

ALBERTO MACHADO DA PONTE NETO

Um estudo randomizado, simples-cego controlado por placebo de transplante de microbiota fecal em pacientes com síndrome metabólica e obesidade

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Guimarães
Hourneaux de Moura

**São Paulo
2023**

ALBERTO MACHADO DA PONTE NETO

Um estudo randomizado, simples-cego controlado por placebo de transplante de microbiota fecal em pacientes com síndrome metabólica e obesidade

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Guimarães
Hourneaux de Moura

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ponte Neto, Alberto Machado da
Um estudo randomizado, simples-cego controlado
por placebo de transplante de microbiota fecal em
pacientes com síndrome metabólica e obesidade /
Alberto Machado da Ponte Neto. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Eduardo Guimarães Hourneaux de Moura.

Descritores: 1.Microbioma gastrointestinal
2.Microbiota 3.Transplante de microbiota fecal
4.Síndrome metabólica 5.Obesidade 6.Ensaio clínico
controlado aleatório 7.Estado pré-diabético
8.Diabetes mellitus

USP/FM/DBD-401/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais, Alberto e Luisalice, que abdicaram de muitas coisas para me conceder a melhor educação possível, me dando todo o amor, incentivo e apoio neste caminho.

A minha amada esposa Lara, que, com todo o amor, me apoia diariamente me incentivando a crescer.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Ivan Ceconelo, Luiz Augusto de Carneiro D'Albuquerque e Flair Carrilho, que são o esteio deste importante Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Guimarães Hourneaux de Moura, meu orientador e chefe do Serviço de Endoscopia Gastrointestinal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo enorme incentivo para realização dessa dissertação e pela competência, dedicação e comprometimento ao ensino no Serviço de Endoscopia.

A Prof. Dra. Regina Rie Imada., Prof. Dr. Carlos Alberto Malheiros e Prof. Dra. Raquel Susana Matos de Miranda Torrinhas, membros da banca de qualificação desta dissertação, pelas contribuições neste trabalho científico.

Ao Prof. Dr. Paulo Sakai, por ser um exemplo e inspiração para todos nós médicos, especialmente na área da endoscopia.

Ao Prof. Dr. Wanderlei Marques Bernardo, pelas aulas e ensino que tornaram possíveis a realização desta dissertação.

Aos meus pais por serem exemplos de amor e dedicação na família e no trabalho.

Aos assistentes do Serviço de Endoscopia Gastrointestinal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Mestres incomparáveis que tanto me ensinaram.

Aos meus colegas de residência, que me apoiaram nessa jornada.

A toda equipe de enfermagem, secretaria e limpeza do Serviço de Endoscopia Gastrointestinal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade

de São Paulo, por toda ajuda e alegria com que trabalhavam diariamente.

À Maria Helena Vargas, pela disponibilidade, cuidado na formatação desta dissertação.

À Vilma Libério, secretária da Pós-Graduação do Programa de Ciências em Gastroenterologia, pela disponibilidade e ajuda nessa jornada.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	8
3 MÉTODOS.....	10
3.1 Concepção do Estudo	11
3.2 População de Estudo	12
3.3 Coleta de Amostras	13
3.4 Preparação da Solução de Microbiota.....	13
3.5 Procedimento	14
3.6 Acompanhamento.....	14
3.7 Extração de DNA e Sequenciamento de Extremidade Parada	14
3.7.1 Análise bioinformática.....	16
3.8 Análise Estatística	17
4 RESULTADOS.....	18
4.1 Participantes.....	19
4.2 Características Gerais e Dados Clínicos.....	19
4.3 Acompanhamento Clínico	21
4.4 Análise de Microbiomas.....	22
4.4 Diversidade Alfa e Beta.....	25
5 DISCUSSÃO.....	27
5.1 Limitações.....	31
6 CONCLUSÃO.....	34
7 ANEXOS	36
8 REFERÊNCIAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	- <i>American Diabetes Association</i>
CDI	- Infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
EUA	- Estados Unidos da América
IDF	- International Diabetes Federation
IMC	- Índice de massa corporal
NCEP-ATP III	- <i>National Cholesterol Education Program</i>
SM	- Síndrome metabólica
TMF	- Transplante de microbiota fecal
WHO	- <i>World Health Organization</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Peso corporal ao longo do estudo, por grupo	20
Tabela 2 -	Níveis de hemoglobina glicada ao longo do estudo, por grupo	21
Tabela 3 -	Abundância de fillos ao longo do estudo, por grupos.....	24
Tabela 4 -	Abundância de gêneros ao longo do estudo, por grupos.....	24

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Abundância relativa	23
Gráfico 2 -	Índices de diversidade alfa, por grupo, ao longo do tempo ..	25
Gráfico 3 -	Diversidade beta da comunidade microbiana.....	26

RESUMO

Ponte Neto AM. Um estudo randomizado, simples-cego controlado por placebo de transplante de microbiota fecal em pacientes com síndrome metabólica e obesidade [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: a síndrome metabólica é uma doença multifatorial, e a microbiota intestinal pode desempenhar um papel em sua patogênese. Obesidade, especialmente obesidade abdominal, é associada a resistência à insulina, frequentemente aumentando o risco de diabetes mellitus tipo 2, disfunção endotelial vascular, alteração do perfil lipídico, hipertensão e inflamação vascular, todos os quais promovem o desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica. **Objetivos:** avaliar os resultados do TMF em pacientes com síndrome metabólica. **Métodos:** este foi um estudo randomizado, prospectivo, simples-cego controlado por placebo comparando transplante de microbiota fecal (TMF) e um procedimento simulado em pacientes com síndrome metabólica. Foram selecionadas 32 pacientes mulheres, que foram divididas em oito grupos de quatro pacientes cada. Todas as pacientes foram submetidas à endoscopia gastrointestinal superior. Em cada um destes grupos de quatro, duas pacientes foram aleatoriamente alocadas para serem submetidas a TMF, as outras duas pacientes receberam infusão de solução salina. As pacientes foram acompanhadas por 1 ano depois dos procedimentos, durante este tempo dados antropométricos, bioquímicos e bioimpedância foram coletados. As pacientes também tinham consultas periódicas com um nutricionista e endocrinologista. O desfecho primário é a avaliação da mudança na microbiota intestinal dos pacientes submetidos ao TMF. **Resultados:** houve evidência de uma mudança na composição da microbiota pós-procedimento nas pacientes que foram submetidas a TMF em relação aos que foi observado nas pacientes submetidas ao procedimento simulado. Entretanto, não foram encontradas diferença entre os dois grupos em termos de parâmetros clínicos avaliados. **Conclusões:** Estudos com amostras maiores de pacientes devem ser realizados para avaliar os potenciais efeitos do TMF na mudança de parâmetros clínicos em pacientes com síndrome metabólica.

Palavras-chave: Microbioma gastrointestinal. Microbiota. Transplante de microbiota fecal. Síndrome metabólica. Obesidade. Ensaio clínico controlado aleatório. Estado pré-diabético. Diabetes mellitus.

ABSTRACT

Ponte Neto AM. A Randomized placebo-controlled single-blind of fecal microbiota transplantation in patients with metabolic syndrome and obesity [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Background: metabolic syndrome is a multifactorial disease, and the gut microbiota may play a role in its pathogenesis. Obesity, especially abdominal obesity, is associated with insulin resistance, often increasing the risk of type 2 diabetes mellitus, vascular endothelial dysfunction, an abnormal lipid profile, hypertension, and vascular inflammation, all of which promote the development of atherosclerotic cardiovascular disease. Objectives: evaluate the results of fecal microbiota transplantation (FMT) in patients with metabolic syndrome. Methods: this was a randomized, prospective, single-blind, placebo-controlled study comparing fecal microbiota transplantation (FMT) and a sham procedure in patients with metabolic syndrome. We selected 32 female patients, who were divided into eight groups of four patients each. All of the patients were submitted to upper gastrointestinal endoscopy. In each group, two patients were randomly allocated to undergo FMT, the two other patients receiving saline infusion. The patients were followed for 1 year after the procedures, during which time anthropometric, bioimpedance, and biochemical data were collected. The patients also had periodic consultations with a nutritionist and an endocrinologist. The primary end point was a change in the gut microbiota. Results: there was evidence of a postprocedural change in microbiota composition in the patients who underwent FMT in relation to that observed in those who underwent the sham procedure. However, we found no difference between the two groups in terms of the clinical parameters evaluated. Conclusions: studies with larger patient samples should be carried out in order to assess the potential effects of FMT on clinical parameters.

Keywords: Gastrointestinal microbiome. Microbiota. Fecal microbiota transplantation. Metabolic syndrome. Obesity. Randomized controlled trial. Prediabetic state. Diabetes

mellitus.

1 INTRODUÇÃO

A prevalência da síndrome metabólica (SM) é paralela à da obesidade e diabetes – até 45% da população mundial – e espera-se que aumente como consequência do aumento da longevidade e estilos de vida pouco saudáveis (Alberti *et al.*, 2016; Saklayen, 2018). A obesidade tornou-se um dos problemas de saúde pública mais importantes nos Estados Unidos da América (EUA) e em diversos outros países desenvolvidos, assim como em economias emergentes. O aumento na prevalência de obesidade resultou em aumentos na incidência de doenças associadas, como diabetes, dislipidemia e hipertensão (Strauss e Pollack, 2001; Ogden *et al.*, 2016; GBD 2015 Obesity Collaborators *et al.*, 2017).

A obesidade, especialmente a obesidade abdominal, está associada à resistência à insulina, muitas vezes aumentando o risco de diabetes tipo 2, disfunção endotelial vascular, perfil lipídico alterado, hipertensão e inflamação vascular, todos os quais promovem o desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica (DeFronzo e Ferrannini, 1991; Reaven, 1997; Lindsay e Howard, 2004). Indivíduos nos quais os fatores de risco metabólicos para diabetes tipo 2 coexistem com aqueles para doença cardiovascular são classificados como portadores de síndrome metabólica (Eckel *et al.*, 2005).

Existem algumas definições de síndrome metabólica na literatura que foram atualizadas desde sua primeira publicação em 1998 por um grupo de consultores da *World Health Organization* (WHO), que propôs uma definição que poderia ser

modificada quando mais dados estivessem disponíveis. Os autores dessa definição foram flexíveis quanto a possíveis revisões nela, deixando claro que ela poderia ser modificada quando mais informações científicas estivessem disponíveis. Portanto, em 1999, a definição foi revisada para atender a novos critérios diagnósticos de hipertensão arterial que passaram a ser adotados pela WHO (1999). A complexidade do método, porém, para determinar a resistência à insulina (*clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico) e o uso do teste de tolerância à glicose tornaram a definição da WHO pouco utilizada na prática clínica.

Em 2001, nos EUA, um grupo de cardiologistas e endocrinologistas do *National Cholesterol Education Program* (NCEP-ATP III) propôs uma nova definição para SM que não incluía a determinação direta da resistência à insulina (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001). Segundo esse grupo, uma pessoa é considerada portadora da SM quando apresenta três ou cinco componentes indicados, em qualquer ordem de agrupação.

Quadro 1 - Critérios diagnósticos para síndrome metabólica conforme NCEP-ATP III

Presença de três ou mais dos seguintes fatores de risco	
Triglicérides	≥
HDL-colesterol	
Homem	< 40 mg/dL
Mulher	< 50 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130/85 mmHg
Obesidade central	
Homem	Circunferência da cintura ≥ 102 cm
Mulher	Circunferência da cintura ≥ 88 cm
Glicose de jejum	≥ 110 mg/dL ≥ 100 mg/dL*

A definição de 2001 usava o critério para hiperglicemia quando a glicemia de jejum era ≥ 110 mg/dL; a definição de 2005 usava o critério para hiperglicemia quando a glicemia de jejum era de ≥ 100 mg/dL.

Fonte: adaptado de Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001).

O NCEP-ATP III definia originariamente a hiperglicemia como glicemia de jejum ≥ 110 mg/dL. Em 2005, essa definição foi revisada e passou a adotar a glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL como referência para a hiperglicemia (Grundy *et al.*, 2005), pois esse era o novo ponto de corte recomendado pela *American Diabetes Association* (ADA) (Genuth *et al.*, 2003).

Em 2005, a *International Diabetes Federation* (IDF) promoveu, em Berlim, o I Congresso Internacional de Síndrome Metabólica e Pré-Diabetes, com a finalidade de unificar os critérios diagnósticos existente (Alberti *et al.*, 2006). A definição da síndrome metabólica pela IDF considera a obesidade central, avaliada pela circunferência abdominal, um componente essencial para o diagnóstico da síndrome metabólica, dadas as fortes evidências de associação com a doença cardiovascular e com os outros componentes da síndrome metabólica, levando em conta a diferenciação do risco de acordo com a etnia populacional. Dessa forma, o diagnóstico poderia ser usado em qualquer parte do mundo e comparações posteriores seriam padronizadas e, conseqüentemente, mais adequadas, sendo esta a definição utilizada neste trabalho.

Existem diversas modalidades de tratamento para obesidade e síndrome metabólica. No entanto, o manejo ideal ainda é um desafio, pois múltiplos fatores estão envolvidos em sua fisiopatologia, como predisposição genética, sedentarismo e distribuição específica da gordura corporal (Kahn *et al.*, 2005; Grundy, 2007). Abordagens terapêuticas direcionadas à disbiose e manipulação do microbioma intestinal foram desenvolvidas recentemente. Tais abordagens incluem o uso de prebióticos, probióticos, simbióticos, antibióticos e transplante de microbiota fecal (TMF). Sabe-se que o TMF pode alterar a microbiota intestinal e aumentar sua diversidade, resultando em um microbioma que poderia ajudar a diminuir a gordura corporal e aumentar a sensibilidade à insulina, além de facilitar o tratamento da síndrome metabólica e da obesidade. A microbiota intestinal é composta por trilhões de microrganismos que podem influenciar o organismo humano por diversos mecanismos, tendo sido associada a diversas doenças e condições, incluindo obesidade e síndrome metabólica (Bäckhed *et al.*, 2004; Kahn *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2005; Le Chatelier *et al.*, 2013; Druart *et al.*, 2014; Dao *et al.*, 2016).

Alterações na composição e função microbiana intestinal, comumente referidas como “disbiose”, têm sido associadas a uma variedade de doenças humanas, incluindo infecção por *Clostridioides difficile* (CDI), síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal, diabetes tipo 2, doença cardiovascular e mais recentemente obesidade e síndrome metabólica (Brahe *et al.*, 2016; He e Shi, 2017; Wortelboer *et al.*, 2019). A disbiose da microbiota intestinal foi definida como uma alteração na comunidade bacteriana intestinal, em relação a indivíduos saudáveis, em direção a uma composição microbiana desequilibrada, muitas vezes com mais bactérias “inflamatórias” (ou seja, Proteobactérias), diversidade reduzida e níveis reduzidos de

metabólitos benéficos, como ácidos graxos de cadeia curta (Tamboli *et al.*, 2004; Walker e Lawley, 2013; Machiels *et al.*, 2014). Embora evidências crescentes de modelos de doenças animais tenham descrito potenciais relações causais entre uma microbiota intestinal alterada e a obesidade, não se sabe se a disbiose intestinal na obesidade humana é causadora ou ocorre como consequência, sendo uma questão a ser elucidada (Lapidus *et al.*, 1984; Ohlson *et al.*, 1985). Por exemplo, a análise da microbiota intestinal de camundongos geneticamente obesos, em comparação com suas contrapartes magras, revelou uma menor diversidade de genes microbianos intestinais e maior proporção de bactérias do filo Bacteroidetes em relação as do filo Firmicutes. Camundongos livres de germes colonizados com essa microbiota associada à obesidade mostraram ter maior gordura corporal e absorção de energia em comparação com camundongos colonizados com microbiota magra doadora (Fujioka *et al.*, 1987; Reaven, 1988). Um estudo mais recente de 154 gêmeos humanos revelou que a obesidade estava associada à redução da diversidade bacteriana intestinal, abundância de Bacteroidetes, níveis de butirato e propionato e aminoácidos de cadeia ramificada elevados. A transferência de conteúdo fecal de gêmeos humanos de diferentes fenótipos de obesidade para camundongos livres de germes resultou na adoção de seus fenótipos de doadores humanos (Navas-Molina *et al.*, 2013).

O transplante de microbiota fecal é uma estratégia baseada transplantar bactérias intestinais de um indivíduo para outro visando restaurar o ecossistema microbiano intestinal (Zimmet, 1992; WHO, 1999; Grundy *et al.*, 2005). Nos últimos anos, a TMF tem sido amplamente investigada na CDI, uma doença associada à disbiose intestinal (Bagdasarian *et al.*, 2015; Weingarden e Vaughn, 2017; Nishida *et al.*, 2018). O TMF é uma terapia eficaz para o tratamento da CDI recorrente e reversão

da disbiose microbiana, com aumento da diversidade bacteriana intestinal e diminuição da abundância relativa de Proteobacteria (Balkau e Charles, 1999; Kahn et al., 2005). Dada a evidência de causa potencial entre a microbiota intestinal e a obesidade em estudos com animais, foram feitas tentativas para transplantar a microbiota intestinal de doadores magros e saudáveis para obesos e receptores com síndrome metabólica em testes em humanos. No entanto, até o momento, os benefícios clínicos do uso de TMF para reconstruir os ecossistemas microbianos intestinais em pacientes com obesidade e síndrome metabólica não estão bem estabelecidos.

O objetivo deste estudo foi avaliar os resultados do TMF em pacientes com síndrome metabólica. Para tanto, foi realizado um ensaio clínico randomizado controlado por placebo.

2 OBJETIVO

Avaliar se o transplante de microbiota intestinal em paciente com síndrome metabólica e obesidades grau I e II apresentam benefícios clínicos e laboratoriais quando recebem infusão intestinal de solução com microbiota de doadores eutróficos comparados com a infusão de solução salina 6 semanas e 1 ano após o transplante.

3 MÉTODOS

3.1 Concepção do Estudo

Este foi um ensaio clínico randomizado, simples-cego, controlado por placebo, comparando TMF e um procedimento simulado em pacientes com síndrome metabólica. Foram selecionadas pacientes diagnosticadas com síndrome metabólica de acordo com os critérios da Federação Internacional de Diabetes de 2006 (Alberti *et al.*, 2006). Os critérios adicionais de inclusão foram ser do sexo feminino, ter idade entre 18 e 70 anos e índice de massa corporal (IMC) de 30 kg/m² a 40 kg/m². Foram excluídas as pacientes com cirurgia gastrointestinal prévia, imunodeficiência, tratamento prévio para obesidade e uso de qualquer medicamento para perda de peso, antibióticos ou probióticos nos últimos 3 meses. O desfecho primário foi uma mudança na microbiota intestinal.

Após uma triagem inicial para as características da síndrome metabólica, as pacientes foram encaminhadas para consultas com nutricionista e endocrinologista. Foram analisados dados antropométricos, de bioimpedância e bioquímicos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na cidade de São Paulo, Brasil (Anexo A). Todas as pacientes participantes forneceram consentimento informado por escrito (Anexo B).

3.2 População de Estudo

Pacientes do sexo feminino com obesidades grau I ou II foram recrutadas por meio de anúncio na entrada do Hospital das Clínicas. Foram incluídas 32 pacientes do sexo feminino (faixa etária, 20-69 anos) com obesidade classe I e II (IMC 30-40 kg/m²) e síndrome metabólica. A síndrome metabólica foi definida como glicemia de jejum > 100 mg/dL ou uso de medicações antidiabéticas ou insulina, mais pelo menos dois dos seguintes critérios: triglicerídeos \geq 150 mg/dL; colesterol de lipoproteína de alta densidade < 50 mg/dL (o padrão para mulheres); pressão arterial \geq 130/85 mmHg ou uso de medicação anti-hipertensiva; e obesidade abdominal, definida como circunferência da cintura \geq 80 cm (padrão para mulheres).

Optou-se por utilizar uma única doadora de fezes, na tentativa de manter a mesma diversidade bacteriana para todos os receptores, apesar de nem todas as doações terem sido realizadas no mesmo dia. Para a triagem do doador, utilizou-se o protocolo de van Nood *et al.* (2013) (Anexo C). A doadora (uma mulher de 30 anos) era voluntária e foi inicialmente triada com um questionário sobre doenças transmissíveis. Amostras de fezes e sangue foram coletadas. A amostra de fezes foi rastreada para parasitas, *Clostridium difficile* e bactérias enteropatogênicas. A amostra de sangue foi rastreada para o seguinte: anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana; vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II; hepatite A, B e C; citomegalovírus; Vírus de Epstein Barr; *Treponema pallidum*; *Strongyloides stercoralis*; e *Entamoeba histolytica*. A triagem foi repetida a cada 4 meses durante o período de doação de 1 ano. Imediatamente antes de cada doação, outro questionário foi utilizado para identificar alguma doença recente (van Nood *et al.*, 2013).

3.3 Coleta de Amostras

No dia do procedimento, uma amostra de fezes foi coletada de cada paciente. Na maioria dos casos, as amostras foram coletadas a partir de uma evacuação espontânea da paciente antes do procedimento ou por extração de toque retal após a paciente ter sido sedada. Em uma paciente foi necessária a realização de proctoscopia para obtenção da amostra de fezes, que foi captada com laço. Depois de rotuladas, as amostras de fezes foram armazenadas a -80 °C.

3.4 Preparação da Solução de Microbiota

No dia da doação, a solução de microbiota foi preparada diluindo 200 g de fezes do doador em 500 mL de soro fisiológico estéril. A solução foi agitada, após o que o sobrenadante foi coado e transferido para um frasco estéril (van Nood *et al.*, 2013). Imediatamente após o preparo, a solução de microbiota foi transportada do laboratório para o centro de endoscopia.

3.5 Procedimento

As 32 pacientes foram divididas em oito grupos de quatro pacientes cada. Todas as pacientes foram submetidas à endoscopia digestiva alta. Em cada grupo, duas pacientes foram alocadas aleatoriamente para realizar TMF, as outras duas pacientes receberam infusão de solução salina. Todos os procedimentos foram realizados no centro de endoscopia do Hospital das Clínicas.

Todas as pacientes foram submetidas à endoscopia digestiva alta sob sedação. As infusões foram realizadas com um colonoscópio, que foi avançado além da flexura duodenojejunal e liberou 200 mL da microbiota ou solução salina. Nas pacientes do grupo TMF, a solução foi infundida em até 4 horas após a coleta das fezes do doador.

3.6 Acompanhamento

As pacientes foram acompanhadas por 1 ano após o procedimento, período em que tiveram consultas adicionais com nutricionista e endocrinologista: com 6 semanas e 1 ano. Em cada visita, foram avaliados parâmetros antropométricos, uso de medicamentos, uso de antibióticos e queixas das pacientes. Amostras de fezes coletadas em cada momento (linha de base, 6 semanas e 1 ano) foram analisadas.

Após os procedimentos, as pacientes foram orientadas a aderir a uma dieta diabética padronizada (1000 calorias/dia) e orientadas a manter um diário alimentar por um período de 1 ano. Elas também foram instruídas a não usar probióticos e a informar a equipe de pesquisa se precisassem usar antibióticos.

3.7 Extração de DNA e Sequenciamento de Extremidade Parada

Uma alíquota de 200 mg de fezes de cada paciente foi analisada com o QiaAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada usando os iniciadores V4F (TCGTCGGCAG CCAGTGAGTGTGTATAAGAG ACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e V4R (GTCTCGTGGGCTCGGAGAT GTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Kozich *et al.*, 2013). A amplificação foi realizada em duas etapas com um protocolo de preparação Illumina personalizado (Illumina, San Diego, CA, EUA). As amostras foram reunidas e carregadas em um cartucho de reagente Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA) para sequenciamento de 500 ciclos de extremidade pareada a uma concentração final de 12 pM. A biblioteca foi agrupada a uma densidade de aproximadamente 820 K/mm². Análise de imagem, chamada de base e avaliação de qualidade de dados foram realizadas na plataforma MiSeq. Um controle negativo livre de DNA foi usado e as etapas de reação em cadeia da polimerase foram realizadas. Em um gel, nenhum sinal de amplificação visível foi observado para o controle sem modelo, indicando que a contaminação bacteriana era mínima.

3.7.1 Análise bioinformática

As leituras brutas foram desmultiplexadas e analisadas usando o software QIIME, versão 1.9 (Edgar *et al.*, 2011). O software foi utilizado para remover códigos de barras e sequências de primers, bem como extrair artefatos quiméricos, alinhar sequências, construir matrizes de distância, definir unidades taxonômicas operacionais (para construção de árvores filogenéticas), calcular índices de diversidade e testar hipóteses. Após a remoção dos códigos de barras e primers, foram filtradas as sequências, descartando as *reads* menores que aproximadamente 400 bp. Em seguida, foram verificadas as quimeras, usando USEARCH (Edgar *et al.*, 2011), e foram excluídas as sequências identificadas como quiméricas. As sequências das demais bibliotecas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais, com base em 97% de similaridade com as sequências do banco de dados SILVA, versão 128 (Quast *et al.*, 2013). A abundância relativa das bactérias foi determinada em relação aos principais filos e gêneros que apareceram em pelo menos 1% do total encontrado em ambos os grupos.

Os índices de diversidade alfa e beta foram calculados para cada biblioteca. Para calcular a diversidade alfa, utilizou-se a estimativa de riqueza Chao1 (Chao, 1984), juntamente com os índices de diversidade Shannon e Simpson (Shannon, 1948; Pylro *et al.*, 2014). Para calcular a diversidade beta, construiu-se um gráfico de análise de coordenadas principais com base nas matrizes de distância UniFrac ponderadas e não ponderadas (Lozupone e Knight, 2005; Navas-Molina *et al.*, 2013). As sequências de ácidos nucleicos estão disponíveis no *Sequence Read Archive* (número de acesso, PRJNA766355).

3.8 Análise Estatística

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas, foram observados os valores mínimo e máximo, bem como o cálculo de médias, desvios-padrão e quartis. Para as variáveis qualitativas, foram calculadas frequências absolutas e relativas.

Para comparar as médias entre os dois grupos, utilizou-se o teste t de *Student* (Rosner, 2011). Quando a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (Rosner, 2011). Para comparar os grupos ao longo do tempo, foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney, Wilcoxon e Friedman com correção de Bonferroni (Rosner, 2011).

O modelo linear generalizado foi utilizado para comparar os dois grupos, em relação aos dados clínicos, por meio de regressão logística linear e ordinal. Este modelo também foi utilizado para avaliar o efeito da variável independente (TMF) sobre as variáveis dependentes - índices de diversidade alfa (com distribuição gama) e abundância relativa de filos e gêneros bacterianos (com distribuição linear). Para detectar diferenças entre grupos na diversidade beta, utilizou-se análise de variância multivariada permutacional, com a função adonis para distâncias de Bray-Curtis. Para cada variável, foram utilizadas 999 permutações.

Para estudar as correlações entre os períodos pré- e pós-procedimento, empregou-se o coeficiente de correlação de Spearman (Rosner, 2011). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote de *software* SPSS Statistics, versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Participantes

Foram incluídas 32 pacientes com síndrome metabólica e uma doadora de fezes. Das 32 pacientes avaliadas, quatro não completaram o estudo: duas desistiram após randomização; uma engravidou durante o seguimento; e uma desistiu durante o seguimento. Portanto, a amostra final foi composta por 28 pacientes: 15 no grupo TMF e 13 no grupo placebo.

4.2 Características Gerais e Dados Clínicos

Quando avaliadas todas as 32 pacientes no início do estudo, não houve diferenças estatísticas entre os dois grupos em termos de idade média ($55,20 \pm 10,22$ anos *vs.* $53,62 \pm 13,09$ anos, $P = 0,722$), peso corporal ($94,12 \pm 8,27$ kg *vs.* $89,29 \pm 5,70$ kg, $P = 0,867$), ou IMC ($36,69 \pm 2,94$ kg/m² *vs.* $35,74 \pm 2,22$ kg/m², $P = 0,719$). A Tabela 1 mostra a variação do peso corporal ao longo do estudo, por grupo, entre as 28 pacientes que completaram o estudo. No geral, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos quanto às características clínicas no momento da coleta da amostra.

Tabela 1 - Peso corporal ao longo do estudo, por grupo

Nenhum evento adverso grave foi relatado em nenhum dos grupos.

Grupo	Média	DP	Varição	Mediana	IIQ
TMF (n = 15)					
Linha de base	94,18	7,95	82,00-110,00	93,50	87,75-100,38
6 semanas	93,86	9,94	82,00-114,00	93,00	85,00-100,50
1 ano	95,79	11,05	81,00-116,00	95,00	86,50-102,25
Placebo (n = 13)					
Linha de base	91,28	10,60	82,00-120,00	89,50	83,25-94,50
6 semanas	89,79	9,53	80,50-112,00	86,50	82,25-96,75
1 ano	90,50	13,11	73,00-117,00	86,50	81,25-99,75

DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil; TMF: transplante de microbiota fecal.

Também não foram observadas diferenças estatísticas entre os dois grupos em termos de parâmetros bioquímicos (por exemplo, hematologia, glicose, função renal e química do fígado), massa magra ou porcentagem de gordura corporal.

4.3 Acompanhamento Clínico

Em 6 semanas e 1 ano após os procedimentos, não houve diferenças estatísticas entre os grupos TMF e placebo para qualquer um dos seguintes: peso corporal; IMC; circunferência da cintura; circunferência do quadril; glicemia de jejum; insulina; hemoglobina glicada (Tabela 2); o perfil de resistência à insulina; o ponto de compensação respiratória; e o perfil lipídico.

Tabela 2 - Níveis de hemoglobina glicada ao longo do estudo, por grupo

Grupo	Média	DP	Variação	Mediana	IIQ
TMF (n = 15)					
<i>Baseline</i>	6,75	1,09	5,60-8,90	6,30	6,10-7,60
6 semanas	6,65	1,09	5,60-9,10	6,10	6,00-7,60
1 ano	7,34	1,85	5,60-11,50	6,70	5,80-8,30
Placebo (n = 13)					
<i>Baseline</i>	6,99	1,99	4,80-12,50	6,60	6,00-7,50
6 semanas	6,75	1,38	5,00-10,20	6,30	6,00-7,40
1 ano	7,29	2,56	4,90-13,80	6,30	5,90-8,10

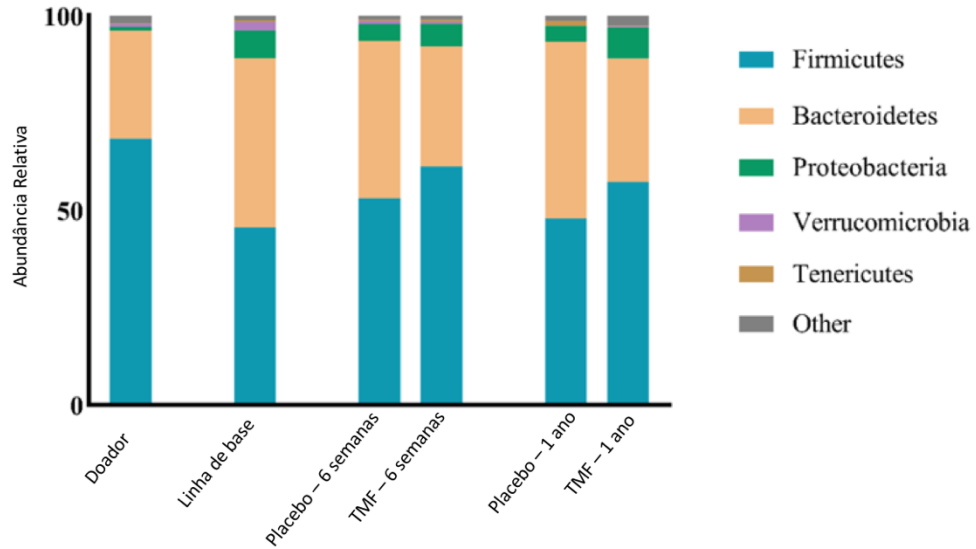
DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil; TMF: transplante de microbiota fecal.

4.4 Análise de Microbiomas

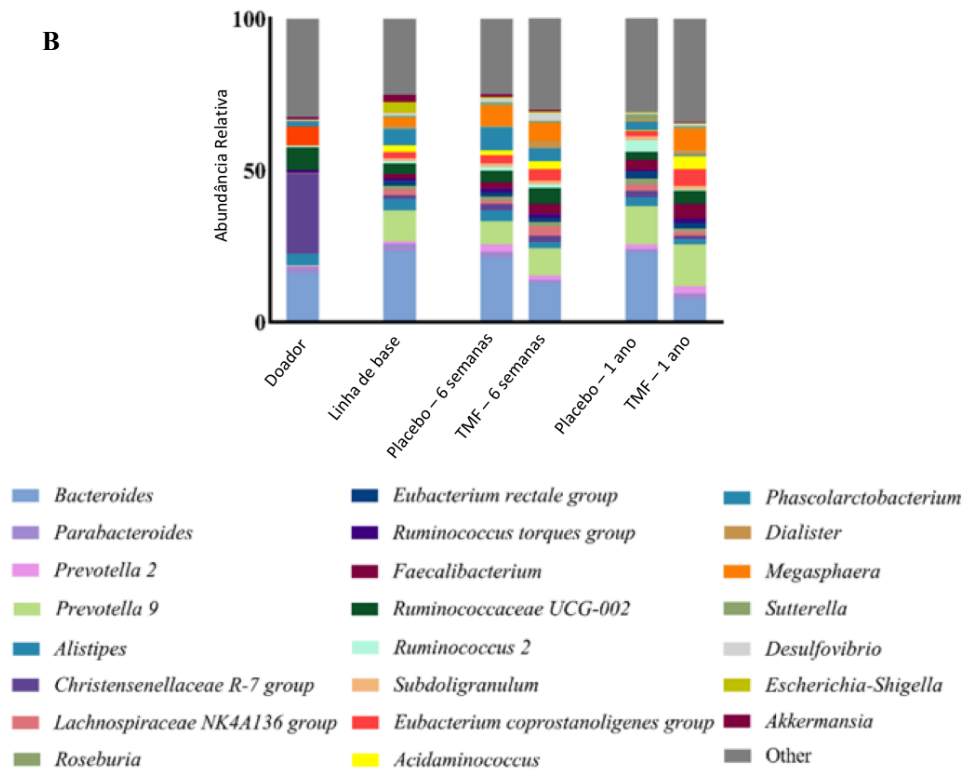
Em ambos os grupos, os filos predominantes foram Firmicutes e Bacteroidetes, incluindo o perfil do doador, que apresenta uma relação maior de Firmicutes em relação aos Bacteroidetes (Gráfico 1). Às 6 semanas após os procedimentos, a abundância relativa de Firmicutes foi maior no grupo placebo do que no grupo TMF (Gráfico 1A e Tabela 3). Ao longo do período de estudo, a abundância de Firmicutes no grupo TMF aumentou, enquanto a de Bacteroidetes diminuiu nesse grupo, resultando na razão Firmicutes/Bacteroidetes sendo maior no grupo TMF do que no grupo placebo. No doador, os gêneros mais predominantes são o *Ruminococcus torques* e *Bacteroides*. Nos grupos submetidos ao estudo, os gêneros mais abundantes foram *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcaceae* UCG-002 e *Megasphaera* (Gráfico 1B e Tabela 4). Embora não tenha havido diferenças significativas nas abundâncias de gêneros e filos entre os grupos e entre os pontos de tempo, houve um aumento acentuado de *Ruminococcus 2* e *Phascolarctobacterium* no grupo placebo, bem como uma diminuição de *Bacteroides* no grupo TMF. Ao longo do estudo, as abundâncias de *Prevotella*, *Ruminococcaceae* UCG-002 e *Faecalibacterium* foram maiores no grupo TMF do que no grupo placebo.

Gráfico 1 - Abundância relativa

A



B



Os painéis A e B mostram a abundância relativa de filos e dos 15 principais gêneros, respectivamente, em todas as amostras na linha de base, incluindo do doador, bem como nos grupos placebo e transplante de microbiota fecal (TMF) em 6 semanas e 1 ano após os procedimentos.

Tabela 3 - Abundância de filos ao longo do estudo, por grupos

Filos	Linha de base	6 semanas		1 ano	
	(agrupado)	Placebo	TMF	Placebo	TMF
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Firmicutes	55,50	55,50	61,29	47,90	57,32
Bacteroidetes	36,00	36,00	30,83	45,48	31,69
Proteobacteria	5,97	5,97	5,84	4,05	8,01
Verrucomicrobia	0,26	0,26	0,49	0,03	0,26
Tenericutes	0,63	0,63	0,46	1,30	0,14
Other	1,64	1,64	1,10	1,25	2,58

TMF: transplante de microbiota fecal.

Tabela 4 - Abundância de gêneros ao longo do estudo, por grupos

Gêneros	Linha de base	6 semanas		1 ano	
	(agrupado)	Placebo	TMF	Placebo	TMF
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>Bacteroides</i>	23,53	21,24	12,65	22,91	7,84
<i>Parabacteroides</i>	4,60	14,47	1,32	1,14	1,49
<i>Prevotella 2</i>	1,67	1,32	1,39	1,49	2,49
<i>Prevotella 9</i>	9,25	1,79	8,93	12,63	13,67
<i>Alistipes</i>	4,56	11,74	1,96	2,84	1,68
<i>Christensenellaceae</i>					
<i>R-7 group</i>	1,96	2,16	2,18	2,20	1,29
<i>Lachnospiraceae</i>					
<i>NK4A136 group</i>	2,15	1,89	3,16	2,23	1,31
<i>Roseburia</i>	1,61	2,23	1,36	1,79	1,06
<i>Eubacterium</i>					
<i>rectale group</i>	1,80	1,40	1,45	2,36	1,97
<i>Ruminococcus</i>					
<i>torques group</i>	1,23	1,93	1,08	0,61	1,28
<i>Faecalibacterium</i>	3,14	0,99	3,45	3,38	4,75
<i>Ruminococcaceae</i>					
<i>UCG-002</i>	3,99	3,86	5,15	2,55	4,41
<i>Ruminococcus 2</i>	2,37	4,04	1,28	3,83	0,33
<i>Subdoligranulum</i>	1,37	1,81	1,11	1,25	1,29
<i>Eubacterium</i>					
<i>coprostanoligenes</i>	3,14	1,22	3,99	1,81	5,53
<i>group</i>					
<i>Acidaminococcus</i>	2,70	3,78	2,53	0,18	4,30
<i>Phascolarctobacterium</i>	2,49	2,34	4,24	2,91	0,46
<i>Dialister</i>	1,61	2,54	2,46	0,14	1,29
<i>Megasphaera</i>	3,69	1,29	5,93	0,31	7,23
<i>Sutterella</i>	2,03	4,49	0,78	1,96	0,90
<i>Desulfovibrio</i>	1,19	1,21	2,50	0,33	0,74
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,58	1,19	0,49	0,31	0,32
<i>Akkermansia</i>	0,27	0,37	0,48	0,03	0,22

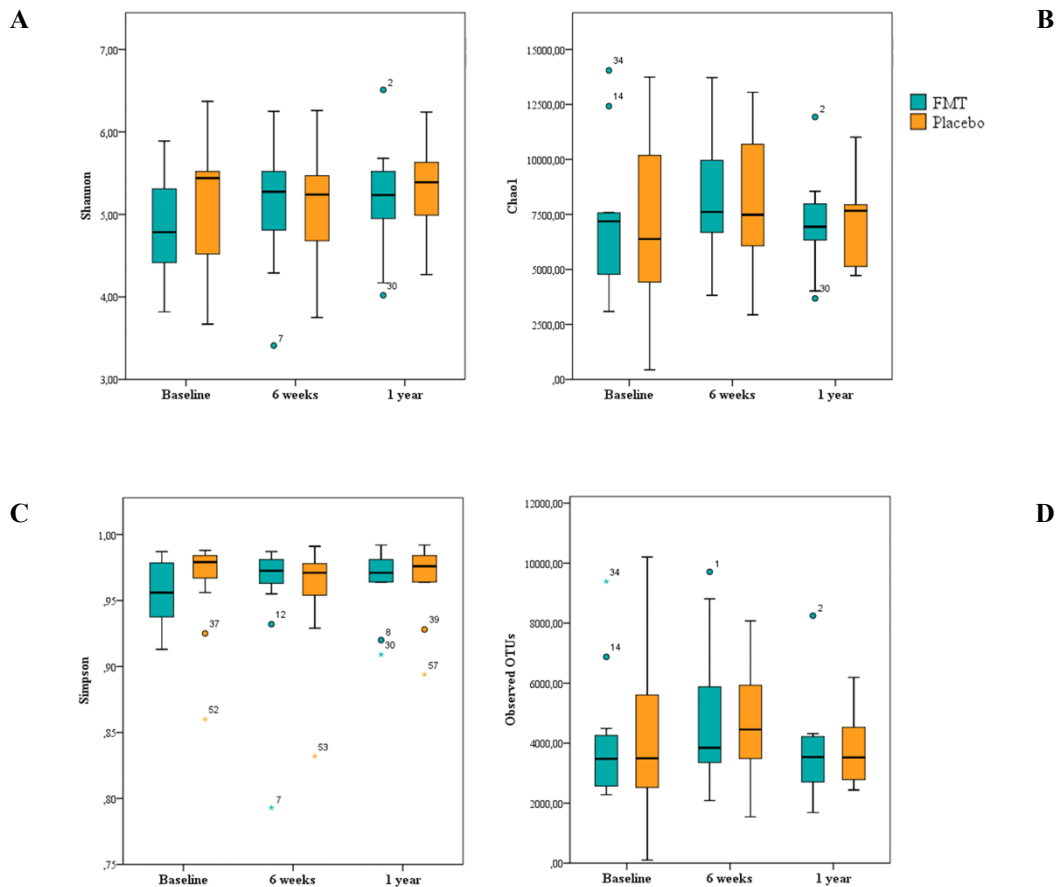
<i>Outros</i>	23,84	0,24	30,13	30,84	34,15
---------------	-------	------	-------	-------	-------

TMF: transplante de microbiota fecal.

4.4 Diversidade Alfa e Beta

Não houve diferenças significativas entre os grupos TMF e placebo em termos de diversidade alfa (Gráfico 2). No entanto, observou-se uma correlação negativa significativa entre o índice de diversidade de Shannon e o percentual de gordura corporal em ambos os grupos. Também se descobriu que a estimativa de riqueza de Chao1 mostrou uma correlação negativa significativa com a massa gorda, assim como os índices de diversidade de Shannon e Simpson.

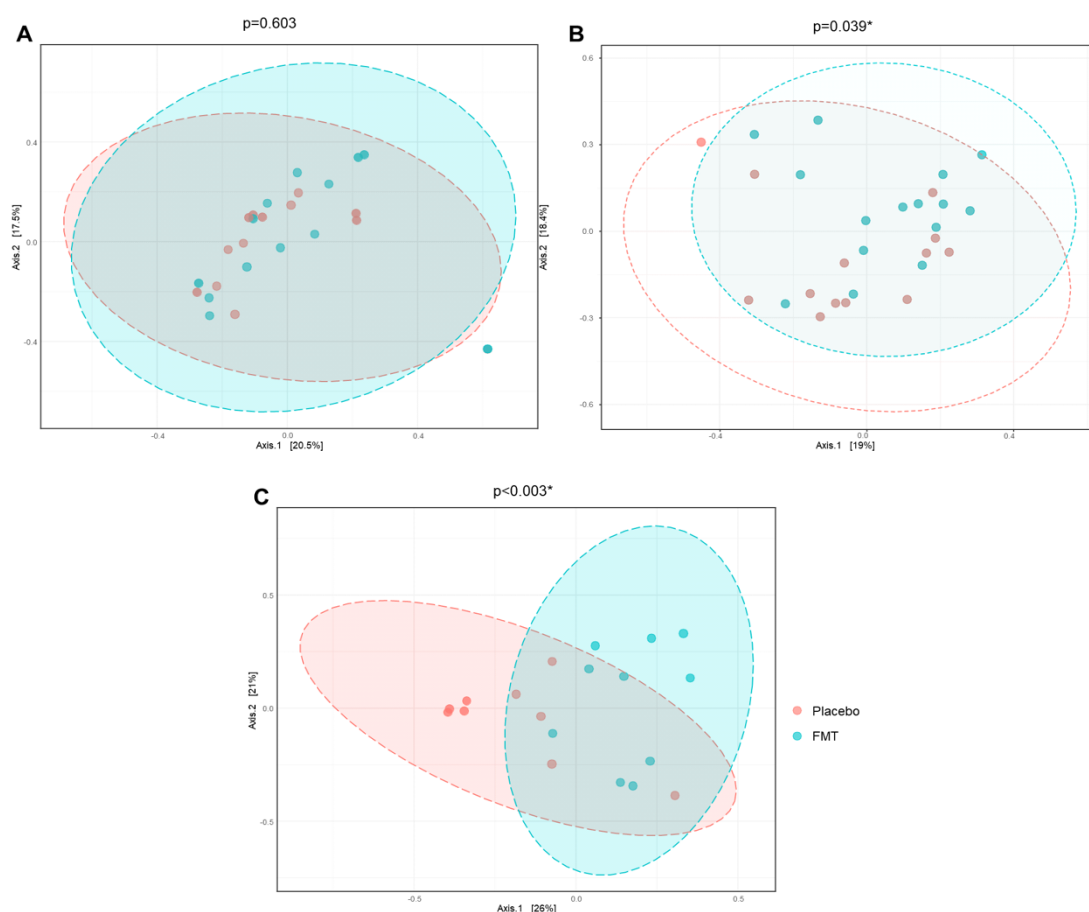
Gráfico 2 - Índices de diversidade alfa, por grupo, ao longo do tempo



Os painéis A a D, respectivamente, mostram o índice de diversidade de Shannon, a estimativa de riqueza Chao1, o índice de diversidade de Simpson e as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) observadas, ao longo do tempo, nos grupos placebo e TMF.

A diversidade beta da comunidade microbiana mostrou diferenças significativas entre os grupos TMF e placebo ao longo do estudo (Gráfico 3): na linha de base ($F = 0,83294$, $R^2 = 0,033542$, $P = 0,603$); em 6 semanas após os procedimentos ($F = 1,9699$, $R^2 = 0,070431$, $P = 0,039$); e 1 ano após os procedimentos ($F = 3,0656$, $R^2 = 0,15278$, $P < 0,003$).

Gráfico 3 - Diversidade beta da comunidade microbiana



Distância de Bray-Curtis, nos grupos placebo e transplante de microbiota fecal (TMF): na linha de base (Painel A); 6 semanas após os procedimentos (Painel B); e 1 ano após a intervenção (Painel C).

5 DISCUSSÃO

Demonstrou-se que a microbiota intestinal desempenha um papel em várias doenças, incluindo doença inflamatória intestinal (Weingarden e Vaughn, 2017; Nishida *et al.*, 2018; Sasson *et al.*, 2021; Fehily *et al.*, 2021), colite pseudomembranosa (Kassam *et al.*, 2013; Bagdasarian *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2017), colangite esclerosante primária (Shah *et al.*, 2020) e doença cardiovascular (Lindsay e Howard, 2004). A microbiota intestinal também interage com obesidade, síndrome metabólica e resistência à insulina (van Nood *et al.*, 2013; Zhang e Hu, 2020), que têm fatores de risco comuns e são altamente correlacionados.

A microbiota intestinal parece ser um fator importante no desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica, sendo o TMF, portanto, uma possível modalidade de tratamento. Estudos controlados mostraram que o TMF altera a microbiota intestinal de ratos e reduz seu peso, indicando que a microbiota está diretamente relacionada à capacidade de absorção de nutrientes (Backhed *et al.*, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2006).

Em um estudo randomizado controlado de TMF, envolvendo pacientes do sexo masculino com síndrome metabólica (Vrieze *et al.*, 2012), o perfil glicêmico em 6 semanas após o TMF foi melhor nos pacientes que receberam microbiota (de indivíduos magros) do que naqueles que receberam microbiota autóloga. Em outro ensaio clínico randomizado (Kootte *et al.*, 2017), 38 pacientes do sexo masculino obesos foram randomizados para receber microbiota autóloga ou microbiota alogênica

de doadores magros. Os autores verificaram que, em 6 semanas após os procedimentos, houve um aumento significativo (11,5%) na resistência à insulina entre os pacientes que receberam microbiota alogênica, embora esse aumento não tenha se mantido em 18 semanas após o procedimento, o que sugere que o TMF tem apenas um efeito de curto prazo. Em um estudo controlado randomizado duplo-cego de TMF (Smits *et al.*, 2018), 20 pacientes do sexo masculino com síndrome metabólica foram alocados para receber microbiota autóloga ou alogênica (vegana). Nesse estudo, uma ligeira melhora na resistência à insulina foi observada 2 semanas após o TMF nos pacientes que receberam microbiota alogênica.

Em uma revisão sistemática de TMF em indivíduos obesos com síndrome metabólica, Zhang *et al.* (2019) avaliaram três estudos randomizados controlados por placebo envolvendo um total coletivo de 63 pacientes. Eles não identificaram diferenças estatísticas entre TMF e placebo em termos de perfil glicêmico ou perda de peso. No entanto, os estudos avaliados diferiram em vários aspectos, incluindo o número de doadores, tempo de seguimento e forma de preparo da solução de microbiota. Em outra revisão sistemática de TMF em pacientes com obesidade e síndrome metabólica, Proença *et al.* (2020) avaliaram seis estudos: os três estudos randomizados controlados por placebo mencionados acima (van Nood *et al.*, 2013; Kootte *et al.*, 2017; Smits *et al.*, 2018); dois estudos randomizados duplo-cegos controlados por placebo (Allegretti *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020); e os dados de pré-publicação do presente estudo. Proença *et al.* (2020), que envolveu um total coletivo de 154 pacientes, não detectaram diferença estatística entre TMF e placebo em relação aos parâmetros clínicos avaliados.

No presente estudo, não houve diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos ou antropométricos, entre os dois grupos em nenhum dos momentos avaliados. No entanto, houve diferenças pós-procedimento significativas na composição da microbiota entre o grupo placebo e o grupo TMF, como evidenciado pelos resultados da diversidade beta, que indicam que o TMF é eficaz na alteração do microbioma intestinal e que tais alterações podem persistir por pelo menos 1 ano após o procedimento. No entanto, outros estudos mostraram que não há diferença na diversidade alfa no microbioma intestinal, conforme avaliado com o índice de diversidade de Shannon, entre pacientes que recebem TMF e aqueles que recebem placebo (Kootte *et al.*, 2017; Smits *et al.*, 2018). Em um desses estudos (Kootte *et al.*, 2017), os indivíduos do grupo TMF foram divididos em dois subgrupos, com base na resposta de sensibilidade à insulina observada: respondedores metabólicos e não respondedores metabólicos. Entre os respondedores metabólicos, houve um aumento significativo (em relação ao valor basal) na abundância relativa de *Akkermansia muciniphila*. Estudos em humanos e animais demonstraram que *A. muciniphila* está intimamente associada a melhorias na sensibilidade à insulina (Everard *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2014; Anhê *et al.*, 2015; Dao *et al.*, 2016). Seus efeitos benéficos podem ser devidos a um aumento induzido microrganismos no nível intestinal de endocanabinoides e expressão epitelial do receptor Toll-like 2, que regula a função da barreira intestinal e a inflamação (Everard *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2014; Anhê *et al.*, 2015; Plovier *et al.*, 2017). No entanto, no presente trabalho, não se observou diferença entre o grupo TMF e o grupo placebo, em termos de abundância de *A. muciniphila*, em 6 semanas ou 1 ano. A falta de diferença estatística em relação à abundância de *A. muciniphila* não pode ser avaliada isoladamente, pois a saúde do microbioma intestinal

é definida em termos de diversidade, estabilidade, resistência e resiliência (Lozupone *et al.*, 2012).

A razão entre os filos mais abundantes da microbiota humana (Firmicutes/Bacteroidetes) é considerada maior em pacientes obesos em relação a indivíduos eutróficos (Magne *et al.*, 2020; Zou *et al.*, 2020). Contudo, alguns estudos mostraram evidências contrárias a esses achados, demonstrando razão menor entre esses dois filos em pacientes obesos (Schwiertz *et al.*, 2010). A menor diversidade bacteriana em paciente obesos, pode sugerir que mudanças a nível de família, gênero ou espécie parecem ser mais importantes do que a relação entre os filos (Aguirre *et al.*, 2015). Neste estudo não foram evidenciadas alterações significativas em nenhuma das análises feitas em relação a razão entre os filos Firmicutes/Bacteroidetes.

5.1 Limitações

Este ensaio tem várias limitações. Como a disbiose intestinal pode ser influenciada por inflamação, dieta e exposições ambientais (Levy *et al.*, 2017), houve grande variabilidade entre os indivíduos avaliados. Essa variabilidade pode ser atribuída, em parte, ao fato de que a dieta padronizada recomendada não foi seguida. Todos os pacientes avaliados eram resistentes à insulina ou tinham diabetes, e sabe-se que o uso de medicamentos como a metformina pode alterar a diversidade da microbiota intestinal (Forslund *et al.*, 2015; Vallianou *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Além disso, ainda não existe um protocolo bem estabelecido para a preparação da microbiota intestinal do doador. Embora protocolo elaborado por van Nood *et al.* (2013), tenha sido seguido, não foi possível garantir que as bactérias anaeróbias permanecessem viáveis até o momento do transplante. As duas espécies mais fortemente associadas à

saúde metabólica – *Faecalibacterium prausnitzii* e *A. muciniphila* – são anaeróbicas (Miquel *et al.*, 2013; Reunanen *et al.*, 2015). Um protocolo de preparação de microbiota anaeróbica pode ser necessário para aumentar a viabilidade bacteriana e o sucesso do enxerto de anaeróbios estritos em TMF (Costello *et al.*, 2017; Chu *et al.*, 2017). Seria assim possível transplantar uma maior diversidade de microbiota e manter a composição da solução de microbiota o mais próximo possível da amostra do doador. Além disso, optou-se pela infusão por via anterógrada, que é apenas uma das muitas vias possíveis de entrega de TMF, e as taxas de sucesso mostraram variar dependendo da via de entrega (Camarota *et al.*, 2014). Mais estudos são necessários para entender a dose e a duração da terapia necessária para maximizar o efeito terapêutico do TMF, otimizando a tolerância e a adesão do paciente (Davidovics *et al.*, 2019). Além disso, foi incluído apenas um doador (uma mulher) e presente amostra foi composta apenas por pacientes do sexo feminino, enquanto a maioria dos estudos comparáveis da literatura avaliou pacientes do sexo masculino. O sexo é reconhecido como um fator importante em uma variedade de condições comuns, incluindo distúrbios autoimunes, metabólicos, cardiovasculares e psiquiátricos (Whitacre, 2001; Arnold e Lysis, 2012; Danska, 2014). A atividade física é um importante fator na composição da microbiota intestinal por aumentar a velocidade do trânsito intestinal e o tempo de contato do quimo pelos diferentes segmentos do trato gastrointestinal (Liu *et al.*, 2015). Neste estudo não foi avaliada a realização de atividade física por parte dos pacientes.

Por fim, esta análise também foi limitada não apenas pelo pequeno tamanho desta amostra, mas também pelo pequeno número de estudos sobre o tema na literatura e seu pequeno tamanho amostral. Como este foi um estudo de centro único, os

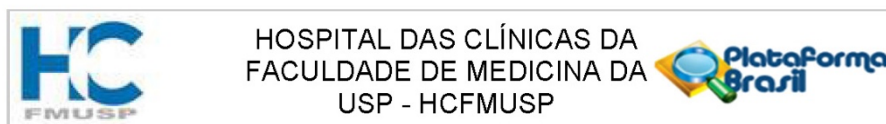
presentes achados podem não refletir os resultados que podem ser esperados em populações globais.

6 CONCLUSÃO

Até o momento, os resultados clínicos relacionados ao TMF permanecem incertos. Múltiplas variáveis foram identificadas nos estudos descritos até agora, apesar do pequeno número de pacientes avaliadas. Portanto, há necessidade de mais estudos envolvendo amostras maiores de pacientes e avaliando um número maior de variáveis.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel da Microbiota Intestinal como Ferramenta para Manejo de Síndrome Metabólica e Obesidade

Pesquisador: Eduardo Guimarães Hourneaux Moura

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 62319916.9.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.857.922

Apresentação do Projeto:

Este é um projeto sobre transplante fecal em casos de síndrome metabólica e obesidade.

Objetivo da Pesquisa:

Visa apurar os benefícios da troca do microbioma sobre variáveis nutricionais, metabólicas e hormonais. Trata-se de um piloto com casuística modesta, dada a inexistência de experiência com esta indicação em nosso meio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são pequenos e estão devidamente contemplados. A equipe é qualificada e os pacientes serão adequadamente supervisionados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é interessante e segue as tendências recentes da literatura. Poderá se converter numa proposta de grande potencial para esta entidade de crescente prevalência.

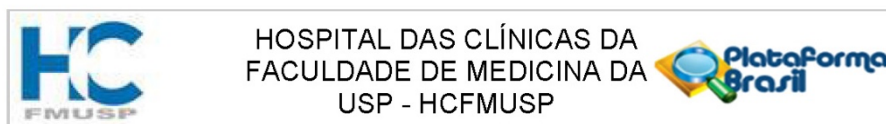
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os TCLEs para doador e receptor são adequados.

Recomendações:

Não há.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.657.922

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_816951.pdf	23/11/2016 12:14:05		Aceito
Outros	Anuencia_IMT.pdf	23/11/2016 12:12:41	Ana Carolina Cândido	Aceito
Outros	Cappesq_assinada.pdf	23/11/2016 12:11:56	Ana Carolina Cândido	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RECEPTORES.docx	23/11/2016 12:10:53	Ana Carolina Cândido	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_DOADORES.docx	23/11/2016 12:10:32	Ana Carolina Cândido	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_Papel_da_Microbiota_Intestinal.docx	23/11/2016 12:10:17	Ana Carolina Cândido	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_assinada.pdf	23/11/2016 12:09:20	Ana Carolina Cândido	Aceito

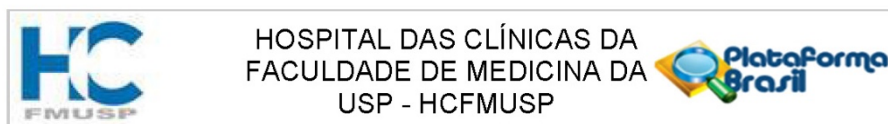
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 1.657.922

SAO PAULO, 09 de Dezembro de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O senhor(a) está sendo convidado(a) a participar deste protocolo de pesquisa intitulado *Um estudo randomizado, simples-cego controlado por placebo de transplante de microbiota fecal em pacientes com síndrome metabólica e obesidade*. Estas doenças são consideradas epidemias em saúde, e são de difícil tratamento. Através deste estudo pretende-se testar mais uma forma de tratar e melhorar a qualidade de vida das pessoas que são acometidas, e ainda avaliar o quanto este novo tratamento diminui os riscos destas pessoas terem complicações de saúde. Este tratamento consiste na transferência de microbiota intestinal de doadores magros para o sistema digestório de pacientes com síndrome metabólica e obesidade, e já foi testado em animais e inclusive em humanos em estudos anteriores, com evidência de que os resultados podem ser muito satisfatórios. O transplante de microbiota intestinal já é uma alternativa de tratamento comprovada e utilizada para doenças como a colite pseudomembranosa e a doença inflamatória intestinal, e se neste estudo os resultados forem positivos, poderá ser também implementado como mais uma alternativa de tratamento para as pessoas obesas e com síndrome metabólica.

A participação voluntária do senhor(a) no estudo se dará da seguinte maneira: inicialmente, o senhor(a) será submetido a 1) coleta de sangue por punção de veia periférica de membro superior para análise de parâmetros laboratoriais, 2) coleta de fezes em chapéu de toalete acoplado ao vaso sanitário para análise de sua composição bacteriana, e 3) mensuração de peso, altura, circunferência abdominal e exame de bioimpedância, para avaliação da composição corporal de massa magra e gordura. Enquanto isso, serão selecionadas para este estudo pessoas magras e saudáveis, que realizarão os mesmos exames e outros para garantia de seu perfeito estado de saúde, desta forma respeitando todas as exigências de segurança biológica que são estabelecidas para este protocolo de estudo. Estas pessoas serão responsáveis pela doação de fezes, que serão devidamente avaliadas para se descartar doenças transmissíveis, e depois disso estas fezes serão processadas em laboratório especializado para que se selecione apenas o material que vai ser considerado a matéria prima para o novo tratamento que está sendo testado. Posteriormente, o senhor(a) será submetido a exame de endoscopia digestiva alta, sob sedação, e neste exame será realizada a infusão (transplante) de uma quantidade de líquido pré-determinada, diretamente na porção final do seu duodeno (intestino). Este líquido poderá ser o material que foi preparado através das fezes das pessoas magras ou apenas soro fisiológico, e nem o senhor(a) nem o médico que realizará o exame saberão qual foi o líquido separado para a infusão, pois os dois terão o mesmo aspecto, e só quem saberá o que cada paciente vai receber serão os pesquisadores deste estudo que ficarão responsáveis por manter este sigilo, e que no final do estudo avaliarão se houve

diferença no tratamento entre as pessoas que receberam transplante de fezes e as que receberam apenas soro fisiológico. Depois da realização do exame de endoscopia, o senhor(a) ficará em observação clínica até a completa recuperação da sedação, e receberá alta após. Por fim, para que sejam comparados os resultados do tratamento entre o grupo de pacientes que recebeu transplante de fezes e o grupo de pacientes que recebeu infusão de soro fisiológico, todos os pacientes deverão repetir todos os exames que foram realizados no início do estudo, que serão realizados depois de 6 semanas da endoscopia digestiva alta. Durante todo este tempo e também após o final do estudo, todos os pacientes serão acompanhados por equipe multidisciplinar especializada, que avaliará cada passo no tratamento realizado e dará toda a assistência necessária a cada paciente durante a pesquisa, e ao final do estudo todos os detalhes do tratamento e dos seus resultados serão revelados para todos os pesquisadores envolvidos e para os pacientes, que terão seu sigilo mantido em todas as etapas, e inclusive na publicação dos resultados do estudo.

Por tratar-se de um estudo experimental, os potenciais benefícios esperados do transplante a que o senhor(a) será submetido(a) só poderão ser observados ao final do prazo de 6 semanas e no longo prazo. Os potenciais benefícios, se houverem, serão: redução da massa corporal, redução da gordura corporal e de circunferência abdominal e melhor controle da glicemia basal e do colesterol. Os potenciais danos ou consequências negativas a que o senhor(a) poderá ser exposto imediatamente e alguns dias após o transplante serão: náuseas, vômitos, diarreia ou constipação. Os potenciais efeitos de longo prazo do transplante ainda não foram completamente esclarecidos, justamente pela escassez de trabalhos experimentais semelhantes. Ao senhor(a) deverá ficar explícito que são potenciais, porém improváveis, consequências de longo prazo do transplante: indução de doenças autoimunes e infecção por vírus, bactérias e outros patógenos presentes nas fezes recebidas.

O senhor(a) será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios de assistência nessa instituição.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial, da pesquisa, etc, permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. O senhor(a) não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Em caso de dúvidas poderá entrar em contato com os responsáveis Dr. Alberto Machado da Ponte Neto e Dr. Eduardo Guimarães Hourneaux de Moura, e no telefone institucional (11) 26616261 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000 Tel: 3893-

4401/4407 E-mail: cep.fm@usp.br.

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ESCLARECIMENTO PELO
SUJEITO DA PESQUISA**

Eu, _____, declaro ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li neste documento descrevendo o estudo *Um estudo randomizado, simples-cego controlado por placebo de transplante de microbiota fecal em pacientes com síndrome metabólica e obesidade*.

Eu confirmo que discuti com o Dr. Alberto Machado da Ponte Neto sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram esclarecidos para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus potenciais benefícios, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, e sem prejuízo no meu atendimento neste serviço. Este documento será emitido em duas vias que serão assinadas por mim e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Dr. Alberto Machado da Ponte Neto

Data / /

Anexo C - Protocolo de doação de microbiota intestinal

PROTOCOLO PARA O DOADOR DE MICROBIOTA INTESTINAL

O senhor(a) está sendo convidado(a) a participar deste protocolo de pesquisa intitulado Um estudo randomizado, simples-cego controlado por placebo de transplante de microbiota fecal em pacientes com síndrome metabólica e obesidade. Devido ao risco de transmissão de doenças para os receptores será necessário o preenchimento do checklist abaixo:

- 1- A fezes do doador foram avaliadas para a presença de parasitas (incluindo *Blastocystis hominis* e *Dientamoeba fragilis*), *C. difficile*, e enteropathogenic bactéria?

SIM

NÃO

- 2- O doador foi avaliado para a presença das seguintes doenças nos últimos 4 meses: HIV; HTLV (human T-cell lymphotropic virus) tipos 1 e 2; hepatites A, B, e C; Citomegalovirus; Epstein–Barr vírus; *Treponema pallidum*; *Strongyloides stercoralis* e *Entamoeba histolytica*?

SIM

NÃO

Paciente está apto para a doação de microbiota caso a resposta seja “SIM” para as duas perguntas

8 REFERÊNCIAS

Aguirre M, Venema K. Does the Gut Microbiota Contribute to Obesity? Going beyond the Gut Feeling. *Microorganisms*. 2015; 3(2):213-35.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006;23(5):469-80.

Allegretti JR, Kassam Z, Mullish BH, Chiang A, Carrellas M, Hurtado J, Marchesi JR, McDonald JAK, Pechlivanis A, Barker GF, Miguéns Blanco J, Garcia-Perez I, Wong WF, Gerardin Y, Silverstein M, Kennedy K, Thompson C. Effects of fecal microbiota transplantation with oral capsules in obese patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(4):855-63.e2.

Anhê FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, Garofalo C, Moine Q, Desjardins Y, Levy E, Marette A. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*. 2015;64(6):872-83.

Arnold AP, Lusis AJ. Understanding the sexome: measuring and reporting sex differences in gene systems. *Endocrinology*. 2012;153(6):2551-5.

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat

storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-23.

Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. *JAMA*. 2015;313(4):398-408.

Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med*. 1999;16(5):442-3.

Brahe LK, Astrup A, Larsen LH. Can We Prevent Obesity-Related Metabolic Diseases by Dietary Modulation of the Gut Microbiota? *Adv Nutr*. 2016;7(1):90-101.

Cammarota G, Ianiro G, Bibbò S, Gasbarrini A. Fecal microbiota transplantation: a new old kid on the block for the management of gut microbiota-related disease. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48(Suppl 1):S80-4.

Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat*. 1984;11(4):265-70.

Chu ND, Smith MB, Perrotta AR, Kassam Z, Alm EJ. Profiling Living Bacteria Informs Preparation of Fecal Microbiota Transplantations. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170922.

Costello SP, Soo W, Bryant RV, Jairath V, Hart AL, Andrews JM. Systematic review with meta-analysis: faecal microbiota transplantation for the induction of remission for active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(3):213-24.

Danska JS. Sex matters for mechanism. *Sci Transl Med*. 2014;6(258):258fs40.

Davidovics ZH, Michail S, Nicholson MR, Kocielek LK, Pai N, Hansen R, Schwerd T, Maspons A, Shamir R, Szajewska H, Thapar N, de Meij T, Mosca A, Vandenplas Y, Kahn SA, Kellermayer R; FMT Special Interest Group of the North American Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology, Nutrition, the European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology, Nutrition. Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile* Infection and Other Conditions in Children: A Joint position paper from the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019;68(1):130-43.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011;27(16):2194-200.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.

Fehily SR, Basnayake C, Wright EK, Kamm MA. Fecal microbiota transplantation therapy in Crohn's disease: Systematic review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2021;36(10):2672-86.

Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S,

Prifti E, Vieira-Silva S, Gudmundsdottir V, Pedersen HK, Arumugam M, Kristiansen K, Voigt AY, Vestergaard H, Herczeg R, Costea PI, Kultima JR, Li J, Jørgensen T, Levenez F, Dore J; MetaHIT consortium, Nielsen HB, Brunak S, Raes J, Hansen T, Wang J, Ehrlich SD, Bork P, Pedersen O. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015 Dec 10;528(7581):262-6.

Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism*. 1987;36(1):54-9.

Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P; Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26(11):3160-7.

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112(17):2735-52.

He M, Shi B. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell Biosci*. 2017;7:54.

Kassam Z, Lee CH, Yuan Y, Hunt RH. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2013 Apr;108(4):500-8.

Kootte RS, Levin E, Salojärvi J, Smits LP, Hartstra AV, Udayappan SD, Hermes G, Bouter KE, Koopen AM, Holst JJ, Knop FK, Blaak EE, Zhao J, Smidt H, Harms AC, Hankemeijer T, Bergman JJGHM, Romijn HA, Schaap FG, Olde Damink SWM, Ackermans MT, Dallinga-Thie GM, Zoetendal E, de Vos WM, Serlie MJ, Stroes ESG, Groen AK, Nieuwdorp M. Improvement of Insulin sensitivity after lean donor feces in metabolic syndrome is driven by baseline intestinal microbiota composition. *Cell Metab*. 2017;26(4):611-619.e6.

Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(17):5112-20.

L Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E, Sjöström L. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;289(6454):1257-61.

Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):219-32.

Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):8228-35.

Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220-30.

Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Van Immerseel F, Verbeke K, Ferrante M, Verhaegen J, Rutgeerts P, Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(8):1275-83.

Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, Balamurugan R. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*. 2020; 12(5):1474.

Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, Thomas M, Wells JM, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(3):255-61.

Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*. 2018;11(1):1-10.

Ohlson LO, Larsson B, Svärdsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, Björntorp P, Tibblin G. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*. 1985;34(10):1055-8.

Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, van der Ark KC, Aalvink S, Martinez LO, Dumas ME, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, Belzer C, de Vos WM, Cani PD. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med*. 2017;23(1):107-13.

Proença IM, Allegretti JR, Bernardo WM, de Moura DTH, Ponte Neto AM, Matsubayashi CO, Flor MM, Kotinda APST, de Moura EGH. Fecal microbiota transplantation improves metabolic syndrome parameters: systematic review with meta-analysis based on randomized clinical trials. *Nutr Res*. 2020;83:1-14.

Pylro VS, Roesch LF, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods*. 2014;107:30-7.

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(Database issue):D590-6.

Reunanen J, Kainulainen V, Huuskonen L, Ottman N, Belzer C, Huhtinen H, de Vos WM, Satokari R. *Akkermansia muciniphila* Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(11):3655-62.

Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 7. ed. Boston: Brooks/Cole; 2011.

Sasson AN, Ingram RJM, Zhang Z, Taylor LM, Ananthakrishnan AN, Kaplan GG, Ng SC, Ghosh S, Raman M. The role of precision nutrition in the modulation of microbial composition and function in people with inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2021;6(9):754-69.

Schwiertz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010; 18(1):190-5.

Shah A, Macdonald GA, Morrison M, Holtmann G. Targeting the Gut Microbiome as a Treatment for Primary Sclerosing Cholangitis: A Conceptual Framework. *Am J Gastroenterol*. 2020;115(6):814-22.

Shannon CE. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*. 1948;27(3):379-423.

Shen NT, Maw A, Tmanova LL, Pino A, Ancy K, Crawford CV, Simon MS, Evans AT. Timely use of probiotics in hospitalized adults prevents clostridium difficile infection: a systematic review with meta-regression analysis. *Gastroenterology*. 2017 Jun;152(8):1889-900.e9.

Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, Bae JW. An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*. 2014;63(5):727-35.

Smits LP, Kootte RS, Levin E, Prodan A, Fuentes S, Zoetendal EG, Wang Z, Levison BS, Cleophas MCP, Kemper EM, Dallinga-Thie GM, Groen AK, Joosten LAB, Netea MG, Stroes ESG, de Vos WM, Hazen SL, Nieuwdorp M. Effect of vegan fecal microbiota transplantation on Carnitine- and Choline-derived Trimethylamine-N-Oxide production and vascular inflammation in patients with metabolic syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(7):e008342.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004;53(1):1-4.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-31.

Vallianou NG, Stratigou T, Tsagarakis S. Metformin and gut microbiota: their interactions and their impact on diabetes. *Hormones (Athens).* 2019;18(2):141-44.

van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG, Keller JJ. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med.* 2013;368(5):407-15.

Verard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, Cani PD. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(22):9066-71.

Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, Dallinga-Thie GM, Ackermans MT, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Van Hylckama Vlieg JE, Bloks VW, Groen AK, Heilig HG, Zoetendal EG, Strees ES, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012;143(4):913-6.e7.

Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacol Res*. 2013;69(1):75-86.

Weingarden AR, Vaughn BP. Intestinal microbiota, fecal microbiota transplantation, and inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*. 2017;8(3):238-52.

Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2001;2(9):777-80.

World Health Organization (WHO). *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications*. Geneve: WHO; 1999. Report of a WHO consultation.

Wortelboer K, Nieuwdorp M, Herrema H. Fecal microbiota transplantation beyond *Clostridioides difficile* infections. *EBioMedicine*. 2019;44:716-29.

Yu EW, Gao L, Stastka P, Cheney MC, Mahabamunuge J, Torres Soto M, Ford CB, Bryant JA, Henn MR, Hohmann EL. Fecal microbiota transplantation for the improvement of metabolism in obesity: The FMT-TRIM double-blind placebo-controlled pilot trial. *PLoS Med*. 2020;17(3):e1003051.

Zhang Q, Hu N. Effects of Metformin on the Gut Microbiota in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:5003-5014.

Zhang Z, Mocanu V, Cai C, Dang J, Slater L, Deehan EC, Walter J, Madsen KL. Impact of Fecal Microbiota Transplantation on Obesity and Metabolic Syndrome-A Systematic Review. *Nutrients.* 2019;11(10):2291.

Zimmet PZ. Kelly West Lecture 1991. Challenges in diabetes epidemiology--from West to the rest. *Diabetes Care.* 1992; 15(2):232-52.

Zou Y , Ju X , Chen W , Yuan J , Wang Z , Aluko RE , He R . Rice bran attenuated obesity via alleviating dyslipidemia, browning of white adipocytes and modulating gut microbiota in high-fat diet-induced obese mice. *Food Funct.* 2020; 11(3):2406-2417.