gerais .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Microbiota intestinal dos equinos .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Efeitos do exercício físico sobre a microbiota .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Treinamento e desempenho dos equinos.....</b>	<b>4</b>
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 2 – Efeitos do treinamento submáximo sobre a microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Material e métodos .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Animais.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Coleta das amostras de fezes .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 Momentos de coleta.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Análise do pH fecal.....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Treinamento submáximo.....</b>	<b>11</b>
<b>2.6 Extração de DNA e sequenciamento.....</b>	<b>12</b>
<b>2.7 Bioinformática e análises estatísticas.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>15</b>
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>17</b>
<b>7. Conflito de interesse.....</b>	<b>20</b>
<b>8. Financiamento .....</b>	<b>20</b>
<b>10. Tabelas .....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 3 – Efeitos do teste de esforço incremental e da máxima fase estável de lactato sobre a microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto .....</b>	<b>34</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Animais.....</b>	<b>36</b>

2.2 Coleta das amostras de fezes .....	36
2.3 Momentos de coleta .....	36
2.4 Análise do pH fecal.....	36
2.5 Treinamento dos animais .....	37
2.6 Extração de DNA e sequenciamento.....	38
2.7 Bioinformática e análises estatísticas.....	38
3.1.1 Teste de esforço incremental (TEI) ao longo do tempo .....	39
3.1.2 Teste de esforço incremental (TEI) vs máxima fase estável do lactato (MFEL) .....	40
3.1.3 Lactato estável vs. Excedido .....	41
3.1.4 Dinâmica do lactato durante o MFEL.....	43
3.1.5 pH fecal no teste de esforço incremental e máxima fase estável do lactato .....	43
4. Discussão .....	44
5. Conclusão .....	46
6. Referências .....	46
7. Conflito de interesse .....	49
8. Financiamento.....	49
9. Figuras .....	49

## CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "Respostas glicêmicas e insulinêmicas de equinos com sobrepeso e concordância entre métodos para determinação do limiar de lactato", sob orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz e Certificado CEUA protocolo nº 2310/21, aprovado em reunião ordinária em 16 de setembro de 2021, teve inclusão na metodologia de coleta de fezes para avaliação da microbiota dos equinos" com aprovação da alteração em reunião ordinária de 17 de abril de 2024.

Jaboticabal, 17 de abril de 2024.

**Helena Cristina Delgado Brito**  
Coordenadora – CEUA

## **EFEITOS DO EXERCÍCIO AGUDO OU CRÔNICO SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL DE EQUINOS COM SOBREPESO**

### **RESUMO**

Microbiota intestinal equina desempenha papel fundamental na digestão de fibras, metabolismo de carboidratos e homeostase intestinal. Dois estudos investigaram efeitos do exercício físico na microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto, analisando impacto do treinamento submáximo e dos estímulos agudos do teste de esforço incremental (TEI) e da máxima fase estável do lactato (MFEL). No primeiro estudo, equinos foram submetidos a protocolo de treinamento submáximo por sete semanas, seguido por período de recuperação de 30 dias. Treinamento não alterou significativamente diversidade alfa, mas diversidade beta variou ao longo do tempo, sugerindo adaptação transitória ao exercício. Aumento na abundância de Proteobacteria foi observado após sete semanas, seguido por redução na recuperação, indicando resposta adaptativa ao esforço físico. pH fecal apresentou leve redução após treinamento, mas estabilizou-se na recuperação, reforçando que efeitos do treinamento foram temporários e não comprometeram homeostase intestinal. No segundo estudo, equinos foram avaliados antes e após protocolos de TEI e MFEL para análise dos efeitos do exercício agudo. Riqueza microbiana aumentou 24 horas após TEI, seguida de redução em 48 horas, enquanto na MFEL microbiota manteve-se estável. No MLSSLACEX, onde lactato excedeu 1 mM, observou-se maior dissimilaridade na microbiota, sugerindo que esforços intensos impactam sua composição. pH fecal reduziu após TEI, indicando maior fermentação bacteriana, enquanto permaneceu estável no MFEL, demonstrando que intensidade moderada não causou alterações significativas. Resultados indicam que exercício físico modula temporariamente microbiota intestinal de equinos, sendo intensidade e duração determinantes para magnitude dessas mudanças. Treinamento submáximo promove adaptações transitórias sem impacto duradouro, enquanto exercícios agudos acima do limiar de lactato induzem variações mais expressivas. Achados reforçam importância do controle da intensidade do treinamento e estratégias nutricionais para preservar saúde intestinal de equinos atletas.

**Palavras-chave:** equino, treinamento submáximo, máxima fase estável do lactato, microbiota intestinal, teste de esforço incremental

## **EFFECTS OF ACUTE OR CHRONIC EXERCISE ON THE INTESTINAL MICROBIOTA OF OVERWEIGHT HORSES**

### **ABSTRACT**

Equine gut microbiota plays a fundamental role in fiber digestion, carbohydrate metabolism, and intestinal homeostasis. Two studies investigated the effects of physical exercise on the gut microbiota of pasture-maintained horses, analyzing the impact of submaximal training and acute stimuli from the incremental exercise test (TEI) and maximal lactate steady state (MLSS). In the first study, horses underwent a submaximal training protocol for seven weeks, followed by a 30-day recovery period. Training did not significantly alter alpha diversity, but beta diversity varied over time, suggesting a transient adaptation to exercise. An increase in Proteobacteria abundance was observed after seven weeks, followed by a reduction during recovery, indicating an adaptive response to physical effort. Fecal pH showed a slight reduction after training but stabilized during recovery, reinforcing that training effects were temporary and did not compromise intestinal homeostasis. In the second study, horses were evaluated before and after TEI and MLSS protocols to analyze the effects of acute exercise. Microbial richness increased 24 hours after TEI, followed by a reduction at 48 hours, while in MLSS, microbiota remained stable. In MLSSLACEX, where lactate exceeded 1 mM, greater microbiota dissimilarity was observed, suggesting that intense efforts impact microbial composition. Fecal pH decreased after TEI, indicating greater bacterial fermentation, while it remained stable in MLSS, demonstrating that moderate intensity did not cause significant alterations. Results indicate that physical exercise temporarily modulates the equine gut microbiota, with intensity and duration being key determinants of the magnitude of these changes. Submaximal training promotes transient adaptations without long-term impact, while acute exercise above the lactate threshold induces more pronounced variations. Findings highlight the importance of training intensity control and nutritional strategies to preserve the gut health of athletic horses.

**Keywords:** equine, submaximal training, maximal lactate steady state, intestinal microbiota, incremental exercise test

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AGCC – Ácidos Graxos de Cadeia Curta
- ASV – Amplicon Sequence Variant
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- ECC – Escore de Condição Corporal
- FC – Frequência Cardíaca
- IET – Teste de Esforço Incremental (Incremental Exercise Test)
- LL – Limiar de Lactato
- LT – Limiar de Lactato (Lactate Threshold)
- LTV – Limiar de Lactato Visual (Visual Lactate Threshold)
- LVC – Curva de Velocidade do Lactato (Lactate-Velocity Curve)
- MFEL – Máxima Fase Estável do Lactato
- MLSS – Máxima Fase Estável do Lactato (Maximal Lactate Steady State)
- MLSS\_Start – Antes da sessão da Máxima Fase Estável do Lactato
- MLSSLACEX – Sessões onde o lactato excedeu o limiar
- MLSS\_24h – 24 horas após MFEL
- MLSS\_48h – 48 horas após MFEL
- NGS – Sequenciamento de Nova Geração (Next-Generation Sequencing)
- PCoA – Análise de Coordenadas Principais (Principal Coordinate Analysis)
- PERMANOVA – Permutational Multivariate Analysis of Variance
- qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
- RNA – Ácido Ribonucleico
- rRNA – RNA Ribossomal
- TEI – Teste de Esforço Incremental (Incremental Exercise Test)
- V2 – Velocidade na qual a concentração de lactato atinge 2 mM
- V4 – Velocidade na qual a concentração de lactato atinge 4 mM
- Submax – Início do treinamento submáximo
- Submax\_C – Grupo controle sem treinamento
- Week7 – Após sete semanas de treinamento

Week7\_C – Grupo controle na semana 7

Trev30 – 30 dias após recuperação do treinamento

Crev30 – Grupo controle após 30 dias

pH – Potencial Hidrogeniônico

mM – Milimolar

m/s – Metros por segundo

bpm – Batimentos por minuto

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2 – Efeitos do treinamento submáximo sobre a microbiota de equinos mantidos a pasto

<b>Tabela 1.</b> Média $\pm$ desvio padrão da abundância relativa dos filos bacterianos da microbiota intestinal de equinos submetidos a um treinamento submáximo. ....	28
<b>Tabela 2.</b> Média $\pm$ desvio padrão da abundância relativa das famílias bacterianas da microbiota intestinal de equinos submetidos a um treinamento submáximo. ....	29
<b>Tabela 3.</b> Média $\pm$ desvio padrão da abundância relativa dos gêneros bacterianos da microbiota intestinal de equinos submetidos a um treinamento submáximo. ....	30
<b>Tabela 4.</b> Comparação estatística pareada da beta diversidade da microbiota intestinal dos equinos submetidos ao treinamento submáximo. As comparações entre os diferentes momentos do experimento foram realizadas com p-valor ajustado (p adj) indicando diferenças estatisticamente significativas ( $p \text{ adj} \leq 0,05$ ) entre alguns grupos. ....	31
<b>Tabela 5.</b> Valores médios de pH fecal ( $\pm$ desvio padrão) de cavalos submetidos ao treinamento submáximo e seus respectivos grupos controle. Os grupos analisados foram Submax_C (controle antes do treinamento submáximo), Submax (antes do início do treinamento submáximo), Week7_C (controle na semana 7), Week7 (sete semanas de treinamento), Crev30 (controle após 30 dias) e Trev30 (30 dias de recuperação). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....	32
<b>Tabela 6.</b> Médias e desvio padrão (DP) das medidas de massa corporal e circunferência do pescoço nos terços proximal (25%), médio (50%) e distal (75%) antes e após o treinamento submáximo. ....	33

### Capítulo 3 – Efeitos do teste de esforço incremental e da máxima fase estável sobre a microbiota de equinos mantidos a pasto

<b>Tabela 1.</b> Média $\pm$ desvio padrão da abundância relativa dos filos bacterianos da microbiota intestinal de equinos submetidos a um treinamento submáximo. ....	28
<b>Tabela 2.</b> Média $\pm$ desvio padrão da abundância relativa das famílias bacterianas da microbiota intestinal de equinos submetidos a um treinamento submáximo. ....	29
<b>Tabela 3.</b> Média $\pm$ desvio padrão da abundância relativa dos gêneros bacterianos da microbiota intestinal de equinos submetidos a um treinamento submáximo. ....	30
<b>Tabela 4.</b> Comparação estatística pareada da beta diversidade da microbiota intestinal dos equinos submetidos ao treinamento submáximo. As comparações entre os diferentes momentos do experimento foram realizadas com p-valor ajustado (p adj) indicando diferenças estatisticamente significativas ( $p \text{ adj} \leq 0,05$ ) entre alguns grupos. ....	31
<b>Tabela 5.</b> Valores médios de pH fecal ( $\pm$ desvio padrão) de cavalos submetidos ao treinamento submáximo e seus respectivos grupos controle. Os grupos analisados foram Submax_C (controle antes do treinamento submáximo), Submax (antes do início do treinamento submáximo), Week7_C (controle na semana 7), Week7 (sete semanas de treinamento), Crev30 (controle após 30 dias) e Trev30 (30 dias de recuperação). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....	32
<b>Tabela 6.</b> Médias e desvio padrão (DP) das medidas de massa corporal e circunferência do pescoço nos terços proximal (25%), médio (50%) e distal (75%) antes e após o treinamento submáximo. ....	33

<b>Tabela 1.</b> Comparação da abundância relativa dos principais filos bacterianos nos diferentes tempos do teste de esforço incremental (IET).....	67
<b>Tabela 2.</b> Comparação da abundância relativa das principais famílias bacterianas nos diferentes tempos do teste de esforço incremental (IET).....	68
<b>Tabela 3.</b> Comparação da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos nos diferentes tempos do teste de esforço incremental (IET).....	69
<b>Tabela 4.</b> Comparação da abundância relativa dos principais filos bacterianos entre os protocolos de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato (MFEL).....	70
<b>Tabela 5.</b> Comparação da abundância relativa das principais famílias bacterianas entre os protocolos de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato (MFEL).....	72
<b>Tabela 6.</b> Comparação da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos entre os protocolos de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato (MFEL).....	75
<b>Tabela 7.</b> Comparação da alfa diversidade microbiana intestinal entre os protocolos de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato (MLSS) nos diferentes tempos. IET_Start: antes do teste de esforço incremental (TEI); IET24H e IET48H: 24h e 48h após o TEI, respectivamente; MLSS_Start: antes da sessão da máxima fase estável do lactato (MFEL); MLSS24H: 24h após a MFEL.....	78
<b>Tabela 8.</b> Comparação da abundância relativa dos principais filos bacterianos entre máxima fase estável do lactato (MLSS) e do lactato excedido (MLSSLACEX). ....	78
<b>Tabela 9.</b> Comparação da abundância relativa das principais famílias bacterianas entre os estímulos da máxima fase estável do lactato (MLSS) e do lactato excedido (MLSSLACEX). ....	79
<b>Tabela 10.</b> Comparação da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos entre os estímulos da máxima fase estável do lactato (MLSS) e do lactato excedido (MLSSLACEX). ....	80
<b>Tabela 11.</b> Comparação da alfa diversidade microbiana intestinal da MFEL: MLSS_Start: antes da sessão da máxima fase estável do lactato (MFEL); MLSS: sessões onde o lactato permaneceu estável; MLSSLACEX: sessões onde o lactato excedeu o limiar. ....	81
<b>Tabela 12.</b> Comparação da beta diversidade microbiana intestinal da MFEL: MLSS_Start, MLSS e MLSSLACEX pelo índice de Bray-Curtis. MLSS_Start: antes da sessão da máxima fase estável do lactato (MFEL); MLSS: sessões onde o lactato permaneceu estável; MLSSLACEX: sessões onde o lactato excedeu o limiar. ....	81
<b>Tabela 13.</b> Variação do pH fecal em equinos submetidos a testes de esforço incremental (TEI) e máxima fase estável do lactato (MFEL) ao longo de 48 horas.....	82

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2 – Efeitos do treinamento submáximo sobre a microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto

- Figura 1.** Distribuição da abundância relativa dos principais filos bacterianos nos grupos ao longo do tempo. O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal em resposta ao treinamento físico submáximo. ....21
- Figura 2.** Abundância relativa das famílias bacterianas nos grupos ao longo do tempo. O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal em resposta ao treinamento físico submáximo. ....22
- Figura 3.** O gráfico mostra as variações na composição de gêneros bacterianos nos grupos ao longo do tempo. O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal em resposta ao treinamento físico submáximo. ....23
- Figura 4.** O gráfico apresenta a riqueza de espécies ao longo do protocolo de treinamento físico submáximo nos equinos. ....24
- Figura 5.** O gráfico apresenta a diversidade alfa pela métrica Shannon ao longo do protocolo de treinamento físico submáximo nos equinos. ....25
- Figura 6.** Análise de coordenadas principais (PCoA), por meio do índice de Bray-Curtis para amostras microbiológicas avaliada em relação ao treinamento submáximo. ....26
- Figura 7.** Variação do pH fecal de cavalos submetidos ao treinamento submáximo. Os valores representam a média do pH para cada grupo: Submax\_C (controle antes do treinamento submáximo), Submax (antes do início do treinamento submáximo), Week7\_C (controle na semana 7), Week7 (sete semanas de treinamento), Crev30 (controle após 30 dias) e Trev30 (30 dias de recuperação). Letras distintas sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....27

### Capítulo 3 – Efeitos do teste de esforço incremental e da máxima fase estável de lactato sobre a microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto

- Figura 1.** Distribuição da abundância relativa dos principais filos bacterianos nos grupos ao longo do tempo. O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal em resposta ao treinamento físico submáximo. ....21
- Figura 2.** Abundância relativa das famílias bacterianas nos grupos ao longo do tempo. O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal em resposta ao treinamento físico submáximo. ....22
- Figura 3.** O gráfico mostra as variações na composição de gêneros bacterianos nos grupos ao longo do tempo. O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal em resposta ao treinamento físico submáximo. ....23
- Figura 4.** O gráfico apresenta a riqueza de espécies ao longo do protocolo de treinamento físico submáximo nos equinos. ....24
- Figura 5.** O gráfico apresenta a diversidade alfa pela métrica Shannon ao longo do protocolo de treinamento físico submáximo nos equinos. ....25

<b>Figura 6.</b> Análise de coordenadas principais (PCoA), por meio do índice de Bray-Curtis para amostras microbiológicas avaliada em relação ao treinamento submáximo. ....	26
<b>Figura 7.</b> Variação do pH fecal de cavalos submetidos ao treinamento submáximo. Os valores representam a média do pH para cada grupo: Submax_C (controle antes do treinamento submáximo), Submax (antes do início do treinamento submáximo), Week7_C (controle na semana 7), Week7 (sete semanas de treinamento), Crev30 (controle após 30 dias) e Trev30 (30 dias de recuperação). Letras distintas sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....	27
<b>Figura 1.</b> Distribuição da abundância relativa dos principais filos bacterianos entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS). O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal dos equinos. ....	49
<b>Figura 2.</b> Distribuição da abundância relativa das principais famílias bacterianas entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS). ....	51
<b>Figura 3.</b> Distribuição da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS). ....	52
<b>Figura 4.</b> Análise de alfa diversidade (Observed ASVs) entre os tempos experimentais do teste de esforço incremental em cavalos (IET_Start, IET_24h, IET_48h). ....	53
<b>Figura 5.</b> Análise de alfa diversidade (Índice de Shannon) entre os tempos experimentais do teste de esforço incremental em cavalos (IET_Start, IET_24h, IET_48h). ....	54
<b>Figura 6.</b> Análise de beta diversidade pela distância de Bray-Curtis do teste de esforço incremental (IET) em cavalos. ....	55
<b>Figura 7.</b> Análise de alfa diversidade (Observed ASVs) entre os estímulos induzidos pelo teste de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato em cavalos (MFEL). ....	56
<b>Figura 8.</b> Análise de alfa diversidade (Índice de Shannon) entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS). ....	57
<b>Figura 9.</b> Análise de beta diversidade pela distância de Bray-Curtis entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato (MLSS) em cavalos. ....	58
<b>Figura 10.</b> Distribuição da abundância relativa dos principais filos bacterianos entre os estímulos da máxima fase estável do lactato e lactato excedido (MLSS_Start, MLSS, MLSSLACEX). ....	59
<b>Figura 11.</b> Distribuição da abundância relativa das principais famílias bacterianas entre os estímulos da máxima fase estável do lactato e lactato excedido (MLSS_Start, MLSS, MLSSLACEX). ....	60
<b>Figura 12.</b> Distribuição da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos entre os estímulos da máxima fase estável do lactato e lactato excedido (MLSS_Start, MLSS, MLSSLACEX). ....	61
<b>Figura 13.</b> Análise de alfa diversidade (Observed ASVs) entre os estímulos da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS_Start, MLSS, MLSSLACEX), com lactato estável e excedido. ....	62
<b>Figura 14.</b> Análise de alfa diversidade (Índice de Shannon) entre os estímulos da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS_Start, MLSS, MLSSLACEX), com lactato estável e excedido. ....	63
<b>Figura 15.</b> Análise de beta diversidade pela distância de Bray-Curtis entre os estímulos da máxima fase estável do lactato (MLSS_Start, MLSS, MLSSLACEX), com lactato estável e excedido. ....	64

<b>Figura 16.</b> Variação do pH fecal em equinos submetidos a testes de esforço incremental (TEI) e máxima fase estável do lactato (MFEL) ao longo de 48 horas.....	65
<b>Figura 17.</b> Resposta da lactatemia de dez cavalos durante sessão de exercício constante no estado estável máximo de lactato (MFEL), abaixo do MLSS e acima do MLSS. Amostras de sangue foram obtidas a cada 5 minutos. WU: aquecimento.....	66

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

### **1. INTRODUÇÃO**

A microbiota intestinal desempenha um papel essencial na fisiologia dos equinos, atuando na digestão de fibras, na modulação do sistema imunológico e no metabolismo energético dos animais (Fernandes et al., 2014; Garber, Hastie & Murray, 2020). A composição desse ecossistema microbiano é influenciada por diversos fatores, incluindo idade, dieta, estado fisiológico e ambiente (Costa & Weese, 2012; Julliand & Grimm, 2017). Em equinos mantidos a pasto, a dieta rica em forragem é determinante para a estabilidade microbiana, favorecendo filos bacterianos predominantes, como Firmicutes e Bacteroidetes, responsáveis pela fermentação de polissacarídeos complexos e pela produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Theelen et al., 2021). No entanto, modificações no manejo nutricional e a exposição a diferentes níveis de exercício físico podem alterar essa composição, influenciando diretamente a homeostase intestinal e o desempenho atlético dos equinos (Janabis et al., 2016).

Estudos indicam que o exercício físico tem o potencial de modificar a diversidade e a estrutura da microbiota intestinal em diversas espécies, incluindo humanos, roedores e equinos (Allen et al., 2015; Janabis et al., 2016). Essas alterações podem ser benéficas ou prejudiciais, dependendo da intensidade e da duração do esforço. Exercícios aeróbicos moderados tendem a aumentar a abundância de bactérias benéficas, como *Roseburia* e *Faecalibacterium*, produtoras de AGCC que promovem a integridade da mucosa intestinal e a regulação do sistema imunológico (Silvers et al., 2021). Por outro lado, o exercício intenso pode levar a um quadro de disbiose, caracterizado pela redução da diversidade microbiana e pelo aumento da permeabilidade intestinal, favorecendo processos inflamatórios (Górniak et al., 2021).

No contexto da fisiologia esportiva equina, a avaliação da capacidade aeróbica é fundamental para a otimização do desempenho atlético. O teste de esforço incremental (TEI) é amplamente utilizado para determinar o limiar de lactato (LL), ponto em que ocorre um aumento exponencial na concentração plasmática de lactato, indicando transição para metabolismo anaeróbico (Ferraz et al., 2022). Paralelamente, a máxima fase estável de lactato (MFEL) representa a intensidade máxima na qual a concentração de lactato permanece em equilíbrio durante exercício contínuo, sendo considerada o padrão ouro para prescrição de treinamentos aeróbicos (Heck & Wackerhage, 2024). Embora esses testes sejam essenciais para o ajuste da carga de trabalho em equinos atletas, seu impacto sobre a microbiota intestinal ainda não é bem compreendido.

Por outro lado, o treinamento submáximo tem sido estudado como uma estratégia menos agressiva, capaz de promover adaptações fisiológicas sem comprometer a homeostase intestinal (Plancade et al., 2019). Esse tipo de treinamento mantém os animais dentro de uma faixa de esforço moderado, prevenindo efeitos deletérios associados ao exercício extenuante, como estresse oxidativo e inflamação intestinal (Cholewińska et al., 2020). No entanto, ainda há lacunas na literatura quanto aos efeitos do treinamento submáximo na diversidade microbiana e na estabilidade do ecossistema intestinal de equinos.

Dessa forma, a presente dissertação está organizada em capítulos que abordam, de maneira sistemática, os impactos do exercício físico sobre a microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto. Nos capítulos subsequentes, os temas são aprofundados por meio de dois artigos científicos. O primeiro investiga as respostas microbianas ao teste de esforço incremental e à máxima fase estável do lactato, enquanto o segundo explora os efeitos do treinamento submáximo na composição da microbiota equina.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### *2.1 Microbiota intestinal dos equinos*

A microbiota intestinal de equinos é composta por um complexo ecossistema de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus, que desempenham papéis essenciais na digestão de fibras, na fermentação de polissacarídeos estruturais e na produção de metabólitos importantes, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Julliard & Grimm, 2017; Theelen et al., 2021). A predominância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes é um dos principais marcadores de um microbioma equilibrado, auxiliando na degradação de celulose e hemicelulose, componentes essenciais da dieta equina baseada em forragens (Fernandes et al., 2014).

A composição microbiana pode ser afetada por fatores extrínsecos, como alterações dietéticas, uso de antibióticos e práticas de manejo, que impactam diretamente a diversidade e estabilidade do microbioma intestinal (Costa & Weese, 2012). Alterações bruscas na dieta podem resultar em disbiose, caracterizada pela redução da diversidade microbiana e pelo aumento de microrganismos potencialmente patogênicos, desencadeando distúrbios gastrointestinais, como a cólica e a laminite (Garber, Hastie & Murray, 2020).

Além da dieta, outro fator relevante na modulação da microbiota intestinal é a atividade física. Estudos recentes sugerem que o exercício físico pode influenciar significativamente a composição e diversidade microbiana em equinos atletas, promovendo mudanças na abundância relativa de determinadas bactérias e impactando a digestão e o metabolismo energético dos animais (Allen et al., 2015; Almeida et al., 2016).

## *2.2 Efeitos do exercício físico sobre a microbiota*

O exercício físico é um fator determinante na homeostase metabólica e fisiológica dos equinos, influenciando não apenas o sistema musculoesquelético e cardiorrespiratório, mas também o equilíbrio da microbiota intestinal (Costa & Weese, 2012; Julliand & Grimm, 2017). A relação entre atividade física e microbiota intestinal tem sido amplamente estudada em diversas espécies, demonstrando que diferentes tipos e intensidades de treinamento podem modular a diversidade e a composição microbiana de maneira significativa (Evans et al., 2014; Allen et al., 2015). No contexto dos equinos atletas, essa interação pode ter implicações diretas no metabolismo energético, na digestibilidade da dieta e na resposta inflamatória ao exercício (Theelen et al., 2021).

Estudos demonstram que o treinamento aeróbico moderado pode favorecer um aumento da diversidade microbiana e estimular a proliferação de bactérias benéficas, como *Roseburia* e *Faecalibacterium*, que desempenham um papel essencial na fermentação de polissacarídeos e na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente o butirato (Silvers et al., 2021). Esse metabólito é um dos principais reguladores da integridade da mucosa intestinal e está associado à redução da inflamação sistêmica, o que pode contribuir para a melhora da adaptação fisiológica ao treinamento (Julliand & Grimm, 2017). Em equinos mantidos a pasto, onde a dieta é predominantemente rica em fibras fermentáveis, a microbiota intestinal pode responder de forma ainda mais expressiva ao exercício, otimizando o aproveitamento energético e reduzindo o impacto do estresse oxidativo induzido pelo esforço físico (Plancade et al., 2019).

No entanto, a resposta da microbiota ao treinamento não é uniforme e pode ser influenciada pela intensidade e duração do exercício. Enquanto a prática regular e moderada favorece um microbioma mais equilibrado, exercícios intensos ou prolongados podem levar a um estado de disbiose, caracterizado pela redução da diversidade microbiana e pela perda da estabilidade da microbiota intestinal (Górniak et al., 2021). Esse desequilíbrio pode

comprometer a digestão e absorção de nutrientes, além de aumentar a permeabilidade intestinal, favorecendo a translocação bacteriana e estimulando processos inflamatórios sistêmicos (Cholewińska et al., 2020). Em equinos submetidos a treinamento de alta intensidade, essa condição pode estar associada à ocorrência de diarreias, cólicas e queda no desempenho atlético devido a uma menor eficiência na metabolização de substratos energéticos (Julliand & Grimm, 2017; Costa & Weese, 2012).

A relação entre microbiota intestinal e desempenho esportivo também pode estar associada à regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios (Julliand & Grimm, 2017). Algumas bactérias intestinais são responsáveis pela fermentação de fibras e pela produção de metabólitos que impactam a homeostase energética, auxiliando no suprimento de glicose e ácidos graxos de cadeia curta para o metabolismo muscular (Mach et al., 2020). Em cavalos atletas, um microbioma mais equilibrado pode favorecer uma melhor adaptação ao treinamento, otimizando o tempo de recuperação e reduzindo a fadiga muscular (Plancade et al., 2019). Por outro lado, um desequilíbrio microbiano pode resultar na produção de metabólitos pró-inflamatórios, comprometendo o desempenho físico e aumentando o risco de sobrecarga fisiológica (Allen et al., 2015).

Embora a relação entre microbiota e desempenho esportivo tenha sido amplamente explorada em humanos e roedores, ainda há lacunas na literatura sobre o impacto específico do treinamento na microbiota intestinal de equinos (Theelen et al., 2021). Pesquisas recentes sugerem que alterações na composição microbiana podem influenciar diretamente a capacidade de adaptação ao exercício, afetando a biodisponibilidade de nutrientes e a eficiência do metabolismo energético (Allen et al., 2015). Dessa forma, compreender os mecanismos pelos quais o exercício modula a microbiota intestinal pode fornecer subsídios para aprimorar estratégias de manejo nutricional e prescrição de treinamento, garantindo um melhor desempenho atlético e maior bem-estar para os equinos atletas (Julliand & Grimm, 2017; Plancade et al., 2019).

### *2.3 Treinamento e desempenho dos equinos*

A prescrição de treinamento para equinos atletas é baseada na avaliação da capacidade aeróbica e anaeróbica, sendo os testes fisiológicos ferramentas essenciais para ajustar a carga de trabalho de acordo com a aptidão individual do animal (Ferraz et al., 2022). A determinação precisa da capacidade aeróbica é essencial para evitar sobrecarga fisiológica e otimizar o

desempenho esportivo, sendo amplamente utilizada a avaliação do limiar de lactato (LL) e da máxima fase estável de lactato (MFEL).

O teste de esforço incremental (TEI) é um dos métodos mais empregados para determinar o limiar de lactato (LL), que corresponde à intensidade de exercício na qual a produção de lactato no sangue se torna maior do que sua remoção, resultando em um aumento exponencial da concentração plasmática (Heck et al., 1985; Ferraz et al., 2022). O LL tem sido amplamente utilizado na prescrição de treinamento aeróbico em equinos, pois permite identificar o ponto ideal para otimização do condicionamento físico sem comprometer a homeostase metabólica (Svedahl & MacIntosh, 2003).

Além do TEI, outro método amplamente utilizado para monitoramento da capacidade aeróbica é a máxima fase estável de lactato (MFEL), considerada o padrão ouro para a determinação do desempenho aeróbico em humanos e animais, incluindo equinos e cães (Soares et al., 2014; Ferraz et al., 2022). A MFEL pode ser definida como a maior intensidade de exercício na qual a concentração plasmática de lactato ([La-]) atinge um estado dinâmico de equilíbrio entre produção, remoção e metabolismo, sem aumento progressivo da concentração ao longo do tempo (Brooks, 2020; Heck & Wackerhage, 2024). O critério mais aceito para identificação da MFEL é a variação máxima de 1mM de [La-] durante os últimos 20 minutos de uma sessão de exercício de velocidade constante (Płoszczyca et al., 2020; Ferraz et al., 2022).

### 3. REFERÊNCIAS

ALLEN, J. M. et al. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol*, v. 118, p. 1059–1066, 2015.

BOKULICH, N. A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, v. 6, n. 1, 17 maio 2018.

BROOKS, G. A. Lactate as a fulcrum of metabolism. *Redox Biology* Elsevier B.V., , 1 ago. 2020.

CARTER, R. A. et al. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Veterinary Journal*, v. 179, n. 2, p. 204–210, fev. 2009.

CHOLEWIŃSKA, P. et al. The microbiome of the digestive system of ruminants-a review. *Animal Health Research Reviews* Cambridge University Press, , 1 jun. 2020.

COSTA, M. C.; WEESE, J. S. The equine intestinal microbiome. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 2012.

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*, v. 9, n. 3, 26 mar. 2014.

FERNANDES, K. A. et al. Faecal microbiota of forage-fed horses in new zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. *PLoS ONE*, v. 9, n. 11, 10 nov. 2014.

FERRAZ, G. C. et al. Predicting maximal lactate steady state from lactate thresholds determined using methods based on an incremental exercise test in beagle dogs: A study using univariate and multivariate approaches. *Research in Veterinary Science*, v. 152, p. 289–299, 20 dez. 2022.

FRANK, N. et al. Equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, n. 3, p. 467–475, maio 2010.

GARBER, A.; HASTIE, P.; MURRAY, J. A. Factors Influencing Equine Gut Microbiota: Current Knowledge. *Journal of Equine Veterinary Science* W.B. Saunders, , 1 maio 2020.

GEOR, R. J. Metabolic Predispositions to Laminitis in Horses and Ponies: Obesity, Insulin Resistance and Metabolic Syndromes. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 28, n. 12, p. 753–759, dez. 2008.

GÓRNIAK, W. et al. Effect of intense exercise on the level of bacteroidetes and firmicutes phyla in the digestive system of thoroughbred racehorses. *Animals*, v. 11, n. 2, p. 1–9, 2021.

HECK, H. et al. Justification of the 4-mmol/l Lactate Threshold. *International Journal of Sports Medicine*, v. 06, n. 03, p. 117–130, 14 jun. 1985.

HECK, H.; WACKERHAGE, H. The origin of the maximal lactate steady state (MLSS). *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2024.

JANABIS, A. H. D. et al. Exercise training-induced changes in the gut microbiota of Standardbred racehorses. *Comparative Exercise Physiology*, v. 12, n. 3, p. 119–130, 2016.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. The Impact of Diet on the Hindgut Microbiome. *Journal of Equine Veterinary Science* W.B. Saunders, , 1 maio 2017.

MACH, N. et al. Priming for welfare: gut microbiota is associated with equitation conditions and behavior in horse athletes. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

PLANCADE, S. et al. Unraveling the effects of the gut microbiota composition and function on horse endurance physiology. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

PŁOSZCZYCA, K. et al. Comparison of maximal lactate steady state with anaerobic threshold determined by various methods based on graded exercise test with 3-minute stages in elite cyclists. *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*, v. 12, n. 1, 1 dez. 2020.

PRATT-PHILLIPS, S.; MUNJIZUN, A. Impacts of Adiposity on Exercise Performance in Horses. *AnimalsMDPI*, 1 fev. 2023.

SILVERS, B. L. et al. 23 Forced exercise on gut microbiota and cytokines in young horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 100, p. 103486, 1 maio 2021.

SOARES, O. A. B. et al. Comparison of maximal lactate steady state with V 2 , V 4 , individual anaerobic threshold and lactate minimum speed in horses [Comparação da máxima fase estável do lactato com a V 2 , V 4 , o limiar anaeróbio individual e lactato mínimo em equinos] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. [s.l: s.n.].

SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B. R. Anaerobic Threshold: The Concept and Methods of Measurement. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.nrcresearchpress.com](http://www.nrcresearchpress.com)>.

THEELEN, M. J. P. et al. The equine faecal microbiota of healthy horses and ponies in the netherlands: Impact of host and environmental factors. *Animals*, v. 11, n. 6, 1 jun. 2021.

WILLING, B. et al. Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. *Equine Veterinary Journal*, v. 41, n. 9, p. 908–914, dez. 2009.

## **CAPÍTULO 2 – Efeitos do treinamento submáximo sobre a microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto**

### **RESUMO**

A atividade física modula o metabolismo microbiano intestinal dos humanos e pode determinar mudanças na microbiota intestinal dos equinos submetidos ao condicionamento físico com repercussões metabólicas e endócrinas. Nesse contexto, os efeitos metabólicos do treinamento submáximo têm sido estudados em equinos, entretanto, os reflexos do condicionamento físico na microbiota intestinal ainda são pouco compreendidos. Investigou-se a influência do treinamento submáximo na composição da microbiota intestinal de equinos mantidos em regime alimentar a pasto em três momentos: antes do treinamento (Submax), após sete semanas de exercício (Week7) e após 30 dias de recuperação (Trev30). A composição e a diversidade da microbiota intestinal, foram investigados pelo sequenciamento da região V4 do 16S rRNA, utilizando plataforma Illumina e ferramentas de Bioinformática. A análise de diversidade beta mostrou variações da composição de espécies entre os grupos ( $p = 0,001$ ) sem impacto significativo na diversidade alfa ( $p > 0,05$ ). A abundância do filo Proteobacteria com 7 semanas (Week7), seguido de redução após 30 dias (Trev30), sugerindo uma resposta adaptativa ao treinamento. A dieta à base de forragem ajudou a manter a estabilidade da microbiota intestinal, evitando grandes alterações na composição bacteriana e promovendo ambiente equilibrado ao longo do estudo. O pH fecal apresentou leve redução após sete semanas de exercício, sem diferenças estatísticas significativas entre os grupos ( $p \geq 0,05$ ), refletindo ajustes metabólicos, e se estabilizou após o período de recuperação em Trev30, sugerindo um reajuste microbiano pós-treinamento. O treinamento submáximo alterou temporariamente a microbiota intestinal, mas sem mudanças permanentes na comunidade microbiana.

**Palavra-chave:** modulação microbiana<sub>1</sub>, microbiota equino<sub>2</sub>, fezes<sub>3</sub>, diversidade microbiana<sub>4</sub>, treinamento submáximo<sub>5</sub>

## 1. Introdução

A relação entre exercício físico crônico e saúde tem sido amplamente documentada em diversas espécies, incluindo equinos(1–4). Estudos indicaram que exercícios aeróbios regulares e moderados estão correlacionados positivamente com a saúde geral dos animais (5,6). Cavalos de esporte frequentemente seguem dietas ricas em carboidratos, proporcionando fonte contínua de energia durante exercícios prolongados (7,8). No entanto, o consumo excessivo de carboidratos facilmente fermentáveis como o amido pode alterar a composição e a função da microbiota intestinal. A redução da diversidade microbiana e diminuição na produção de subprodutos benéficos, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), estão associadas a distúrbios intestinais, como a colite (7,8). Esse fato ressalta a importância da microbiota intestinal na manutenção da saúde geral dos equinos, especialmente no contexto de exercícios físicos e dietas específicas. A microbiota intestinal dos equinos pode desempenhar papel crucial na fisiologia geral dos animais, influenciando desde a saúde metabólica até o desempenho atlético (9,10). Estudos indicaram que um ecossistema microbiano saudável nos cavalos envolve grande diversidade de microrganismos, com algumas espécies dominantes e outras desempenhando funções metabólicas específicas (11,12) . A interação entre treinamento e microbiota intestinal mostra que o exercício moderado pode favorecer o aumento de bactérias benéficas, como *Roseburia* e *Faecalibacterium*, que produzem ácidos graxos essenciais à saúde intestinal (13).

Estudos em roedores e no homem, demonstraram que o exercício físico pode alterar a composição microbiana intestinal (14,15). Treinamento intensivo, de cavalos, pode desequilibrar filos dominantes, como Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria, devido ao estresse fisiológico e inflamação (16,17).

Nesse contexto, o treinamento submáximo surge como alternativa ao condicionamento físico dos equinos servindo como base para situações mais intensas de exercício. Supõe-se que ao induzir resposta na microbiota intestinal, o exercício submáximo pode aumentar a diversidade microbiana e modular e metabólicos. Diante do exposto, este estudo avaliou os efeitos do treinamento submáximo na microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto.

O programa de treino aplicado na presente pesquisa objetivou que os equinos estivessem aptos a realizar o teste para determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL), variável padrão ouro para avaliação da aptidão aeróbia. O presente estudo definiu a MAFEL como a carga

externa onde a concentração plasmática de lactato não aumenta mais do que 1 mM durante os últimos 20 minutos de um exercício de carga constante.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Animais*

O estudo foi realizado com quinze equinos, sendo sete Puro-Sangue Árabe e oito sem raça definida (11 fêmeas e quatro machos castrados), com idades entre 3 e 22 anos e massa corporal média de  $418 \pm 53$  kg. Nenhum dos animais apresentava histórico de doenças gastrintestinais nos últimos seis meses. Todos permaneceram alojados no mesmo pasto recebendo alimentação exclusiva à base de forragem natural de Tanzânia (*Panicum maximum*) e Massai (*Panicum maximum*  $\times$  *Panicum infestum*), com oferta de sal mineral *ad libitum*. Dos quinze equinos, dez foram submetidos ao treinamento físico submáximo, enquanto cinco permaneceram no grupo controle somente com atividade locomotora espontânea na mesma pastagem. Os cavalos foram pesados no início da primeira e última semana de treinamento utilizando balança digital para pesagem de animais (MGR-3000 Junior®, Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil).

### *2.2 Coleta das amostras de fezes*

As amostras de fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais utilizando luvas de palpação sendo acondicionadas em potes coletores estéreis. As fezes foram armazenadas imediatamente após a coleta em recipiente isotérmico e transportadas para o laboratório, onde foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA.

### *2.3 Momentos de coleta*

Para a avaliação do treinamento submáximo, as coletas foram realizadas em três momentos ao longo do experimento. A primeira coleta ocorreu antes do início do protocolo de treinamento submáximo (Submax), estabelecendo valores basais para comparação com as etapas subsequentes. Após sete semanas de treinamento, realizou-se a segunda coleta (Week7), visando identificar possíveis alterações fisiológicas e metabólicas associadas ao exercício prolongado. O terceiro e último momento de coleta ocorreu 30 dias após a interrupção do treinamento (Trev30), permitindo a análise das respostas do organismo ao período de recuperação. Para controle das variáveis e melhor interpretação dos efeitos do treinamento,

coletas equivalentes foram realizadas nos equinos que compuseram o grupo controle que conforme supramencionado não passaram pelo protocolo de treinamento submáximo, sendo identificados como SubmaxC (início), Week7C (sete semanas) e Crev30 (30 dias de recuperação).

#### *2.4 Análise do pH fecal*

O pH fecal foi avaliado em todas as etapas de coleta utilizando pHmetro de bancada. Para a análise, 30 g de fezes frescas foram diluídas em 30 mL de água ultrapura do tipo I, fornecida pelo sistema Milli-Q®.

#### *2.5 Treinamento submáximo*

O treinamento dos equinos foi monitorado para quantificação da carga interna. Assim, a frequência cardíaca (FC) foi medida durante as etapas do treino por meio de um frequencímetro Polar, receptor M430 com transmissor específico Polar H-10, para cavalos (Polar Electro®, Kempele, Finlândia). Tal dispositivo possui taxa de amostragem de 128 Hz e foi recentemente validado especificamente para uso em cavalos (18). O protocolo de treinamento teve duração de seis semanas, com três sessões semanais de 12 minutos cada. Nas três primeiras semanas, os animais passaram por uma fase de adaptação, que consistiu em 2 minutos de aquecimento a 1,5 m/s, seguidos de 10 minutos de exercício na esteira para manter a frequência cardíaca em torno de 130 bpm. A esteira foi inclinada a 5%, e a velocidade foi ajustada conforme a resposta da FC de cada animal. Quando a FC caía abaixo de 125 bpm, a velocidade foi aumentada em intervalos de 0,1 m/s, enquanto, quando a FC ultrapassava 140 bpm, a velocidade foi reduzida no mesmo intervalo. Nas três semanas seguintes, a intensidade do treinamento foi progressivamente elevada. Durante esse período, os cavalos continuaram com o aquecimento de 2 minutos a 1,5 m/s e a inclinação de 5%, mas a meta passou a ser frequência cardíaca de 160 bpm durante os 10 minutos de exercício. Da mesma forma que na fase inicial, a velocidade foi ajustada conforme a resposta da FC: caso a frequência estivesse abaixo de 155 bpm, a velocidade era aumentada em intervalos de 0,1 m/s, e se ultrapassasse 170 bpm, a velocidade era reduzida proporcionalmente.

Esse protocolo visou otimizar a capacidade cardiorrespiratória dos animais, proporcionando um treinamento submáximo, progressivo e controlado, permitindo a prescrição individualizada da resposta ao exercício.

## 2.6 Extração de DNA e sequenciamento

A extração de DNA foi realizada a partir de 250 mg de amostras fecais, utilizando o kit Power Fecal Pro DNA Kit (QIAGEN), conforme as instruções do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), submetido a uma corrente de 80 V por cerca de 2 horas. A quantificação do DNA foi realizada com o Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), utilizando o Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen®), seguindo as orientações do fabricante. A região V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada por PCR utilizando primers específicos: 515F: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3' e 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (19). Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram purificados a partir de gel de agarose 2% (p/v), utilizando o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research, Irvine, CA). Em seguida, as bibliotecas foram preparadas com o Kit Nextera XT Index v2 (Illumina), quantificadas e misturadas em concentrações equimolares, submetidas ao sequenciamento. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq, utilizando o kit MiSeq® v2 (300 ciclos) e a configuração de leitura pareada (2×150 bp). O sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitou a obtenção de dados detalhados sobre a composição microbiana, fornecendo uma base robusta para análises taxonômicas e funcionais da microbiota intestinal dos equinos analisados.

## 2.7 Bioinformática e análises estatísticas

Foram analisadas 44 amostras fecais para caracterizar a microbiota intestinal ao longo do treinamento, utilizando o QIIME2 versão 2023.7 (20). As sequências correspondentes aos primers foram verificadas com USEARCH11 (21) e removidas com 'cutadapt' no QIIME2. O plug-in DADA2 foi utilizado para a filtragem das leituras, remoção de quimeras e junção das leituras pareadas. A taxonomia das ASVs foi atribuída utilizando o banco de dados Silva 138.1 (22). Para melhorar a qualidade, foram removidas ASVs presentes em apenas uma amostra e as atribuídas a cloroplastos ou mitocôndrias. A diversidade alfa foi avaliada pelos índices de Shannon e ASVs observadas, enquanto a diversidade beta foi calculada pelo índice de Bray-Curtis e visualizada por PCoA, com diferenças significativas analisadas por PERMANOVA, utilizando a plataforma MicrobiomeAnalyst (23). Os gráficos foram gerados usando o pacote ggplot2 no RStudio. A análise da abundância relativa concentrou-se nos filos, famílias e gêneros mais prevalentes (>1%). Todas as análises estatísticas foram realizadas, considerando

um nível de significância de 5%. As médias e os desvios padrão foram calculados para descrever os dados. A comparação entre os grupos foi realizada no software SAS® (Statistical Analysis System), por meio do procedimento PROC NPAR1WAY com a opção WILCOXON, que executa o teste de Kruskal-Wallis, apropriado para dados não paramétricos. Quando o teste apresentou significância estatística, foi empregada a opção DSCF (Dwass-Steel-Critchlow-Fligner), que realiza automaticamente comparações múltiplas post hoc entre os grupos.

### 3. Resultados

A composição da microbiota intestinal dos equinos variou ao longo do experimento, com predominância dos filos Firmicutes, Bacteroidota, Verrucomicrobiota e Euryarchaeota. Filos menos abundantes como Proteobacteria, Actinobacteriota, Spirochaetota, Halobacterota, Planctomycetota e Cyanobacteria também foram identificados (Figura 1). Firmicutes e Bacteroidota se destacaram como os filos mais abundantes, enquanto Proteobacteria apresentou variação significativa entre os grupos ( $p = 0,0074$ , Tabela 1), apresentando maior abundância nos grupos Week7\_C e Week7, e menor abundância em Submax\_C. Embora o gráfico de abundância relativa (Figura 1) sugira maior presença de Proteobacteria no grupo Trev30, os testes estatísticos não indicaram uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Em termos de famílias bacterianas, as mais representativas foram Lachnospiraceae, Oscillospiraceae e Christensenellaceae, seguidas por Rikenellaceae e Prevotellaceae, além de Methanobacteriaceae e Eggerthellaceae. A distribuição dessas famílias variou significativamente, com destaque para Eggerthellaceae, que apresentou menor abundância no grupo Submax\_C (controle sem treinamento) em comparação com Submax (início do treinamento submáximo). Já os grupos Crev30, Trev30, Week7 e Week7\_C apresentaram valores intermediários, sem distinção significativa entre si. A família UCG\_010, predominante em Submax\_C, apresentou redução em Trev30, enquanto em Week7\_C exibiu um valor intermediário. Ao nível de gênero, observou-se que os principais gêneros bacterianos, como Lachnospiraceae\_XPB1014\_group, Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group e Christensenellaceae\_R7\_group, também apresentaram variações conforme o grupo experimental (Figura 3). O gênero Lachnospiraceae\_XPB1014\_group apresentou maior abundância relativa antes do treinamento, em Submax, porém, observa-se redução significativa nos momentos de coleta posteriores, tanto nos grupos tratados quanto no grupo controle (Tabela 3, Figura 3). A abundância relativa do gênero Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group, exibiu leve

aumento no momento final de coleta (Trev30) ( $p=0,0273$ ). Ao passo que a abundância do gênero UCG\_010 apresentou comportamento inverso ( $p=0,0255$ ).

Os resultados referentes à diversidade alfa da microbiota intestinal dos equinos submetidos ao treinamento submáximo foram avaliados por duas métricas: Observed ASVs, que mede a riqueza de espécies, e o índice de Shannon, que considera tanto a riqueza quanto a uniformidade da comunidade microbiana. Embora pequenas variações possam ser observadas (Figura 4 e 5), não há evidências estatísticas que indiquem alterações na alfa diversidade entre as diferentes fases experimentais. A beta diversidade da microbiota intestinal dos equinos, avaliada pelo índice de Bray-Curtis, apresentou diferença estatisticamente significativa na composição microbiana entre os grupos experimentais (Figura 6) ( $p = 0,001$ ). A análise estatística (Tabela 4) indicou variação na composição microbiana ao longo do período experimental. Comparações entre Submax e Crev30 ( $p = 0,015$ ) e entre Submax e Week7\_C ( $p = 0,015$ ) mostraram diferenças entre esses grupos. Variações também foram observadas entre Submax\_C e Trev30 ( $p = 0,015$ ) e entre Submax\_C e Week7 ( $p = 0,015$ ). A comparação entre Trev30 e Week7\_C apresentou valor de  $p$  de 0,015. Já a comparação entre Submax e Submax\_C indicou um valor de  $p$  de 0,02. A disposição das amostras no gráfico de Bray-Curtis (Figura 6) mostra distinção entre os grupos experimentais, com separação perceptível entre diferentes momentos do treinamento e recuperação.

Além das mudanças na composição microbiana, o pH fecal mostrou variações entre os grupos ao longo do experimento (Figura 7, Tabela 5). No momento inicial, o grupo SubmaxC0 (controle antes do treinamento submáximo) apresentou um pH médio de  $7,00 \pm 0,27$ , estatisticamente semelhante ao grupo Submax (antes do início do treinamento submáximo), que registrou o maior valor ( $7,09 \pm 0,20$ ). Na avaliação realizada após sete semanas, os grupos Week7\_C (controle na semana 7) e Week7 (sete semanas de treinamento) apresentaram valores médios de  $6,94 \pm 0,23$  e  $6,96 \pm 0,29$ , respectivamente. No grupo Crev30 (controle após 30 dias), observou-se a menor média de pH ( $6,55 \pm 0,47$ ), sendo significativamente diferente do grupo inicial Submax ( $p<0,05$ ), mas estatisticamente semelhante aos grupos Week7, Week7\_C e Trev30 ( $p\geq 0,05$ ). O grupo Trev30 (30 dias após o término do treinamento) apresentou um valor médio de  $6,96 \pm 0,29$ , sem diferenças estatísticas em relação aos demais grupos ( $p\geq 0,05$ ). O teste de Tukey indicou que os grupos Week7, Week7\_C e Trev30 não diferiram estatisticamente entre si, enquanto o grupo Crev30 apresentou um pH significativamente menor em relação ao grupo Submax ( $p<0,05$ ), mas sem diferenças estatísticas em relação aos demais ( $p\geq 0,05$ ). O

grupo treinado apresentou redução significativa da massa corporal em relação ao Submax ( $p = 0,01$ ) (Tabela 6).

#### 4. Discussão

Este estudo investigou o impacto do treinamento submáximo sobre a microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto, analisando sua composição antes do treinamento (Submax), após sete semanas de exercício (Week7) e após 30 dias de recuperação (Trev30). Firmicutes, Bacteroidota, Verrucomicrobiota e Euryarchaeota foram os filos mais abundantes em todos os grupos. Proteobacteria aumentou em Week7, possivelmente em resposta ao estresse fisiológico e à maior demanda energética durante o treinamento. Esse aumento pode estar associado à maior mobilização de substratos fermentáveis no intestino e ao ajuste microbiano às novas condições fisiológicas impostas pelo exercício crônico, o que já foi descrito em estudos sobre alterações microbianas induzidas pelo treinamento físico (2,24,25). A redução de Proteobacteria em Trev30 sugere retorno à homeostase intestinal, possivelmente associado à redistribuição do fluxo sanguíneo para o trato digestório após o término do treinamento (26). No grupo controle (Week7\_C), a abundância permaneceu estável, indicando que essas mudanças foram diretamente influenciadas pelo treinamento.

Entre as famílias predominantes estavam Lachnospiraceae, WCHB1\_41, Oscillospiraceae e Rikenellaceae. Eggerthellaceae. Estas famílias apresentaram menor abundância em Submax C e maior em Submax, sugerindo que diferenças individuais antes do treinamento podem influenciar a resposta microbiana ao exercício. A família UCG\_010, mais abundante em Submax\_C e reduzida em Trev30, pode ter relação com adaptação da microbiota intestinal a maior demanda metabólica durante o treinamento (12). A manutenção da estabilidade dessas famílias ao longo do estudo pode estar associada à dieta rica em fibra, que tem sido descrita como um fator de preservação da diversidade microbiana em equinos (8,13). Entre os gêneros predominantes, a maior abundância de Lachnospiraceae\_XPB1014\_group em Submax e sua redução em Crev30 podem estar relacionadas à adaptação do metabolismo de fibras à intensidade do exercício. Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group, que reduziu em Submax, mas aumentou em Week7\_C, pode ter sido influenciado por fatores ambientais e dietéticos, uma vez que estudos indicam que a microbiota equina responde dinamicamente a variações de manejo e treinamento (12,26).

A diversidade alfa, medida pelos índices Observed ASVs e Shannon, não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos, sugerindo que o treinamento não reduziu a riqueza da microbiota. Esse resultado corrobora achados anteriores que indicam que, em protocolos de exercício moderado, a diversidade alfa da microbiota equina tende a permanecer estável (26). Entretanto, isso não exclui a possibilidade de alterações funcionais na microbiota, que não podem ser captadas por análises baseadas apenas em 16S rRNA (27). A diversidade beta, no entanto, variou entre os grupos ao longo do experimento, demonstrando que o treinamento modulou a estrutura da comunidade bacteriana. As diferenças entre Submax e Crev30, Submax e Week7\_C, e entre Trev30 e Submax\_C reforçam que o exercício influencia a microbiota intestinal, seja por ajustes na utilização de substratos energéticos, seja pelo impacto mecânico da atividade física sobre a função intestinal (28).

Os achados indicam que o treinamento submáximo promoveu alterações temporárias na microbiota intestinal, sem impacto duradouro na diversidade global. Essas mudanças parecem refletir adaptações fisiológicas ao exercício, sendo revertidas após o período de recuperação. Durante o treinamento, alterações na microbiota podem impactar a digestão, absorção de nutrientes e resposta imunológica, afetando o desempenho dos equinos (26).

Ao longo do experimento, o pH fecal apresentou mudanças, refletindo as adaptações induzidas pelo treinamento submáximo. Submax, antes do início do treinamento, apresentou o valor mais alto de pH, enquanto, após sete semanas de exercício, Week7 apresentou uma leve redução, acompanhada por um aumento na abundância de Proteobacteria, filo que inclui bactérias fermentadoras rápidas, responsáveis pela produção de metabólitos ácidos, esse aumento no pH mais baixo pode estar relacionado à maior demanda metabólica imposta pelo treinamento, resultando em mudanças transitórias na microbiota intestinal(29). Após o período de 30 dias de recuperação em Trev30, o pH fecal se estabilizou, retornando a valores intermediários, indicando um reajuste microbiano após o término do treinamento. A presença e atividade de Firmicutes e Bacteroidota, especialmente das famílias Lachnospiraceae e Prevotellaceae, podem ter desempenhado um papel importante na regulação do pH intestinal, por meio da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)(30) . A modulação da microbiota observada em resposta ao exercício parece ser um reflexo das adaptações metabólicas induzidas pelo treinamento, com o retorno ao equilíbrio microbiano em Trev30, sem comprometer a homeostase a longo prazo (28).

No entanto, algumas limitações devem ser consideradas. O período de sete semanas pode não ter sido suficiente para induzir mudanças prolongadas. Além disso, a análise baseada no sequenciamento de 16S rRNA permite identificar a composição microbiana, mas não suas funções metabólicas. Estudos futuros devem considerar protocolos mais extensos e abordagens funcionais para esclarecer os impactos do treinamento na microbiota e sua influência no desempenho atlético de equinos.

## 5. Conclusão

O treinamento submáximo induziu alterações transitórias na microbiota intestinal de equinos, sem impacto duradouro na diversidade alfa, mas com mudanças na composição microbiana ao longo do tempo. O aumento de Proteobacteria durante o treinamento e sua posterior redução na recuperação indicam uma resposta adaptativa da microbiota às demandas metabólicas do exercício. No entanto, a estabilidade da diversidade alfa sugere que a dieta à base de forragem pode ter contribuído para a manutenção da comunidade microbiana. As diferenças na diversidade beta reforçam o efeito modulador do treinamento na microbiota intestinal, embora essas mudanças tenham sido reversíveis. O pH fecal apresentou uma redução após sete semanas de exercício, refletindo ajustes metabólicos da microbiota, e se estabilizou após o período de recuperação em Trev30, indicando um reajuste microbiano pós-treinamento. A ausência de modificações permanentes sugere que a microbiota equina é capaz de se modular e ajustar conforme o nível de atividade física.

## 6. Referências

1. Willemse E. THE IMPACT OF ENDURANCE EXERCISE ON FECAL INDICATORS OF EQUINE GUT HEALTH. (2019).
2. Placade S, Clark A, Philippe C, Helbling JC, Moisan MP, Esquerré D, Moyec L le, Robert C, Barrey E, Mach N. Unraveling the effects of the gut microbiota composition and function on horse endurance physiology. *Sci Rep* (2019) 9: doi: 10.1038/s41598-019-46118-7
3. Evans CC, LePard KJ, Kwak JW, Stancukas MC, Laskowski S, Dougherty J, Moulton L, Glawe A, Wang Y, Leone V, 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: doi: 10.1371/journal.pone.0092193

4. De Almeida MLM, Feringer WH, Carvalho JRG, Rodrigues IM, Jordão LR, Fonseca MG, De Rezende ASC, De Queiroz Neto A, Weese JS, Da Costa MC, et al. Intense exercise and aerobic conditioning associated with chromium or L-carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. *PLoS One* (2016) 11: doi: 10.1371/journal.pone.0167108
5. Bishwajit G, Tang S, Yaya S, He Z, Feng Z. Lifestyle Behaviors, Subjective Health, and Quality of Life Among Chinese Men Living With Type 2 Diabetes. *Am J Mens Health* (2017) 11:357–364. doi: 10.1177/1557988316681128
6. Kanagasabai T, Riddell MC, Arden CI. Physical Activity Contributes to Several Sleep-Cardiometabolic Health Relationships. *Metab Syndr Relat Disord* (2017) 15:44–51. doi: 10.1089/met.2016.0103
7. Harlow BE, Donley TM, Lawrence LM, Flythe MD. Effect of starch source (corn, oats or wheat) and concentration on fermentation by equine faecal microbiota in vitro. *J Appl Microbiol* (2015) 119:1234–1244. doi: 10.1111/jam.12927
8. Willing B, Vörös A, Roos S, Jones C, Jansson A, Lindberg JE. Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. *Equine Vet J* (2009) 41:908–914. doi: 10.2746/042516409X447806
9. Pratt-Phillips S, Munjizun A. Impacts of Adiposity on Exercise Performance in Horses. *Animals* (2023) 13: doi: 10.3390/ani13040666
10. Garber A, Hastie P, Murray JA. Factors Influencing Equine Gut Microbiota: Current Knowledge. *J Equine Vet Sci* (2020) 88: doi: 10.1016/j.jevs.2020.102943
11. Costa MC, Weese JS. The equine intestinal microbiome. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* (2012) 13:121–128. doi: 10.1017/S1466252312000035
12. Mach N, Ruet A, Clark A, Bars-Cortina D, Ramayo-Caldas Y, Crisci E, Pennarun S, Dhorne-Pollet S, Foury A, Moisan MP, et al. Priming for welfare: gut microbiota is associated with equitation conditions and behavior in horse athletes. *Sci Rep* (2020) 10: doi: 10.1038/s41598-020-65444-9
13. Julliand V, Grimm P. The Impact of Diet on the Hindgut Microbiome. *J Equine Vet Sci* (2017) 52:23–28. doi: 10.1016/j.jevs.2017.03.002
14. Janabis AHD, Biddle AS, Klein D, McKeever KH. Exercise training-induced changes in the gut microbiota of Standardbred racehorses. *Comp Exerc Physiol* (2016) 12:119–130. doi: 10.3920/CEP160015

15. Allen JM, Berg Miller ME, Pence BD, Whitlock K, Nehra V, Gaskins HR, White BA, Fryer JD, Woods JA. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* (2015) 118:1059–1066. doi: 10.1152/jappphysiol.01077.2014.-We
16. O'hara E, Neves ALA, Song Y, Guan LL. The Role of the Gut Microbiome in Cattle Production and Health: Driver or Passenger? AV08CH09\_Guan ARjats.cls. *Annual Review of Animal Biosciences Downloaded from www.annualreviews.org Guest* (2025) 12:47. doi: 10.1146/annurev-animal-021419
17. Theelen MJP, Luiken REC, Wagenaar JA, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Rossen JWA, Zomer AL. The equine faecal microbiota of healthy horses and ponies in the netherlands: Impact of host and environmental factors. *Animals* (2021) 11: doi: 10.3390/ani11061762
18. Haughan J, Manriquez M, Cohen ND, Robinson MA, de Solis CN. Comparison of novel wearable cardiac monitors to yield accurate exercising ECG and heart rate data in horses. *Comp Exerc Physiol* (2021) 17:457–466. doi: 10.3920/CEP200080
19. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108:4516–4522. doi: 10.1073/pnas.1000080107
20. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* (2019) 37:852–857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9
21. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* (2010) 26:2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
22. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, Huttley GA, Gregory Caporaso J. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* (2018) 6: doi: 10.1186/s40168-018-0470-z
23. Lu S, Deng H, Zhou C, Du Z, Guo X, Cheng Y, He X. Enhancement of  $\beta$ -Caryophyllene Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via Synergistic Evolution of  $\beta$ -Caryophyllene Synthase and Engineering the Chassis. *ACS Synth Biol* (2023) 12:1696–1707. doi: 10.1021/acssynbio.3c00024

24. O'Donnell MM, Harris HMB, Jeffery IB, Claesson MJ, Younge B, O'Toole PW, Ross RP. The core faecal bacterial microbiome of Irish Thoroughbred racehorses. *Lett Appl Microbiol* (2013) 57:492–501. doi: 10.1111/lam.12137
25. Gubert C, Kong G, Renoir T, Hannan AJ. Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis* (2020) 134: doi: 10.1016/j.nbd.2019.104621
26. Górniak W, Cholewińska P, Szeligowska N, Wołoszyńska M, Soroko M, Czyż K. Effect of intense exercise on the level of bacteroidetes and firmicutes phyla in the digestive system of thoroughbred racehorses. *Animals* (2021) 11:1–9. doi: 10.3390/ANI11020290
27. Silvers BL, Leatherwood JL, Bradbery AN, Guy CP, Martinez RE, Much ML, Keshri J, Dass SC, White-Springer SH. 23 Forced exercise on gut microbiota and cytokines in young horses. *J Equine Vet Sci* (2021) 100:103486. doi: 10.1016/J.JEVS.2021.103486
28. Almeida MLM, Feringer WH, Carvalho JRG, Rodrigues IM, Jordão LR, Fonseca MG, De Rezende ASC, De Queiroz Neto A, Weese JS, Da Costa MC, et al. Intense exercise and aerobic conditioning associated with chromium or L-carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. *PLoS One* (2016) 11: doi: 10.1371/journal.pone.0167108
29. Van den Berg M, Hoskin SO, Rogers CW, Grinberg A. Fecal pH and Microbial Populations in Thoroughbred Horses During Transition from Pasture to Concentrate Feeding. *J Equine Vet Sci* (2013) 33:215–222. doi: 10.1016/j.jevs.2012.06.004
30. Dougal K, de la Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Newbold CJ. Identification of a Core Bacterial Community within the Large Intestine of the Horse. *PLoS One* (2013) 8: doi: 10.1371/journal.pone.0077660

## **7. Conflito de interesse**

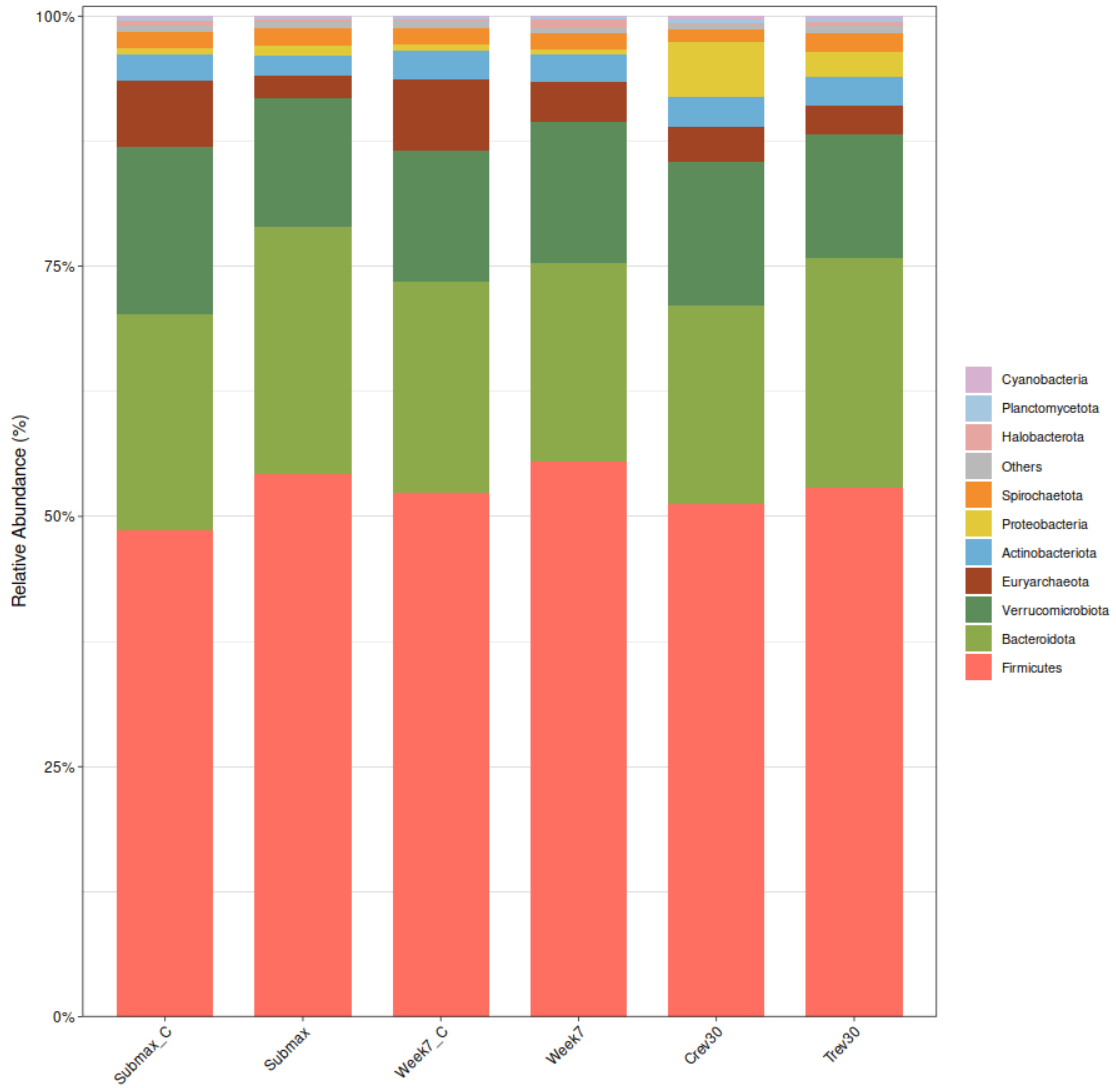
*Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.*

## **8. Financiamento**

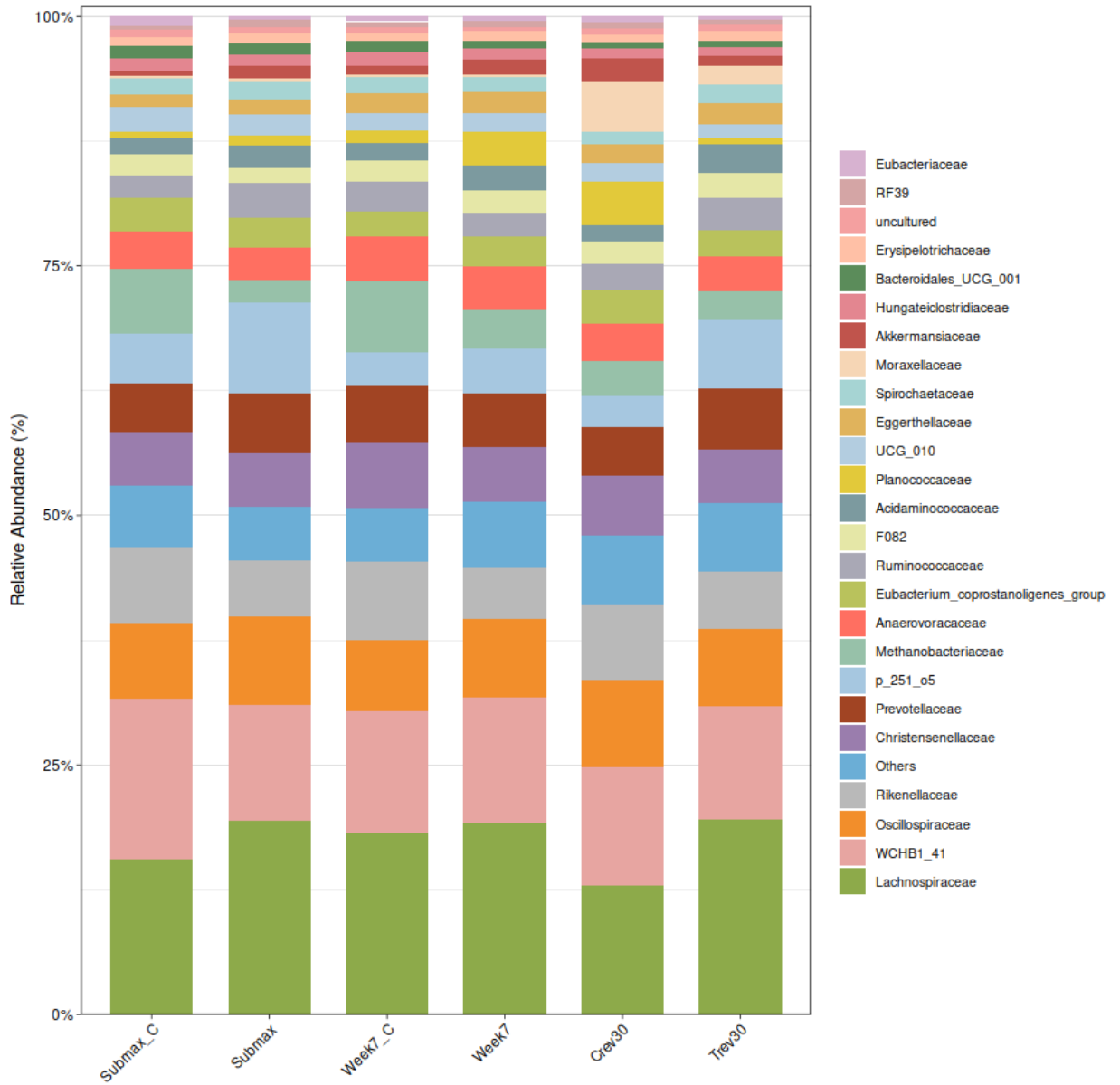
Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2023/10337-4 e Processo 2020/09633-0).

## 9. Figuras

**Figura 1.** Distribuição da abundância relativa dos principais filos bacterianos nos grupos ao longo do tempo. O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal em resposta ao treinamento físico submáximo.

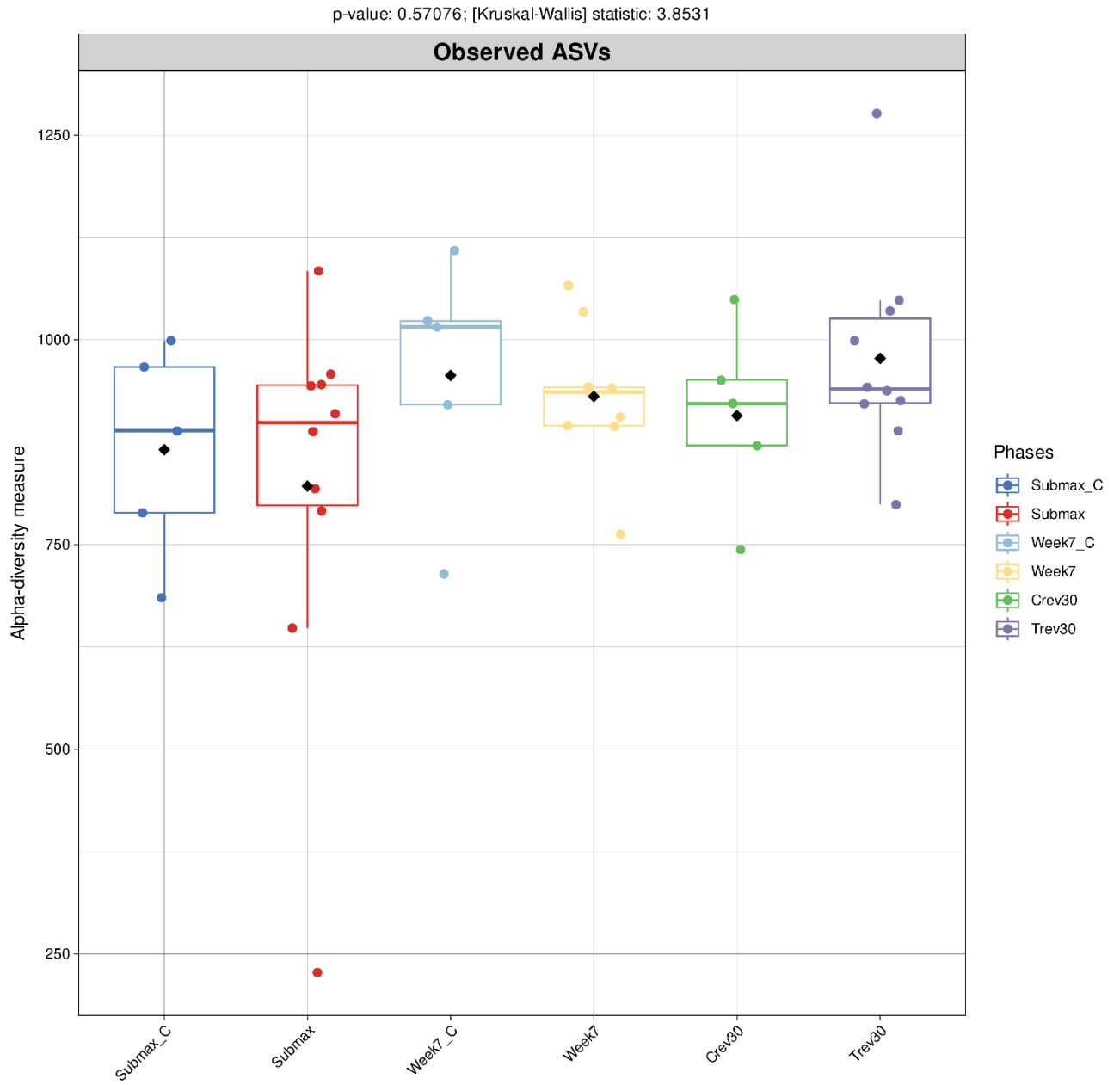


**Figura 2.** Abundância relativa das famílias bacterianas nos grupos ao longo do tempo. O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal em resposta ao treinamento físico submáximo.

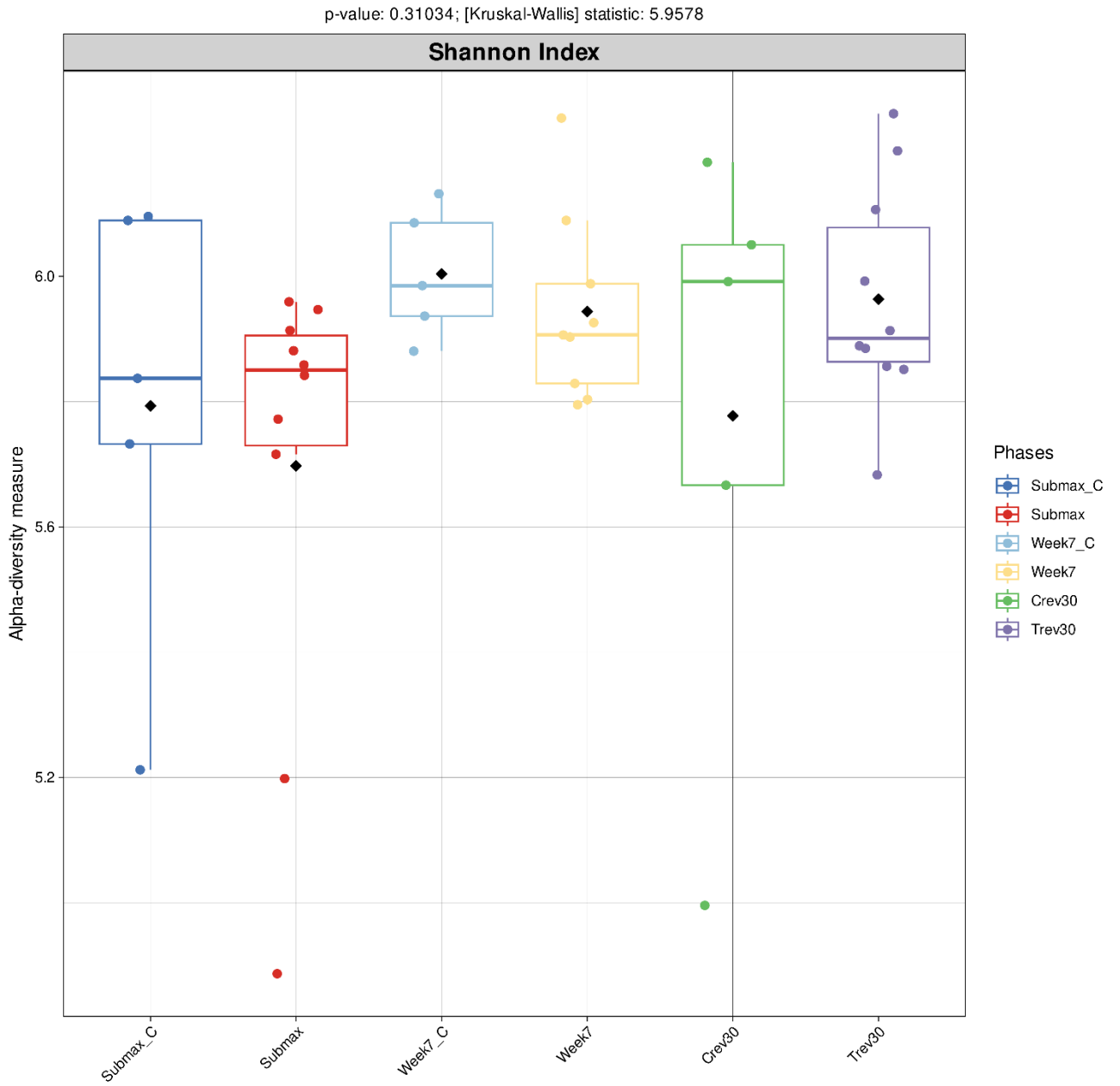




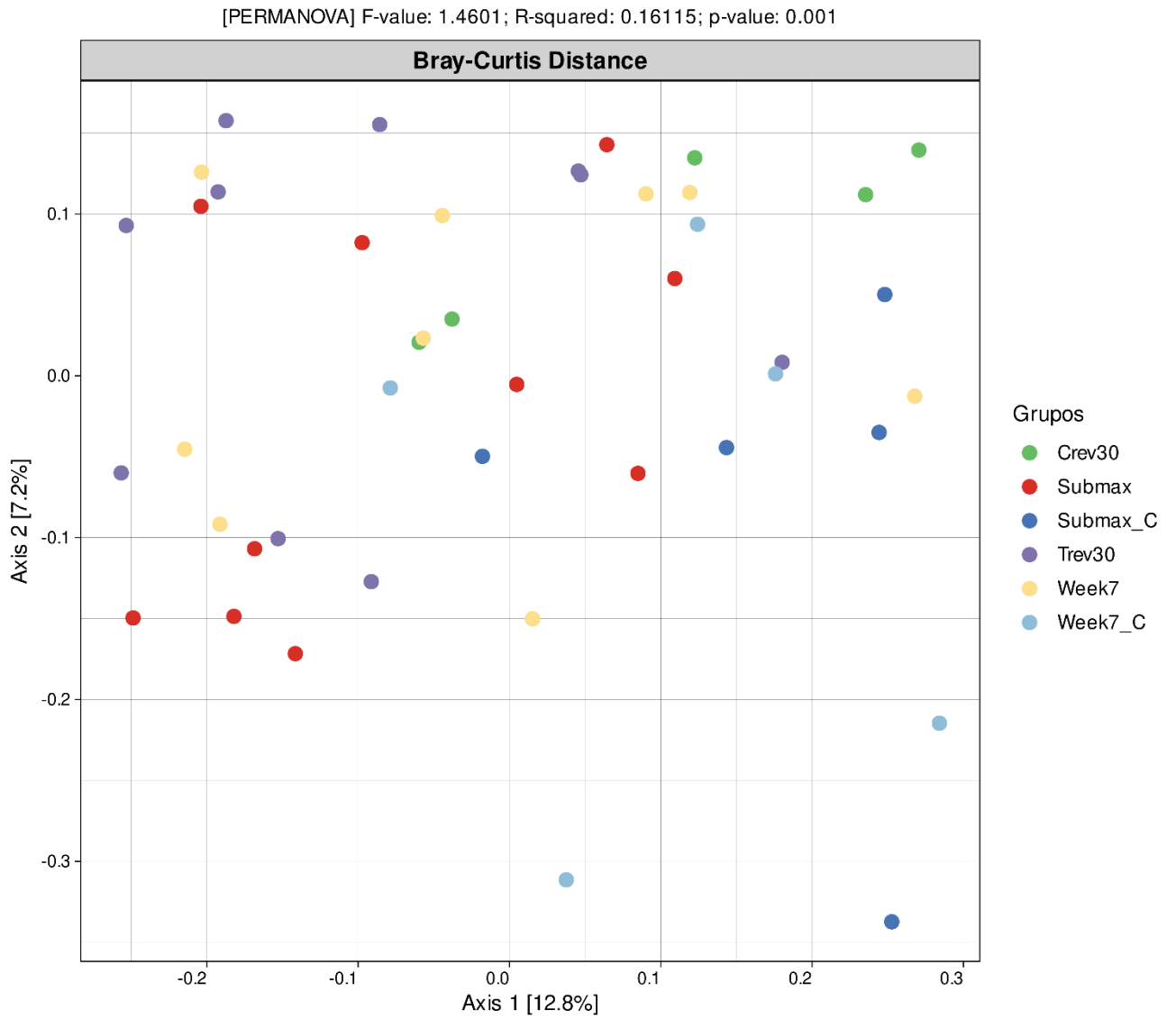
**Figura 4.** O gráfico apresenta a riqueza de espécies ao longo do protocolo de treinamento físico submáximo nos equinos.



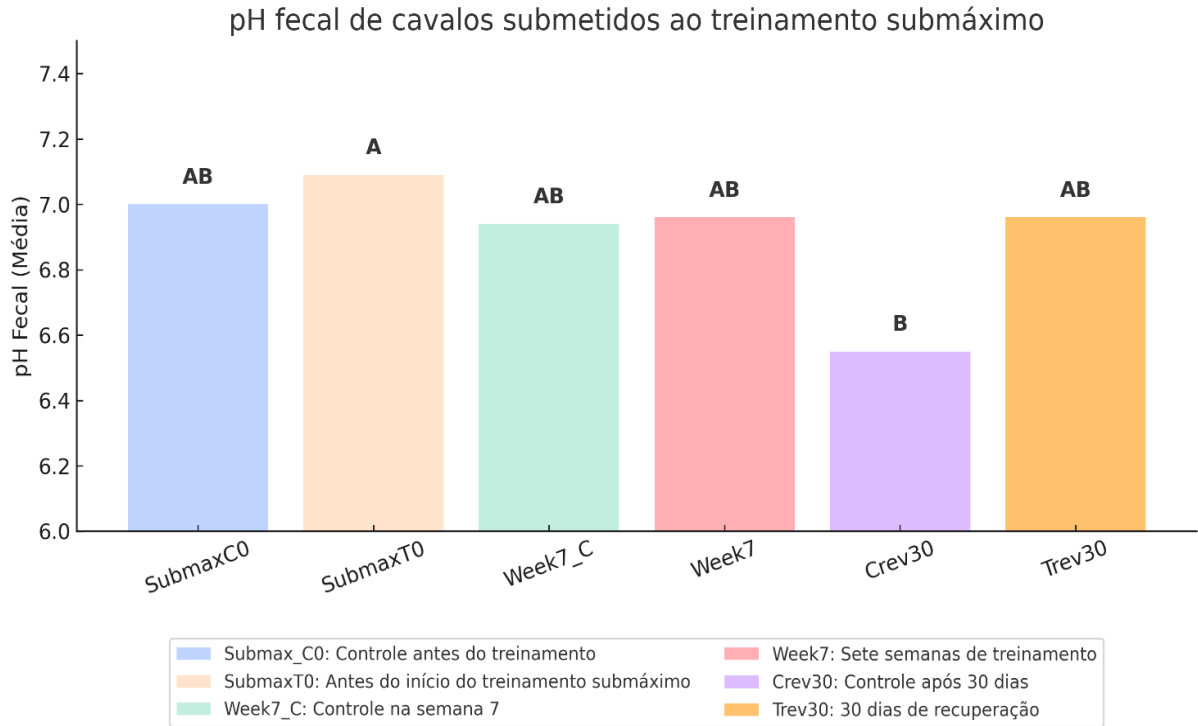
**Figura 5.** O gráfico apresenta a diversidade alfa pela métrica Shannon ao longo do protocolo de treinamento físico submáximo nos equinos.



**Figura 6.** Análise de coordenadas principais (PCoA), por meio do índice de Bray-Curtis para amostras microbiológicas avaliada em relação ao treinamento submáximo.



**Figura 7.** Variação do pH fecal de cavalos submetidos ao treinamento submáximo. Os valores representam a média do pH para cada grupo: Submax\_C (controle antes do treinamento submáximo), Submax (antes do início do treinamento submáximo), Week7\_C (controle na semana 7), Week7 (sete semanas de treinamento), Crev30 (controle após 30 dias) e Trev30 (30 dias de recuperação). Letras distintas sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



## 10. Tabelas

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão da abundância relativa dos filos bacterianos da microbiota intestinal de equinos submetidos a um treinamento submáximo.

Filo	Tratamento/Nº de equinos/Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probabilidade do Teste	Teste
	Crev30		Submax		Submax_C				
	5	10	5	10	5	10			
Others	0,0054 $\pm$ 0,0017 A	0,0064 $\pm$ 0,0029 A	0,0071 $\pm$ 0,0038 A	0,0079 $\pm$ 0,0037 A	0,0059 $\pm$ 0,0029 A	0,0067 $\pm$ 0,0038 A	0,5927	0,7056	F
Actinobacteriota	0,0302 $\pm$ 0,0045 A	0,0193 $\pm$ 0,0103 A	0,0260 $\pm$ 0,0119 A	0,0287 $\pm$ 0,0074 A	0,0279 $\pm$ 0,0056 A	0,0292 $\pm$ 0,0043 A	2,1661	0,0784	F
Bacteroidota	0,1981 $\pm$ 0,0428 A	0,2465 $\pm$ 0,0724 A	0,2157 $\pm$ 0,0471 A	0,2295 $\pm$ 0,0457 A	0,1985 $\pm$ 0,0445 A	0,2117 $\pm$ 0,0479 A	1,0592	0,3980	F
Cyanobacteria	0,0035 $\pm$ 0,0026 A	0,0015 $\pm$ 0,0015 A	0,0020 $\pm$ 0,0018 A	0,0022 $\pm$ 0,0015 A	0,0015 $\pm$ 0,0007 A	0,0010 $\pm$ 0,0004 A	7,4811	0,1872	Kruskal-Wallis
Euryarchaeota	0,0353 $\pm$ 0,0199 A	0,0229 $\pm$ 0,0151 A	0,0658 $\pm$ 0,0985 A	0,0294 $\pm$ 0,0179 A	0,0396 $\pm$ 0,0146 A	0,0711 $\pm$ 0,0518 A	7,7787	0,1689	Kruskal-Wallis
Firmicutes	0,5129 $\pm$ 0,0275 A	0,5428 $\pm$ 0,0733 A	0,4867 $\pm$ 0,1035 A	0,5291 $\pm$ 0,0417 A	0,5551 $\pm$ 0,0380 A	0,5234 $\pm$ 0,0766 A	0,9625	0,4528	F
Halobacterota	0,0012 $\pm$ 0,0007 A	0,0025 $\pm$ 0,0024 A	0,0043 $\pm$ 0,0063 A	0,0040 $\pm$ 0,0069 A	0,0078 $\pm$ 0,0074 A	0,0020 $\pm$ 0,0010 A	4,7637	0,4454	Kruskal-Wallis
Planctomycetota	0,0033 $\pm$ 0,0010 A	0,0018 $\pm$ 0,0009 A	0,0029 $\pm$ 0,0018 A	0,0034 $\pm$ 0,0022 A	0,0024 $\pm$ 0,0013 A	0,0022 $\pm$ 0,0011 A	1,3843	0,2519	F
Proteobacteria	0,0541 $\pm$ 0,0771 A	0,0098 $\pm$ 0,0083 B	0,0064 $\pm$ 0,0041 B	0,0247 $\pm$ 0,0276 AB	0,0052 $\pm$ 0,0044 B	0,0064 $\pm$ 0,0069 B	15,8281	0,0074	Kruskal-Wallis
Spirochaetota	0,0128 $\pm$ 0,0058 A	0,0179 $\pm$ 0,0074 A	0,0159 $\pm$ 0,0071 A	0,0181 $\pm$ 0,0109 A	0,0152 $\pm$ 0,0058 A	0,0160 $\pm$ 0,0043 A	0,4389	0,8185	F
Verrucomicrobiota	0,1432 $\pm$ 0,0510 A	0,1286 $\pm$ 0,0373 A	0,1671 $\pm$ 0,0512 A	0,1230 $\pm$ 0,0515 A	0,1410 $\pm$ 0,0432 A	0,1303 $\pm$ 0,0180 A	0,7997	0,5569	F

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste indicado ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão da abundância relativa das famílias bacterianas da microbiota intestinal de equinos submetidos a um treinamento submáximo.

Família	Tratamento/Nº de equinos/Médias e Desvios Padrões*										Valor do teste	Probab. do teste		
	Crev30		Submax		Submax_C		Trev30		Week7				Week7_C	
	5		10		5		10		10				5	
Acidaminococcaceae	0,016 $\pm$ 0,007	A	0,022 $\pm$ 0,005	A	0,015 $\pm$ 0,007	A	0,029 $\pm$ 0,005	A	0,025 $\pm$ 0,005	A	0,017 $\pm$ 0,007	A	0,97	0,4511
Akkermansiaceae	0,024 $\pm$ 0,008	A	0,012 $\pm$ 0,006	A	0,006 $\pm$ 0,008	A	0,01 $\pm$ 0,006	A	0,015 $\pm$ 0,006	A	0,008 $\pm$ 0,008	A	0,65	0,6637
Anaerovoracaceae	0,038 $\pm$ 0,004	A	0,032 $\pm$ 0,003	A	0,036 $\pm$ 0,004	A	0,035 $\pm$ 0,003	A	0,043 $\pm$ 0,003	A	0,044 $\pm$ 0,004	A	1,95	0,109
Bacteroidales_BS11_gut_group	0,007 $\pm$ 0,002	A	0,012 $\pm$ 0,002	A	0,013 $\pm$ 0,002	A	0,005 $\pm$ 0,002	A	0,008 $\pm$ 0,002	A	0,011 $\pm$ 0,002	A	2,44	0,0514
Bacteroidales_RF16_group	0,06 $\pm$ 0,008	A	0,054 $\pm$ 0,006	A	0,053 $\pm$ 0,008	A	0,054 $\pm$ 0,006	A	0,055 $\pm$ 0,006	A	0,067 $\pm$ 0,008	A	0,47	0,7942
Bacteroidales_UCG_001	0,019 $\pm$ 0,003	A	0,015 $\pm$ 0,002	A	0,012 $\pm$ 0,003	A	0,022 $\pm$ 0,002	A	0,022 $\pm$ 0,002	A	0,02 $\pm$ 0,003	A	2,06	0,0924
Christensenellaceae	0,007 $\pm$ 0,002	A	0,01 $\pm$ 0,001	A	0,009 $\pm$ 0,002	A	0,011 $\pm$ 0,001	A	0,01 $\pm$ 0,001	A	0,008 $\pm$ 0,002	A	0,68	0,6449
Eggerthellaceae	0,006 $\pm$ 0,001	AB	0,003 $\pm$ 0,001	B	0,01 $\pm$ 0,001	A	0,003 $\pm$ 0,001	B	0,004 $\pm$ 0,001	B	0,005 $\pm$ 0,001	AB	4,23	0,0037
Erysipelotrichaceae	0,034 $\pm$ 0,004	A	0,03 $\pm$ 0,003	A	0,034 $\pm$ 0,004	A	0,026 $\pm$ 0,003	A	0,03 $\pm$ 0,003	A	0,025 $\pm$ 0,004	A	0,9	0,4939
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,024 $\pm$ 0,006	A	0,015 $\pm$ 0,004	A	0,022 $\pm$ 0,006	A	0,024 $\pm$ 0,004	A	0,023 $\pm$ 0,004	A	0,021 $\pm$ 0,006	A	0,672	0,647
F082	0,01 $\pm$ 0,003	A	0,011 $\pm$ 0,002	A	0,012 $\pm$ 0,003	A	0,01 $\pm$ 0,002	A	0,011 $\pm$ 0,002	A	0,014 $\pm$ 0,003	A	0,35	0,8794
Hungateiclostridiaceae	0,129 $\pm$ 0,019	A	0,194 $\pm$ 0,014	A	0,155 $\pm$ 0,019	A	0,196 $\pm$ 0,014	A	0,191 $\pm$ 0,014	A	0,182 $\pm$ 0,019	A	2,37	0,0576
Lachnospiraceae	0,035 $\pm$ 0,017	A	0,023 $\pm$ 0,012	A	0,066 $\pm$ 0,017	A	0,029 $\pm$ 0,012	A	0,04 $\pm$ 0,013	A	0,071 $\pm$ 0,017	A	1,62	0,1774
Methanobacteriaceae	0,05 $\pm$ 0,013	A	0,003 $\pm$ 0,009	A	0,002 $\pm$ 0,013	A	0,019 $\pm$ 0,009	A	0,002 $\pm$ 0,01	A	0,003 $\pm$ 0,013	A	2,32	0,062
Oscillospiraceae	0,087 $\pm$ 0,009	A	0,088 $\pm$ 0,007	A	0,075 $\pm$ 0,009	A	0,078 $\pm$ 0,007	A	0,08 $\pm$ 0,007	A	0,072 $\pm$ 0,009	A	0,66	0,6532
p_251_o5	0,031 $\pm$ 0,02	A	0,091 $\pm$ 0,014	A	0,049 $\pm$ 0,02	A	0,068 $\pm$ 0,014	A	0,045 $\pm$ 0,015	A	0,034 $\pm$ 0,02	A	2,05	0,0934
Planococcaceae	0,044 $\pm$ 0,013	A	0,011 $\pm$ 0,009	A	0,006 $\pm$ 0,013	A	0,007 $\pm$ 0,009	A	0,034 $\pm$ 0,01	A	0,014 $\pm$ 0,013	A	1,99	0,1027
Prevotellaceae	0,048 $\pm$ 0,007	A	0,06 $\pm$ 0,005	A	0,049 $\pm$ 0,007	A	0,062 $\pm$ 0,005	A	0,053 $\pm$ 0,005	A	0,056 $\pm$ 0,007	A	0,85	0,5264
RF39	0,006 $\pm$ 0,002	A	0,008 $\pm$ 0,001	A	0,004 $\pm$ 0,002	A	0,005 $\pm$ 0,001	A	0,006 $\pm$ 0,001	A	0,006 $\pm$ 0,002	A	1,19	0,3344
Rikenellaceae	0,074 $\pm$ 0,008	A	0,056 $\pm$ 0,006	A	0,076 $\pm$ 0,008	A	0,058 $\pm$ 0,006	A	0,051 $\pm$ 0,006	A	0,078 $\pm$ 0,008	A	2,61	0,06
Ruminococcaceae	0,025 $\pm$ 0,005	A	0,036 $\pm$ 0,004	A	0,023 $\pm$ 0,005	A	0,032 $\pm$ 0,004	A	0,024 $\pm$ 0,004	A	0,03 $\pm$ 0,005	A	1,54	0,2006
Spirochaetaceae	0,013 $\pm$ 0,003	A	0,018 $\pm$ 0,002	A	0,016 $\pm$ 0,003	A	0,018 $\pm$ 0,002	A	0,015 $\pm$ 0,003	A	0,016 $\pm$ 0,003	A	0,43	0,8264
UCG_010	0,019 $\pm$ 0,003	AB	0,02 $\pm$ 0,002	AB	0,025 $\pm$ 0,003	A	0,014 $\pm$ 0,002	B	0,018 $\pm$ 0,002	AB	0,017 $\pm$ 0,003	AB	2,91	0,0255
uncultured	0,006 $\pm$ 0,002	A	0,007 $\pm$ 0,001	A	0,006 $\pm$ 0,002	A	0,006 $\pm$ 0,001	A	0,005 $\pm$ 0,002	A	0,006 $\pm$ 0,002	A	0,24	0,9411
WCHB1_41	0,119 $\pm$ 0,02	A	0,116 $\pm$ 0,014	A	0,161 $\pm$ 0,02	A	0,113 $\pm$ 0,014	A	0,126 $\pm$ 0,015	A	0,122 $\pm$ 0,02	A	0,87	0,5088
Others	0,07 $\pm$ 0,008	A	0,053 $\pm$ 0,006	A	0,063 $\pm$ 0,008	A	0,068 $\pm$ 0,006	A	0,066 $\pm$ 0,006	A	0,054 $\pm$ 0,008	A	1,2	0,3269

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey (p $\geq$ 0,05).

**Tabela 3.** Média  $\pm$  desvio padrão da abundância relativa dos gêneros bacterianos da microbiota intestinal de equinos submetidos a um treinamento submáximo.

Gênero	Tratamentos / N°. Animais / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Prob do Teste	Teste
	Crev30	Submax	Submax_C	Trev30	Week7	Week7_C			
	5	10	5	10	9	5			
Phascolarctobacterium	0,0161 $\pm$ 0,0071 A	0,0219 $\pm$ 0,0179 A	0,0153 $\pm$ 0,0084 A	0,0287 $\pm$ 0,0148 A	0,0246 $\pm$ 0,0178 A	0,0172 $\pm$ 0,0073 A	5,2853	0,3821	Kruskal-Wallis
Akkermansia	0,0243 $\pm$ 0,0296 A	0,0122 $\pm$ 0,0160 A	0,0058 $\pm$ 0,0061 A	0,0100 $\pm$ 0,0074 A	0,0153 $\pm$ 0,0287 A	0,0084 $\pm$ 0,0082 A	3,1894	0,6708	Kruskal-Wallis
Family_XIII_AD3011_group	0,0076 $\pm$ 0,0019 A	0,0111 $\pm$ 0,0097 A	0,0078 $\pm$ 0,0032 A	0,0067 $\pm$ 0,0024 A	0,0152 $\pm$ 0,0081 A	0,0191 $\pm$ 0,0098 A	15,9039	0,7100	Kruskal-Wallis
Christensenellaceae_R7_group	0,0575 $\pm$ 0,0142 A	0,0468 $\pm$ 0,0191 A	0,0484 $\pm$ 0,0147 A	0,0521 $\pm$ 0,0147 A	0,0531 $\pm$ 0,0186 A	0,0643 $\pm$ 0,0222 A	0,81	0,5516	F
Eggerthellaceae_uncultured	0,0126 $\pm$ 0,0050 A	0,0100 $\pm$ 0,0054 A	0,0079 $\pm$ 0,0032 A	0,0154 $\pm$ 0,0063 A	0,0142 $\pm$ 0,0038 A	0,0150 $\pm$ 0,0067 A	2,22	0,0724	F
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0338 $\pm$ 0,0089 A	0,0300 $\pm$ 0,0113 A	0,0337 $\pm$ 0,0168 A	0,0259 $\pm$ 0,0069 A	0,0300 $\pm$ 0,0069 A	0,0250 $\pm$ 0,0060 A	0,90	0,4939	F
F082	0,0236 $\pm$ 0,0115 A	0,0150 $\pm$ 0,0116 A	0,0219 $\pm$ 0,0056 A	0,0244 $\pm$ 0,0162 A	0,0232 $\pm$ 0,0142 A	0,0211 $\pm$ 0,0110 A	0,67	0,6470	F
Lachnospiraceae	0,0534 $\pm$ 0,0201 A	0,0754 $\pm$ 0,0237 A	0,0608 $\pm$ 0,0194 A	0,0793 $\pm$ 0,0164 A	0,0717 $\pm$ 0,0145 A	0,0688 $\pm$ 0,0070 A	1,81	0,1345	F
Lachnospiraceae_AC2044_group	0,0196 $\pm$ 0,0111 A	0,0296 $\pm$ 0,0118 A	0,0228 $\pm$ 0,0095 A	0,0259 $\pm$ 0,0087 A	0,0301 $\pm$ 0,0120 A	0,0248 $\pm$ 0,0086 A	0,98	0,4446	F
Lachnospiraceae_UC009	0,0096 $\pm$ 0,0061 A	0,0140 $\pm$ 0,0097 A	0,0105 $\pm$ 0,0057 A	0,0160 $\pm$ 0,0146 A	0,0160 $\pm$ 0,0094 A	0,0124 $\pm$ 0,0050 A	3,6666	0,5983	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae_XPB1014_group	0,0113 $\pm$ 0,0067 C	0,0285 $\pm$ 0,0126 A	0,0276 $\pm$ 0,0129 AB	0,0187 $\pm$ 0,0072 BC	0,0274 $\pm$ 0,0072 AB	0,0240 $\pm$ 0,0066 AB	3,30	0,0143	F
Methanobrevibacter	0,0353 $\pm$ 0,0199 A	0,0229 $\pm$ 0,0151 A	0,0658 $\pm$ 0,0985 A	0,0294 $\pm$ 0,0179 A	0,0396 $\pm$ 0,0146 A	0,0711 $\pm$ 0,0518 A	7,7787	0,1689	Kruskal-Wallis
Acinetobacter	0,0496 $\pm$ 0,0789 A	0,0032 $\pm$ 0,0053 A	0,0024 $\pm$ 0,0033 A	0,0187 $\pm$ 0,0292 A	0,0018 $\pm$ 0,0038 A	0,0028 $\pm$ 0,0063 A	8,9477	0,1112	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae_NK4A214_group	0,0450 $\pm$ 0,0118 A	0,0466 $\pm$ 0,0125 A	0,0490 $\pm$ 0,0112 A	0,0360 $\pm$ 0,0097 A	0,0444 $\pm$ 0,0083 A	0,0447 $\pm$ 0,0077 A	1,54	0,1994	F
Oscillospiraceae_UC002	0,0143 $\pm$ 0,0183 A	0,0151 $\pm$ 0,0108 A	0,0043 $\pm$ 0,0030 A	0,0111 $\pm$ 0,0076 A	0,0124 $\pm$ 0,0092 A	0,0050 $\pm$ 0,0042 A	11,7251	0,3880	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae_UC005	0,0110 $\pm$ 0,0041 AB	0,0145 $\pm$ 0,0064 AB	0,0096 $\pm$ 0,0041 B	0,0173 $\pm$ 0,0088 A	0,0121 $\pm$ 0,0047 AB	0,0123 $\pm$ 0,0053 AB	1,47	0,2227	F
p_251_o5	0,0311 $\pm$ 0,0195 A	0,0911 $\pm$ 0,0717 A	0,0491 $\pm$ 0,0346 A	0,0678 $\pm$ 0,0341 A	0,0451 $\pm$ 0,0352 A	0,0343 $\pm$ 0,0215 A	10,8354	0,5470	Kruskal-Wallis
Planococcaceae	0,0233 $\pm$ 0,0406 A	0,0065 $\pm$ 0,0109 A	0,0035 $\pm$ 0,0046 A	0,0044 $\pm$ 0,0048 A	0,0223 $\pm$ 0,0191 A	0,0074 $\pm$ 0,0141 A	4,7645	0,4453	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae_UC001	0,0146 $\pm$ 0,0045 A	0,0184 $\pm$ 0,0082 A	0,0151 $\pm$ 0,0072 A	0,0167 $\pm$ 0,0034 A	0,0141 $\pm$ 0,0077 A	0,0160 $\pm$ 0,0113 A	0,41	0,8369	F
Prevotellaceae_UC003	0,0103 $\pm$ 0,0070 A	0,0161 $\pm$ 0,0073 A	0,0141 $\pm$ 0,0061 A	0,0165 $\pm$ 0,0056 A	0,0158 $\pm$ 0,0077 A	0,0115 $\pm$ 0,0077 A	0,90	0,4906	F
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,0677 $\pm$ 0,0190 AB	0,0471 $\pm$ 0,0170 C	0,0686 $\pm$ 0,0323 AB	0,0493 $\pm$ 0,0126 BC	0,0457 $\pm$ 0,0128 C	0,0694 $\pm$ 0,0154 A	2,86	0,0273	F
Ruminococcus	0,0132 $\pm$ 0,0060 A	0,0233 $\pm$ 0,0101 A	0,0132 $\pm$ 0,0095 A	0,0213 $\pm$ 0,0097 A	0,0133 $\pm$ 0,0105 A	0,0192 $\pm$ 0,0223 A	8,6262	0,1249	Kruskal-Wallis
Treponema	0,0126 $\pm$ 0,0057 A	0,0175 $\pm$ 0,0073 A	0,0157 $\pm$ 0,0071 A	0,0177 $\pm$ 0,0109 A	0,0151 $\pm$ 0,0058 A	0,0157 $\pm$ 0,0043 A	0,40	0,8439	F
UC010	0,0185 $\pm$ 0,0047 ABC	0,0203 $\pm$ 0,0068 AB	0,0255 $\pm$ 0,0113 A	0,0135 $\pm$ 0,0032 C	0,0177 $\pm$ 0,0050 BC	0,0172 $\pm$ 0,0050 BC	2,91	0,0255	F
WCHB1_41	0,1189 $\pm$ 0,0500 A	0,1164 $\pm$ 0,0407 A	0,1612 $\pm$ 0,0538 A	0,1130 $\pm$ 0,0500 A	0,1257 $\pm$ 0,0457 A	0,1219 $\pm$ 0,0211 A	0,87	0,5088	F
Others	0,2649 $\pm$ 0,0157 A	0,2463 $\pm$ 0,0401 A	0,2404 $\pm$ 0,0388 A	0,2639 $\pm$ 0,0276 A	0,2541 $\pm$ 0,0385 A	0,2514 $\pm$ 0,0327 A	0,53	0,7490	F

\*:Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste indicado ( $p \geq 0,05$ )

**Tabela 4.** Comparação estatística pareada da beta diversidade da microbiota intestinal dos equinos submetidos ao treinamento submáximo. As comparações entre os diferentes momentos do experimento foram realizadas com p-valor ajustado (p adj) indicando diferenças estatisticamente significativas ( $p \text{ adj} \leq 0,05$ ) entre alguns grupos.

Group	pval	p.adj
Submax vs Crev30	0,005	0,015
Submax vs 7weeks_C	0,005	0,015
Submax_C vs Trev30	0,003	0,015
Submax_C vs 7weeks	0,003	0,015
Trev30 vs 7weeks_C	0,005	0,015
Submax vs Submax_C	0,008	0,02

**Tabela 5.** Valores médios de pH fecal ( $\pm$  desvio padrão) de cavalos submetidos ao treinamento submáximo e seus respectivos grupos controle. Os grupos analisados foram Submax\_C (controle antes do treinamento submáximo), Submax (antes do início do treinamento submáximo), Week7\_C (controle na semana 7), Week7 (sete semanas de treinamento), Crev30 (controle após 30 dias) e Trev30 (30 dias de recuperação). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Group	pH
Crev30	6,55 $\pm$ 0,47 B
SubmaxC0	7,00 $\pm$ 0,27 AB
SubmaxT0	7,09 $\pm$ 0,20 A
Trev30	6,96 $\pm$ 0,29 AB
Week7	6,96 $\pm$ 0,29 AB
Week7_c	6,94 $\pm$ 0,23 AB

Valores seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p \geq 0,05$ )

**Tabela 6.** Médias e desvio padrão (DP) das medidas de massa corporal e circunferência do pescoço nos terços proximal (25%), médio (50%) e distal (75%) antes e após o treinamento submáximo.

Grupos	MC (kg)		CP (cm)					
	Média	DP	25%		50%		75%	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
SubmaxC	426 <sup>a</sup>	57,9	77,0 <sup>a</sup>	3,50	102,0 <sup>a</sup>	7,01	118,0 <sup>a</sup>	6,11
Week7C	415 <sup>a</sup>	35,9	75,4 <sup>a</sup>	2,49	92,7 <sup>b</sup>	3,50	113,0 <sup>ab</sup>	4,86
Submax	404 <sup>ab</sup>	54,4	69,6 <sup>b</sup>	3,42	87,2 <sup>b</sup>	7,29	106,0 <sup>bc</sup>	7,39
Week7	389 <sup>ac</sup>	46,4	67,8 <sup>c</sup>	2,92	84,0 <sup>c</sup>	5,68	104,0 <sup>c</sup>	5,90

MC, massa corporal; CP, circunferência do pescoço; 25%, terço proximal da NC; 50%, terço médio da NC; 75% terço distal da NC; SubmaxC, grupo controle antes do programa de condicionamento de sete semanas; Week7C, grupo controle após sete semanas de programa de condicionamento; Submax, grupo treinado antes do programa de condicionamento de sete semanas; Week7, grupo treinado após sete semanas de programa de condicionamento; DP, desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística,  $P < 0,05$ .

### **CAPÍTULO 3 – Efeitos do teste de esforço incremental e da máxima fase estável de lactato sobre a microbiota intestinal de equinos mantidos a pasto**

#### **RESUMO**

A dieta fornece subsídios energéticos para o metabolismo e exerce influência direta na microbiota intestinal dos equinos. O impacto do exercício e de treinamentos intensivos na composição e diversidade microbiana ainda são pouco explorados nos equinos. Investigaram-se efeitos do exercício agudo na microbiota intestinal de equinos submetidos ao teste de esforço incremental (TEI) e a máxima fase estável do lactato (MFEL), comparando-se sessões de exercício que promoveram com estabilidade no lactato plasmático com sessões que induziram variação de lactato plasmático maior que 1 mM (MFEL LACEX). Dez equinos foram avaliados antes e após os protocolos do TEI e MFEL, com coletas de amostras fecais realizadas em três momentos distintos: pré-exercício, 24 horas e 48 horas após as sessões. Empregou-se sequenciamento de nova geração (NGS) da região V4 do gene 16S rRNA. Subsequentemente, por meio de análises bioinformáticas utilizando o QIIME2, caracterizou-se a microbiota intestinal e compararam-se as diversidades alfa e beta entre os estímulos que foram aplicados. Na microbiota intestinal predominaram os filos Firmicutes e Bacteroidota, independentemente do protocolo de exercício. No TEI, observou-se a riqueza microbiana aumentou 24 horas após e decaiu em 48 horas, sem impacto na diversidade alfa ou beta ( $p > 0,05$ ). Na MFEL, a composição microbiana mostrou-se estável e no MLSSLACEX, onde o lactato excedeu a concentração de 1mM, ocorreram alterações na diversidade beta entre os estímulos ( $p = 0,007$ ) e maior dissimilaridade da microbiota em relação ao MFEL. A diversidade alfa foi maior no MFEL 24 horas após ( $p = 0,0021$ ). Este aumento na diversidade alfa pode ter sido consequência de efeito adaptativo ao esforço físico aeróbio. O pH fecal foi menor 48 horas após o TEI ( $p < 0,05$ ) o que sugere aumento da fermentação bacteriana, enquanto no MFEL permaneceu estável ( $p \geq 0,05$ ). O exercício físico modulou a microbiota intestinal dos cavalos de forma transitória na microbiota.

**Palavra-chave:** modulação microbiana<sub>1</sub>, microbiota equino<sub>2</sub>, fezes<sub>3</sub>, treinamento agudo<sub>4</sub>

## 1. Introdução

A microbiota intestinal dos equinos desempenha papel relevante na homeostase orgânica, atuando na digestão de fibras, no metabolismo de carboidratos e na regulação do sistema imune (1). Sua composição é influenciada por fatores como idade, dieta, composição corpórea e ambiente (2), podendo a diversidade microbiana ser rapidamente alterada por mudanças na dieta (3). Em equinos jovens, os filos Bacteroidetes e Firmicutes predominam, enquanto a inclusão de concentrados na dieta pode aumentar a abundância de Proteobacteria e Actinobacteria (4). Estudos recentes sugeriram que o exercício físico pode impactar a diversidade e a composição da microbiota intestinal em humanos e animais, com evidências de alterações na microbiota de roedores e equinos submetidos a esforços agudos ou crônicos(5,6). Em equinos, o exercício moderado favoreceu o aumento de bactérias benéficas, como *Roseburia* e *Faecalibacterium*, que produzem ácidos graxos de cadeia curta, essenciais à saúde intestinal (3). Entretanto, exercícios intensos podem reduzir a diversidade microbiana devido ao estresse oxidativo e à inflamação inerente a este tipo de esforço físico, impactando bactérias do gênero *Lactobacillus* (7).

O padrão ouro para avaliar o desempenho aeróbio é o estado estacionário dinâmico da concentração de lactato, tradicionalmente conhecida como máxima fase estável de lactato (MFEL), que indica os domínios de intensidade do exercício e se tornou ferramenta para prescrição do treinamento aeróbio. MFEL pode ser conceituada como o limite superior da concentração plasmática de L-lactato ( $[La^-]$ ) que atinge um estado estacionário durante uma carga externa de treinamento constante num período definido (8,9). No entanto, trata-se de um protocolo trabalhoso pois requer pelo menos três sessões de exercício de velocidade constante com duração de 30 minutos em dias alternados (10). Portanto, é necessário usar outros procedimentos de ajuste de curva para predição da MFEL com uma única sessão de exercício. Neste sentido, um teste de exercício incremental (TEI) é frequentemente realizado para determinar a deflexão da curva de velocidade-lactato (CVL) e estabelecer o limiar de lactato (LL) para predição da MFEL. LL refere-se à intensidade do exercício na qual ocorrem alterações metabólicas, causando aumento nas demandas fisiológicas à medida que a carga externa se intensifica. É onde as fibras musculares do tipo II de contração rápida, muitas vezes chamadas de produtoras de lactato (11), são ativadas(12–15). Neste limiar, a via glicolítica torna-se altamente ativa, levando ao aumento das concentrações de  $[La^-]$ . Faltam pesquisas sobre se testes de esforço tais como TEI e MFEL impactam na microbiota fecal de equinos.

A investigação da microbiota fecal de equinos atletas permite compreender o impacto do treinamento físico na saúde e no desempenho esportivo, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias de manejo nutricional, assim como para prescrição racional de programas de

treinamento (16,17). Objetivou-se avaliar como os testes de esforço, TEI e MFEL, impactam a diversidade e a composição da microbiota intestinal de equinos.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Animais

A pesquisa foi conduzida com dez equinos, dos quais sete pertenciam à raça Puro-Sangue Árabe e três sem raça definida. A idade dos animais variava entre 3 e 22 anos, com uma massa corporal média de  $418 \pm 53$  kg. Nenhum deles apresentou histórico de doenças gastrintestinais nos seis meses anteriores ao estudo. Durante o período experimental, todos permaneceram no mesmo pasto e receberam exclusivamente uma dieta composta por forragem natural das gramíneas Tanzânia (*Panicum maximum*) e Massai (*Panicum maximum* × *Panicum infestum*), além de sal mineral *ad libitum*. Os cavalos foram submetidos a dois estímulos de exercício: Teste de esforço incremental (TEI) e a máxima fase estável de lactato (MFEL), sendo os mesmos indivíduos avaliados em ambos os protocolos.

### 2.2 Coleta das amostras de fezes

As amostras de fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais utilizando luvas de palpação sendo acondicionadas em potes coletores estéreis. As fezes foram armazenadas imediatamente após a coleta em recipiente isotérmico e transportadas para o laboratório, onde foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA.

### 2.3 Momentos de coleta

As amostras foram obtidas em diferentes momentos para avaliar a resposta aguda ao exercício. No teste de esforço incremental (TEI), as coletas ocorreram antes do teste (IET-T0), 24 horas após (IET-T24) e 48 horas após (IET-T48). No protocolo do teste de máxima fase estável do lactato (MFEL), as amostras foram coletadas antes do teste (MLSS-T0), 24 horas após (MLSS-T24) e 48 horas após (MLSS-T48). Esses intervalos permitiram acompanhar possíveis variações nos parâmetros analisados ao longo do tempo, considerando a resposta fisiológica dos equinos ao esforço físico.

### 2.4 Análise do pH fecal

A medição do pH fecal ocorreu em todas as fases de coleta com uso de pHmetro de bancada. Para a análise, 30 g de fezes frescas foram diluídas em 30 mL de água ultrapura tipo I, obtida pelo sistema Milli-Q®.

## 2.5 *Treinamento dos animais*

O treinamento dos equinos foi monitorado para quantificação da carga interna. Assim, a frequência cardíaca (FC) foi medida durante as etapas do treino por meio de um frequencímetro Polar, receptor M430 com transmissor específico Polar H-10, para cavalos (Polar Electro®, Kempele, Finlândia). Tal dispositivo possui taxa de amostragem de 128 Hz e foi recentemente validado especificamente para uso em cavalos (18). O protocolo de treinamento foi distribuído em duas etapas:

### **Etapa 1 (E1): Teste de esforço incremental (TEI)**

Para determinação do limiar individual de lactato, foram submetidos ao teste de esforço incremental (TEI), seguindo protocolo adaptado de (19) e. O teste iniciou-se com fase de aquecimento composta por 3 minutos de trote a 1,5 m/s, seguida por 2 minutos a 3 m/s com inclinação de 5% da esteira. Após essa etapa, velocidade foi ajustada para 3,5 m/s, sendo progressivamente aumentada em 0,5 m/s a cada 2 minutos, até atingir 10 m/s. Entre os estágios de velocidade, foi estabelecido intervalo de recuperação ativa de 1 minuto a 1,5 m/s. Inclinação da esteira permaneceu fixa em 5% durante toda a avaliação. Término do TEI ocorreu ao atingir frequência cardíaca de 200 bpm ou ao completar o último estágio de velocidade. Ao final de cada estágio, foram coletadas amostras sanguíneas para posterior análise da concentração de [La<sup>-</sup>]. Após a conclusão do protocolo, realizavam recuperação ativa a 1,5 m/s por 5 minutos, sem inclinação na esteira.

### **Etapa 2 (E2): Teste de máxima fase estável do lactato (MFEL)**

Após determinação do limiar individual de lactato e da respectiva velocidade no TEI, os animais foram submetidos ao protocolo de MFEL. O procedimento consistiu em sessões de exercício contínuo em esteira, com intervalo de recuperação de 48 horas entre as sessões. Número de sessões variou entre três e quatro, conforme resposta individual. Cada sessão iniciou-se com 5 minutos de aquecimento a 2 m/s, seguidos por 25 minutos de corrida contínua em velocidade constante, com inclinação fixa de 5%. Velocidade inicial foi estabelecida com base no limiar de lactato identificado no IET. Para as sessões seguintes, ajustes foram aplicados em acréscimos ou reduções de 0,3, 0,5 ou 1 m/s, conforme variação na concentração de [La<sup>-</sup>], até que fosse atingido o MFEL. Amostras sanguíneas foram coletadas para monitoramento da concentração de [La<sup>-</sup>]. O MFEL foi caracterizado como a intensidade em que a velocidade aplicada não provocou aumento superior a 1 mM na concentração de [La<sup>-</sup>] entre 10 e 30 minutos de exercício contínuo (20). Após atingir a máxima fase estável do lactato, realizaram exercícios complementares de 10 minutos para manutenção do condicionamento, até que todos os integrantes completassem o protocolo.

## *2.6 Extração de DNA e sequenciamento*

A extração de DNA foi realizada a partir de 250 mg de amostras fecais, utilizando o kit Power Fecal Pro DNA Kit (QIAGEN), conforme as instruções do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), submetido a uma corrente de 80 V por cerca de 2 horas. A quantificação do DNA foi realizada com o Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), utilizando o Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen®), seguindo as orientações do fabricante. A região V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada por PCR utilizando primers específicos: 515F: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' e 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (19). Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram purificados a partir de gel de agarose 2% (p/v), utilizando o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research, Irvine, CA). Em seguida, as bibliotecas foram preparadas com o Kit Nextera XT Index v2 (Illumina), quantificadas e misturadas em concentrações equimolares, submetidas ao sequenciamento. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq, utilizando o kit MiSeq® v2 (300 ciclos) e a configuração de leitura pareada (2×150 bp). O sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitou a obtenção de dados detalhados sobre a composição microbiana, fornecendo uma base robusta para análises taxonômicas e funcionais da microbiota intestinal dos equinos analisados.

## *2.7 Bioinformática e análises estatísticas*

Caracterização da microbiota intestinal ao longo do treinamento foi realizada a partir de 124 amostras fecais, analisadas no software QIIME2 versão 2023.7 (21). Sequências correspondentes aos primers foram verificadas com USEARCH11 (22) e removidas no QIIME2 por meio do cutadapt. O processamento das sequências incluiu filtragem das leituras, remoção de quimeras e pareamento por meio do plug-in DADA2. Classificação taxonômica das ASVs foi realizada com o banco de dados Silva 138.1, considerando identidade de 99% (23,24). Para garantir maior precisão, ASVs detectadas em apenas uma amostra, assim como aquelas associadas a cloroplastos ou mitocôndrias, foram eliminadas. Para análise da diversidade alfa, foram utilizadas as métricas Observed ASVs e Índice de Shannon. Diversidade beta foi calculada com o índice de Bray-Curtis e visualizada por PCoA. Avaliação estatística das diferenças entre os testes foi realizada por PERMANOVA, utilizando a plataforma MicrobiomeAnalyst (25,26). Os gráficos foram gerados usando o pacote ggplot2 no RStudio. A análise da abundância relativa concentrou-se nos filos, famílias e gêneros mais prevalentes (>1%). As médias e os desvios padrão foram calculados, e a comparação entre os testes foi realizada no software SAS®, utilizando o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos e

ANOVA (teste F) quando aplicável, considerando os valores de p para a significância estatística. Todas as análises foram realizadas considerando um nível de significância de 5%.

### 3. Resultados

#### 3.1.1 Teste de esforço incremental (TEI) ao longo do tempo

A abundância relativa dos filos antes e após o teste de esforço incremental (TEI) foi analisada nos tempos IET\_Start (0h), IET\_24h e IET\_48h (Figura 1). Firmicutes e Bacteroidota foram os grupos predominantes em todas as condições, enquanto filos menos representativos, como Actinobacteriota, Spirochaetota e Verrucomicrobiota, não tiveram padrão de resposta. Os valores apresentados na indicam que não houve variação estatística entre os tempos analisados (Tabela 1,  $p > 0,05$ ). As famílias mais abundantes no IET (0h, 24h e 48h) foram Lachnospiraceae, WCHB1-41, Oscillospiraceae e Prevotellaceae, mantendo-as proporções ao longo do período analisado (Figura 2). Essas famílias pertencem aos filos Firmicutes (Lachnospiraceae, Oscillospiraceae) e Bacteroidota (Prevotellaceae) induzem fermentação de fibras e a digestão de polissacarídeos complexos. Em adição outras famílias do Filo Firmicutes, Acidaminococcaceae ( $p = 0,0228$ ), Anaerovoracaceae ( $p = 0,0415$ ) e Erysipelotrichaceae ( $p = 0,0343$ ) variaram abundância nos intervalos de tempo (Tabela 2) com a Acidaminococcaceae e Anaerovoracaceae aumentando em 24h e reduzindo em 48h. enquanto a Erysipelotrichaceae exibiu redução em 24h e aumentando no tempo 48h. Famílias menos abundantes, como Bacteroidales\_UCG\_001, Akkermansiaceae, Spirochaetaceae e Methanobacteriaceae, não apresentaram variações importantes. Os gêneros microbianos apresentaram composição relativamente estável ao longo dos tempos IET (0h, 24h e 48h) (Figura 3). WCHB1-41, Lachnospiraceae, Rikenellaceae, Christensenellaceae e Oscillospiraceae predominaram, porém, sem alterações significativas. De forma análoga gêneros menos abundantes, como Planococcaceae, Eubacterium Oscillospiraceae\_UCG\_002 e Prevotellaceae\_UCG\_004 oscilaram sem uma tendência definida. Observou-se que o Phascolarctobacterium e Planococcaceae apresentaram, respectivamente, aumento ( $p = 0,0228$ ) e ( $p = 0,0124$ ) (Tabela 3) após 24h para depois reduzir em 48h. O Planococcaceae teve redução progressiva ao longo do tempo.

Para a métrica Observed ASVs (Figura 4), a mediana inicial foi próxima de 900 ASVs, com ampla variação entre os indivíduos. Após 24 horas, mediana aumentou e observando-se maior dispersão dos valores. Em IET\_48h, observou-se uma redução na riqueza microbiana em relação ao período anterior, com valores mais uniformes. O Índice de Shannon (Figura 5) mostrou tendência semelhante, com mediana próxima de 5,8 antes do teste, leve aumento em IET\_24h e posterior redução em IET\_48h. A dispersão dos valores foi maior em IET\_24h, sugerindo variabilidade individual. Os testes de Kruskal-Wallis não indicaram diferenças estatisticamente significativas entre

os tempos para Observed ASVs ( $p = 0,10889$ ) nem para o Índice de Shannon ( $p = 0,36931$ ). A análise de beta diversidade pela métrica de Bray-Curtis (Figura 6) avaliou a dissimilaridade da composição microbiana antes (IET\_Start), 24 horas após (IET\_24h) e 48 horas após (IET\_48h) o teste de esforço incremental (TEI). Os testes apresentaram ampla dispersão e sobreposição, sem uma separação clara entre os tempos avaliados. O teste PERMANOVA não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os estímulos ( $p = 0,982$ ).

### 3.1.2 Teste de esforço incremental (TEI) vs máxima fase estável do lactato (MFEL)

Os Filos Firmicutes e Bacteroidota foram predominantes nos tempos T0, T24 e T48 em ambos os tratamentos (TEI e MFEL) ao longo do tempo (Figura 1). No tempo T0H, as abundâncias relativas não foram alteradas para a maioria dos filios ( $p > 0,05$ , Tabela 4). A única exceção foi a categoria Others ( $p = 0,0029$ ), que apresentou maior proporção no MFEL. Essa categoria agrupa filios menos representativos ou pouco classificados. Após 24 horas, a composição da microbiota manteve um padrão estável, com poucas variações entre os tratamentos. Os filios Euryarchaeota ( $p = 0,0385$ ) e Others ( $p = 0,0442$ ) apresentaram diferenças estatísticas, com maior abundância de Others no IET e aumento de Euryarchaeota no MLSS-T24. Os demais filios não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ , Tabela 4). No T48, algumas diferenças foram observadas entre os tratamentos. Os filios Actinobacteriota ( $p = 0,0244$ ) e Bacteroidota ( $p = 0,0395$ ) apresentaram variações entre os estímulos, com menor abundância de Actinobacteriota e maior presença de Bacteroidota no MLSS-T48. Euryarchaeota ( $p = 0,0034$ ) e Fibrobacterota ( $p = 0,0206$ ) também apresentaram diferenças, com maior proporção no MLSS-T48. Os demais filios não apresentaram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ , Tabela 4). A microbiota apresentou variações pontuais entre os tratamentos IET e MLSS nos tempos T0, T24 e T48, na maioria das famílias, com estabilidade ao longo das 48 horas após os exercícios agudos (Figura 2). No tempo T0, três famílias diferiram entre os tratamentos (Tabela 5). Acidaminococcaceae ( $p = 0,0003$ ) e Erysipelotrichaceae ( $p = 0,0070$ ) apresentaram maior abundância no MLSS\_Start, enquanto Anaerovoracaceae ( $p = 0,0213$ ) predominou no IET\_Start. As demais famílias mantiveram proporções semelhantes ( $p > 0,05$ ). Após 24 horas, as diferenças foram observadas em Eggerthellaceae ( $p = 0,0473$ ) e Methanobacteriaceae ( $p = 0,0385$ ), mais abundantes no MLSS-T24, enquanto F082 ( $p = 0,0334$ ) predominou no IET24 (Tabela 5). As demais famílias permaneceram estáveis entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). No tempo T48, quatro famílias apresentaram diferenças significativas (Tabela 5), todas com maior abundância no MLSS-T48: Acidaminococcaceae ( $p = 0,0010$ ), Eggerthellaceae ( $p = 0,0159$ ), Methanobacteriaceae ( $p = 0,0034$ ) e p\_251\_o5 ( $p = 0,0366$ ). No nível de gênero, algumas alterações foram observadas entre os tratamentos IET e MLSS, com variações específicas ao longo do tempo, enquanto a composição geral

manteve-se relativamente estável nas 48 horas após os testes físicos (Figura 3, Tabela 6). No tempo T0, Oscillospiraceae\_NK4A214\_group ( $p = 0,0015$ ) foi mais abundante no IET\_Start, enquanto Phascolarctobacterium ( $p = 0,0003$ ), Marvinbryantia ( $p = 0,0479$ ) e Prevotellaceae\_UCG\_001 ( $p = 0,0055$ ) apresentaram maior abundância no MLSS\_Start (Tabela Suplementar S11). Após 24 horas, os gêneros F082 ( $p = 0,0334$ ) e Methanobrevibacter ( $p = 0,0385$ ) apresentaram maior abundância no IET24, enquanto Eggerthellaceae\_uncultured ( $p = 0,0109$ ) predominou no MLSS-T24 (Tabela 6). No tempo T48 após, p\_251\_o5 ( $p = 0,0366$ ) e Planococcaceae ( $p = 0,0267$ ) foram mais abundantes no IET48, enquanto Phascolarctobacterium ( $p = 0,001$ ), Eggerthellaceae\_uncultured ( $p = 0,0084$ ) e Methanobrevibacter ( $p = 0,0034$ ) predominaram no MLSS-T48 (Tabela 6)

As métricas de alfa diversidade foram avaliadas para comparar a riqueza e a diversidade microbiana nos protocolos de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato (MLSS). Na métrica Observed ASVs (Figura 7), a riqueza microbiana em IET\_Start apresentou valores inferiores a 900 ASVs, com um leve aumento em IET\_24h, seguido de redução em IET\_48h. A dispersão dos valores foi maior em IET\_24h, indicando maior variação entre os indivíduos. No MLSS, a riqueza inicial (MLSS\_Start) foi superior à IET\_Start, aumentando em MLSS\_24h, com maior dispersão dos dados. Em MLSS\_48h, houve uma leve redução, mas os valores permaneceram superiores aos do início do protocolo. O teste de Kruskal-Wallis indicou diferenças estatisticamente significativas entre os testes ( $p = 0.0021$ , Figura 7). As comparações múltiplas (Tabela 7) mostraram que MLSS\_24h apresentou maior riqueza microbiana em relação a IET\_48h, IET\_Start e MLSS\_Start ( $p_{adj} < 0.05$ ). No Índice de Shannon (Figura 8), a diversidade microbiana no IET permaneceu relativamente estável ao longo do tempo, com valores próximos a 5.8. No MLSS, a diversidade inicial foi ligeiramente inferior, aumentando em MLSS\_24h, com maior dispersão dos valores, e mantendo-se relativamente estável em MLSS\_48h ( $p = 0.0311$ , Figura 8, Tabela 7). Apesar disso, MLSS\_24h apresentou uma tendência de maior diversidade em relação a MLSS\_Start e ao IET. A avaliação da beta diversidade pela métrica de Bray-Curtis (Figura 9) comparou a composição microbiana do teste de esforço incremental (IET\_Start, IET\_24h, IET\_48h) e da máxima fase estável do lactato (MLSS\_Start, MLSS\_24h, MLSS\_48h). Os pontos referentes a cada estímulo apresentaram ampla distribuição, sem indicação de um agrupamento específico. O teste PERMANOVA (Figura 9) não identificou diferenças estatisticamente significativas entre os testes ( $p = 0.735$ ).

### 3.1.3 Lactato estável vs. Excedido

Os tratamentos analisados representam diferentes condições do teste de máxima fase estável do lactato (MFEL): MLSS\_Start ocorre antes da sessão, MLSS corresponde às sessões onde o lactato permaneceu estável e MLSSLACEX às sessões onde o limiar foi excedido (Figura 10). O filo

Bacteroidota ( $p = 0,0007$ ) foi mais abundante no MLSS\_Start em comparação com MLSSLACEX e MLSS. Euryarchaeota ( $p = 0,0037$ ) apresentou maior abundância no MLSS e MLSSLACEX, enquanto MLSS\_Start teve valores significativamente menores. Fibrobacterota ( $p = 0,0029$ ) foi menos abundante no MLSS\_Start quando comparado a MLSSLACEX e MLSS (Tabela 8). A distribuição das famílias mais abundantes nos diferentes tratamentos é apresentada (Figura 11). Acidaminococcaceae ( $p = 0,0025$ ) apresentou maior abundância no MLSS e MLSSLACEX, com menor valor em MLSS\_Start (Tabela 9). Eggerthellaceae ( $p = 0,0363$ ) e Methanobacteriaceae ( $p = 0,0037$ ) foram mais abundantes no MLSS, seguidas por MLSSLACEX, enquanto MLSS\_Start apresentou os menores valores (Tabela 9). Prevotellaceae ( $p = 0,0210$ ) foi menos abundante no MLSS, aumentando nos demais tratamentos. WCHB1\_41 ( $p = 0,0257$ ) apresentou um padrão semelhante, com menor abundância no MLSS em relação a MLSSLACEX e MLSS\_Start (Tabela 9). p\_251\_o5 ( $p = 0,0493$ ) também demonstrou variação significativa, sendo menos abundante no MLSS\_Start. Moraxellaceae ( $p = 0,0403$ ) mostrou menor abundância em MLSSLACEX comparado aos outros (Tabela 9). A composição dos gêneros mais abundantes nos diferentes tratamentos evidencia mudanças pontuais na microbiota (Figura 12). As variações estatísticas observadas estão detalhadas (Tabela 10). Phascolarctobacterium ( $p = 0,0022$ ) teve maior abundância em MLSS e MLSSLACEX, enquanto MLSS\_Start apresentou valores inferiores. Eggerthellaceae\_uncultured ( $p = 0,0086$ ) seguiu um comportamento semelhante, com menor abundância em MLSS\_Start (Tabela 10). Methanobrevibacter ( $p = 0,0037$ ) esteve mais representado em MLSS, com redução progressiva nos outros tratamentos. Planococcaceae ( $p = 0,0080$ ) demonstrou menor abundância em MLSS\_Start, enquanto MLSS e MLSSLACEX mantiveram valores mais próximos. WCHB1\_41 ( $p = 0,0257$ ) teve maior expressão em MLSSLACEX, seguido por MLSS\_Start, e menor presença em MLSS (Tabela 10).

A riqueza e a diversidade microbiana foram avaliadas antes (MLSS\_Start), durante as sessões onde o lactato permaneceu estável (MLSS) e nas sessões onde o lactato excedeu o limiar (MLSSLACEX). Na métrica Observed ASVs (Figura 13), a mediana inicial foi inferior a 900 ASVs, com menor dispersão dos valores. Durante MLSS, observou-se um aumento na riqueza microbiana, acompanhado de maior variação entre os indivíduos. Esse padrão foi mantido em MLSSLACEX, onde os valores permaneceram elevados e amplamente distribuídos. O teste de Kruskal-Wallis indicou diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,00678$ , Figura 13). As comparações múltiplas (Tabela 11) mostraram que MLSS\_Start apresentou riqueza microbiana inferior em relação a MLSS ( $p.adj = 0,0028$ ) e MLSSLACEX ( $p.adj = 0,0163$ ), enquanto não houve diferença significativa entre MLSS e MLSSLACEX ( $p.adj = 0,3815$ ). Já na métrica Índice de Shannon (Figura 14), a mediana inicial foi inferior a 5.8, com menor dispersão dos valores. Durante MLSS, houve um leve aumento na diversidade microbiana, acompanhado de maior variabilidade entre os indivíduos. Esse padrão foi

mantido em MLSSLACEX, onde os valores permaneceram elevados e amplamente distribuídos. No entanto, o teste de Kruskal-Wallis não indicou diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,0619$ , Figura 14). A análise de beta diversidade pela métrica de Bray-Curtis (Figura 15) avaliou a dissimilaridade da composição microbiana entre MLSS\_Start (antes da máxima fase estável do lactato), MLSS (sessões onde o lactato permaneceu estável) e MLSSLACEX (sessões onde o lactato excedeu o limiar). A distribuição dos pontos sugere uma leve separação entre as condições avaliadas. O teste PERMANOVA (Figura 15) indicou diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,007$ ). As comparações múltiplas (Tabela 12) mostram que MLSS diferiu significativamente de MLSS\_Start ( $p_{adj} = 0,027$ ) e de MLSSLACEX ( $p_{adj} = 0,0495$ ). No entanto, MLSSLACEX e MLSS\_Start não apresentaram diferenças estatísticas ( $p_{adj} = 0,079$ ).

#### *3.1.4 Dinâmica do lactato durante o MFEL*

A resposta da lactatemia durante a sessão da MFEL é apresentada na Figura 17. Os valores médios de lactato antes do exercício foram semelhantes. Durante o aquecimento, ocorreu um leve aumento na lactatemia em todas as condições. Nos primeiros minutos do exercício contínuo, < MLSS e MLSS mantiveram concentrações estáveis de lactato, enquanto > MLSS apresentou aumento progressivo ao longo do tempo. Ao final de 30 minutos, > MLSS atingiu valores de lactato mais elevados, enquanto MLSS manteve níveis estáveis e < MLSS apresentou os menores valores (Figura 17).

#### *3.1.5 pH fecal no teste de esforço incremental e máxima fase estável do lactato*

A análise do pH fecal foi realizada em diferentes momentos dos estímulos TEI (Teste de Esforço Incremental) e MFEL (Máxima Fase Estável do Lactato) (Figura 16). No TEI, IET-T0 (antes do TEI) apresentou um pH médio de  $7,10 \pm 0,28$ , enquanto no IET-T24 (24 horas após o TEI) o pH foi  $6,53 \pm 0,28$ , e em IET-48H (48 horas após o TEI) foi  $6,45 \pm 0,31$  (Figura 16). A análise estatística revelou que IET-T0 e IET-T24 não apresentaram diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ), mas houve uma redução significativa no pH de IET-T0 para IET-48H ( $p < 0,05$ ), conforme indicado na Tabela 13. No MFEL, MLSS-T0 (antes do MFEL) apresentou um pH médio de  $6,94 \pm 0,37$ , com um pequeno aumento para MLSS-T24 (24 horas após o MFEL), com pH de  $7,02 \pm 0,29$ , e para MLSS-T48 (48 horas após o MFEL), com pH de  $7,08 \pm 0,30$  (Figura 16). No entanto, não houve diferença significativa entre os tempos analisados (MLSS-T0, MLSS-T24 e MLSS-T48), com  $p \geq 0,05$ , como mostrado na Tabela 13.

#### 4. Discussão

Os Filos Firmicutes e Bacteroidetes predominaram o que está de acordo com estudos anteriores (27). No entanto, os tipos de testes induziram respostas distintas da microbiota intestinal. No teste de esforço incremental (TEI), a abundância relativa de Firmicutes aumentou nas primeiras 24 horas e diminuiu nas 48 horas, todavia o Filo Bacteroidetes apresentou comportamento inverso. Esse padrão de resposta pode indicar que o exercício modifica transitoriamente a microbiota, possivelmente relacionada ao metabolismo de substratos energéticos e à regulação da homeostase intestinal (7). Sabe-se que o Filo Firmicutes degrada fibras e produz ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) e, por sua vez os Bacteroides digere polissacarídeos complexos (28). O aumento transitório de Firmicutes pode indicar ajuste metabólico para otimizar a absorção de energia durante o período pós-exercício, conforme observado em equinos atletas submetidos a treinamento regular (29).

Na máxima fase estável do lactato (MFEL), a microbiota manteve maior estabilidade ao longo do teste em alterações relevantes na abundância relativa dos dois fillos dominantes. Essa resposta pode indicar que a intensidade moderada e constante do exercício nesse protocolo não impôs demanda metabólica abrupta suficiente para induzir mudanças expressivas na microbiota intestinal. No entanto, observou-se que MLSSLACEX apresentou maior variação na composição microbiana, especialmente nas primeiras 24 horas após, provavelmente, devido ao aumento do estresse metabólico em exercício de intensidade que supera a capacidade de regulação do lactato (7). A variação observada nos fillos Proteobacteria e Spirochaetes no MLSSLACEX reforça a hipótese de que o treinamento em intensidades superiores ao limiar de lactato pode modular adaptação microbiana precoce, conforme relatado em equinos submetidos a esforços intensos(28). A análise da lactatemia durante o MFEL revelou que os valores de lactato permaneceram estáveis quando a intensidade do exercício foi mantida próxima ao MLSS, enquanto aumentaram progressivamente quando o limiar foi excedido (10). Esse comportamento indica que o MFEL representa um ponto de equilíbrio entre a produção e a remoção de lactato, permitindo a manutenção do exercício por períodos prolongados sem acúmulo significativo desse metabólito (10). Em contrapartida, quando a intensidade ultrapassa o MLSS, a produção de lactato excede sua remoção, levando ao aumento progressivo da lactatemia e à consequente fadiga (10). A estabilidade da microbiota intestinal observada no MLSS pode estar relacionada à manutenção da homeostase metabólica nesse estado, uma vez que a regulação do lactato influencia diretamente o metabolismo energético e a resposta fisiológica ao exercício (12). Por outro lado, no MLSSLACEX, onde a lactatemia aumentou progressivamente ao longo da sessão, a microbiota apresentou maior variação, sugerindo que o estresse metabólico imposto pelo acúmulo de lactato pode impactar a composição microbiana (12).

A análise da diversidade alfa repercutiu o aumento na riqueza microbiana, no TEI após 24 horas do exercício, seguido de leve estabilização em 48 horas (Observed ASVs). A riqueza e

uniformidade das espécies (Índice de Shannon) refletiu essa tendência, sugerindo que o esforço incremental pode promover enriquecimento transitório de grupos bacterianos potencialmente benéficos (3). A diversidade alfa permaneceu relativamente estável, no MFEL, reforçando a ideia de que o exercício em estado estacionário pouco interfere na microbiota (7,30). No entanto, que a riqueza microbiana menor no MLSSLACEX em relação ao MLSS, sugere que ultrapassar o limiar de lactato pode comprometer temporariamente a diversidade microbiana intestinal devido ao estresse fisiológico e inflamatório (7). A diversidade beta no TEI, apresentou oscilações retornando ao basal após 48 horas, o que pode indicar resiliência microbiana. Por sua vez, o MFEL, a beta diversidade manteve-se estável ao longo do tempo, sugerindo que o exercício moderado e constante não induziu alterações significativas na composição da microbiota. No entanto, no MLSSLACEX, a beta diversidade mostrou maior dissimilaridade em relação ao MLSS, indicando que o exercício acima do limiar de lactato pode modificar a microbiota intestinal, possivelmente devido à ativação de mecanismos fisiológicos relacionados ao metabolismo anaeróbico e à resposta inflamatória sistêmica (11). As abundâncias relativas de Lachnospiraceae e Ruminococcaceae aumentaram, após 24 horas, no TEI, recuperando-se em 48 horas uma vez que essas famílias degradam fibras e produzem SCFAs sugerindo que o exercício pode estimular a atividade fermentativa intestinal no curto prazo (7). Já a família Prevotellaceae apresentou leve declínio após o exercício, possivelmente indicando menor demanda metabólica por carboidratos não estruturais (31). O aumento, embora transitórios, dos gêneros *Treponema* e *Methanobrevibacter* sugere que esses gêneros podem participar da adaptação intestinal, ao esforço físico, possivelmente por meio da regulação do metabolismo do metano e da degradação de polissacarídeos estruturais (30). No MLSSLACEX, *Treponema* apresentou redução acentuada, sugerindo que o exercício acima do limiar de lactato pode impactar negativamente na fermentação, essencial para a homeostase intestinal (7).

Houve redução do pH fecal após 48 horas do exercício, no TEI ( $p < 0,05$ ). A queda no pH pode ser atribuída à fermentação bacteriana de substratos energéticos, especialmente pelos filos Firmicutes e Bacteroidota por meio da degradação de fibras e produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), entre eles o acetato, propionato e butirato (32). Esse padrão de redução do pH após o exercício corrobora os achados de Almeida (2016)(6), que relataram diminuição do pH fecal em potras submetidas a exercício incremental. Adicionalmente, subsequente ao teste máxima fase estável do lactato (MLSS) o pH manteve-se estável ( $p \geq 0,05$ ) sugerindo que o exercício de intensidade moderada não altera o pH fecal. Isso corrobora a observação de que a microbiota intestinal nesse estímulo manteve estável, nos filos dominantes e com menor alteração microbiana quando comparado ao MLSSLACEX. A estabilidade do pH e da microbiota no MLSS parece indicar que o exercício intensidade constante não causa estresse metabólico suficiente para alterar o pH fecal, ao contrário

do que foi observado no MLSSLACEX, onde houve uma maior variação na microbiota e maior dissimilaridade na composição microbiana.

No entanto, algumas limitações devem ser consideradas. O período de observação de 48 horas pode não ter sido suficiente para detectar possíveis efeitos de longo prazo na microbiota intestinal.

## 5. Conclusão

Os resultados indicam que exercícios intensos e agudos modulam a microbiota intestinal de equinos de forma distinta, dependendo da intensidade e duração do esforço. O teste de esforço incremental (TEI) causou alterações transitórias em algumas famílias e gêneros, enquanto o teste de máxima fase estável do lactato (MFEL) resultou em mudanças mais evidentes, especialmente após 48 horas, sugerindo adaptação metabólica à demanda energética. A diversidade microbiana foi modulada de maneira transitória, sem alteração na composição global, mas com impacto em táxons específicos. O pH fecal apresentou redução após o TEI, refletindo uma adaptação microbiana temporária, enquanto se manteve estável no MFEL, indicando que a intensidade moderada não provocou mudanças abruptas no ambiente intestinal. Esses resultados sugerem que a intensidade do exercício influencia diretamente a microbiota intestinal, e que o controle da intensidade e estratégias nutricionais podem otimizar os benefícios do exercício e minimizar impactos adversos.

## 6. Referências

1. Fernandes KA, Kittelmann S, Rogers CW, Gee EK, Bolwell CF, Bermingham EN, Thomas DG. Faecal microbiota of forage-fed horses in new zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. *PLoS One* (2014) 9: doi: 10.1371/journal.pone.0112846
2. Garber A, Hastie P, Murray JA. Factors Influencing Equine Gut Microbiota: Current Knowledge. *J Equine Vet Sci* (2020) 88: doi: 10.1016/j.jevs.2020.102943
3. Jullian V, Grimm P. The Impact of Diet on the Hindgut Microbiome. *J Equine Vet Sci* (2017) 52:23–28. doi: 10.1016/j.jevs.2017.03.002
4. Theelen MJP, Luiken REC, Wagenaar JA, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Rossen JWA, Zomer AL. The equine faecal microbiota of healthy horses and ponies in the netherlands: Impact of host and environmental factors. *Animals* (2021) 11: doi: 10.3390/ani11061762
5. Allen JM, Berg Miller ME, Pence BD, Whitlock K, Nehra V, Gaskins HR, White BA, Fryer JD, Woods JA. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* (2015) 118:1059–1066. doi: 10.1152/jappphysiol.01077.2014.-We
6. Almeida MLM, Feringer WH, Carvalho JRG, Rodrigues IM, Jordão LR, Fonseca MG, De Rezende ASC, De Queiroz Neto A, Weese JS, Da Costa MC, et al. Intense exercise and aerobic

conditioning associated with chromium or L-carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. *PLoS One* (2016) 11: doi: 10.1371/journal.pone.0167108

7. Górniak W, Cholewińska P, Szeligowska N, Wołoszyńska M, Soroko M, Czyż K. Effect of intense exercise on the level of bacteroidetes and firmicutes phyla in the digestive system of thoroughbred racehorses. *Animals* (2021) 11:1–9. doi: 10.3390/ANI11020290

8. Johnson PJ, Wiedmeyer CE, LaCarrubba A, Messer NT, Dingfelder HA, Cogswell AM, Amorim JRR, Ganjam VK. Clinical Assessment of Blood Glucose Homeostasis in Horses: Comparison of a Continuous Glucose Monitoring System with a Combined Intravenous Glucose and Insulin Test Protocol. *J Vet Intern Med* (2011) 25:162–165. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0643.x

9. Heck H, Mader A, Hess G, Mücke S, Müller R, Hollmann W. Justification of the 4-mmol/l Lactate Threshold. *Int J Sports Med* (1985) 06:117–130. doi: 10.1055/s-2008-1025824

10. Heck H, Wackerhage H. The origin of the maximal lactate steady state (MLSS). *BMC Sports Sci Med Rehabil* (2024) 16: doi: 10.1186/s13102-024-00827-3

11. Ferraz GC, Sgarbiero T, Carvalho JRG, Almeida MLM, Pereira GT, Funicelli MIG, Pinheiro DG, Restan AZ. Predicting maximal lactate steady state from lactate thresholds determined using methods based on an incremental exercise test in beagle dogs: A study using univariate and multivariate approaches. *Res Vet Sci* (2022) 152:289–299. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.08.020

12. Brooks GA. Lactate as a fulcrum of metabolism. *Redox Biol* (2020) 35: doi: 10.1016/j.redox.2020.101454

13. Ivy JL, Withers RT, Van Handel PJ, Elger DH, Costill DL. Muscle respiratory capacity and fiber type as determinants of the lactate threshold. (1980). 523–527 p. [www.physiology.org/journal/jappl](http://www.physiology.org/journal/jappl)

14. Watanabe T, Kondo S, Kakinoki K, Fukusaki C, Hatta H. Stride-to-stride variability and fluctuations at intensities around lactate threshold in distance runners. *Heliyon* (2023) 9: doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e17437

15. Nagata A, Muro M, Moritani T, Yoshida T. Anaerobic Threshold Determination by Blood Lactate and Myoelectric Signals. (1981). 585–597 p.

16. Milner-Brown HS, Stein RB, Yemm AR. THE ORDERLY RECRUITMENT OF HUMAN MOTOR UNITS DURING VOLUNTARY ISOMETRIC CONTRACTIONS. (1973). 359–370 p.

17. Silvers BL, Leatherwood JL, Bradbery AN, Guy CP, Martinez RE, Much ML, Keshri J, Dass SC, White-Springer SH. 23 Forced exercise on gut microbiota and cytokines in young horses. *J Equine Vet Sci* (2021) 100:103486. doi: 10.1016/J.JEVS.2021.103486
18. Haughan J, Manriquez M, Cohen ND, Robinson MA, de Solis CN. Comparison of novel wearable cardiac monitors to yield accurate exercising ECG and heart rate data in horses. *Comp Exerc Physiol* (2021) 17:457–466. doi: 10.3920/CEP200080
19. Lamprecht ED, Williams CA. Biomarkers of antioxidant status, inflammation, and cartilage metabolism are affected by acute intense exercise but not superoxide dismutase supplementation in horses. *Oxid Med Cell Longev* (2012) doi: 10.1155/2012/920932
20. Ferraz GC, Sgarbiero T, Carvalho JRG, Almeida MLM, Pereira GT, Funicelli MIG, Pinheiro DG, Restan AZ. Predicting maximal lactate steady state from lactate thresholds determined using methods based on an incremental exercise test in beagle dogs: A study using univariate and multivariate approaches. *Res Vet Sci* (2022) 152:289–299. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.08.020
21. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* (2019) 37:852–857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9
22. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* (2010) 26:2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
23. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, Huttley GA, Gregory Caporaso J. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* (2018) 6: doi: 10.1186/s40168-018-0470-z
24. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* (2013) 41: doi: 10.1093/nar/gks1219
25. Lu S, Deng H, Zhou C, Du Z, Guo X, Cheng Y, He X. Enhancement of  $\beta$ -Caryophyllene Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via Synergistic Evolution of  $\beta$ -Caryophyllene Synthase and Engineering the Chassis. *ACS Synth Biol* (2023) 12:1696–1707. doi: 10.1021/acssynbio.3c00024
26. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res* (2017) 45:W180–W188. doi: 10.1093/nar/gkx295

27. Szemplinski KL, Thompson A, Cherry N, Guay K, Smith WB, Brady J, Jones T. Transporting and Exercising Unconditioned Horses: Effects on Microflora Populations. *J Equine Vet Sci* (2020) 90: doi: 10.1016/j.jevs.2020.102988
28. Plancade S, Clark A, Philippe C, Helbling JC, Moisan MP, Esquerré D, Moyec L le, Robert C, Barrey E, Mach N. Unraveling the effects of the gut microbiota composition and function on horse endurance physiology. *Sci Rep* (2019) 9: doi: 10.1038/s41598-019-46118-7
29. Mach N, Lansade L, Bars-Cortina D, Dhorne-Pollet S, Foury A, Moisan MP, Ruet A. Gut microbiota resilience in horse athletes following holidays out to pasture. *Sci Rep* (2021) 11: doi: 10.1038/s41598-021-84497-y
30. Janabis AHD, Biddle AS, Klein D, McKeever KH. Exercise training-induced changes in the gut microbiota of Standardbred racehorses. *Comp Exerc Physiol* (2016) 12:119–130. doi: 10.3920/CEP160015
31. Proudman CJ, Hunter JO, Darby AC, Escalona EE, Batty C, Turner C. Characterisation of the faecal metabolome and microbiome of Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J* (2015) 47:580–586. doi: 10.1111/evj.12324
32. Van den Berg M, Hoskin SO, Rogers CW, Grinberg A. Fecal pH and Microbial Populations in Thoroughbred Horses During Transition from Pasture to Concentrate Feeding. *J Equine Vet Sci* (2013) 33:215–222. doi: 10.1016/J.JEVS.2012.06.004

## 7. Conflito de interesse

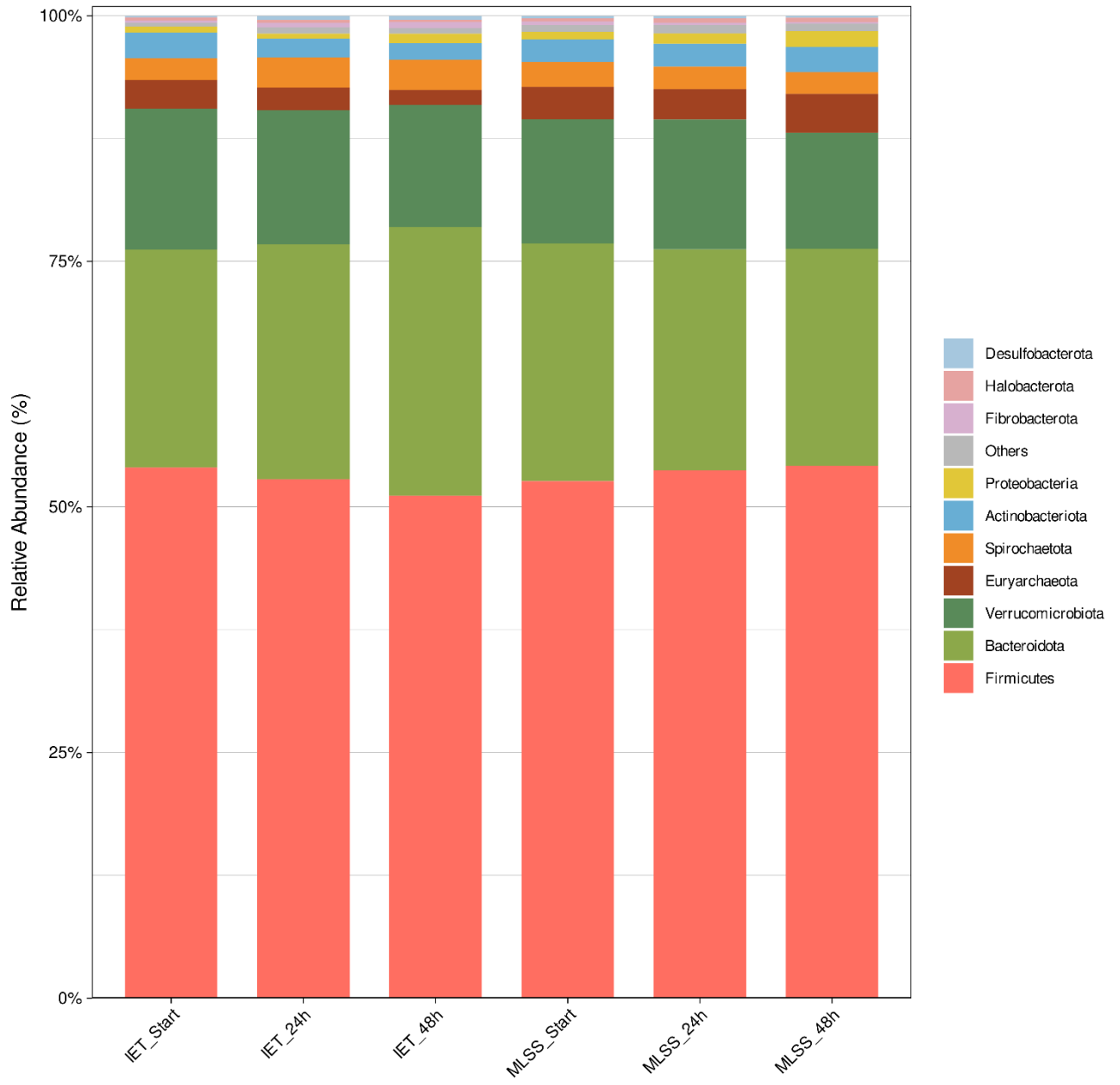
*Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.*

## 8. Financiamento

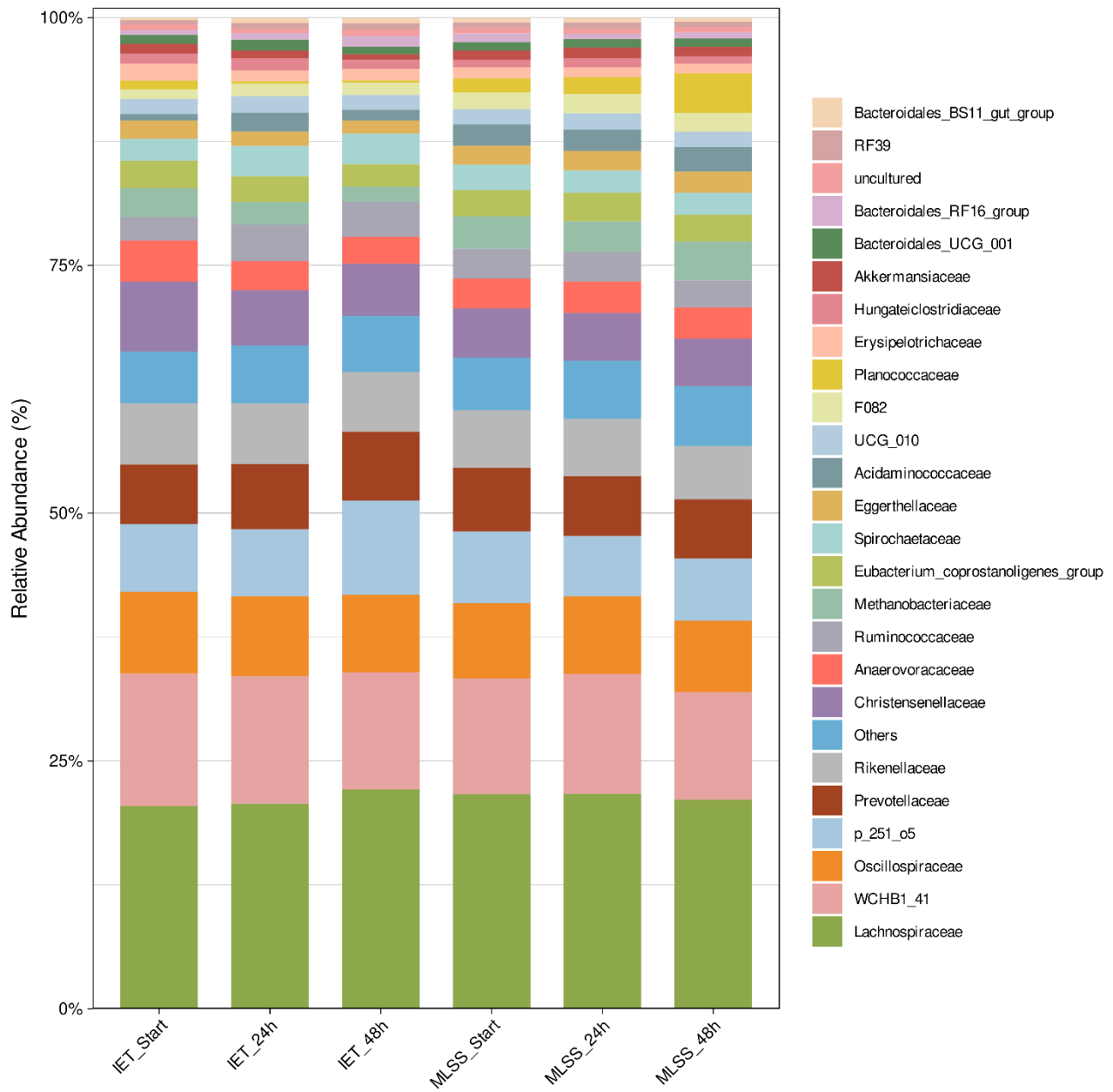
Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2023/10337-4 e Processo 2020/09633-0).

## 9. Figuras

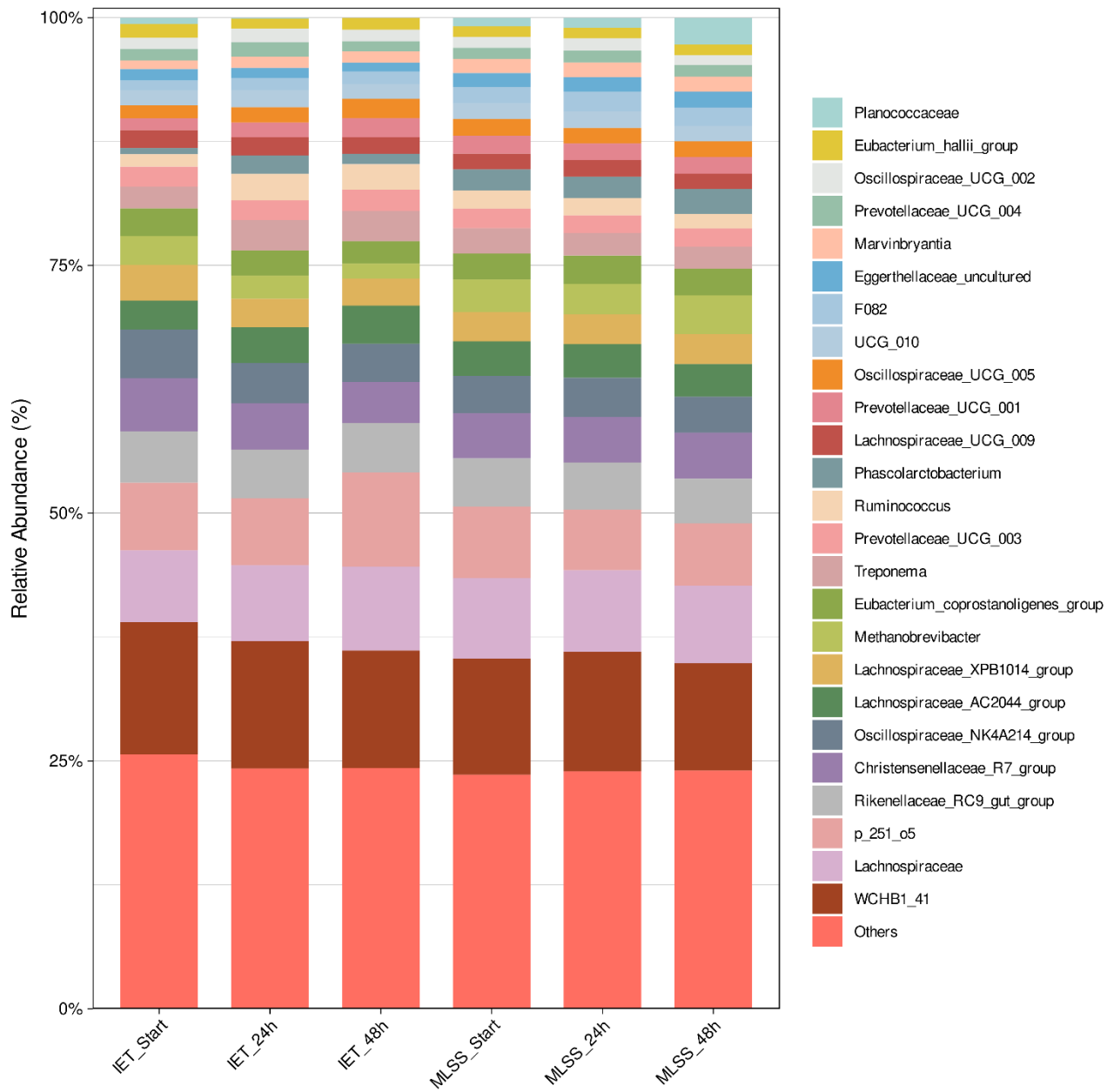
**Figura 1.** Distribuição da abundância relativa dos principais filos bacterianos entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS). O gráfico mostra a variação da composição microbiana intestinal dos equinos.



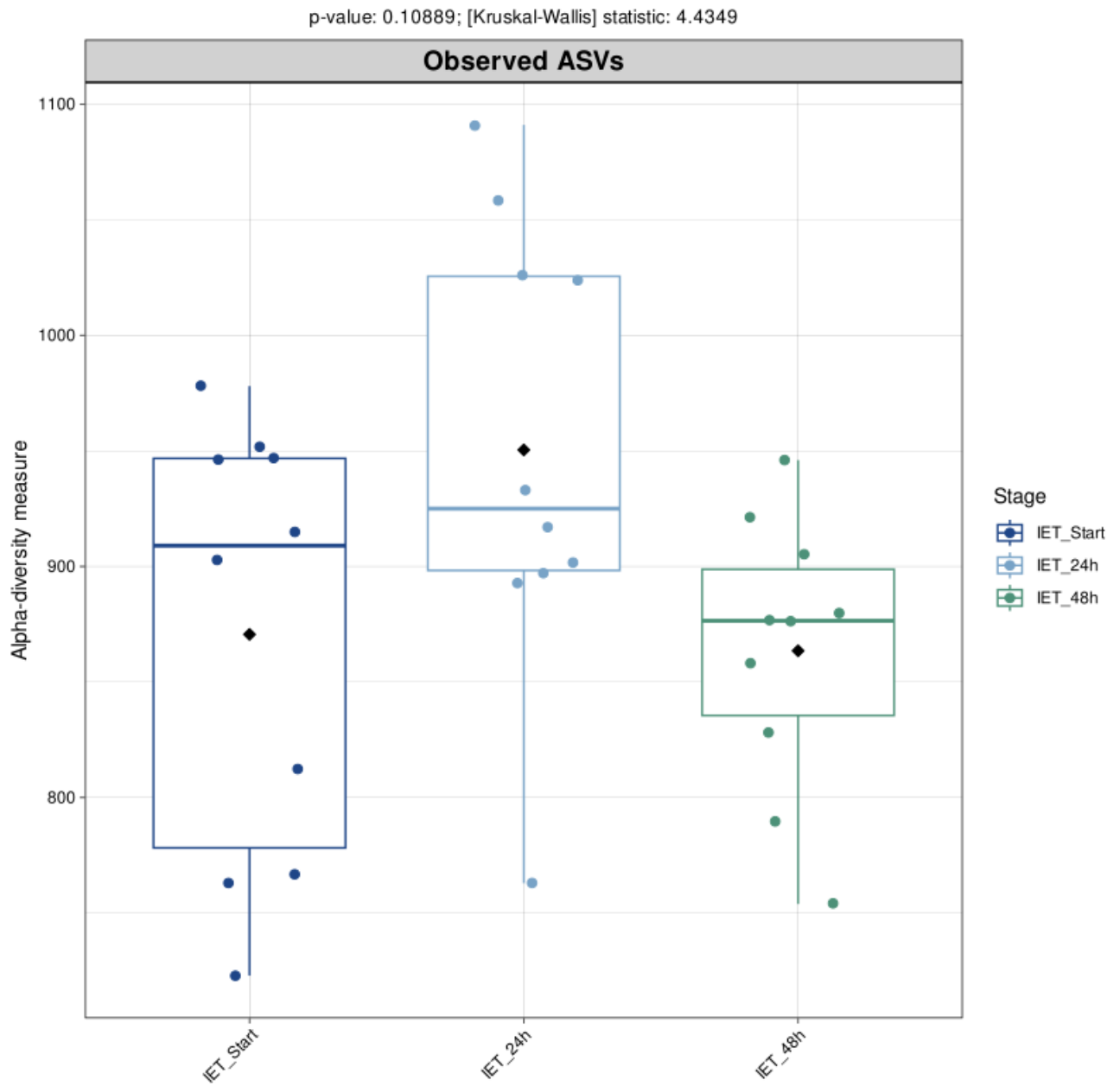
**Figura 2.** Distribuição da abundância relativa das principais famílias bacterianas entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS).



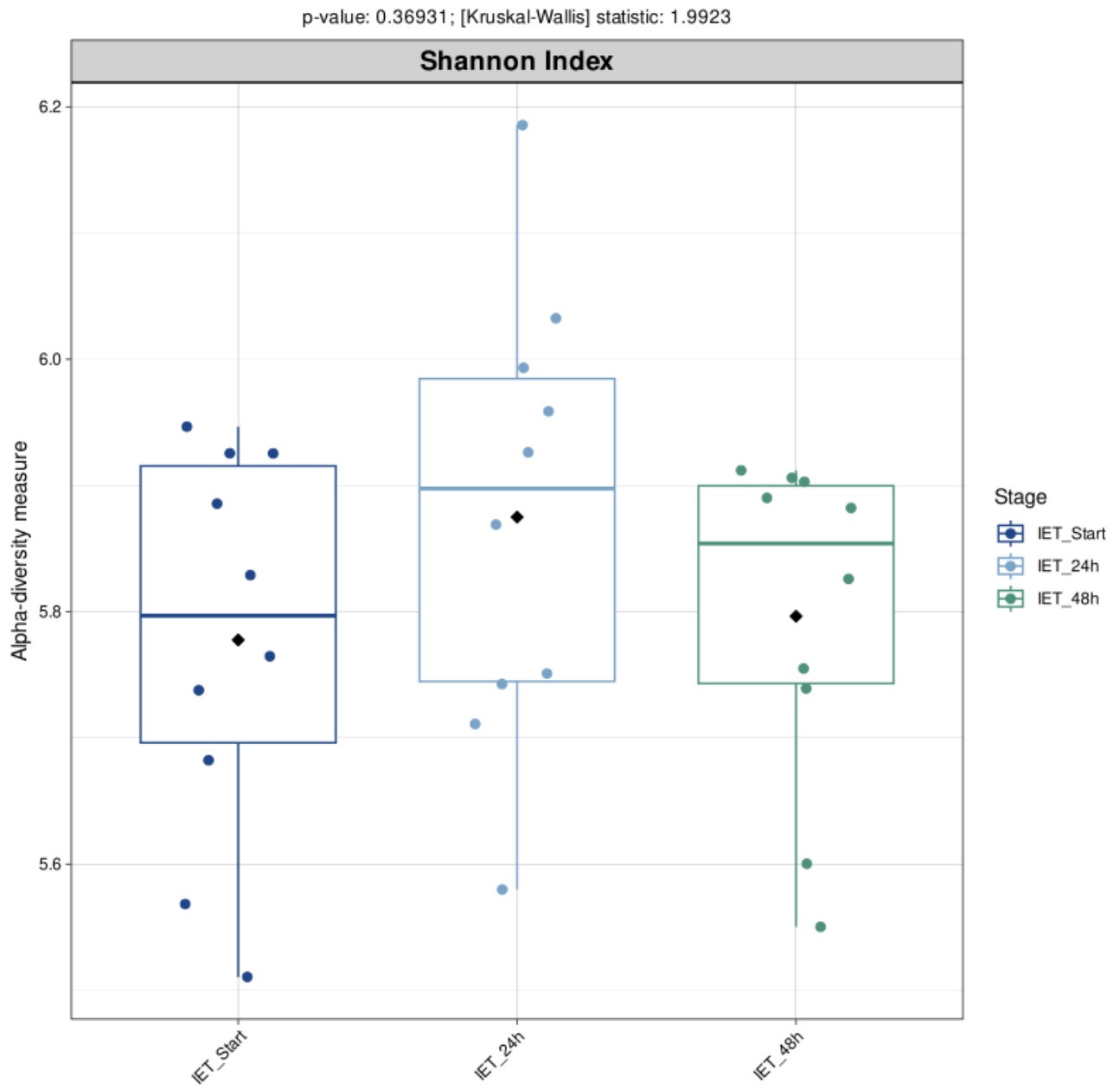
**Figura 3.** Distribuição da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS).



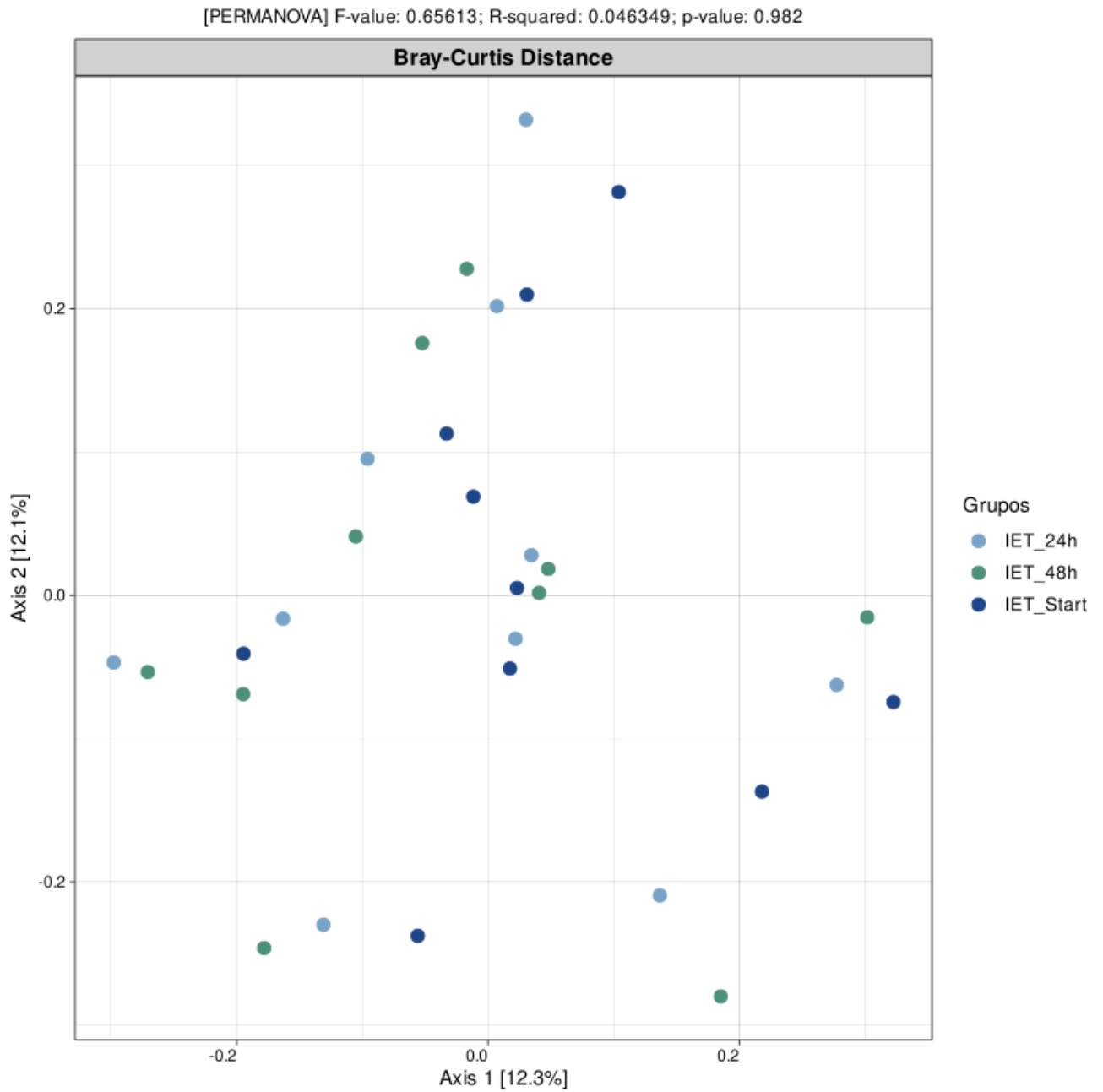
**Figura 4.** Análise de alfa diversidade (Observed ASVs) entre os tempos experimentais do teste de esforço incremental em cavalos (IET\_Start, IET\_24h, IET\_48h).



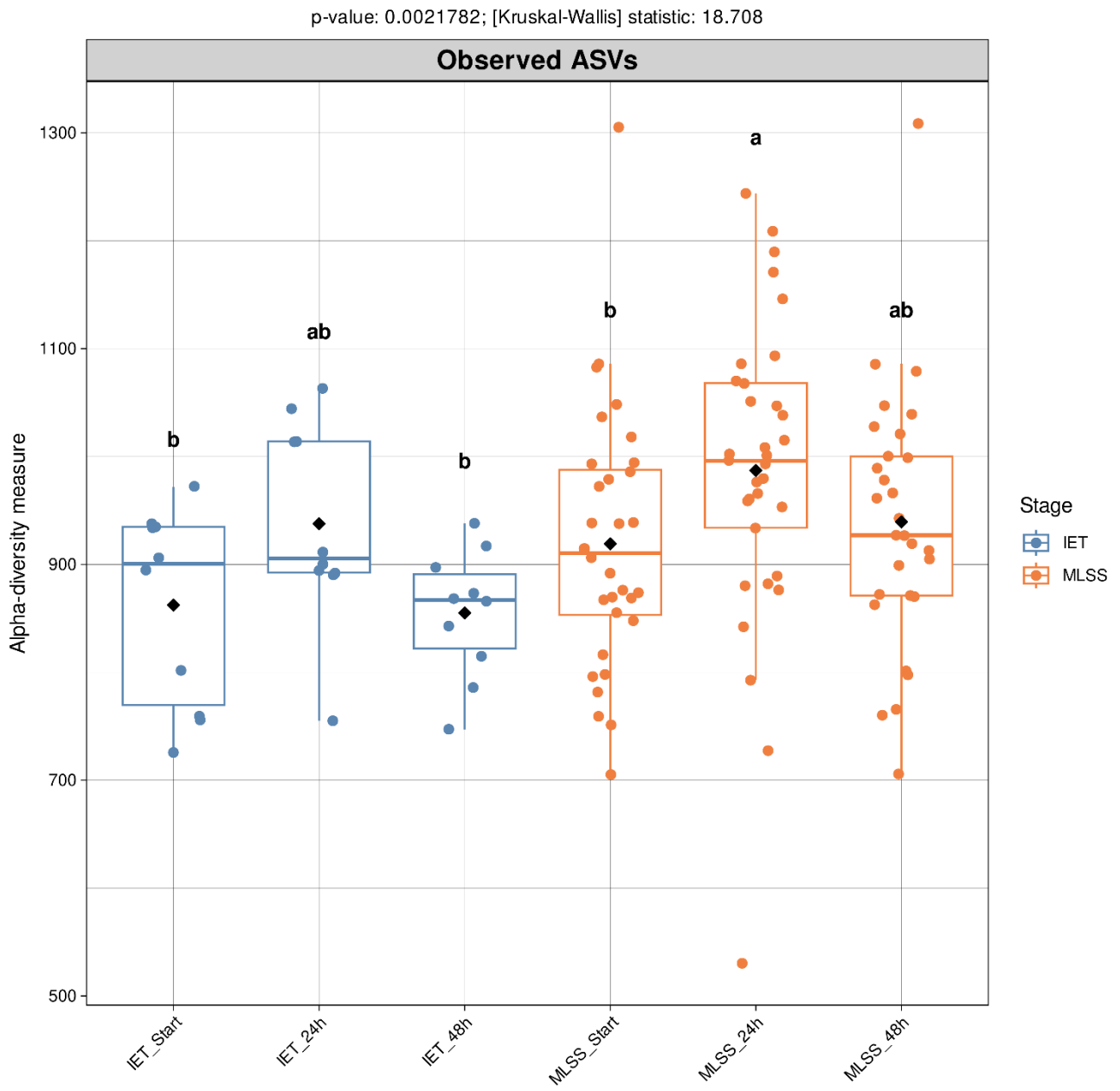
**Figura 5.** Análise de alfa diversidade (Índice de Shannon) entre os tempos experimentais do teste de esforço incremental em cavalos (IET\_Start, IET\_24h, IET\_48h).



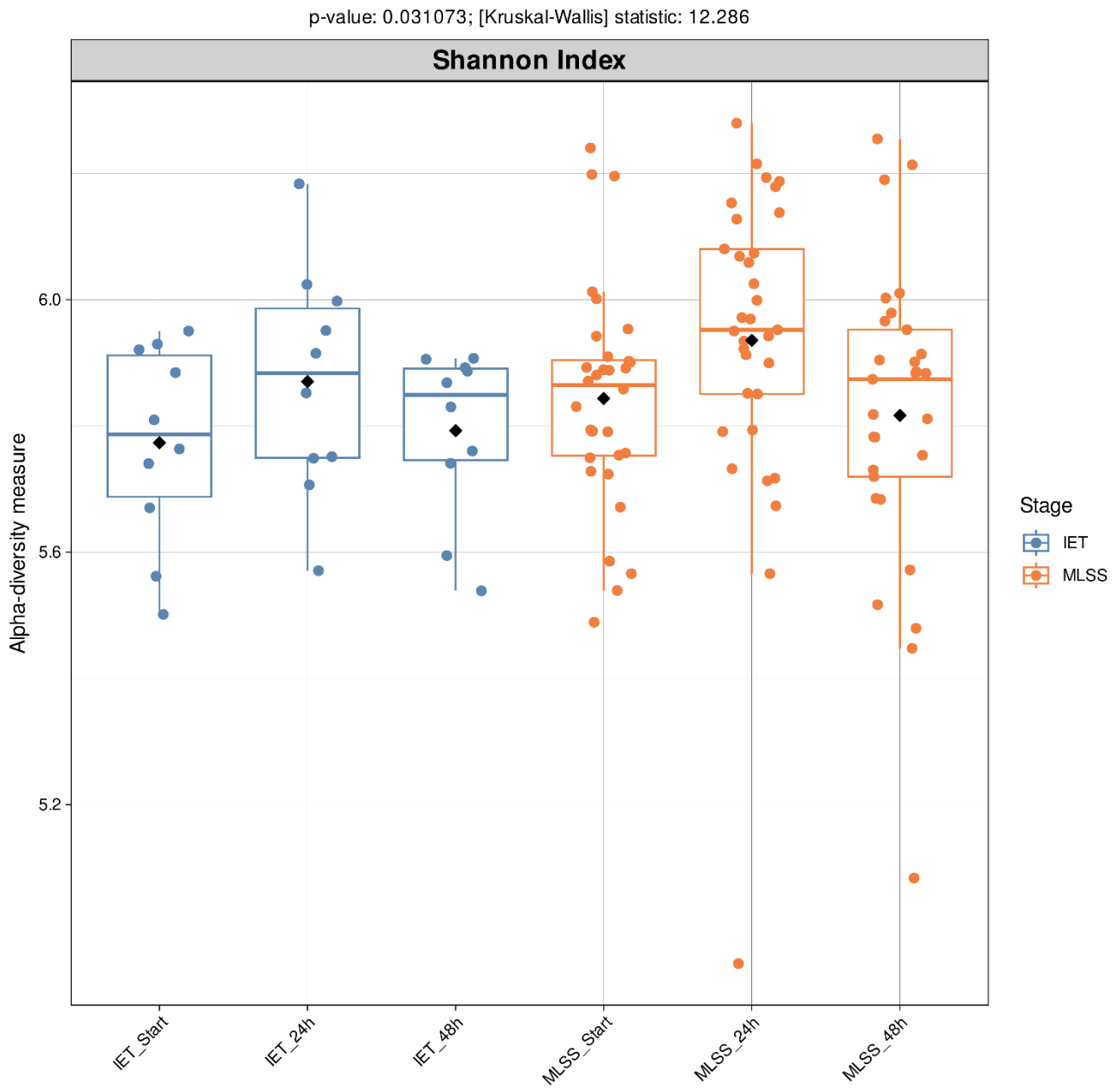
**Figura 6.** Análise de beta diversidade pela distância de Bray-Curtis do teste de esforço incremental (IET) em cavalos.



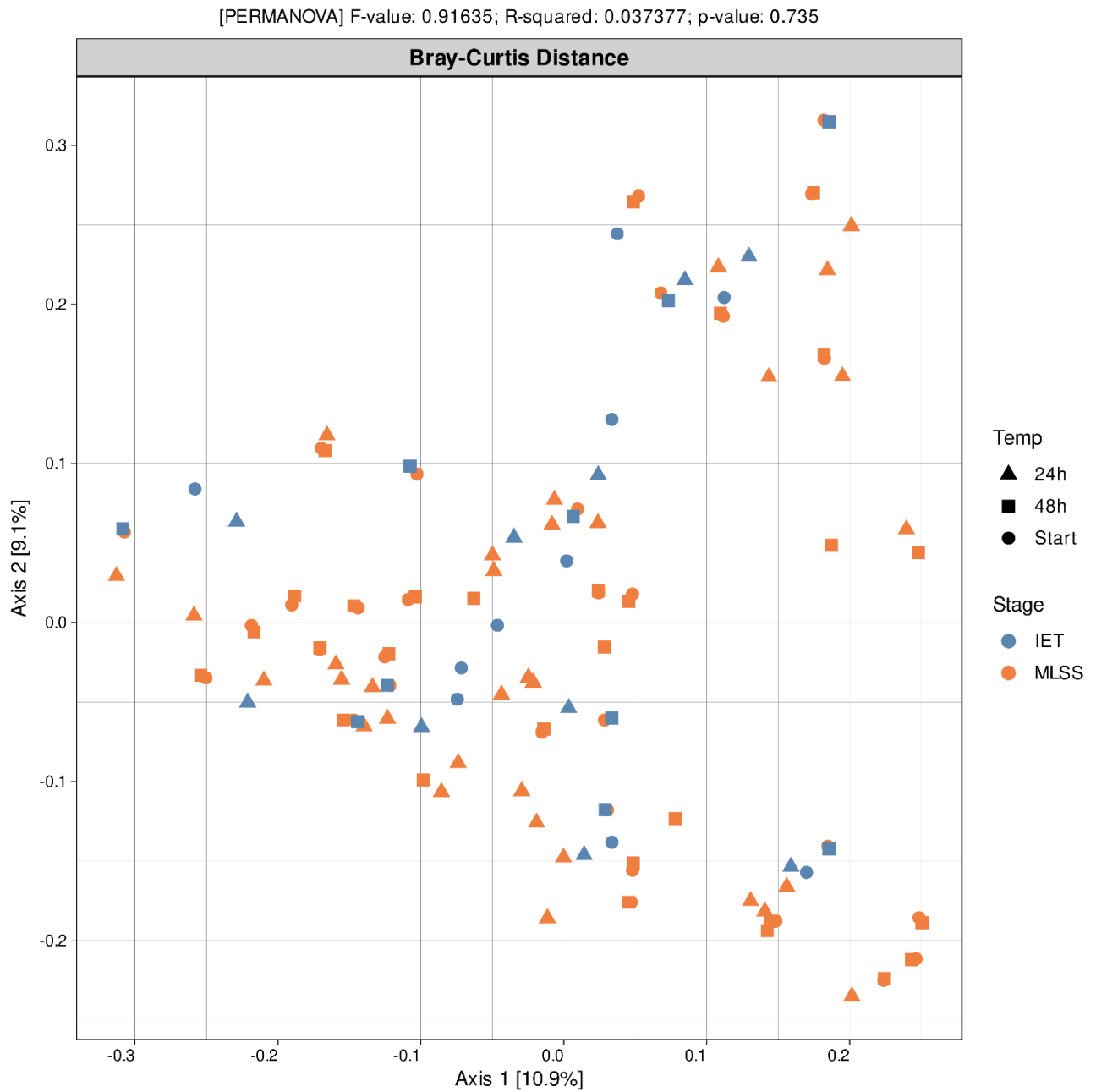
**Figura 7.** Análise de alfa diversidade (Observed ASVs) entre os estímulos induzidos pelo teste de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato em cavalos (MFEL).



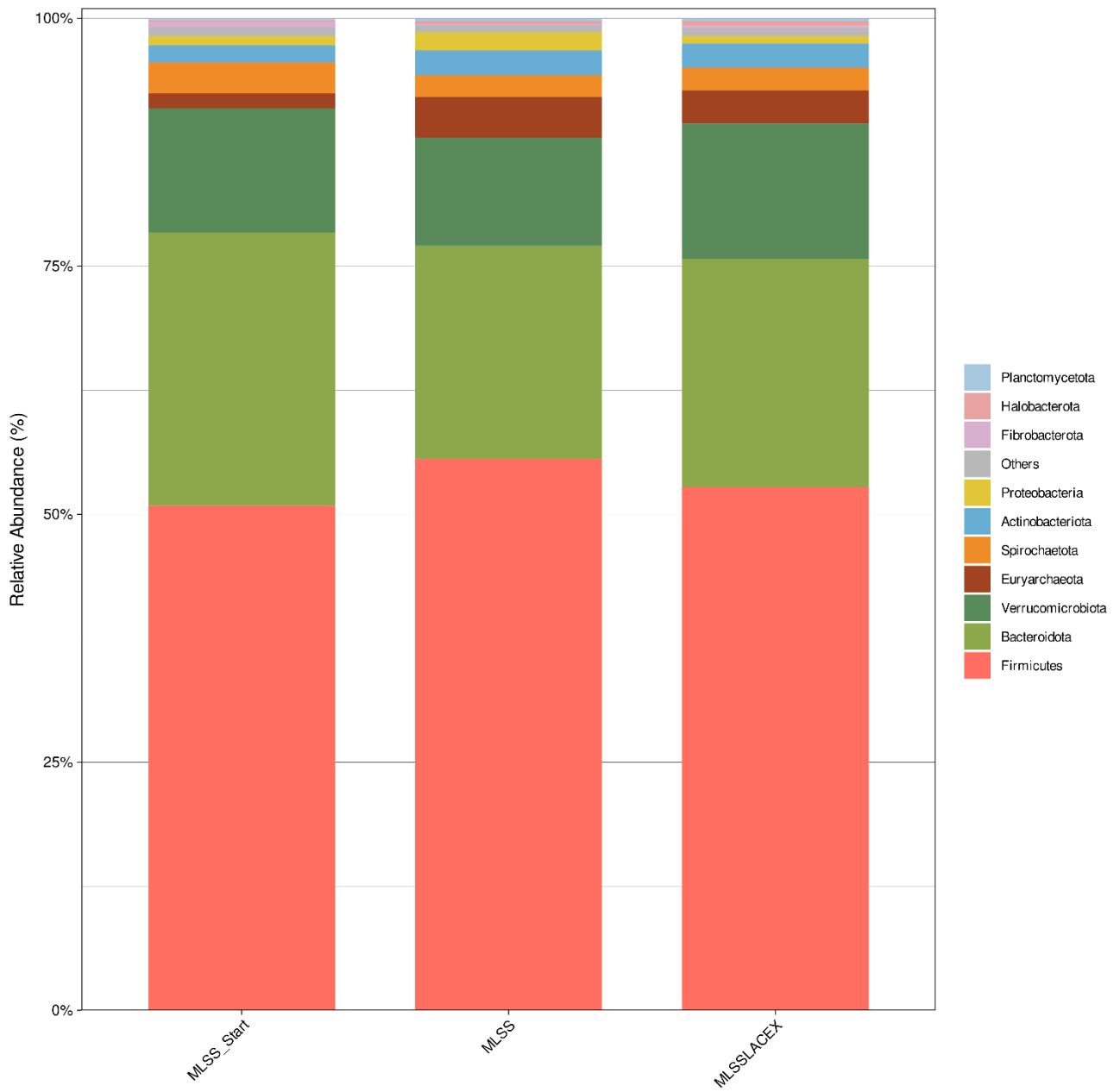
**Figura 8.** Análise de alfa diversidade (Índice de Shannon) entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS).



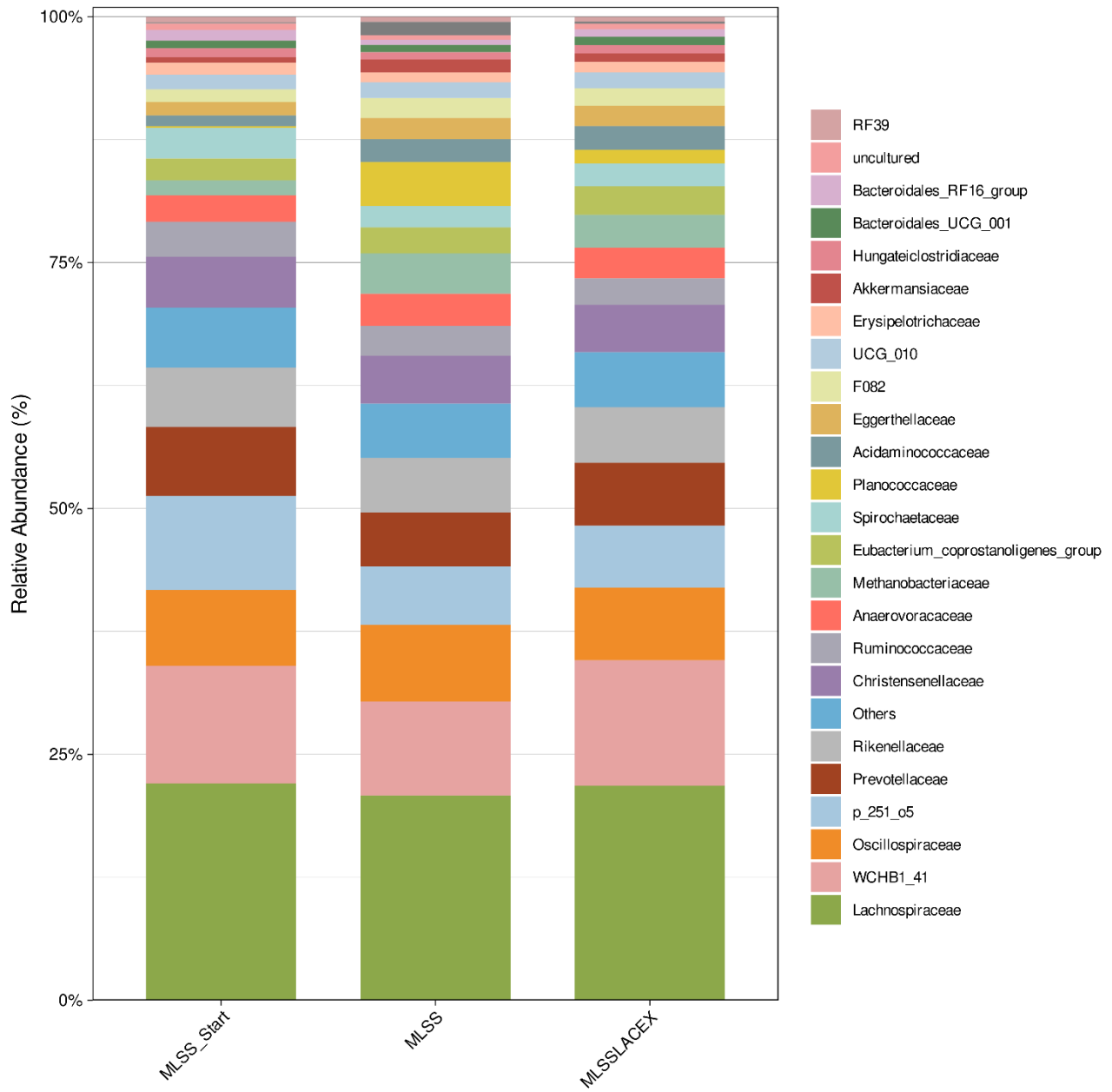
**Figura 9.** Análise de beta diversidade pela distância de Bray-Curtis entre os estímulos do teste de esforço incremental (IET) e da máxima fase estável do lactato (MLSS) em cavalos.



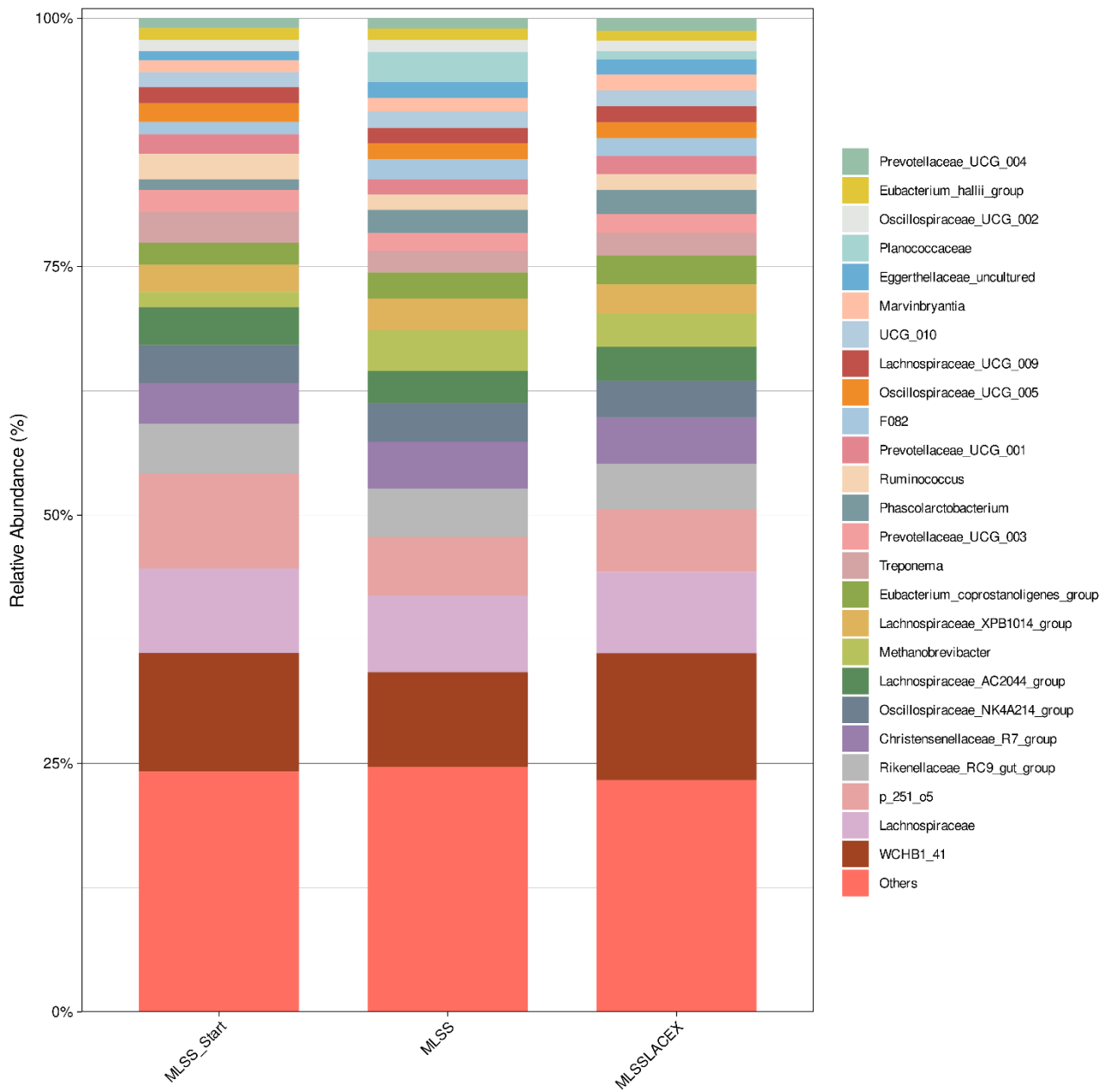
**Figura 10.** Distribuição da abundância relativa dos principais filos bacterianos entre os estímulos da máxima fase estável do lactato e lactato excedido (MLSS\_Start, MLSS, MLSSLACEX).



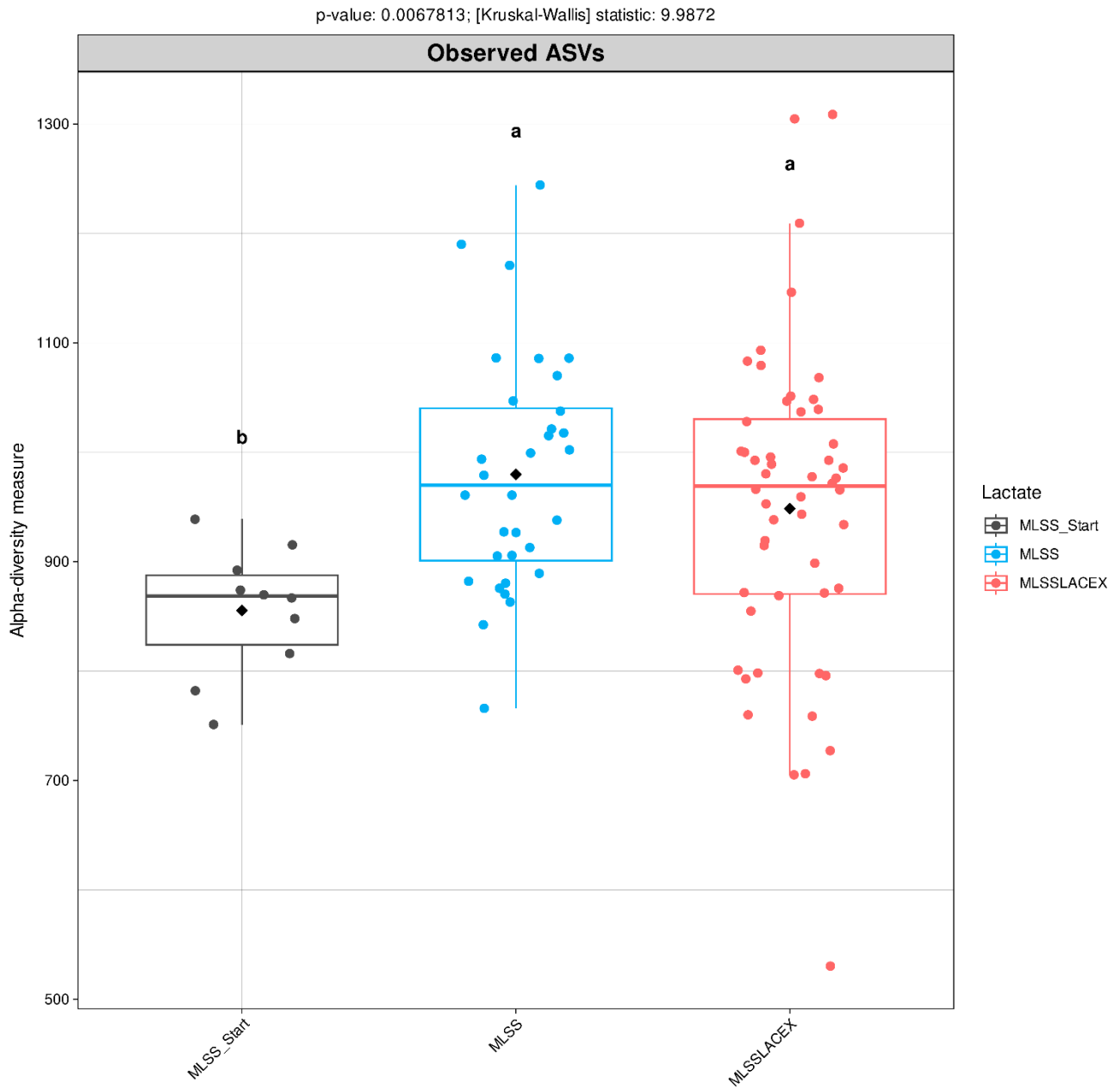
**Figura 11.** Distribuição da abundância relativa das principais famílias bacterianas entre os estímulos da máxima fase estável do lactato e lactato excedido (MLSS\_Start, MLSS, MLSSLACEX).



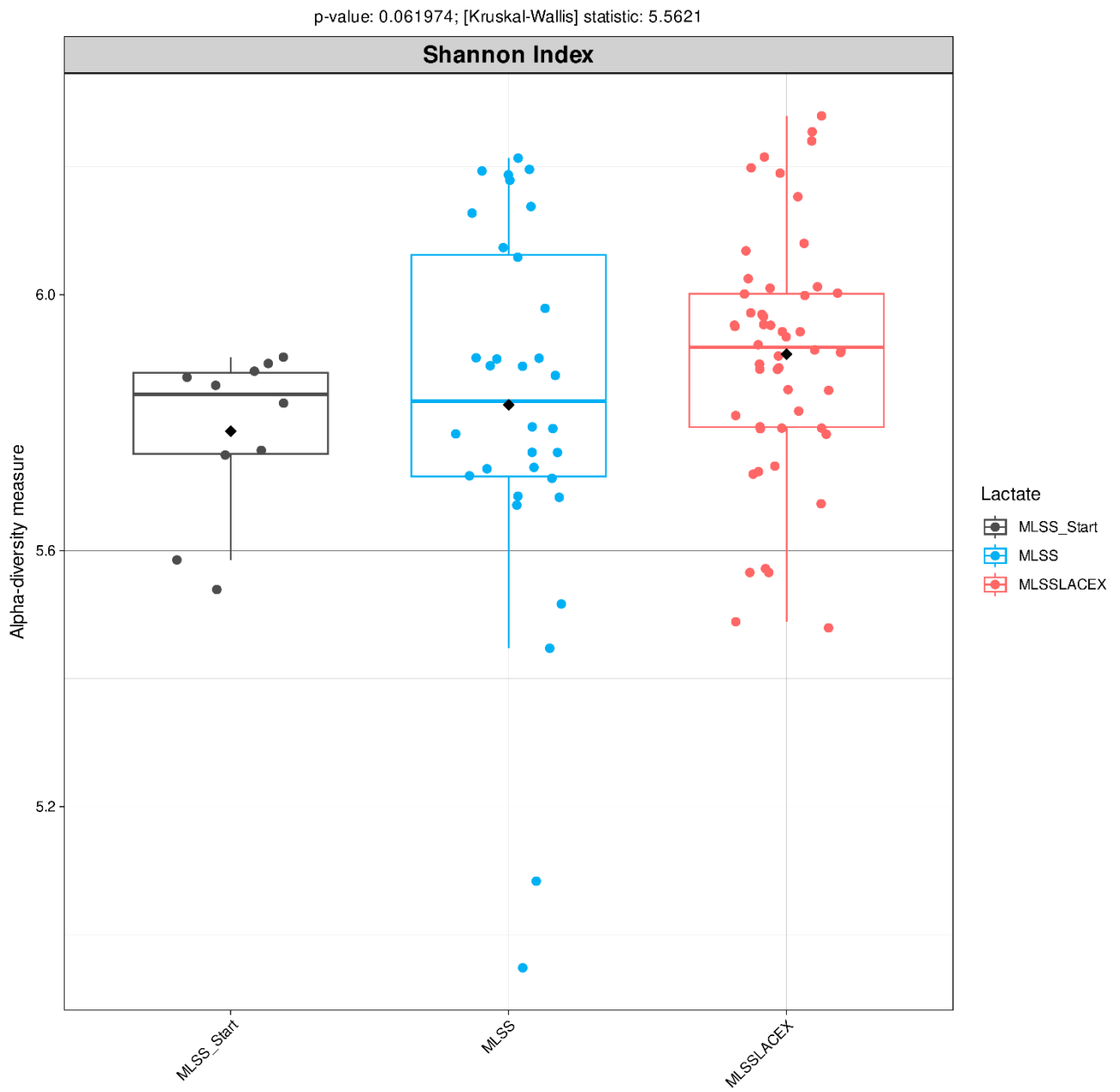
**Figura 12.** Distribuição da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos entre os estímulos da máxima fase estável do lactato e lactato excedido (MLSS\_Start, MLSS, MLSSLACEX).



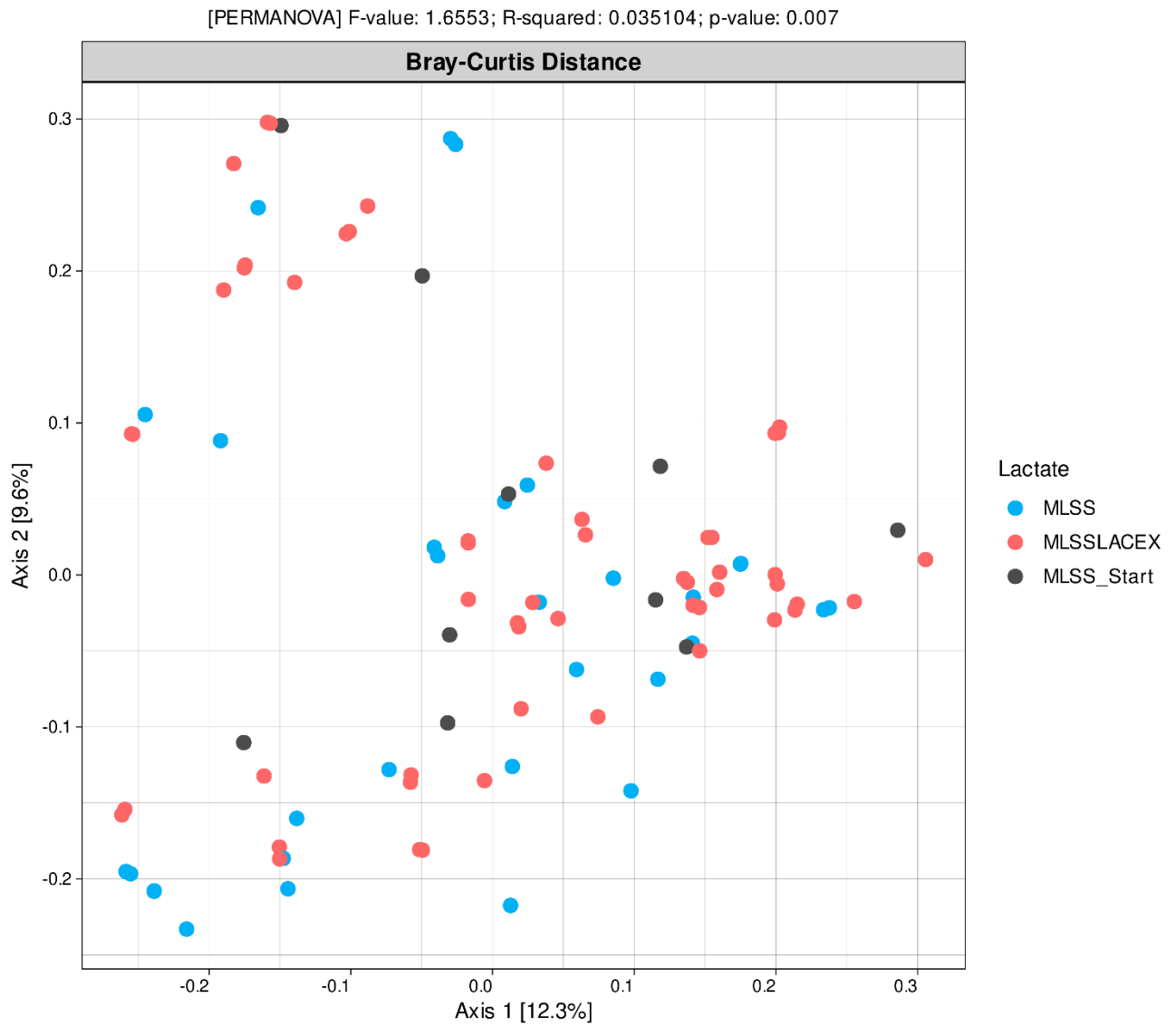
**Figura 13.** Análise de alfa diversidade (Observed ASVs) entre os estímulos da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS\_Start, MLSS, MLSSLACEX), com lactato estável e excedido.



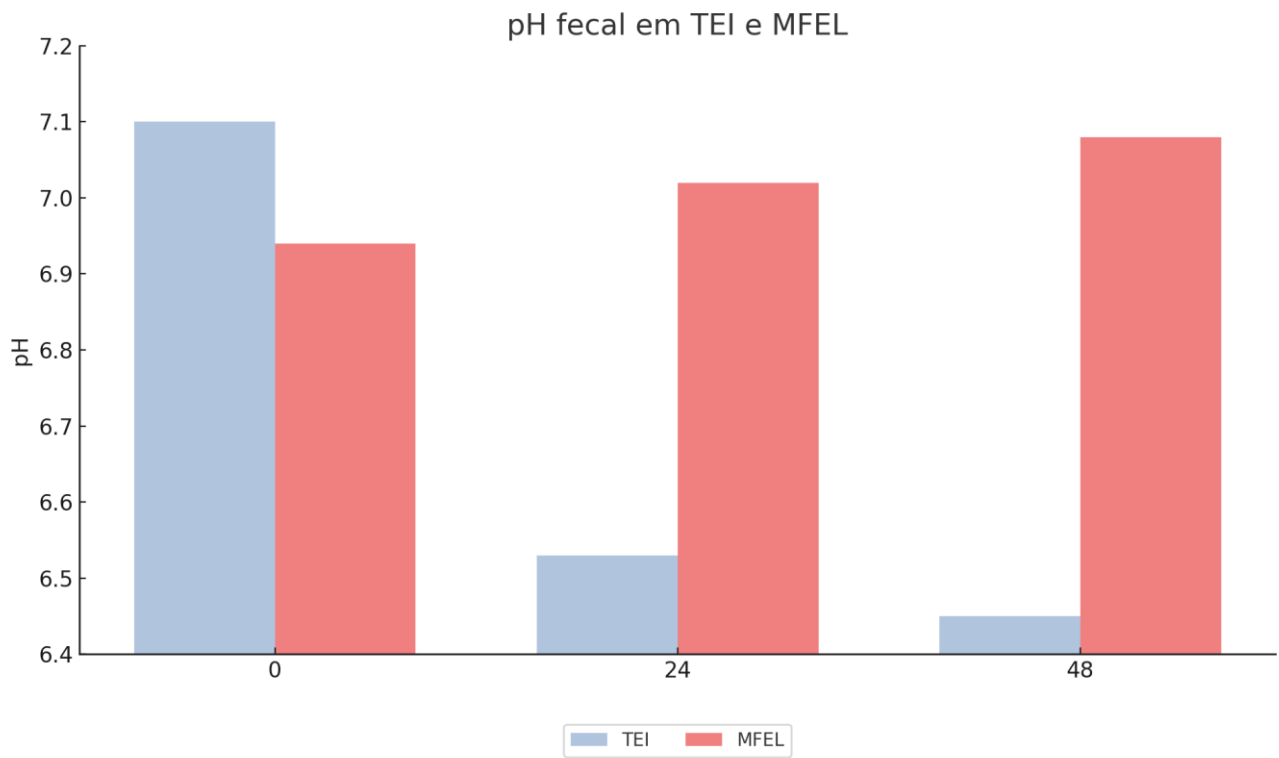
**Figura 14.** Análise de alfa diversidade (Índice de Shannon) entre os estímulos da máxima fase estável do lactato em cavalos (MLSS\_Start, MLSS, MLSSLACEX), com lactato estável e excedido.



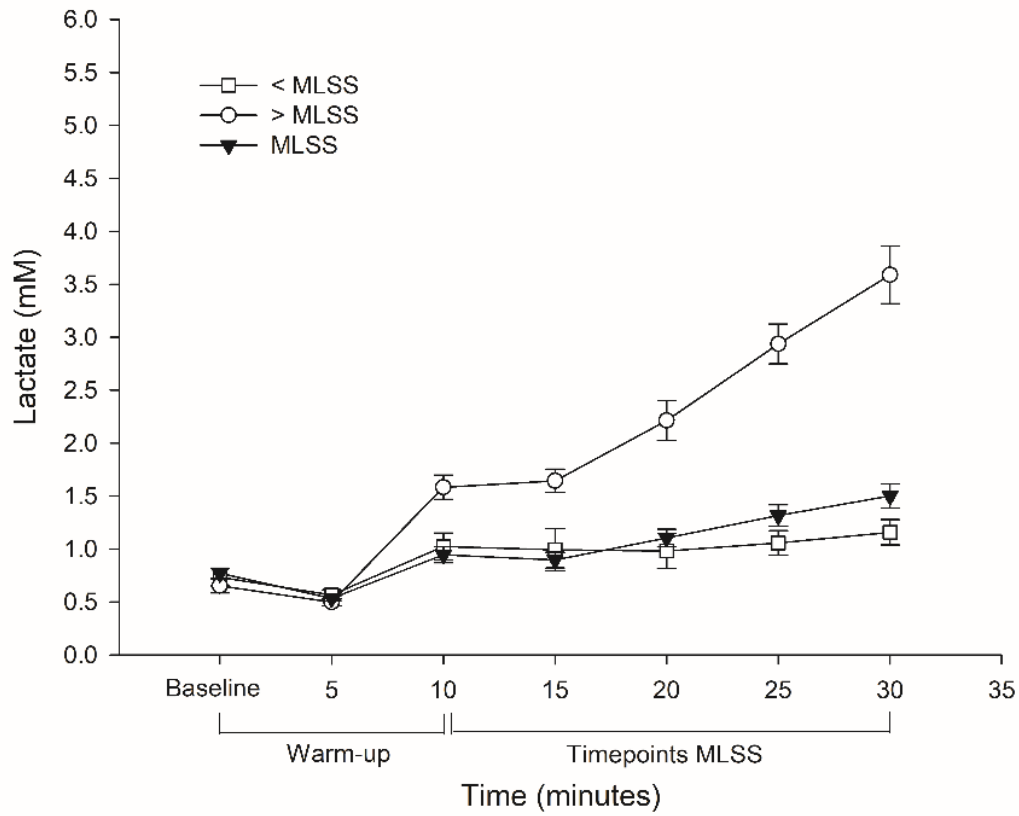
**Figura 15.** Análise de beta diversidade pela distância de Bray-Curtis entre os estímulos da máxima fase estável do lactato (MLSS\_Start, MLSS, MLSSLACEX), com lactato estável e excedido.



**Figura 16.** Variação do pH fecal em equinos submetidos a testes de esforço incremental (TEI) e máxima fase estável do lactato (MFEL) ao longo de 48 horas.



**Figura 17.** Resposta da lactatemia de dez cavalos durante sessão de exercício constante no estado estável máximo de lactato (MFEL), abaixo do MLSS e acima do MLSS. Amostras de sangue foram obtidas a cada 5 minutos. WU: aquecimento.



## Tabelas

**Tabela 1.** Comparação da abundância relativa dos principais filos bacterianos nos diferentes tempos do teste de esforço incremental (IET).

Filo	Tratamento IET / Horas / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	0	24	48	0	24	48			
Others	0,0042 ± 0,0019 A	0,0066 ± 0,0056 A	0,0057 ± 0,0034 A	0,0042 ± 0,0019 A	0,0066 ± 0,0056 A	0,0057 ± 0,0034 A	1,22	0,5446	Kruskal-Wallis
Actinobacteriota	0,0261 ± 0,0096 A	0,0193 ± 0,0078 A	0,017 ± 0,0086 A	0,0261 ± 0,0096 A	0,0193 ± 0,0078 A	0,017 ± 0,0086 A	4,41	0,1104	Kruskal-Wallis
Bacteroidota	0,222 ± 0,0394 A	0,2389 ± 0,054 A	0,2732 ± 0,0639 A	0,222 ± 0,0394 A	0,2389 ± 0,054 A	0,2732 ± 0,0639 A	3,41	0,1819	Kruskal-Wallis
Desulfobacterota	0,0015 ± 0,0007 A	0,0043 ± 0,0034 A	0,004 ± 0,0041 A	0,0015 ± 0,0007 A	0,0043 ± 0,0034 A	0,004 ± 0,0041 A	5,27	0,0718	Kruskal-Wallis
Euryarchaeota	0,0292 ± 0,0233 A	0,023 ± 0,0266 A	0,0152 ± 0,0104 A	0,0292 ± 0,0233 A	0,023 ± 0,0266 A	0,0152 ± 0,0104 A	3,05	0,2173	Kruskal-Wallis
Fibrobacterota	0,002 ± 0,0023 A	0,0045 ± 0,0039 A	0,0064 ± 0,0063 A	0,002 ± 0,0023 A	0,0045 ± 0,0039 A	0,0064 ± 0,0063 A	3,29	0,1931	Kruskal-Wallis
Firmicutes	0,5401 ± 0,057 A	0,5284 ± 0,0416 A	0,5116 ± 0,057 A	0,5401 ± 0,057 A	0,5284 ± 0,0416 A	0,5116 ± 0,057 A	0,13	0,8745	F
Halobacterota	0,0034 ± 0,007 A	0,0028 ± 0,0046 A	0,0021 ± 0,0027 A	0,0034 ± 0,007 A	0,0028 ± 0,0046 A	0,0021 ± 0,0027 A	0,07	0,9673	Kruskal-Wallis
Proteobacteria	0,0059 ± 0,0061 A	0,005 ± 0,0033 A	0,0096 ± 0,0076 A	0,0059 ± 0,0061 A	0,005 ± 0,0033 A	0,0096 ± 0,0076 A	2,17	0,3372	Kruskal-Wallis
Spirochaetota	0,022 ± 0,0127 A	0,0305 ± 0,0199 A	0,0308 ± 0,0193 A	0,022 ± 0,0127 A	0,0305 ± 0,0199 A	0,0308 ± 0,0193 A	1,52	0,4683	Kruskal-Wallis
Verrucomicrobiota	0,1435 ± 0,0623 A	0,1365 ± 0,0782 A	0,1244 ± 0,0632 A	0,1435 ± 0,0623 A	0,1365 ± 0,0782 A	0,1244 ± 0,0632 A	0,44	0,801	Kruskal-Wallis

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste indicado ( $p \geq 0,05$ )

**Tabela 2.** Comparação da abundância relativa das principais famílias bacterianas nos diferentes tempos do teste de esforço incremental (IET).

Família	Tratamento IET / Horas / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	0		24		48				
Acidaminococcaceae	0,0062 ±	0,0070 B	0,0188 ±	0,0145 A	0,0106 ±	0,0086 AB	7,5578	0,0228	Kruskal_Wallis
Akkermansiaceae	0,0100 ±	0,0155 A	0,0077 ±	0,0101 A	0,0060 ±	0,0066 A	0,122	0,9408	Kruskal_Wallis
Anaerovoracaceae	0,0412 ±	0,0117 A	0,0293 ±	0,0097 B	0,0271 ±	0,0120 B	6,3665	0,0415	Kruskal_Wallis
Bacteroidales_BS11_gut_group	0,0026 ±	0,0032 A	0,0053 ±	0,0044 A	0,0059 ±	0,0122 A	3,4105	0,1817	Kruskal_Wallis
Bacteroidales_RF16_group	0,0049 ±	0,0033 A	0,0064 ±	0,0036 A	0,0108 ±	0,0117 A	3,231	0,1988	Kruskal_Wallis
Bacteroidales_UCG_001	0,0091 ±	0,0058 A	0,0110 ±	0,0052 A	0,0076 ±	0,0059 A	2,609	0,2713	Kruskal_Wallis
Christensenellaceae	0,0707 ±	0,0320 A	0,0555 ±	0,0237 A	0,0524 ±	0,0325 A	2,6735	0,2627	Kruskal_Wallis
Eggerthellaceae	0,0188 ±	0,0059 A	0,0146 ±	0,0059 A	0,0135 ±	0,0069 A	3,3626	0,1861	Kruskal_Wallis
Erysipelotrichaceae	0,0170 ±	0,0064 A	0,0113 ±	0,0050 AB	0,0118 ±	0,0072 B	6,7432	0,0343	Kruskal_Wallis
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0278 ±	0,0094 A	0,0258 ±	0,0105 A	0,0227 ±	0,0117 A	0,5895	0,5616	F
F082	0,0096 ±	0,0078 A	0,0125 ±	0,0149 A	0,0127 ±	0,0094 A	0,8594	0,6507	Kruskal_Wallis
Hungateiclostridiaceae	0,0100 ±	0,0113 A	0,0121 ±	0,0140 A	0,0088 ±	0,0050 A	0,2348	0,8892	Kruskal_Wallis
Lachnospiraceae	0,2047 ±	0,0344 A	0,2072 ±	0,0553 A	0,2212 ±	0,0432 A	0,3873	0,6826	F
Methanobacteriaceae	0,0292 ±	0,0233 A	0,0230 ±	0,0266 A	0,0152 ±	0,0104 A	3,0529	0,2173	Kruskal_Wallis
Oscillospiraceae	0,0827 ±	0,0138 A	0,0802 ±	0,0220 A	0,0783 ±	0,0209 A	0,1355	0,8738	F
p_251_o5	0,0682 ±	0,0364 A	0,0679 ±	0,0345 A	0,0949 ±	0,0463 A	2,7948	0,2472	Kruskal_Wallis
Planococcaceae	0,0089 ±	0,0119 A	0,0023 ±	0,0040 A	0,0020 ±	0,0033 a	3,844	0,1463	Kruskal_Wallis
Prevotellaceae	0,0600 ±	0,0155 A	0,0656 ±	0,0140 A	0,0696 ±	0,0222 A	1,4168	0,4924	Kruskal_Wallis
RF39	0,0040 ±	0,0010 A	0,0055 ±	0,0051 A	0,0059 ±	0,0052 A	0,0181	0,991	Kruskal_Wallis
Rikenellaceae	0,0617 ±	0,0219 A	0,0613 ±	0,0151 A	0,0604 ±	0,0194 A	0,1006	0,9509	Kruskal_Wallis
Ruminococcaceae	0,0237 ±	0,0120 A	0,0369 ±	0,0195 A	0,0355 ±	0,0174 A	3,7574	0,1528	Kruskal_Wallis
Spirochaetaceae	0,0220 ±	0,0127 A	0,0305 ±	0,0199 A	0,0307 ±	0,0193 A	1,4116	0,4937	Kruskal_Wallis
UCG_010	0,0153 ±	0,0049 A	0,0171 ±	0,0058 A	0,0149 ±	0,0070 A	0,9394	0,6252	Kruskal_Wallis
WCHB1_41	0,1335 ±	0,0633 A	0,1287 ±	0,0780 A	0,1183 ±	0,0654 A	0,3019	0,8599	Kruskal_Wallis
Others	0,0521 ±	0,0140 A	0,0585 ±	0,0112 A	0,0566 ±	0,0156 A	1,6206	0,4447	Kruskal_Wallis

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste indicado ( $p \geq 0,05$ )

**Tabela 3.** Comparação da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos nos diferentes tempos do teste de esforço incremental (IET).

Genero	Tratamento IET / Horas / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	0		24		48				
Phascolarctobacterium	0,0062 ±	0,007 B	0,0188 ±	0,0145 A	0,0106 ±	0,0086 AB	7,56	0,0228	Kruskal-Wallis
Christensenellaceae_R7_group	0,0535 ±	0,0228 A	0,0467 ±	0,0182 A	0,0413 ±	0,0228 A	2,35	0,3083	Kruskal-Wallis
Eggerthellaceae_uncultured	0,0115 ±	0,004 A	0,0102 ±	0,004 A	0,0091 ±	0,0045 A	2,29	0,3190	Kruskal-Wallis
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0278 ±	0,0094 A	0,0258 ±	0,0105 A	0,0227 ±	0,0117 A	1,62	0,4448	F
F082	0,0096 ±	0,0078 A	0,0125 ±	0,0149 A	0,0127 ±	0,0094 A	0,86	0,6507	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae	0,0724 ±	0,016 A	0,0762 ±	0,0269 A	0,0848 ±	0,0223 A	1,14	0,5661	F
Eubacterium_hallii_group	0,0139 ±	0,0063 A	0,01 ±	0,0041 A	0,012 ±	0,0073 A	1,70	0,4284	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae_AC2044_group	0,0292 ±	0,0099 A	0,0361 ±	0,0142 A	0,0384 ±	0,013 A	2,14	0,3422	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae_UCG_009	0,0181 ±	0,0089 A	0,0184 ±	0,0073 A	0,0164 ±	0,0098 A	1,04	0,5945	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae_XPB1014_group	0,0359 ±	0,0157 A	0,0289 ±	0,0129 A	0,0271 ±	0,014 A	2,48	0,2894	Kruskal-Wallis
Marvinbryantia	0,0088 ±	0,0034 A	0,0111 ±	0,0042 A	0,0113 ±	0,005 A	2,24	0,3263	Kruskal-Wallis
Methanobrevibacter	0,0292 ±	0,0233 A	0,023 ±	0,0266 A	0,0152 ±	0,0104 A	3,05	0,2173	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae_NK4A214_group	0,0493 ±	0,008 A	0,0407 ±	0,0086 A	0,0387 ±	0,0122 A	4,85	0,0885	F
Oscillospiraceae_UCG_002	0,0113 ±	0,007 A	0,0141 ±	0,0114 A	0,0117 ±	0,0088 A	0,59	0,7433	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae_UCG_005	0,0133 ±	0,0045 A	0,0154 ±	0,005 A	0,0193 ±	0,0109 A	1,84	0,3985	Kruskal-Wallis
p_251_o5	0,0682 ±	0,0364 A	0,0679 ±	0,0345 A	0,0949 ±	0,0463 A	2,79	0,2472	Kruskal-Wallis
Planococcaceae	0,0062 ±	0,0087 A	0,0009 ±	0,002 AB	0,0001 ±	0,0002 B	8,78	0,0124	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae_UCG_001	0,0119 ±	0,0041 A	0,0148 ±	0,0053 A	0,0196 ±	0,0093 A	5,95	0,0511	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae_UCG_003	0,0203 ±	0,009 A	0,0203 ±	0,0075 A	0,0212 ±	0,0102 A	0,02	0,9885	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae_UCG_004	0,0117 ±	0,0071 A	0,0144 ±	0,0084 A	0,0102 ±	0,0055 A	1,32	0,5159	F
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,0519 ±	0,0215 A	0,0489 ±	0,0133 A	0,05 ±	0,0166 A	0,01	0,9961	Kruskal-Wallis
Ruminococcus	0,0124 ±	0,0102 A	0,0265 ±	0,0207 A	0,0258 ±	0,018 A	3,93	0,1405	Kruskal-Wallis
Treponema	0,0218 ±	0,0126 A	0,0303 ±	0,0197 A	0,0306 ±	0,0192 A	1,41	0,4937	Kruskal-Wallis
UCG_010	0,0153 ±	0,0049 A	0,0171 ±	0,0058 A	0,0149 ±	0,007 A	0,94	0,6252	F
WCHB1_41	0,1335 ±	0,0633 A	0,1287 ±	0,078 A	0,1183 ±	0,0654 A	0,30	0,8599	Kruskal-Wallis
Others	0,2567 ±	0,0384 A	0,2425 ±	0,0313 A	0,2431 ±	0,0574 A	1,12	0,5724	F

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste indicado ( $p \geq 0,05$ )

**Tabela 4.** Comparação da abundância relativa dos principais filos bacterianos entre os protocolos de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato (MFEL).

Filo	Hora Zero / Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*				Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	IET		MLSS				
Others	0,0042 ±	0,0019 B	0,0071 ±	0,0027 A	8,8984	0,0029	Kruskal-Wallis
Actinobacteriota	0,0261 ±	0,0096 A	0,0228 ±	0,0101 A	0,6358	0,4253	Kruskal-Wallis
Bacteroidota	0,222 ±	0,0394 A	0,2422 ±	0,0516 A	1,5386	0,2148	Kruskal-Wallis
Desulfobacterota	0,0015 ±	0,0007 A	0,0027 ±	0,0025 A	2,4049	0,121	Kruskal-Wallis
Euryarchaeota	0,0292 ±	0,0233 A	0,0327 ±	0,0284 A	0,0218	0,8826	Kruskal-Wallis
Fibrobacterota	0,002 ±	0,0023 A	0,0035 ±	0,0044 A	0,4417	0,5063	Kruskal-Wallis
Firmicutes	0,5401 ±	0,057 A	0,5263 ±	0,0572 A	0,3488	0,5548	F
Halobacterota	0,0034 ±	0,007 A	0,0032 ±	0,0046 A	0,7858	0,3754	Kruskal-Wallis
Proteobacteria	0,0059 ±	0,0061 A	0,0077 ±	0,0055 A	1,6505	0,1989	Kruskal-Wallis
Spirochaetota	0,022 ±	0,0127 A	0,0256 ±	0,0136 A	0,8654	0,3522	Kruskal-Wallis
Verrucomicrobiota	0,1435 ±	0,0623 A	0,1263 ±	0,0629 A	0,7334	0,3918	Kruskal-Wallis

Filo	24 Horas / Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*				Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	IET		MLSS				
Others	0,0066 ±	0,0056	0,0086 ±	0,0037 A	4,0502	0,0442	Kruskal-Wallis
Actinobacteriota	0,0193 ±	0,0078 A	0,0236 ±	0,0069 A	2,4099	0,1206	Kruskal-Wallis
Bacteroidota	0,2389 ±	0,054 A	0,2249 ±	0,0373 A	0,6951	0,4044	Kruskal-Wallis
Desulfobacterota	0,0043 ±	0,0034 A	0,0024 ±	0,0015 A	2,9265	0,0871	Kruskal-Wallis
Euryarchaeota	0,023 ±	0,0266 B	0,0308 ±	0,0174 A	4,2846	0,0385	Kruskal-Wallis
Fibrobacterota	0,0045 ±	0,0039 A	0,0026 ±	0,0023 A	1,1318	0,2874	Kruskal-Wallis
Firmicutes	0,5284 ±	0,0416 A	0,5375 ±	0,0476 A	0,4	0,5271	F
Halobacterota	0,0028 ±	0,0046 A	0,0045 ±	0,0055 A	0,517	0,4721	Kruskal-Wallis
Proteobacteria	0,005 ±	0,0033 A	0,0102 ±	0,0201 A	0,9	0,3428	Kruskal-Wallis
Spirochaetota	0,0305 ±	0,0199 A	0,0229 ±	0,0114 A	1,1011	0,294	Kruskal-Wallis
Verrucomicrobiota	0,1365 ±	0,0782 A	0,132 ±	0,053 A	0,186	0,6663	Kruskal-Wallis

Filo	48 Horas / Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*				Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	IET		MLSS				
Others	0,0074 ±	0,0024 A	0,0057 ±	0,0034 B	3,4804	0,0621	Kruskal-Wallis
Actinobacteriota	0,0255 ±	0,0097 A	0,017 ±	0,0086 B	5,069	0,0244	Kruskal-Wallis
Bacteroidota	0,2206 ±	0,0409 B	0,2732 ±	0,0639 A	4,2372	0,0395	Kruskal-Wallis
Desulfobacterota	0,0021 ±	0,0012 A	0,004 ±	0,0041 A	1,027	0,3109	Kruskal-Wallis
Euryarchaeota	0,0393 ±	0,0288 A	0,0152 ±	0,0104 B	8,5666	0,0034	Kruskal-Wallis
Fibrobacterota	0,002 ±	0,0024 B	0,0064 ±	0,0063 A	5,3633	0,0206	Kruskal-Wallis
Firmicutes	0,5422 ±	0,0623 A	0,5116 ±	0,057 A	1,9128	0,1667	F
Halobacterota	0,0042 ±	0,0052 A	0,0021 ±	0,0027 A	0,9322	0,3343	Kruskal-Wallis
Proteobacteria	0,0163 ±	0,0325 A	0,0096 ±	0,0076 A	0,0093	0,9231	Kruskal-Wallis
Spirochaetota	0,0222 ±	0,0086 A	0,0308 ±	0,0193 A	1,1959	0,2742	Kruskal-Wallis
Verrucomicrobiota	0,1184 ±	0,0634 A	0,1244 ±	0,0632 A	0,1748	0,6759	Kruskal-Wallis

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste indicado ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 5.** Comparação da abundância relativa das principais famílias bacterianas entre os protocolos de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato (MFEL)

Família	Hora Zero / Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste		
	IET			MLSS							
Acidaminococcaceae	0,0062	±	0,0070	B	0,0214	±	0,0132	A	12,98	0,0003	Kruskal-Wallis
Akkermansiaceae	0,0100	±	0,0155	A	0,0093	±	0,0091	A	0,87	0,3522	Kruskal-Wallis
Anaerovoracaceae	0,0412	±	0,0117	A	0,0304	±	0,0086	B	5,31	0,0213	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_BS11_gut_group	0,0026	±	0,0032	A	0,0050	±	0,0088	A	0,40	0,5254	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_RF16_group	0,0049	±	0,0033	A	0,0088	±	0,0086	A	1,58	0,2094	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_UCG_001	0,0091	±	0,0058	A	0,0084	±	0,0073	A	0,78	0,3756	Kruskal-Wallis
Christensenellaceae	0,0707	±	0,0320	A	0,0498	±	0,0226	A	3,80	0,0513	Kruskal-Wallis
Eggerthellaceae	0,0188	±	0,0059	A	0,0190	±	0,0093	A	0,11	0,7453	Kruskal-Wallis
Erysipelotrichaceae	0,0170	±	0,0064	A	0,0111	±	0,0047	B	9,80	0,0017	Kruskal-Wallis
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0278	±	0,0094	A	0,0265	±	0,0100	A	1,26	0,2683	F
F082	0,0096	±	0,0078	A	0,0167	±	0,0121	A	3,04	0,0814	Kruskal-Wallis
Hungateiclostridiaceae	0,0100	±	0,0113	A	0,0078	±	0,0045	A	0,01	0,9294	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae	0,2047	±	0,0344	A	0,2165	±	0,0416	A	0,66	0,4229	F
Methanobacteriaceae	0,0292	±	0,0233	A	0,0327	±	0,0284	A	0,02	0,8826	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae	0,0827	±	0,0138	A	0,0758	±	0,0178	A	0,15	0,7038	F
p_251_o5	0,0682	±	0,0364	A	0,0723	±	0,0354	A	0,04	0,8362	Kruskal-Wallis
Planococcaceae	0,0089	±	0,0119	A	0,0144	±	0,0371	A	0,76	0,3834	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae	0,0600	±	0,0155	A	0,0641	±	0,0190	A	0,15	0,7010	Kruskal-Wallis
RF39	0,0040	±	0,0010	A	0,0049	±	0,0033	A	0,20	0,6577	Kruskal-Wallis
Rikenellaceae	0,0617	±	0,0219	A	0,0581	±	0,0178	A	0,22	0,6366	Kruskal-Wallis
Ruminococcaceae	0,0237	±	0,0120	A	0,0300	±	0,0134	A	1,65	0,1989	Kruskal-Wallis
Spirochaetaceae	0,0220	±	0,0127	A	0,0256	±	0,0135	A	0,81	0,3677	Kruskal-Wallis
UCG_010	0,0153	±	0,0049	A	0,0155	±	0,0050	A	0,13	0,7231	Kruskal-Wallis
WCHB1_41	0,1335	±	0,0633	A	0,1170	±	0,0641	A	0,71	0,4000	Kruskal-Wallis
Others	0,0521	±	0,0140	A	0,0528	±	0,0130	A	0,28	0,5950	Kruskal-Wallis

Família	24 Horas / Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste		
	IET			MLSS							
Acidaminococcaceae	0,0188	±	0,0145	A	0,0215	±	0,0088	A	1,2570	0,2622	Kruskal-Wallis
Akkermansiaceae	0,0077	±	0,0101	A	0,0111	±	0,0138	A	0,7943	0,3728	Kruskal-Wallis
Anaerovoracaceae	0,0293	±	0,0097	A	0,0320	±	0,0070	A	0,9555	0,3283	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_BS11_gut_group	0,0053	±	0,0044	A	0,0049	±	0,0063	A	0,6480	0,4208	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_RF16_group	0,0064	±	0,0036	A	0,0056	±	0,0043	A	1,4580	0,2273	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_UCG_001	0,0110	±	0,0052	A	0,0082	±	0,0057	A	2,7802	0,0954	Kruskal-Wallis
Christensenellaceae	0,0555	±	0,0237	A	0,0480	±	0,0131	A	0,4761	0,4902	Kruskal-Wallis
Eggerthellaceae	0,0146	±	0,0059	B	0,0195	±	0,0066	A	3,9347	0,0473	Kruskal-Wallis
Erysipelotrichaceae	0,0113	±	0,0050	A	0,0101	±	0,0041	A	0,5166	0,4723	Kruskal-Wallis
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0258	±	0,0105	A	0,0287	±	0,0087	A	0,0645	0,8008	F
F082	0,0125	±	0,0149	B	0,0198	±	0,0138	A	4,5260	0,0334	Kruskal-Wallis
Hungateiclostridiaceae	0,0121	±	0,0140	A	0,0089	±	0,0052	A	0,0074	0,9313	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae	0,2072	±	0,0553	A	0,2171	±	0,0601	A	0,2169	0,6439	F
Methanobacteriaceae	0,0230	±	0,0266	B	0,0308	±	0,0174	A	4,2846	0,0385	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae	0,0802	±	0,0220	A	0,0783	±	0,0200	A	0,7851	0,3808	F
p_251_o5	0,0679	±	0,0345	A	0,0608	±	0,0260	A	0,2388	0,6250	Kruskal-Wallis
Planococcaceae	0,0023	±	0,0040	A	0,0167	±	0,0597	A	2,2369	0,1348	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae	0,0656	±	0,0140	A	0,0605	±	0,0175	A	1,3894	0,2385	Kruskal-Wallis
RF39	0,0055	±	0,0051	A	0,0058	±	0,0030	A	1,5643	0,2110	Kruskal-Wallis
Rikenellaceae	0,0613	±	0,0151	A	0,0576	±	0,0189	A	0,6025	0,4376	Kruskal-Wallis
Ruminococcaceae	0,0369	±	0,0195	A	0,0297	±	0,0110	A	0,7439	0,3884	Kruskal-Wallis
Spirochaetaceae	0,0305	±	0,0199	A	0,0227	±	0,0114	A	1,0711	0,3007	Kruskal-Wallis
UCG_010	0,0171	±	0,0058	A	0,0166	±	0,0041	A	0,2389	0,6250	Kruskal-Wallis
WCHB1_41	0,1287	±	0,0780	A	0,1209	±	0,0555	A	0,0000	1,0000	Kruskal-Wallis
Others	0,0585	±	0,0112	A	0,0587	±	0,0233	A	0,6025	0,4376	Kruskal-Wallis

Família	48 Horas / Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*				Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	IET		MLSS				
Acidaminococcaceae	0,0106 ±	0,0086 B	0,0250 ±	0,0119 A	10,7628	0,0010	Kruskal-Wallis
Akkermansiaceae	0,0060 ±	0,0066 A	0,0099 ±	0,0090 A	1,9577	0,1618	Kruskal-Wallis
Anaerovoracaceae	0,0271 ±	0,0120 A	0,0313 ±	0,0062 A	1,1267	0,2885	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_BS11_gut_group	0,0059 ±	0,0122 A	0,0043 ±	0,0063 A	0,0313	0,8596	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_RF16_group	0,0108 ±	0,0117 A	0,0065 ±	0,0061 A	2,484	0,1150	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_UCG_001	0,0076 ±	0,0059 A	0,0081 ±	0,0069 A	0,021	0,8849	Kruskal-Wallis
Christensenellaceae	0,0524 ±	0,0325 A	0,0480 ±	0,0179 A	0,0259	0,8722	Kruskal-Wallis
Eggerthellaceae	0,0135 ±	0,0069 B	0,0214 ±	0,0091 A	5,819	0,0159	Kruskal-Wallis
Erysipelotrichaceae	0,0118 ±	0,0072 A	0,0102 ±	0,0038 A	0,0259	0,8722	Kruskal-Wallis
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0227 ±	0,0117 A	0,0269 ±	0,0089 A	0,8838	0,3533	F
F082	0,0127 ±	0,0094 A	0,0186 ±	0,0122 A	1,8248	0,1767	Kruskal-Wallis
Hungateiclostridiaceae	0,0088 ±	0,0050 A	0,0072 ±	0,0038 A	0,7825	0,3764	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae	0,2212 ±	0,0432 A	0,2110 ±	0,0406 A	0,4543	0,5045	F
Methanobacteriaceae	0,0152 ±	0,0104 B	0,0393 ±	0,0288 A	8,5666	0,0034	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae	0,0783 ±	0,0209 A	0,0721 ±	0,0170 A	1,4157	0,2417	F
p_251_o5	0,0949 ±	0,0463 A	0,0626 ±	0,0227 B	4,3707	0,0366	Kruskal-Wallis
Planococcaceae	0,0020 ±	0,0033 A	0,0400 ±	0,0743 A	2,5899	0,1075	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae	0,0696 ±	0,0222 A	0,0598 ±	0,0182 A	1,4162	0,2340	Kruskal-Wallis
RF39	0,0059 ±	0,0052 A	0,0048 ±	0,0030 A	0,0166	0,8976	Kruskal-Wallis
Rikenellaceae	0,0604 ±	0,0194 A	0,0537 ±	0,0181 A	0,931	0,3346	Kruskal-Wallis
Ruminococcaceae	0,0355 ±	0,0174 A	0,0273 ±	0,0105 A	1,3408	0,2469	Kruskal-Wallis
Spirochaetaceae	0,0307 ±	0,0193 A	0,0221 ±	0,0085 A	1,1959	0,2742	Kruskal-Wallis
UCG_010	0,0149 ±	0,0070 A	0,0154 ±	0,0047 A	0,0437	0,8344	Kruskal-Wallis
WCHB1_41	0,1183 ±	0,0654 A	0,1086 ±	0,0636 A	0,5472	0,4594	Kruskal-Wallis
Others	0,0566 ±	0,0156 A	0,0605 ±	0,0336 A	0,2486	0,6181	Kruskal-Wallis

**Tabela 6.** Comparação da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos entre os protocolos de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato (MFEL).

Genero	0 Horas / Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*				Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	IET		MLSS				
Phascolarctobacterium	0,0062 ±	0,007 B	0,0214 ±	0,0132 A	12,98	0,0003	Kruskal-Wallis
Christensenellaceae_R7_group	0,0535 ±	0,0228 A	0,0455 ±	0,019 A	0,68	0,4083	Kruskal-Wallis
Eggerthellaceae_uncultured	0,0115 ±	0,004 A	0,014 ±	0,0069 A	0,55	0,4603	Kruskal-Wallis
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0278 ±	0,0094 A	0,0265 ±	0,01 A	0,15	0,7038	F
F082	0,0096 ±	0,0078 A	0,0167 ±	0,0121 A	3,04	0,0814	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae	0,0724 ±	0,016 A	0,081 ±	0,0186 A	1,74	0,1949	F
Eubacterium_hallii_group	0,0139 ±	0,0063 A	0,0109 ±	0,0064 A	1,81	0,179	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae_AC2044_group	0,0292 ±	0,0099 A	0,0347 ±	0,0112 A	1,54	0,2149	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae_UCG_009	0,0181 ±	0,0089 A	0,016 ±	0,0097 A	1,36	0,2434	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae_XPB1014_group	0,0359 ±	0,0157 A	0,0296 ±	0,0121 A	1,36	0,2434	Kruskal-Wallis
Marvinbryantia	0,0088 ±	0,0034 B	0,0143 ±	0,0085 A	3,92	0,0479	Kruskal-Wallis
Methanobrevibacter	0,0292 ±	0,0233 A	0,0327 ±	0,0284 A	0,02	0,8826	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae_NK4A214_group	0,0493 ±	0,008 A	0,0379 ±	0,0096 B	11,61	0,0015	F
Oscillospiraceae_UCG_002	0,0113 ±	0,007 A	0,0112 ±	0,0075 A	0,06	0,8132	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae_UCG_005	0,0133 ±	0,0045 A	0,0171 ±	0,0084 A	1,61	0,2041	Kruskal-Wallis
p_251_o5	0,0682 ±	0,0364 A	0,0723 ±	0,0354 A	0,04	0,8362	Kruskal-Wallis
Planococcaceae	0,0062 ±	0,0087 A	0,0084 ±	0,0227 A	3,24	0,0719	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae_UCG_001	0,0119 ±	0,0041 A	0,018 ±	0,007 B	7,71	0,0055	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae_UCG_003	0,0203 ±	0,009 A	0,0199 ±	0,0081 A	0,01	0,906	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae_UCG_004	0,0117 ±	0,0071 A	0,011 ±	0,0063 A	0,07	0,7873	F
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,0519 ±	0,0215 A	0,0487 ±	0,0166 A	0,04	0,8362	Kruskal-Wallis
Ruminococcus	0,0124 ±	0,0102 A	0,0179 ±	0,013 A	1,4	0,2375	Kruskal-Wallis
Treponema	0,0218 ±	0,0126 A	0,0254 ±	0,0134 A	0,84	0,3599	Kruskal-Wallis
UCG_010	0,0153 ±	0,0049 A	0,0155 ±	0,005 A	0,02	0,8895	F
WCHB1_41	0,1335 ±	0,0633 A	0,117 ±	0,0641 A	0,71	0,4	Kruskal-Wallis
Others	0,2567 ±	0,0384 A	0,2363 ±	0,0437 A	1,75	0,1931	F

Genero	24 Horas / Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	IET			MLSS					
Phascolarctobacterium	0,0188 ±	0,0145 A	0,0215 ±	0,0088 B	1,26	0,2622	Kruskal-Wallis		
Christensenellaceae_R7_group	0,0467 ±	0,0182 A	0,0462 ±	0,0126 A	0,04	0,8405	Kruskal-Wallis		
Eggerthellaceae_uncultured	0,0102 ±	0,004 B	0,0149 ±	0,0055 A	6,47	0,0109	Kruskal-Wallis		
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0258 ±	0,0105 A	0,0287 ±	0,0087 A	0,79	0,3808	F		
F082	0,0125 ±	0,0149 B	0,0198 ±	0,0138 A	4,53	0,0334	Kruskal-Wallis		
Lachnospiraceae	0,0762 ±	0,0269 A	0,0822 ±	0,0233 A	0,48	0,4906	F		
Eubacterium_hallii_group	0,01 ±	0,0041 A	0,0105 ±	0,0047 A	0	0,9771	Kruskal-Wallis		
Lachnospiraceae_AC2044_group	0,0361 ±	0,0142 A	0,0339 ±	0,0122 A	0,19	0,6663	Kruskal-Wallis		
Lachnospiraceae_UCG_009	0,0184 ±	0,0073 A	0,0167 ±	0,0111 A	1,79	0,1813	Kruskal-Wallis		
Lachnospiraceae_XPB1014_group	0,0289 ±	0,0129 A	0,0301 ±	0,0143 A	0	0,9771	Kruskal-Wallis		
Marvinbryantia	0,0111 ±	0,0042 A	0,0147 ±	0,008 A	1,13	0,2875	Kruskal-Wallis		
Methanobrevibacter	0,023 ±	0,0266 B	0,0308 ±	0,0174 A	4,28	0,0385	Kruskal-Wallis		
Oscillospiraceae_NK4A214_group	0,0407 ±	0,0086 A	0,0394 ±	0,0102 A	0,12	0,7315	F		
Oscillospiraceae_UCG_002	0,0141 ±	0,0114 A	0,0126 ±	0,0097 A	0,1	0,7518	Kruskal-Wallis		
Oscillospiraceae_UCG_005	0,0154 ±	0,005 A	0,0158 ±	0,0066 A	0	0,9771	Kruskal-Wallis		
p_251_o5	0,0679 ±	0,0345 A	0,0608 ±	0,026 A	0,24	0,625	Kruskal-Wallis		
Planococcaceae	0,0009 ±	0,002 A	0,0102 ±	0,0384 A	1,89	0,1693	Kruskal-Wallis		
Prevotellaceae_UCG_001	0,0148 ±	0,0053 A	0,0167 ±	0,0066 A	0,79	0,3728	Kruskal-Wallis		
Prevotellaceae_UCG_003	0,0203 ±	0,0075 A	0,0181 ±	0,0077 A	0,93	0,3355	Kruskal-Wallis		
Prevotellaceae_UCG_004	0,0144 ±	0,0084 A	0,0118 ±	0,006 A	1,18	0,2836	F		
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,0489 ±	0,0133 A	0,0476 ±	0,0181 A	0,16	0,6873	Kruskal-Wallis		
Ruminococcus	0,0265 ±	0,0207 A	0,0175 ±	0,0106 A	1,6	0,2059	Kruskal-Wallis		
Treponema	0,0303 ±	0,0197 A	0,0225 ±	0,0114 A	1,13	0,2875	Kruskal-Wallis		
UCG_010	0,0171 ±	0,0058 A	0,0166 ±	0,0041 A	0,11	0,7453	F		
WCHB1_41	0,1287 ±	0,078 A	0,1209 ±	0,0555 A	0	1	Kruskal-Wallis		
Others	0,2425 ±	0,0313 A	0,2395 ±	0,0417 A	0,04	0,8364	F		

Genero	48 Horas / Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	IET			MLSS					
Phascolarctobacterium	0,0106 ±	0,0086 B	0,025 ±	0,0119 A	10,762	0,001	Kruskal-Wallis		
Christensenellaceae_R7_group	0,0413 ±	0,0228 A	0,0466 ±	0,0176 A	0,9941	0,3187	Kruskal-Wallis		
Eggerthellaceae_uncultured	0,0091 ±	0,0045 B	0,0162 ±	0,0068 A	6,9559	0,0084	Kruskal-Wallis		
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0227 ±	0,0117 A	0,0269 ±	0,0089 A	1,4157	0,2417	F		
F082	0,0127 ±	0,0094 A	0,0186 ±	0,0122 A	1,8248	0,1767	Kruskal-Wallis		
Lachnospiraceae	0,0848 ±	0,0223 A	0,0782 ±	0,0156 A	1,0871	0,3039	F		
Eubacterium_hallii_group	0,012 ±	0,0073 A	0,0108 ±	0,006 A	0,0934	0,7599	Kruskal-Wallis		
Lachnospiraceae_AC2044_group	0,0384 ±	0,013 A	0,0329 ±	0,0097 A	1,1959	0,2742	Kruskal-Wallis		
Lachnospiraceae_UCG_009	0,0164 ±	0,0098 A	0,0153 ±	0,0088 A	0,4138	0,52	Kruskal-Wallis		
Lachnospiraceae_XPB1014_group	0,0271 ±	0,014 A	0,0301 ±	0,0118 A	1,1266	0,2885	Kruskal-Wallis		
Marvinbryantia	0,0113 ±	0,005 A	0,015 ±	0,0091 A	1,0593	0,3034	Kruskal-Wallis		
Methanobrevibacter	0,0152 ±	0,0104 B	0,0393 ±	0,0288 A	8,5666	0,0034	Kruskal-Wallis		
Oscillospiraceae_NK4A214_group	0,0387 ±	0,0122 A	0,0362 ±	0,0082 A	0,5268	0,4725	F		
Oscillospiraceae_UCG_002	0,0117 ±	0,0088 A	0,0099 ±	0,0066 A	0,299	0,5845	Kruskal-Wallis		
Oscillospiraceae_UCG_005	0,0193 ±	0,0109 A	0,0157 ±	0,0068 A	0,4139	0,52	Kruskal-Wallis		
p_251_o5	0,0949 ±	0,0463 A	0,0626 ±	0,0227 B	4,3707	0,0366	Kruskal-Wallis		
Planococcaceae	0,0001 ±	0,0002 B	0,027 ±	0,0515 A	4,9119	0,0267	Kruskal-Wallis		
Prevotellaceae_UCG_001	0,0196 ±	0,0093 A	0,0171 ±	0,0064 A	0,0838	0,7722	Kruskal-Wallis		
Prevotellaceae_UCG_003	0,0212 ±	0,0102 A	0,0187 ±	0,0068 A	0,2028	0,6525	Kruskal-Wallis		
Prevotellaceae_UCG_004	0,0102 ±	0,0055 A	0,0119 ±	0,0069 A	0,4931	0,4869	F		
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,05 ±	0,0166 A	0,0451 ±	0,0169 A	0,5007	0,4792	Kruskal-Wallis		
Ruminococcus	0,0258 ±	0,018 A	0,0145 ±	0,0084 A	2,6907	0,1009	Kruskal-Wallis		
Treponema	0,0306 ±	0,0192 A	0,022 ±	0,0084 A	1,3407	0,2469	Kruskal-Wallis		
UCG_010	0,0149 ±	0,007 A	0,0154 ±	0,0047 A	0,0602	0,8075	F		
WCHB1_41	0,1183 ±	0,0654 A	0,1086 ±	0,0636 A	0,5472	0,4594	Kruskal-Wallis		
Others	0,2431 ±	0,0574 A	0,2403 ±	0,0421 A	0,0273	0,8696	F		

**Tabela 7.** Comparação da alfa diversidade microbiana intestinal entre os protocolos de esforço incremental (IET) e máxima fase estável do lactato (MLSS) nos diferentes tempos. IET\_Start: antes do teste de esforço incremental (TEI); IET24H e IET48H: 24h e 48h após o TEI, respectivamente; MLSS\_Start: antes da sessão da máxima fase estável do lactato (MFEL); MLSS24H: 24h após a MFEL.

Group	pval	p.adj
MLSST24H vs IET48H	0,00039014	0,0058521
MLSST24H vs IET0H	0,0036883	0,027663
MLSST24H vs MLSST0H	0,0086786	0,043393

**Tabela 8.** Comparação da abundância relativa dos principais filos bacterianos entre máxima fase estável do lactato (MLSS) e do lactato excedido (MLSSLACEX).

FILO	Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*			Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	MLSS	MLSSLACE	MLSS_sta			
Others	0,0070 ± 0,0025 A	0,0076 ± 0,0028 A	0,0081 ± 0,0050 A	0,71	0,7029	Kruskal-Wallis
Actinobacteriota	0,0410 ± 0,0261 A	0,0336 ± 0,0250 A	0,0152 ± 0,0106 B	3,17	0,0467	Tukey
Bacteroidota	0,0015 ± 0,0019 B	0,0027 ± 0,0026 B	0,0063 ± 0,0061 A	7,88	0,0007	Tukey
Euryarchaeota	0,5545 ± 0,0592 A	0,5287 ± 0,0504 A	0,5088 ± 0,0567 B	11,21	0,0037	Kruskal-Wallis
Fibrobacterota	0,0032 ± 0,0037 B	0,0048 ± 0,0060 A	0,0018 ± 0,0024 C	11,65	0,0029	Kruskal-Wallis
Firmicutes	0,0027 ± 0,0012 B	0,0029 ± 0,0019 A	0,0017 ± 0,0011 C	3,55	0,0326	Tukey
Halobacterota	0,0185 ± 0,0359 A	0,0072 ± 0,0075 A	0,0096 ± 0,0074 A	2,67	0,2632	Kruskal-Wallis
Planctomycetota	0,0224 ± 0,0096 A	0,0229 ± 0,0100 A	0,0311 ± 0,0197 A	2,24	0,1119	Tukey
Proteobacteria	0,1088 ± 0,0593 A	0,1360 ± 0,0572 A	0,1252 ± 0,0645 A	1,07	0,5855	Kruskal-Wallis
Spirochaetota	0,0250 ± 0,0090 A	0,0245 ± 0,0086 A	0,0174 ± 0,0088 A	1,16	0,5605	Kruskal-Wallis
Verrucomicrobiota	0,2154 ± 0,0376 A	0,2291 ± 0,0381 A	0,2750 ± 0,0642 A	5,50	0,0640	Kruskal-Wallis

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste indicado ( $p \geq 0,05$ )

**Tabela 9.** Comparação da abundância relativa das principais famílias bacterianas entre os estímulos da máxima fase estável do lactato (MLSS) e do lactato excedido (MLSSLACEX).

Família	Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	MLSS		MLSSLACE		MLSS_sta				
Acidaminococcaceae	0,0235 ± 0,0086	A	0,0242 ± 0,0121	A	0,0109 ± 0,0090	B	12,01	0,0025	Kruskal-Wallis
Akkermansiaceae	0,0138 ± 0,0140	A	0,0087 ± 0,0088	A	0,0059 ± 0,0063	A	4,08	0,1298	Kruskal-Wallis
Anaerovoracaceae	0,0324 ± 0,0084	A	0,0314 ± 0,0052	A	0,0267 ± 0,0115	A	2,33	0,3121	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_RF16_group	0,0052 ± 0,0047	A	0,0072 ± 0,0060	A	0,0111 ± 0,0119	A	5,75	0,0565	Kruskal-Wallis
Bacteroidales_UCG_001	0,0077 ± 0,0061	A	0,0086 ± 0,0069	A	0,0076 ± 0,0063	A	1,28	0,5274	Kruskal-Wallis
Christensenellaceae	0,0487 ± 0,0164	A	0,0480 ± 0,0156	A	0,0517 ± 0,0323	A	0,34	0,8457	Kruskal-Wallis
Eggerthellaceae	0,0211 ± 0,0088	A	0,0205 ± 0,0080	B	0,0136 ± 0,0069	C	6,63	0,0363	Kruskal-Wallis
Erysipelotrichaceae	0,0097 ± 0,0041	A	0,0106 ± 0,0036	A	0,0120 ± 0,0069	A	1,18	0,3112	Tukey
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0266 ± 0,0082	A	0,0288 ± 0,0089	A	0,0223 ± 0,0120	A	4,53	0,1038	Kruskal-Wallis
F082	0,0206 ± 0,0141	A	0,0182 ± 0,0123	A	0,0128 ± 0,0091	A	2,48	0,2895	Kruskal-Wallis
Hungateiclostridiaceae	0,0072 ± 0,0041	A	0,0083 ± 0,0047	A	0,0089 ± 0,0050	A	1,69	0,4293	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae	0,2087 ± 0,0579	A	0,2177 ± 0,0429	A	0,2206 ± 0,0446	A	0,48	0,7855	Kruskal-Wallis
Methanobacteriaceae	0,0410 ± 0,0261	A	0,0336 ± 0,0250	A	0,0152 ± 0,0106	B	11,21	0,0037	Kruskal-Wallis
Moraxellaceae	0,0140 ± 0,0365	A	0,0018 ± 0,0074	B	0,0010 ± 0,0029	B	3,33	0,0403	Tukey
Oscillospiraceae	0,0782 ± 0,0210	A	0,0737 ± 0,0166	A	0,0771 ± 0,0197	A	0,83	0,6604	Kruskal-Wallis
p_251_o5	0,0592 ± 0,0232	A	0,0631 ± 0,0245	A	0,0956 ± 0,0464	A	6,02	0,0493	Kruskal-Wallis
Planococcaceae	0,0428 ± 0,0874	A	0,0155 ± 0,0379	A	0,0019 ± 0,0033	A	4,57	0,1019	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae	0,0548 ± 0,0161	B	0,0638 ± 0,0172	AB	0,0701 ± 0,0236	A	7,73	0,0210	Kruskal-Wallis
RF39	0,0052 ± 0,0026	A	0,0051 ± 0,0029	A	0,0059 ± 0,0053	A	0,26	0,7748	Tukey
Rikenellaceae	0,0562 ± 0,0216	A	0,0561 ± 0,0161	A	0,0605 ± 0,0187	A	0,56	0,7542	Kruskal-Wallis
Ruminococcaceae	0,0302 ± 0,0098	A	0,0272 ± 0,0112	A	0,0356 ± 0,0171	A	3,64	0,1619	Kruskal-Wallis
Spirochaetaceae	0,0223 ± 0,0096	A	0,0228 ± 0,0100	A	0,0310 ± 0,0197	A	1,31	0,5200	Kruskal-Wallis
UCG_010	0,0162 ± 0,0050	A	0,0158 ± 0,0040	A	0,0150 ± 0,0066	A	0,25	0,8816	Kruskal-Wallis
WCHB1_41	0,0950 ± 0,0578	B	0,1273 ± 0,0591	A	0,1193 ± 0,0664	AB	7,32	0,0257	Kruskal-Wallis
Others	0,0551 ± 0,0112	A	0,0561 ± 0,0125	A	0,0610 ± 0,0203	A	0,59	0,7444	Kruskal-Wallis

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste indicado ( $p \geq 0,05$ )

**Tabela 10.** Comparação da abundância relativa dos principais gêneros bacterianos entre os estímulos da máxima fase estável do lactato (MLSS) e do lactato excedido (MLSSLACEX).

Genero	Tratamentos / Médias e Desvios Padrões*						Valor do Teste	Probab. do Teste	Teste
	MLSS		MLSSLACE		MLSS_sta				
Phascolarctobacterium	0,0235 ± 0,0086	A	0,0242 ± 0,0121	A	0,0109 ± 0,0090	B	6,57	0,0022	Tukey
Christensenellaceae_R7_group	0,0471 ± 0,0161	A	0,0465 ± 0,0153	A	0,0408 ± 0,0230	A	2,47	0,2915	Kruskal-Wallis
Eggerthellaceae_uncultured	0,0158 ± 0,0069	A	0,0156 ± 0,0059	A	0,0092 ± 0,0047	B	9,52	0,0086	Kruskal-Wallis
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0,0266 ± 0,0082	A	0,0288 ± 0,0089	A	0,0223 ± 0,0120	A	2,33	0,1029	Tukey
F082	0,0206 ± 0,0141	A	0,0182 ± 0,0123	A	0,0128 ± 0,0091	A	2,48	0,2895	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae	0,0773 ± 0,0212	A	0,0816 ± 0,0178	A	0,0850 ± 0,0226	A	0,77	0,4672	Tukey
Eubacterium_hallii_group	0,0115 ± 0,0061	A	0,0100 ± 0,0050	A	0,0121 ± 0,0076	A	1,02	0,6005	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae_AC2044_group	0,0325 ± 0,0105	A	0,0339 ± 0,0110	A	0,0381 ± 0,0130	A	0,97	0,3837	Tukey
Lachnospiraceae_UCG_009	0,0157 ± 0,0108	A	0,0161 ± 0,0094	A	0,0160 ± 0,0101	A	0,45	0,7970	Kruskal-Wallis
Lachnospiraceae_XPB1014_group	0,0315 ± 0,0155	A	0,0295 ± 0,0107	A	0,0274 ± 0,0141	A	0,95	0,6221	Kruskal-Wallis
Marvinbryantia	0,0138 ± 0,0076	A	0,0157 ± 0,0092	A	0,0116 ± 0,0054	A	1,74	0,4184	Kruskal-Wallis
Methanobrevibacter	0,0410 ± 0,0261	A	0,0336 ± 0,0250	A	0,0152 ± 0,0106	B	11,21	0,0037	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae_NK4A214_group	0,0391 ± 0,0107	A	0,0371 ± 0,0081	A	0,0384 ± 0,0122	A	0,45	0,6420	Tukey
Oscillospiraceae_UCG_002	0,0123 ± 0,0101	A	0,0107 ± 0,0068	A	0,0112 ± 0,0081	A	0,03	0,9844	Kruskal-Wallis
Oscillospiraceae_UCG_005	0,0158 ± 0,0064	A	0,0159 ± 0,0070	A	0,0189 ± 0,0109	A	0,28	0,8697	Kruskal-Wallis
p_251_o5	0,0592 ± 0,0232	A	0,0631 ± 0,0245	A	0,0956 ± 0,0464	A	6,02	0,0493	Kruskal-Wallis
Planococcaceae	0,0289 ± 0,0597	A	0,0093 ± 0,0229	B	0,0002 ± 0,0002	B	9,65	0,0080	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae_UCG_001	0,0150 ± 0,0070	A	0,0182 ± 0,0055	A	0,0194 ± 0,0096	A	2,91	0,0597	Tukey
Prevotellaceae_UCG_003	0,0180 ± 0,0075	A	0,0189 ± 0,0067	A	0,0220 ± 0,0113	A	1,76	0,4158	Kruskal-Wallis
Prevotellaceae_UCG_004	0,0102 ± 0,0053	A	0,0127 ± 0,0069	A	0,0099 ± 0,0053	A	1,94	0,1501	Tukey
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,0490 ± 0,0210	A	0,0456 ± 0,0146	A	0,0502 ± 0,0168	A	0,57	0,5702	Tukey
Ruminococcus	0,0154 ± 0,0069	A	0,0159 ± 0,0106	A	0,0257 ± 0,0178	A	2,61	0,2708	Kruskal-Wallis
Treponema	0,0222 ± 0,0096	A	0,0226 ± 0,0099	A	0,0308 ± 0,0197	A	1,39	0,4988	Kruskal-Wallis
UCG_010	0,0162 ± 0,0050	A	0,0158 ± 0,0040	A	0,0150 ± 0,0066	A	0,27	0,7644	Tukey
WCHB1_41	0,0950 ± 0,0578	B	0,1273 ± 0,0591	A	0,1193 ± 0,0664	AB	7,32	0,0257	Kruskal-Wallis
Others	0,2469 ± 0,0466	A	0,2333 ± 0,0356	A	0,2418 ± 0,0573	A	1,06	0,3499	Tukey

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste indicado ( $p \geq 0,05$ )

**Tabela 11.** Comparação da alfa diversidade microbiana intestinal da MFEL: MLSS\_Start: antes da sessão da máxima fase estável do lactato (MFEL); MLSS: sessões onde o lactato permaneceu estável; MLSSLACEX: sessões onde o lactato excedeu o limiar.

Group	pval	p.adj
MLSS vs MLSSSstart	0,00093819	0,0028146
MLSSLACEX vs MLSSSstart	0,010909	0,016363
MLSS vs MLSSLACEX	0,38152	0,38152

**Tabela 12.** Comparação da beta diversidade microbiana intestinal da MFEL: MLSS\_Start, MLSS e MLSSLACEX pelo índice de Bray-Curtis. MLSS\_Start: antes da sessão da máxima fase estável do lactato (MFEL); MLSS: sessões onde o lactato permaneceu estável; MLSSLACEX: sessões onde o lactato excedeu o limiar.

Group	pval	p.adj
MLSS vs MLSSSstart	0,009	0,027
MLSS vs MLSSLACEX	0,033	0,0495
MLSSLACEX vs MLSSSstart	0,079	0,079

**Tabela 13.** Variação do pH fecal em equinos submetidos a testes de esforço incremental (TEI) e máxima fase estável do lactato (MFEL) ao longo de 48 horas.

Dia	Tratamentos / Médias e Desvios padrões*		Valor de F	P > F
	IET	MLSS		
0	7,10 ± 0,28 A	6,94 ± 0,37 A	1,373	0,2482
24	6,53 ± 0,28 B	7,02 ± 0,29 A	22,72	<0,0001
48	6,45 ± 0,31 B	7,08 ± 0,30 A	32,22	<0,0001

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste F ( $p \geq 0,05$ )