

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO INTENSO E DO
CONDICIONAMENTO AERÓBIO ASSOCIADO A
SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO OU CARNITINA SOBRE A
MICROBIOTA FECAL DE POTRAS**

Maria Luiza Mendes de Almeida
Tecnóloga em Biocombustíveis

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO INTENSO E DO
CONDICIONAMENTO AERÓBIO ASSOCIADO A
SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO OU CARNITINA SOBRE A
MICROBIOTA FECAL DE POTRAS**

Maria Luiza Mendes de Almeida

**Orientadora: Profa. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos
Coorientador: Prof. Dr. Marcio C. Costa**

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 Microbiologia Agropecuária.

2015

Almeida, Maria Luiza Mendes
A447e Efeitos do exercício intenso e do condicionamento aeróbio
associado a suplementação com cromo ou carnitina sobre a
microbiota fecal de potras / Maria Luiza Mendes de Almeida. –
Jaboticabal, 2015
viii, 57 p. ; il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Coorientador: Marcio C. Costa
Banca examinadora: Gustavo Adolfo Sabatini, Janete Aparecida
Desiderio
Bibliografia

1. Equinos. 2. Microbiota fecal. 3. Exercício. 4. Condicionamento
físico. 5. Carnitina 6. Cromo. 7. Sequenciamento genético I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 579.62 : 636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação -
Serviço Técnico de biblioteca e Documentação – Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Maria Luiza Mendes de Almeida – Nascida na cidade de Diadema – SP, 04 de julho de 1974. Tecnóloga em Biocombustível, graduada pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal – FATEC JB, na cidade de Jaboticabal - SP, com início em fevereiro de 2009 e término em dezembro de 2011. Durante a graduação, realizou iniciação científica com bolsa da FAPESP, no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, no período de 2010 a 2011 sob orientação da Profa. Dra. Lucia Carareto Alves. Recebeu certificado de menção honrosa pelo trabalho de graduação intitulado: “Diversidade Bacteriana de um Consórcio Degradador de Celulose”. Em 05 de agosto de 2013, ingressou no curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes

de Macedo Lemos e co-orientação do Prof. Dr. Marcio Costa da Universidade de Ghelph, Canadá, como bolsista FAPESP.

Dedico,

A minha família mais que sonhada!

Ao meu marido e grande companheiro, Guilherme, sem você muitos sonhos não seriam possíveis, como esse que se concretiza agora! Te amo muuuito!

Aos meus filhos, Vitor e Maria, pelo apoio, compreensão e amor cotidiano!

À minha norinha, Victória, grande exemplo de mulher e mãe!

À minha netinha, Manuela, que ensinou a todos nós, que nosso “planejamento de vida” pode ser mudado, e a habilidade de sermos felizes diante de mudanças, é essencial!.

Por vocês todos, amor incondicional, respeito e orgulho Eterno!

Dedico,

À minha grande amiga, Eliana, que nos ajudou a ter fé, confiança e superação!

Nosso muito obrigada de coração!

Aos meus novos amigos, Pedro e Sonia Verardino, por me mostrarem um caminho de vida tão óbvio, mas que estava tão distante de mim, o qual me fortalece diariamente.

Nunca esquecerei o carinho de vocês, meu muito obrigada eternamente!

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Zahiro e Lidia, vocês são grandes exemplos de vida! Amo vocês!

À minha irmã mais linda desse mundo, Bi Santinha, amor e amizade para uma vida inteira!

Aos meus sobrinhos mais amados, Luiza e Chico, por terem curiosidade de alguém estudar coco!!!! Chicão a tia ama fazer dedinhos com você!!!

À Família Busca Pé Jaboticabal, Sergio, Vanessa, Talissa, vó Yaeko (Yá), pelo carinho, apoio por toda minha família!

À toda Grande Família e agregados: vó, tios, primos...em especial minha vó Laurinda, meu Tio Toninho, Tia Marlene, Tio Hernandez e Tia Ninha, sei que tenho vocês sempre para contar!

Às minhas comadres Parê e Didi, agradeço o amor de vocês e o cuidado com meus filhos, melhores madrinhas do mundo!!!!

À dona Nilde, por todos os potinhos de vidro guardados durante o experimento!!!

À Gitika, pelo carinho e ajuda de sempre. Obrigada por todo o apoio!

Aos meus amigos de casa: Lu, Bata, Manuzinha, Fernando, Cinthia, Kenia, nossa família de Jaboticabal com churrascos e risadas garantidas!

Ao meu amigo Walter, insuportável, mas você me ajudou e ajuda muito nessa vida Jaboticabalense!!! Vamos que vamos...

À querida “filhota” Henriete, pela sabedoria da humildade e reconhecimento, menina especial de grande valor. Obrigada por tudo que você ajudou e ajuda quietinha no LAFEQ!

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP**, principalmente ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, o Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino e o setor de Eqüinocultura.

À minha orientadora Profa. Dra. **Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**, pela confiança, respeito e dedicação nesse meu aprendizado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Marcio Costa, pela extrema dedicação e paciência em me ensinar e orientar à distância, sem você esse trabalho não teria sido possível, obrigada sempre por tudo!

Aos colegas do LBMP, em especial o João Carlos, que fazem o nosso laboratório pulsar vida, seja com experimentos, risadas, fofocas...tudo de bom de uma família cientista maluca!

Ao amigo Dêco, por sua paciência e sabedoria de lidar com os animais. Aprendi muita coisa com você, obrigadaaaa!!!!

Ao conselho de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, Prof.Dr. Roberto, Profa.Dra Maria Inês, Prof.Dr. Jackson e Prof.Dr. Hélio, pela dedicação a todos os alunos do programa e por me ensinarem muito da vida acadêmica em nossas reuniões do conselho, muito obrigada!

À todos os professores da FCAV, muito obrigada!

À Equipe Peso Pesado, formamos um grupo de peso para tocar essa empreitada com dedicação e bom humor, missão difícil, mas conseguimos todos juntos!

As minhas amigas, Mayara e Jessica, que juntas formamos o “Trio das Poderosas”, só os fortes sobrevivem! Obrigada sempre!!!!

A Profa. Dra. Adalgiza por todos os animais, financiamento captado e ponta pé inicial.

Ao Dr. Tiago de Resende Garcia, por acreditar e confiar em nossa pesquisa nos ajudando na captação de recursos, obrigada pelo seu apoio!

Ao Haras da Esperança e ao Haras Grande Sertão pelas potras cedidas gentilmente para a realização dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento da minha bolsa de pesquisa.

Ao CNPq por parte do financiamento do projeto.

A Tortuga Companhia Zootécnica Agrária pelo financiamento dos suplementos e parte das análises.

A Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador pelo recursos utilizados na execução dessa pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELA.....	xi
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	2
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	3
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO DE LITERAURA.....	5
OBJETIVOS GERAIS.....	10
REFERÊNCIAS.....	11

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO EXERCÍCIO INTENSO E DO CONDICIONAMENTO AERÓBIO ASSOCIADO A SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO OU L-CARNITINA SOBRE A MICROBIOTA FECAL DE POTRAS

INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	35
AGRADECIMENTOS.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2- EFEITOS DO EXERCÍCIO INTENSO E DO CONDICIONAMENTO AERÓBIO ASSOCIADO A SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO OU CARNITINA SOBRE A MICROBIOTA FECAL DE POTRAS

Figura 1. Curva de rarefação comparando o numero de sequencias com o numero de espécies encontradas em DNA de fezes de potras. Os grupos, C: grupo controle, ET: todos os animais que realizaram exercício agudo e condicionamento aeróbio. Para 1-0: imediatamente antes do primeiro teste incremental (TEI-1), 1-48: 48hs após o TEI-1, 2-0: imediatamente antes do segundo teste incremental (TEI-2), 2-48: 48hs após o TEI-2. Para C1-0: azul, C1-48: vermelho, C2-0: roxo, C2-48: verde, E1-0: marron, E1-48: pink, E2-0: verde claro, E2-48: preto.....51

Figura 2. Em A, principais filos que apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Amostras coletadas nos respectivos grupos, E: realizou exercício, Car: realizou exercício e foi suplementado com L-carnitina, Cr: realizou exercício e foi suplementado com cromo. Para 1-0: imediatamente antes do primeiro teste incremental, 1-48: 48hs após o primeiro teste incremental, 2-0: imediatamente antes do segundo teste incremental, 2-48: 48hs após o segundo teste incremental. Em B, principais gêneros que apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Amostras coletadas nos respectivos grupos, E: realizou exercício, Car: realizou exercício e foi suplementado com L-carnitina, Cr: realizou exercício e foi suplementado com cromo. Para 1-0: imediatamente antes do primeiro teste incremental, 1-48: 48hs após o primeiro teste incremental, 2-0: imediatamente antes do segundo teste incremental, 2-48: 48hs após o segundo teste incremental.....52

Figura 3. Dendrograma obtido a partir da análise da microbiota fecal de potras submetidas a teste de esforço incremental em esteira rolante e condicionamento aeróbio . Em A, análise de Yue & Clayton (vermelho: antes do período de condicionamento; azul: após período de condicionamento, verde: controle). Em B, dendrograma obtido a partir do índice Jaccard (vermelho: antes do período de condicionamento, azul: após período de condicionamento, verde: controle).....53

Figura 4. Análise de componentes principais (PCoA) considerando a microbiota fecal de potras submetidas a teste de esforço incremental, em esteira, e a condicionamento aeróbio. Em A, PCoA obtido a partir da análise de Yue & Clayton. Em B, PCoA obtido a partir da análise de índice Jaccard. Para A e B, amostras Before T0: antes do teste de esforço incremental 1 (TEI-1), After T0: 48hs após ao TEI-1; Before T1: antes do teste incremental 2 (TEI-2), After T1: 48hs após ao TEI-2.....54

Figura 5. Em A, energia digestível do concentrado; em B, quantidade de concentrado; em C, peso corpóreo médio das potras submetidas a teste de esforço incremental (TEI1 e TEI2) e a um programa de condicionamento aeróbio por 42 dias. *indica redução na energia digestível e na quantidade do concentrado do controle em relação aos outros grupos experimentais. # indica redução a partir do 32º dia de condicionamento em relação ao grupo controle. Não houve alteração do peso corpóreo médio de todos os grupos experimentais.....55

Figura 6. pH fecal de potras submetidas a um teste de exercício incremental (TEI1 e TEI2) e a um programa de condicionamento aeróbio associado a suplementação oral com L-carnitina (Car, n=3, linha vermelha) ou cromo (Cr, n=3, linha verde). O grupo controle (C, n=3, linha tracejada) não realizou exercício. A linha azul indica o pH médio geral das potras que fizeram os testes de exercício incremental e o período de condicionamento, desconsiderando o fator suplementação do grupo exercício total (ET, n=9). TEI 1-0, TEI 1-48, TEI 2-0 e TEI 2-48, imediatamente antes e 48 horas após o primeiro e o segundo TEI, respectivamente. O pH do grupo ET sofreu redução em relação ao grupo C a partir do dia 21. Não houve diferença entre os grupos E, Car e Cr.....56

Figura 7. Atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) após os dois exercícios testes de exercício incrementais (TEI1 e TEI2). A: CK no TEI1. B: CK no TEI2. C: AST no TEI1. D: AST no TEI2. *indica aumento em relação ao exercício.....57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2- EFEITOS DO EXERCÍCIO INTENSO E DO CONDICIONAMENTO AERÓBIO ASSOCIADO A SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO OU CARNITINA SOBRE A MICROBIOTA FECAL DE POTRAS

Tabela 1. Percentual em base de matéria seca (MS) de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), matéria mineral (MM), cálcio (Ca), fósforo (P), energia digestível (ED), nutrientes digestíveis totais (NDT) e em Mcal/Kg dos alimentos fornecidos durante o período experimental.....48

Tabela 2. Valores de P referentes à parsimônia e AMOVA dos grupos de potras da raça Mangalarga Marchador submetidas a condicionamento aeróbio e suplementadas pela via oral com carnitina ou cromo.....49

Tabela 3. Valores de P referentes à parsimônia e AMOVA de potras da raça Mangalarga Marchador submetidas a teste de esforço incremental (TEI) e a um programa de condicionamento aeróbio.....50

EFEITOS DO EXERCÍCIO INTENSO E DO CONDICIONAMENTO AERÓBIO ASSOCIADO A SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO OU CARNITINA SOBRE A MICROBIOTA FECAL DE POTRAS

RESUMO

Estudos recentes em indivíduos da espécie humana e camundongos relataram que o exercício físico pode alterar a microbiota intestinal. Evidências indicaram que essa comunidade microbiana está envolvida na homeostase do metabolismo do hospedeiro. Ademais, estudos com substâncias ergogênicas são escassos na literatura sobre a microbiota intestinal. Objetivou-se avaliar o impacto do exercício físico agudo e do condicionamento aeróbio associado a suplementação com cromo ou L-carnitina na microbiota intestinal de potras. Nosso modelo experimental utilizou potras da raça Mangalarga Machador em estágio de condicionamento físico incipiente, distribuídas em 4 grupos: Controle (sem exercício), Exercício, L-carnitina e Cromo. As potras foram submetidas a dois testes de esforço incremental e condicionadas em esteira por 42 dias na intensidade de 70-80% do limiar de lactato. Amostras fecais foram obtidas antes e 48 horas após do exercício agudo e do programa de condicionamento. As populações bacterianas foram caracterizadas pelo sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA por meio da plataforma Illumina MiSeq e um total de 5.224.389 de sequências foi obtido de 48 amostras. Para o total de sequências, os três filos mais abundantes foram Firmicutes (50,22%), Verrucomicrobia (15,13%), seguido por 13,80% de bactérias que não foram classificadas no nível filo. Os gêneros com maior abundância relativa foram: Clostridiales não classificados (17,06%), “5 genus incertae sedis” (12,98%) e bactérias não classificadas (12,95%). Nossos resultados indicaram que a atividade física intensa e o condicionamento aeróbio podem alterar a composição e a estrutura da população bacteriana intestinal de potras. O cromo ou a L-carnitina na comparação intra grupos provocaram alterações moderadas na diversidade da microbiota fecal de potras. Entretanto, os resultados dos grupos suplementados não apresentaram alteração em relação às potras que fizeram somente exercício.

Palavras-chave: Equinos, Bactéria intestinal, Gene rRNA 16S, Microbioma, Lactato

EFFECTS OF EXERCISE AND CHROMIUM OR CARNITINE SUPPLEMENTATION ON THE FECAL MICROBIOTA OF FILLIES

SUMMARY

Recent studies performed in humans and rats reported that exercise could alter the intestinal microbiota. Evidence indicated that this microbial community is involved in the metabolic homeostasis of the host. Moreover, studies about ergogenic substances are scarce in the literature on intestinal microbiota. This study aimed to assess the impact of acute exercise and aerobic conditioning, associated either with chromium or L-carnitine supplementation, on the intestinal microbiota of fillies. Twelve "Mangalarga Marchador" fillies in incipient fitness stage were distributed into four groups: control (no exercise), exercise, L-carnitine and chromium. The fillies underwent two incremental exercise tests, before and after training on a treadmill for 42 days at 70-80% of the lactate threshold intensity. Fecal samples were obtained before and 48 hours after the acute exercise (incremental exercise test). Bacterial populations were characterized by sequencing the V4 region of the 16S rRNA gene using the MiSeq Illumina platform, and 5,224,389 sequences were obtained from 48 samples. The results showed that the three most abundant phyla were Firmicutes (50.22%), Verrucomicrobia (15.13%), followed by bacteria that were not classified at the phylum level (13.80%). The genera with the highest relative abundance were unclassified Clostridiales (17.06%), "5 genus incertae sedis" (12.98%) and unclassified bacteria (12.95%). Our results indicated that intense physical activity and aerobic conditioning might change the composition and structure of the intestinal bacterial population in fillies. The intra-group comparison showed that chromium or L-carnitine caused moderate changes in the fecal microbiota of fillies. However, the results of the supplemented groups were not different from the exercise-only group. Thus, further studies using a larger sampling are needed to further investigate these changes.

Keywords: Equine, Intestinal bacteria, 16S rRNA Gene, Microbiome, Lactate

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido como potência mundial no agronegócio e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento classificou a equideocultura brasileira como parte integrante da atividade pecuária, em virtude de sua importância econômica e social.

Esse destaque da cadeia produtiva equestre nacional foi comprovado num estudo elaborado por LIMA et al. (2006), a pedido da Confederação Nacional de Agricultura (CNA), que demonstrou a movimentação, em média, de R\$ 7,3 bilhões por ano com empregabilidade direta de aproximadamente 640 mil pessoas. Já se passaram 9 anos, desde que este estudo foi publicado pelo Centro de Estudos Avançados em Economia (CEPEA-ESALQ/USP), sendo a única fonte de consulta para a justificativa da relevância dos estudos científicos com a espécie equina no Brasil e obtenção de recursos financeiros junto aos órgãos de fomento (CNPq e FAPESP, entre outros). Uma estimativa recente publicada no ano de 2015 por pesquisadores da UFMG indicou que o Brasil possui aproximadamente 5.496.817 equinos (VIEIRA et al., 2015). A complexidade da cadeia produtiva levou os pesquisadores a nomear este segmento econômico de Complexo Agronegócio do Cavalo (CAC). Trata-se de um segmento não linear, diferentemente da cadeia produtiva dos bovinos. O CAC necessita de inovação e tecnificação produzida por uma abordagem multidisciplinar, com auxílio das universidades e institutos de pesquisa, com o objetivo de profissionalizar este segmento econômico que tem papel revelante no agronegócio brasileiro.

Corroborando essa visão multidisciplinar, a matéria vinculada pela revista *Nature* (ADAMS, 2013) demonstrou que o crescimento qualitativo da ciência e, conseqüentemente, de grupos de pesquisa com foco em inovação, está relacionado com o estabelecimento de parcerias nacionais e internacionais. Neste contexto, um aspecto importante que contribuiu para a viabilidade da realização do presente trabalho foi a conjunção de grupos de pesquisadores, no que tange a cooperação nacional e internacional, envolvendo quatro grupos de pesquisa. As potras utilizadas neste

experimento e parte do financiamento foram obtidos pela UFMG por meio do apoio do CNPq. O manejo geral, os testes de esforço incrementais na esteira, bem como a prescrição da intensidade e a avaliação do condicionamento físico foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ). A extração de DNA e interpretação dos dados de bioinformática foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas (LBMP) o qual também financiou o sequenciamento das amostras de DNA. Ambos estão localizados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Campus de Jaboticabal/SP. O *Advanced Analysis Centre*, localizado na Universidade de Ghelph (Canadá), foi responsável pelo sequenciamento das amostras de DNA. Os procedimentos experimentais realizados foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FCAV) de acordo com o protocolo nº 016842/13.

Os microrganismos estão presentes em todos os ambientes da biosfera. Entretanto, devido a dificuldade de se reproduzir em laboratório as mesmas condições naturais do meio que habitam, a maioria desses microrganismos não foi estudada (SIMON e DANIEL, 2011; HANDELSMAN, 1998). Os métodos tradicionais de cultura permitem somente uma avaliação superficial dos componentes do microbioma, sendo uma limitação importante devido a provável presença de microrganismos incultiváveis (ECKBURG et al., 2005). Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas moleculares, como o sequenciamento de nova geração do gene 16S rRNA, é considerado uma revolução para a descoberta de novos organismos e para um melhor entendimento das interações entre as bactérias e delas com o meio que interagem. Por meio desta tecnologia, estabeleceu-se que a maior parte dos organismos que constituem a microbiota intestinal era formada por bactérias até então desconhecidas.

Diversos estudos demonstraram que a microbiota intestinal exerce papel fundamental na regulação metabólica e imunológica e que diferentes populações bacterianas estão relacionadas à obesidade (TURNBAUGH et al., 2009), síndrome do

intestino irritável (FRANK et al., 2007), diabetes tipo I (WEN et al., 2008) e até mesmo em certos aspectos comportamentais (NEUFELD et al., 2011).

REVISÃO DE LITERATURA

No corpo humano existem 10 vezes mais bactérias do que células humanas, sendo que a maioria está presente no trato gastrointestinal que contém até 1000 diferentes espécies e aproximadamente 10^{12} bactérias/grama de fezes (SUAU et al., 1999). Devido à sua complexidade e ao imenso material genético pertencente às suas bactérias, o sistema digestório tem sido classificado costumeiramente como o “segundo genoma”.

Com foco na espécie animal utilizada na presente pesquisa, o intestino grosso dos equinos é uma câmara fermentativa anaeróbia onde bactérias fibrolíticas produzem ácidos graxos de cadeia curta, principal substrato para produção de energia nesta espécie (ARGENZIO et al., 1974). O funcionamento adequado do sistema digestório e da sua microbiota é fundamental para a manutenção da higidez do equino. A partir de uma abordagem comparativa, uma importante característica que faz dos equinos uma espécie única, quando comparada a outras espécies domésticas, é a alta taxa de digestão da fibra dietética observada tanto no ceco como no cólon (LORENZO-FIGUERAS e MERRITT, 2008).

A homeostase do microbiota intestinal dos equinos pode ser modificada por diversos fatores extrínsecos como enfermidades gastrintestinais (COSTA et al., 2012), modificações na dieta (BERG et al., 2012), uso de suplementos nutricionais (TURNBAUGH et al., 2009), aplicações de antibióticos (De LA COCHETIERE et al., 2008; COSTA et al., 2013) e anestésicos gerais (GRONVOLD et al., 2010). Estes fatores extrínsecos podem produzir por vezes consequências sistêmicas importantes prejudicando a saúde da espécie. No entanto, tais informações ainda são escassas na espécie equina (COSTA e WEESE, 2012).

A maioria dos estudos de caracterização da microbiota intestinal de equinos utilizou de maneira exclusiva, métodos tradicionais de cultura bacteriana de fezes ou do

conteúdo intestinal, o que demonstra que as pesquisas com abordagens moleculares inovadoras são necessárias para a determinação da diversidade populacional bacteriana em amostras fecais na espécie equina.

Desta maneira, o interesse acadêmico em caracterizar a diversidade e a estrutura populacional de bactérias intestinais dos equinos e investigar possíveis fatores responsáveis que modifiquem sua homeostase, vem ao encontro com a fisiologia digestiva desta espécie, no que diz respeito as suas nuances relacionadas com o processo de evolução e domesticação. Com o passar do tempo a espécie equina conseguiu se moldar e desempenhar seu papel como animais de esporte, lazer, criação e lida com o gado preservando a sua vida, apesar de todas as imperfeições caracterizadas frequentemente por transtornos digestivos como a síndrome do abdomen agudo (cólicas). Desta maneira, modificações na sua microbiota intestinal podem trazer prejuízos a sua saúde. O manejo intensificado de atletas da espécie equina pode modificar a microbiota fecal estando, por vezes, associado com alterações digestivas e metabólicas que podem reduzir o condicionamento físico ao exercício. Ademais, é nítido o interesse pela comunidade científica e pelo mercado especializado, pela prospecção de bactérias e genes com potencial de aplicação biotecnológica que auxilie na confecção de prebióticos (RESPONDEK et al., 2008) e probióticos (WEESE, 2002; GU e LIU, 2013) e até produção de biocombustíveis (LI et al., 2012).

Neste contexto é praticamente inexistente na literatura, informações que relacionaram tanto a prática aguda de exercício intenso como a realização crônica de esforço físico (condicionamento físico) com possíveis alterações no microbioma intestinal de equinos.

O exercício físico é o estímulo estressante mais fisiológico que existe, pois promove alterações reversíveis em diversas variáveis homeostáticas, sendo que estas mudanças podem ser determinadas por meio de ferramentas laboratoriais. Dependendo do tipo de esforço, que é diferenciado tanto pela duração como pela intensidade (velocidade) de uma sessão de exercício, tais modificações são observadas em variáveis que indicam respostas cardíacas e hematológicas (FERRAZ et al., 2009), o estado ácido-base (FERRAZ et al., 2010a), o grau de desidratação (LINDINGER e

ECKER, 2013), entre outras. Exemplificando, num teste de exercício do tipo incremental é clássica a resposta sistêmica, porém reversível, de indução de acidose metabólica provocada pelo aumento da taxa glicolítica da fibra muscular esquelética. Qual serão as possíveis repercussões desta resposta sistêmica sobre a homeostase da microbiota intestinal em equinos?

Diversos aspectos da vida moderna e do manejo dos animais que foram domesticados podem interferir na composição da MI, sendo que esta comunidade microbiana tornou-se o foco de diversas disciplinas biológicas, notadamente, devido a sua possível contribuição para a manutenção da saúde ao longo da vida do organismo hospedeiro. Como citado anteriormente, as mudanças na composição da microbiota estão relacionadas com alterações comportamentais, obesidade e enfermidades crônicas.

Alguns estudos recentes publicados em periódicos de alto impacto científico envolveu a espécie humana ou animais de laboratório e forneceram evidências que a atividade física pode interferir na comunidade microbiana intestinal (CLARKE et al., 2014; EVANS et al., 2014; ALLEN et al., 2015).

O exercício induziu modificações na MI de ratos Wistar normais, obesos e hipertensos que foram submetidos a um protocolo de condicionamento aeróbio 5 vezes por semana por 4 semanas (PETRIZ et al., 2014). Outro estudo encontrou que o exercício modificou a microbiota de camundongos diabéticos provocando uma maior abundância relativa da espécie Firmicutes e uma redução de Bacteroides/Prevotella spp. Neste mesmo estudo foi encontrado uma maior proporção de Bifidobacterium spp nos camundongos normais em relação aos diabéticos, sendo que os autores concluíram que estudos futuros são necessários para elucidar como a atividade física pode interferir na MI (LAMBERT et al., 2015).

Com relação ao esporte de alto rendimento os resultados de alguns estudos produziram evidências que alguns sinalizadores musculares como a enzima creatina cinase (CK) poderiam interferir na MI por meio sistêmico. Um estudo recente sobre o impacto do exercício associado à ingestão de dieta variada identificou aumento da

diversidade da MI, que teve correlação positiva com a atividade da CK em atletas de alto rendimento de rugby (O'SULLIVAN et al., 2015; CLARKE et al., 2014).

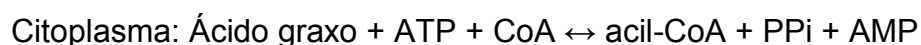
A presente pesquisa também pretendeu verificar se existem alterações adaptativas sobre a microbiota intestinal de equinos submetidos a um programa de condicionamento físico aeróbio. Existem na literatura diversas definições para treinamento, sendo que especificamente o treinamento físico promove a melhora ou a manutenção do desempenho máximo e das habilidades específicas, bem como a procrastinação da fadiga minimizando a incidência de lesões, garantindo a manutenção e a disposição do entusiasmo para realização de exercício. O significado do termo condicionamento é mais restrito, representando a melhoria da condição atlética por meio de alterações adaptativas corpóreas que podem ser avaliadas por ferramentas básicas, porém norteadas pela metodologia científica, como a lactatemia (LINDNER, 2010) e pH plasmático (FERRAZ et al., 2010a). O objetivo central de qualquer programa de condicionamento em equinos atletas é estimular adaptações metabólicas e fisiológicas que proporcionem aumento da aptidão atlética. Para tanto, sessões de exercício intercaladas com períodos de descanso devem ser prescritas com planejamento (MARLIN e NANKERVIS, 2002; DAVIE, 2006; RIVEIRO, 2007; FERRAZ et al. 2010b). A imposição de exercícios com intensidade progressiva em períodos regulares promovem alterações benéficas estruturais e funcionais no organismo atleta, proporcionando o incremento da capacidade competitiva (EVANS, 2000).

Tendo em vista as modificações e adaptações sistêmicas e locais provocadas tanto pelo exercício agudo como crônico, qual será o efeito de uma única sessão de exercício ou do condicionamento físico sobre a microbiota intestinal de equinos? De maneira geral esta é uma das perguntas que os resultados desta dissertação de mestrado tentaram responder.

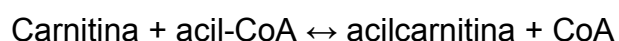
No presente estudo nós utilizamos pela primeira vez o sequenciamento genético de nova geração para estudar possíveis modificações na microbiota fecal de potras, submetidos a sessões de exercício (testes de esforço incrementais) ou ao condicionamento físico aeróbio, associado à suplementação com carnitina ou cromo. Existem artigos científicos publicados a respeito da suplementação com carnitina ou

cromo, que utilizaram indicadores fisiológicos de aptidão física como a glicemia, a lactatemia, triglicerol, pH entre outros (FONSECA et al., 2015).

A carnitina é uma amina e um cofator essencial para transporte dos ácidos graxos de cadeia longa através da membrana mitocondrial interna e sua baixa disponibilidade pode ser um fator limitante ao uso de lipídios durante o exercício (HARRIS e HARRIS, 2005). A carnitina, após ser esterificada, dá origem a acilcarnitina, que sofre β -oxidação para produção de energia, conforme equações descritas abaixo:



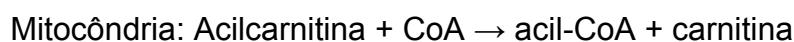
(acil-CoA sintetase)



(carnitina palmitoil transferase I)

↓

Mitocôndria



(carnitina palmitoil transferase II)

↓

Matriz mitocondrial

↓

β -oxidação → Ciclo de Krebs

Dessa forma, o maior aporte de carnitina na dieta pode aumentar a capacidade de transporte de ácidos graxos para a mitocôndria e incrementar sua oxidação (GEOR, 2006), poupando glicogênio (BACURAU et al., 2003). Esta potencialização da oxidação lipídica pode ser benéfica durante exercícios prolongados como provas de enduro e competições de marcha. Será que a suplementação crônica e oral com carnitina pode interferir com a diversidade e induzir mudanças na microbiota intestinal dos equinos?

O cromo trivalente, ao fazer parte da cromodulina, potencializa os efeitos da insulina e pode aumentar a tolerância à glicose, alterando o metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos (NRC, 2007). O cromo pode aumentar a concentração de triacilglicerol e reduzir o pico de insulina, a relação insulina:glicose, as concentrações sanguíneas de lactato e de cortisol (PAGAN et al., 1995) e a frequência

cardíaca de equinos durante o exercício (PRATES et al., 2009; JORDÃO et al., 2011). PRATES et al. (2009) e JORDÃO et al. (2011) observaram retorno mais rápido da frequência cardíaca de repouso em equinos suplementados com cromo trivalente após o exercício, sugerindo que este micromineral pode retardar o aparecimento da fadiga em provas de marcha.

Tanto exercícios de alta intensidade quanto exercícios de longa duração aumentam a absorção do cromo trivalente intestinal, mas a perda urinária ainda é prioritária, resultando em um balanço negativo de cromo trivalente, depleção e redistribuição dos estoques corporais após o exercício. Por isso, especula-se que os atletas apresentem deficiência de cromo trivalente com mais facilidade que indivíduos sedentários ou moderadamente ativos (RUBIN et al., 1998) e que equinos exercitados intensamente e alimentados com dieta rica em grãos eliminem maior quantidade de cromo trivalente pela urina do que equinos sedentários (PAGAN, 2000), o que também justificaria sua suplementação.

Com relação à raça de equinos utilizada neste estudo, a Mangalarga Marchador teve sua origem no Brasil. Atualmente, do ponto de vista comercial, esta raça contribui com o complexo agronegócio do cavalo, tendo em vista que é a raça mais numerosa em nosso país sendo, o estado de Minas Gerais, o que apresenta maior número de criadores e animais (LIMA et al., 2006). O aumento significativo das exportações de equinos para outros países como Bélgica, Holanda, Congo, Austria, Uruguai e Estados Unidos reflete a relevância da raça. No início de 2014 a Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM), contabilizou 8.239 associados e 624.337 animais registrados. Dessa forma, essa raça brasileira, é responsável pela geração de 43.000 empregos diretos (SANTIAGO, 2013).

OBJETIVOS GERAIS

Neste trabalho, o objetivo central foi avaliar se o exercício intenso, representado por dois testes de esforço incrementais, separados por um período de 42 dias de condicionamento aeróbio, foram capazes de alterar a microbiota fecal de potras da raça

Mangalarga Machador em estágio inicial de aptidão física. O protocolo de condicionamento foi prescrito com base na velocidade relacionada ao limiar de lactato das potras. Ademais, existe atualmente no mercado de produtos para cavalos atletas muitos suplementos orais disponíveis para a comercialização, que podem ser fornecidos com o propósito de melhorar o desempenho. Entretanto, existe uma demanda considerável pela realização de estudos científicos que possam demonstrar a eficácia destes suplementos, que costumeiramente são classificados como ergogênicos nutricionais.

REFERÊNCIAS (ABNT - NRB-6023, outubro de 2015)

ADAMS, J. The fourth age of research. **Nature**, v. 497, p. 557–560, 2013.

ABCCMM 2009. Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador. **Regulamento Geral para Eventos Oficializados do Cavalo Mangalarga Marchador**, Belo Horizonte, 54 p.

ARGENZIO, R. A.; SOUTHWORTH, M.; STEVENS, C. E. Sites of organic acid production and absorption in the equine gastrointestinal tract. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 226, n. 5, p. 1043-1050, 1974.

BACURAU, R. F.; NAVARRO, F.; BASSIT, R. A.; MENEGUELLO, M. O.; SANTOS, R. V.; ALMEIDA, A. L. Does exercise training interfere with the effects of l-carnitine supplementation?. **Nutrition**, v. 19, n. 4, p. 337-341, 2003.

COSTA, M. C.; ARROYO, L. G.; ALLEN-VERCOE, E.; STÄMPFLI, H. R.; KIM, P. T.; STURGEON, A.; WEESE J. S. Comparison of the Fecal Microbiota of Healthy Horses and Horses with Colitis by High Throughput Sequencing of the V3-V5 Region of the 16S rRNA Gene. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, e41484, 2012.

COSTA, M. C.; STÄMPFLI, H. R.; ARROYO, L. G.; GOMES, R. G.; WEESE J. S. Effects of parenteral antimicrobials on the equine fecal microbiome investigated by next generation sequencing. **Proceedings of the 2013 ACVIM Forum**, Seattle, 2013.

COSTA, M. C.; WEESE, J. S. The equine intestinal microbiome. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 01, p. 121-128, 2012.

DAVIE, A. J. A scientific approach to training thoroughbreds. In: LINDNER A (Ed.) Management of lameness causes in sport horses pp. 69–83. Wageningen thenetherlands: The Wageningen Press, 2006.

DE LA COCHETIÈRE, M. F.; DURAND, T.; LALANDE, V.; PETIT, J. C.; POTEL, G.; BEAUGERIE, L. Effect of antibiotic therapy on human fecal microbiota and the relation to the development of *Clostridium difficile*. **Microbial ecology**, v. 56, n. 3, p. 395-402, 2008.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

O'SULLIVAN, O.; CRONIN, O.; CLARKE, S. F.; MURPHY, E. F.; MOLLOY, M. G.; SHANAHAN, F.; COTTER, P. D. Exercise and the microbiota. **Gut microbes**, v. 6, p. 131-136, 2015.

CLARKE, S.F.; MURPHY, E. F.; O'SULLIVAN, LUCEY, AJ, HUMPHREYS M, HOGAN A, COTTER P D. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. **Gut**, v. 63, p. 1913-1920, 2014.

EVANS, D.L. Training and fitness in athletic horse. Sidney: **RIRDC.**, 64p. 2000.

FERRAZ, G. C.; SOARES, O. A. B.; FOZ, N. S. B.; PEREIRA, M. C.; QUEIROZ-NETO, A. The workload and plasma ion concentration in a training match session of high-goal (elite) polo ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 191-195, 2010a.

FERRAZ, G.C.; TEIXEIRA NETO, A. R.; PEREIRA, M.C.; LINARDI, R.L.; LACERDA NETO, J. C.; QUEIROZ-NETO, A. Influence of the aerobic training on cortisol and glucose levels in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 23-29, 2010b.

FERRAZ, G.C.; TEIXEIRA-NETO, A.R.; D'ANGELIS, F.H.F. et.al. Alterações hematológicas e cardíacas em cavalos Árabes submetidos ao teste de esforço crescente em esteira rolante. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 431-437, 2009.

FRANK, D. N.; AMAND, A. L. S.; FELDMAN, R. A.; BOEDEKER, E. C.; HARPAZ, N.; PACE, N. R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 34, p. 13780-13785, 2007.

GEOR, R. J. The role of nutritional supplements and feeding strategies in equine athletic performance. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 3, n. 03, p. 109-119, 2006.

GRONVOLD, A.; L'ABÉE-LUND, T. M.; STRAND, E.; SORUM, H.; YANNARELL, A. C.; & MACKIE, R. I. Fecal microbiota of horses in the clinical setting: potential effects of

penicillin and general anesthesia. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 366-372, 2010.

GU, W.; LIU, J. C. Probiotics in Critically Ill Patients: More Data Are Needed. **CHEST Journal**, v. 143, n. 3, p. 873-874, 2013.

HARRIS, P. A.; HARRIS, R. C. Ergogenic potential of nutritional strategies and substances in the horse. **Livestock Production Science**, v. 92, n. 2, p. 147-165, 2005.

LAMBERT, J. E.; MYSLICKI, J. P.; BOMHOF, M. R.; BELKE, D. D.; SHEARER, J.; REIMER, R. A. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. 999, p. 1-4, 2015.

LI, Y.; HU, L.; XUE, G.; LIU, H.; YANG, H.; ZHU, Y.; TIAN Y.; LU X. Comparison of bacterial diversity in large intestine of Xiangxi yellow cattle (*Bos taurus*) associated with different diet: Fresh *Miscanthus sinensis* and mixed forage. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 30, p. 5965-5974, 2012.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. **Piracicaba: ESALQ/USP**, 2006.

LINDINGER, M. I.; ECKER, G. L. Gastric emptying, intestinal absorption of electrolytes and exercise performance in electrolyte-supplemented horses. **Experimental physiology**, v. 98, n. 1, p. 193-206, 2013.

LINDNER, A. E. Maximal lactate steady state during exercise in blood of horses. **Journal of animal science**, v. 88, n. 6, p. 2038-2044, 2010.

LORENZO-FIGUERAS, M.; MERRITT, A. M.; HINCHCLIFF, K. W.; GEOR, R. J.; KANEPS, A. J. Effects of exercise on gastrointestinal function. **Equine Exercise Physiology-The Science of Exercise in the Athletic Horse**. Saunders Elsevier, The Netherlands, p. 424-440, 2008.

MARLIN, D.; NANKERVIS, K. J. **Equine exercise physiology**. John Wiley & Sons, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of horses. 6.ed. Washington: The National Academies Press, 2007. 341 p.

NEUFELD, K. A. M.; KANG, N.; BIENENSTOCK, J.; FOSTER, J. A. Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. **Communicative & integrative biology**, v. 4, n. 4, p. 492-494, 2011.

PAGAN, J. D.; JACKSON, S. G.; DUREN, S. E. The effect of chromium supplementation on metabolic response to exercise in Thoroughbred horses. **Kentucky Equine Research**, Inc., 2000. Disponível em: <www.ker.com/library/advances/130.pdf>. Acessado em: 8 ago. 2010.

PAGAN, J. D.; BURGER, I.; JACKSON, S. G. The influence of time of feeding on exercise response in Thoroughbreds fed a fat supplemented or high carbohydrate diet. In: **PROCEEDINGS OF THE EQUINE NUTRITION AND PHYSIOLOGY SYMPOSIUM**, 9, 1995, East Lansing. p. 92-93.

PRATES, R. C.; REZENDE, H. H. C. D.; LANA, Â. M. Q.; BORGES, I.; MOSS, P. C. B.; MOURA, R. S. D.; REZENDE, A. S. C. D. Heart rate of Mangalarga Marchador mares under marcha test and supplemented with chrome. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 916-922, 2009.

RESPONDEK, F.; SWANSON, K. S.; BELSITO, K. R.; VESTER, B. M.; WAGNER, A.; ISTASSE, L.; DIEZ, M. Short-chain fructooligosaccharides influence insulin sensitivity and gene expression of fat tissue in obese dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 9, p. 1712-1718, 2008.

REZENDE JORDÃO, L. D.; BERGMANN, J. A. G.; MOURA, R. S.; MELO, M. M.; COSTA, M. L.; MOSS, P. C.; REZENDE, A. S. C. D. Effect of feed at different times prior to exercise and chelated chromium supplementation on the athletic performance of Mangalarga Marchador mares. **Comparative Exercise Physiology**, v. 7, n. 03, p. 133-140, 2010.

RIVERO, J. L. A scientific background for skeletal muscle conditioning in equine practice. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 54, n. 6, p. 321-332, 2007.

RUBIN, M. A.; MILLER, J. P.; RYAN, A. S.; TREUTH, M. S.; PATTERSON, K. Y.; PRATLEY, R. E.; ANDERSON, R. A. Acute and chronic resistive exercise increase urinary chromium excretion in men as measured with an enriched chromium stable isotope. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 1, p. 73-78, 1998.

SANTIAGO, J. M.; CARNEIRO, A. S.; REZENDE, M. G. F.; ABRANTES, R. G. P.; LAGE, J.; LANA, Â. M. Q. Comparação entre as medidas morfométricas do rebanho atual de machos mangalarga marchador e dos campeões da raça. **Boletim de Indústria Animal**, v. 70, n. 1, p. 46-52, 2013.

SUAU, A.; BONNET, R.; SUTREN, M.; GODON, J.J.; GIBSON, G.R.; COLLINS, M. D., DORÉ, J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4799–4807, 1999.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, M. L.; JONES, W. J.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. P.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH A. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-484, 2009.

VIEIRA, E. R. et al. Characterization of equidae breeding in Minas Gerais state. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 319-323, 2015.

WEESE, J. S. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, n. 8, p. 357-360, 2002.

WEN, L.; LEY, R. E.; VOLCHKOV, P. Y.; STRANGES, P. B.; AVANESYAN, L.; STONEBRAKER, A. C.; HU, C.; WONG, F. S.; SZOT, G. L.; BLUESTONE, J. A.; GORDON, J. I.; CHERVONSKY, A. V. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1109-1113, 2008.

SIMOM, C.; DANIEL, R. Metagenomics analyses: past and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology Journal**, v. 77, p. 1153-1161, 2011.

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO EXERCÍCIO INTENSO E DO CONDICIONAMENTO AERÓBIO ASSOCIADO A SUPLEMENTAÇÃO COM CROMO OU L-CARNITINA SOBRE A MICROBIOTA FECAL DE POTRAS

Introdução

A microbiota intestinal (MI) representa uma complexa e densa interação de microrganismos, principalmente bactérias, que ajudam a manter a homeostase do metabolismo do hospedeiro. Na espécie equina, o equilíbrio da MI pode ser modificado por alguns fatores extrínsecos como enfermidades gastrintestinais [1], modificações na dieta [2] e aplicações de antibióticos [3,4] ou anestésicos gerais [5]. Um estudo recente revelou que mudanças na MI de éguas precedem o desenvolvimento de injúrias gastrintestinais pós-parto [6]. Atualmente, o foco das pesquisas está relacionado aos possíveis impactos sobre a diversidade da MI provocados pela atividade física, sendo que existem poucos estudos com indivíduos saudáveis. Outro aspecto a ser considerado é que os resultados apresentados na literatura foram obtidos a partir de estudos com variações consideráveis no tipo de dieta [7]. Nesse contexto, dados da literatura relataram que a prática de exercício físico é a maneira mais efetiva para provocar balanço energético negativo e melhorar as funções fisiológicas [8]. Contudo, são raras as informações na literatura, inclusive com cavalos atletas, que relacionaram a prática de exercício intenso e com programas de condicionamento físico, com possíveis alterações na estrutura e na diversidade da MI.

Com enfoque no exercício físico, alguns estudos recentes que empregaram técnicas de sequenciamento genético relataram o efeito do exercício sobre a MI em animais de laboratório, o qual modificou a estrutura e a diversidade da MI de camundongos [9]. Outro estudo identificou

que a variação de esforço produziu alterações na microbiota cecal de camundongos normais e diabéticos [10].

Considerando o exercício como estímulo que modifica a homeostase, uma única sessão de esforço pode promover alterações reversíveis em diversas variáveis fisiológicas, sendo que estas mudanças podem ser confirmadas por meio da quantificação de variáveis laboratoriais. Dependendo do tipo de esforço, que é diferenciado, tanto pela duração como pela intensidade (velocidade) de uma sessão de exercício, tais modificações são observadas em variáveis fisiológicas [11]. Exemplificando, num teste intenso de exercício do tipo incremental é clássica a resposta sistêmica, reversível, do aumento da taxa glicolítica e hidrólise do ATP durante a contração da fibra muscular esquelética com indução de acidose metabólica, associada ao aumento da produção de lactato plasmático [12]. Além disso, o monitoramento da atividade de enzimas séricas como a creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST), após o esforço agudo ou durante programas de condicionamento, pode refletir alterações na permeabilidade do sarcolema. Estas enzimas são consideradas biomarcadores do estado funcional da fibra muscular [13]. Do ponto de vista crônico, já é conceito clássico que um programa de condicionamento físico pode levar a adaptação corpórea dos compartimentos cardíaco e muscular.

Como a influência do exercício sobre a MI é pouco estudada, alguns pesquisadores propuseram que a plasticidade do tecido muscular, induzida pela prática de atividade física, pode interferir na MI por meio de metabólitos oriundos da musculatura que, em tese, atuariam de maneira sistêmica, inclusive sobre o compartimento intestinal. Um estudo recente sobre o impacto do exercício associado à ingestão de dieta variada identificou aumento da diversidade da MI, que teve correlação positiva com a atividade da CK em atletas de alto rendimento de rugby [14,15].

Neste contexto, existem muitos suplementos orais disponíveis para a comercialização no mercado de produtos para atletas da espécie humana e equina que podem ser fornecidos com o objetivo de melhorar o desempenho destes animais. Ademais, existe uma demanda considerável pela realização de estudos científicos que possam demonstrar os possíveis efeitos desses suplementos que costumeiramente são classificados como ergogênicos nutricionais. Desta maneira, o cromo (Cr) ou a L-carnitina (LC) são substâncias com potencial ergogênico para atletas, pois podem aumentar a disponibilidade de energia para o exercício e postergar o início da fadiga [16,17]. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a suplementação oral e crônica com Cr ou LC, durante um programa aeróbio de condicionamento, produziu alterações moderadas em biomarcadores do metabolismo energético de potras [18].

Deste modo, os objetivos do nosso estudo foram: 1) avaliar e descrever os possíveis impactos do exercício intenso e de um programa de condicionamento aeróbio sobre a composição e a diversidade da MI em potras; e 2) investigar se a suplementação crônica com Cr ou LC, associada ao exercício intenso e a um programa de condicionamento aeróbio, podem modificar a composição e a diversidade a MI de potras.

2. Material e métodos

2.1 Localização

A partir da colaboração de três laboratórios o experimento foi realizado. O manejo, testes de esforço incrementais e prescrição da intensidade do condicionamento físico foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício Equino (LAFEQ). A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas (LBMP), ambos

localizados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Campus de Jaboticabal/SP. O sequenciamento foi realizado no Advanced Analysis Centre localizado na University of Guelph's. Os procedimentos experimentais realizados foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FCAV) de acordo com o protocolo nº 016842/13.

2.2 Animais e período de adaptação

Doze potras da raça Mangalarga Marchador (MM), com 2,5 a 3 anos de idade, com peso corporal médio de 330 ± 30 kg e em estágio incipiente de condicionamento físico foram submetidas a um período de adaptação que durou 34 dias. Esse período consistiu na realização de doma e cabrestamento; ambientação ao manejo, dieta, instalações e aos equipamentos de exercício: esteira (Galloper Sahinco®) e caminhador automático (Sahinco®). Nos primeiros cinco dias realizou-se desverminação (Equimax® - Virbac Saúde Animal), casqueamento e avaliação e tratamento odontológico. A manipulação odontológica para a grosagem de pontas dentárias foi necessária somente nas potras 1 e 2 do grupo cromo que necessitou previamente de sedação com detomidina na dose de $10 \mu\text{g/kg}$ e xilazina na dose de $0,5 \text{ mg/kg}$ pela via intravenosa. Nenhum animal recebeu antibiótico ou anti-inflamatório e não foi relatado doença gastrointestinal no período anterior há 6 meses. Todas as potras do experimento ficaram alojadas em piquete com pasto sendo deslocadas para a sala da esteira ou caminhador somente na hora da sessão de treino. Os animais foram alimentados com concentrado em baias individuais.

2.3 Dieta

A formulação da dieta fornecida às potras teve como objetivo central impedir que ocorresse variação expressiva do peso corpóreo durante todo o período experimental, sendo que foi baseada nas exigências para a espécie equina, em fase de crescimento [19], com consumo diário de 2,5% do peso corpóreo (PC) com base na matéria seca. Desta maneira, evitou-se que as potras desenvolvessem emagrecimento ou ganho de peso excessivo. Em valores médios, ao longo do período experimental, o grupo controle consumiu $0,87 \pm 0,26\%$ de concentrado relativo ao PC, sendo que nos 14 dias iniciais o consumo médio foi de $1,10 \pm 0,01\%$ que foi reduzido para $0,63 \pm 0,02\%$. Já as potras que realizaram o programa de condicionamento consumiram $1,23 \pm 0,06\%$ de concentrado relativo ao PC. O restante da dieta foi composta de volumoso (aproximadamente 4 kg de feno de Tifton 85 e pastagem de capim *Panicum maximum* cv. Massai). Ademais, as potras foram avaliadas, por meio de escore de 0 a 5 [20] e pesagem em balança digital. A dieta (Tabela 1) foi composta por pastejo de *Panicum maximum* cv. Massai, feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp.), concentrado (68% de Milho, 12% de Farelo de Soja; 15% de Farelo de Trigo; 3% de Calcário Calcítico; 1% de Fosfato Bicálcico e 1% de Sal Mineral Coequi Plus[®]), 40 mL de óleo de soja, sal mineral (Coequi Plus - Tortuga Companhia Zootécnica Agrária) e água, sendo os dois últimos fornecidos *ad libitum*. Três potras foram suplementadas com 10 g por dia de L-Carnitina em pó, L-carnitine SweetMix[®], Sorocaba, São Paulo, Brasil) e outros três animais foram suplementados com 10 mg por dia de cromo quelatado em cápsula, (Tortuga Agrária Zootechnical Co., São Paulo, Brazil), os quais, foram oferecidos com o concentrado.

2.4 Protocolo de condicionamento

Ao final do período de adaptação, as potras foram submetidas a dois testes de exercício incremental (TEI). Realizou-se o primeiro teste (TEI 1) em esteira com o objetivo de estabelecer o limiar de lactato (LL), a partir da concentração plasmática de lactato para cada potra. A duração do período de condicionamento aeróbio foi de 42 dias. Após este período, as potras realizaram outro teste de exercício incremental (TEI 2). O LL foi utilizado como guia para a prescrição da velocidade (VLL) do exercício na esteira durante o período de condicionamento.

O protocolo do teste consistiu em 10 min de aquecimento (5 min a $1,7 \text{ m s}^{-1}$ e 5 min a $3,5 \text{ m s}^{-1}$, sem inclinação da esteira) [19]. Após o aquecimento, a esteira foi elevada à inclinação de 3% na velocidade de 4 m s^{-1} e iniciou-se a fase de velocidade progressiva em que a velocidade foi aumentada em 1 m s^{-1} a cada três minutos. O teste foi mantido até que os animais atingissem à fadiga, que foi identificada pela incapacidade das potras de acompanhar a velocidade da esteira mesmo sob estímulos para continuar. O desaquecimento teve duração de 10 min (5 min a $3,5 \text{ m s}^{-1}$ e 5 min a $1,7 \text{ m s}^{-1}$). Por meio de sistema de cateter (BD Insyte™ 14 G) e tubo extensor (60 cm – Embramed®) inserido na veia jugular externa, coletaram-se amostras sanguíneas nos 30 segundos finais de cada etapa. Os dados da concentração de lactato plasmático vs as etapas de velocidade estabeleceram o limiar de lactato.

A velocidade relacionada ao limiar de lactato (VLL) foi utilizada para a elaboração do protocolo de condicionamento físico, seis dias por semana, com descanso às segundas-feiras, utilizando esteira e caminhador automático em dias alternados. O exercício em esteira consistiu em 5 min de aquecimento ao passo ($1,7 \text{ m s}^{-1}$) e sem inclinação da esteira, seguido por 30 min de exercício com 3% de inclinação da esteira em velocidade de 70% da VLL nas primeiras duas

semanas e 75 % da VLL na terceira e na quarta semana. A recuperação foi realizada em 5 min ao passo ($1,7 \text{ m s}^{-1}$) sem inclinação da esteira. Na quinta e na sexta semana, o protocolo consistiu em 5 min de aquecimento ao passo ($1,7 \text{ m s}^{-1}$) e sem inclinação da esteira, seguido por etapa de exercício intervalado com 3% de inclinação com duração de 20 min, dos quais 4 min foram realizados em velocidade de 70% da VLL, 4 min em velocidade de 75 % da VLL, 4 min em 80% da VLL, 4 minutos em 75% da VLL e 4 minutos em 70% da VLL. A recuperação foi realizada em 5 min ao passo ($1,7 \text{ m s}^{-1}$) sem inclinação. Cabe ressaltar que nas duas últimas semanas, o planejado seria que as potras se exercitassem somente a 80% VLL, com 3% de inclinação. Contudo, no final da quarta semana de condicionamento, as potras apresentaram relutância para entrar na sala da esteira. Desta maneira, para tentar mitigar esta alteração comportamental, o tempo total de atividade na esteira foi reduzido com a alternância entre as intensidades de exercício. O treino em caminador automático foi realizado em dias alternados ao exercício na esteira ergométrica e consistiu em 60 min de passo na velocidade de 2 m s^{-1} , invertendo o sentido de rotação a cada 10 min [18].

2.5 Grupos experimentais e momentos de coleta de fezes

Ao final do período de adaptação, para composição do grupo controle (sem exercício), as 12 potras foram inicialmente distribuídas aleatoriamente. As potras que compuseram o grupo controle não realizaram teste de esforço.

Com o objetivo de equilibrar os grupos em relação ao grau de condicionamento as potras foram distribuídas conforme as velocidades relacionadas ao VLL, obtidas individualmente, no primeiro teste de esforço incremental (TEI 1). Desta maneira, para a distribuição dos grupos

experimentais (Exercício, Carnitina e Cromo), procedeu-se um sorteio prévio das potras para a composição dos grupos com base nas VLL individuais. Portanto, as potras foram classificadas em baixa (4 potras entre 4,23 a 4,83 m s⁻¹), moderada (2 potras entre 5,00 a 5,83 m s⁻¹) e alta (3 potras entre 6,67 a 7,00 m s⁻¹) velocidade. A partir deste procedimento as potras foram distribuídas de maneira aleatória nos grupos experimentais.

Desta maneira, o presente estudo teve quatro grupos experimentais: controle (C, sem exercício nem suplementação, n=3), exercício (E, exercitadas sem suplementação, n=3), L-carnitina (Car, exercitadas e suplementadas com L-Carnitina n=3) e cromo (Cr, exercitadas e suplementadas com cromo, n=3). Importante informar que para avaliar somente o efeito do exercício agudo quanto do condicionamento aeróbio, e aumentar o n amostral foi desconsiderado o fator suplementação. Para isso, formou-se o grupo exercício total (ET, todos os animais que realizaram exercício agudo e condicionamento aeróbio, n=9).

Para avaliação do efeito do exercício agudo, as amostras de fezes foram coletadas imediatamente antes do TEI-1, sendo que os grupos foram nomeados: C1-0, E1-0, Car1-0 e Cr1-0 e 48hs após ao TEI-1: C1-48, E1-48, Car1-48 e Cr1-48. Para as amostras coletadas imediatamente antes do TEI-2, os grupos foram nomeados: C2-0, E2-0, Car2-0 e Cr2-0 e 48hs após ao TEI-2: C2-48, E2-48, Car2-48 e Cr2-48. O mesmo padrão foi seguido para o grupo exercício total (ET); ET1-0, ET1-48, ET2-0 e ET2-48. Para a avaliação dos efeitos do condicionamento aeróbio e da suplementação, as amostras foram comparadas no início do período de condicionamento (dia 0, imediatamente após os 34 dias de adaptação) e nomeadas em C0, E0, Car0 e Cr0; as amostras colhidas após o período de condicionamento foram C42, E42, Car42 e Cr42.

2.6 Coleta de fezes e mensuração do pH fecal

As amostras de fezes foram coletadas numa quantidade de aproximadamente 200 g, diretamente da ampola retal. Imediatamente após a obtenção das amostras, determinou-se o pH fecal, por meio de pHmetro industrial calibrado (Digimed – DM 22), com 30 g de fezes diluídas em 30 mL de água deionizada. Ato contínuo, outras alíquotas de fezes (aproximadamente 10 g) foram armazenadas e congeladas em freezer -80°C até a extração de DNA. Amostras fecais foram coletadas imediatamente antes e 48 h após TEI-1 e TEI-2 (4 momentos).

2.7 Momentos de coleta e determinação dos biomarcadores plasmáticos e séricos da atividade muscular e peso corpóreo

Para determinação eletro-enzimática da concentração plasmática de lactato (YSI 2300 Analyzer; YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, USA) as amostras sanguíneas foram obtidas imediatamente antes dos testes de esforço e logo após a fadiga, sendo transferidas para tubos de coleta contendo fluoreto de sódio. O pH venoso foi determinado por meio de um analisador químico portátil (i-STAT, EC8+ cartridges; Heska Corporation, Fort Collins, Colorado). Para avaliação da atividade enzimática CK, 10 mL de sangue foram coletados em tubos sem anticoagulante imediatamente antes e 6 h, 12 h, 24 h após os TEIs. A atividade enzimática da AST, dez mililitros de sangue foram coletadas em tubos anticoagulante imediatamente antes e 12 h, 24 h, 48 h após os TEIs. As atividades enzimáticas da CK e AST foram analisadas por meio de espectrofotometria (Quick Lab Chemistry Analyser, Hameln, Germany).

O peso corpóreo foi determinado por meio de uma balança digital (MGR-3000 Jr. Toledo do Brasil Ind. De Balanças Ltd., São Paulo, Brazil) antes do primeiro TEI-1 e nos dias 14, 32 e imediatamente antes do segundo TEI.

2.9 Extração do DNA e sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA

O DNA foi extraído a partir das amostras fecais por meio da utilização do kit FastDNA SPIN for soil (Mpbio®). A quantificação e a qualidade do DNA foi avaliada por meio de espectrofotometria (NanoDrop®, Thermo Fisher Scientific). As concentrações finais de DNA foram diluídas para 20 ng/μL. A região V4 do gene 16SrRNA foi amplificada numa reação contendo: 25 μL de Kapa 2G Fast Hot Start Ready Mix 2X (Kapa Biosystems, USA), 1,3 μL de Mg Cl₂ (50mM) (Invitrogen, USA), 1,0 μL de BSA (2 mg/ml) (Bio-Rad), 16,7 μL água livre de nuclease, 2 μL de DNA e 2 μL dos oligonucleotídeos iniciadores (10 pMol/μL): “primer forward” (S-D-Bact-00564-a-S-15 (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3')) e “primer reverse” (S-D-Bact-0785-b-A-18 (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3')). Os oligonucleotídeos utilizados na reação de amplificação foram desenhados contendo os adaptadores (“forward” TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG e “reverse” GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG) e o index de 8 pb (forward AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-index-TCGTCGGCAGCGTC e reverse CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTCTCGTGGGCTCGG) da Illumina para que as amostras pudessem ser aneladas na lâmina de sequenciamento, visto que os oligonucleotídeos iniciadores são complementares aos da lâmina de sequenciamento.

As amostras foram amplificadas no termociclador Mastercycler pro S (Eppendorf, Hamberg, Germany) sob as seguintes condições: 3min à 94°C para a desnaturação inicial, seguido

de 25 ciclos de 45 seg à 94°C para desnaturação, 1 min à 50°C para anelamento e 90 seg à 72°C para extensão, seguido de 10 min à 72°C para extensão final da fita e foram mantidas a 4°C. Como controle positivo utilizou-se o DNA genômico de uma mistura bacteriana e água livre de nuclease foi utilizada como controle negativo.

Ao final da amplificação as bibliotecas de amplicons foram purificadas com microesferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc, Mississauga, ON), com pequena modificação no protocolo do fabricante. Foram adicionados 72 µL da solução com microesferas magnéticas em 20 µL das bibliotecas amplificadas, esta mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 min. Logo após, as amostras foram lavadas duas vezes com etanol 80%, e ao final foram eluídas em 40 µL de água livre de nucleasse. As amostras purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) e qualificadas em gel de agarose 1%, após este procedimento as amostras foram diluídas a 5 ng/µL.

O sequenciamento foi realizado na University of Guelph's Advanced Analysis Centre, utilizando-se plataforma Illumina MiSeq (Illumina RTA v1.17.28; MCS v2.2) com o kit 2 x 250 pb.

2.10 Análise de bioinformática e análise estatística

A análise bioinformática foi realizada utilizando-se o software Mothur (versão 1.31.2) seguindo protocolo de um estudo [21]. As sequências de boa qualidade foram classificadas em “operational taxonomic units” (OTUs) e agrupadas a 97% de similaridade e subsequentemente alinhadas com a base de referência SILVA [22]. A classificação taxonômica de cada OTU foi feita com a base de dados Ribosomal Database Project (RDP, março de 2012) [23]. A detecção de quimeras foi realizada utilizando-se o software uchime [24].

Para diminuir os erros de sequências não uniformes, foi utilizada uma subamostragem (16.656 sequências por amostra). Para garantir a representação da subamostragem foi calculada a Good's coverage e a avaliação visual da cobertura do número de espécies presentes em cada amostra foi feita por meio das curvas de rarefação. A diversidade presente em cada amostra foi estimada pelo inverso do índice de Simpson e a riqueza pelo software Catchall [25]. Gráficos de barras representando a abundância relativa de filos e gêneros presentes em cada grupo nos diferentes momentos foram gerados e o teste Steel-Dwass comparou a abundância relativa entre os grupos controlando para erros de comparação múltipla. Para comparação dos índices de alfa diversidade (Catchall e inverso de Simpson) em cada grupo, foi utilizado o teste estatístico Anova com valores de $P < 0.05$ considerado significativo.

A similaridade entre as populações bacterianas presente em cada amostra foi estimada utilizando-se uma matriz de distância no formato Phylip para o cálculo dos coeficientes de Yue & Clayton, que leva em conta a diversidade bacteriana (estrutura da comunidade), e de Jaccard clássico, que leva em conta a riqueza bacteriana (composição da comunidade). A representação visual desses cálculos foi feita através de dendrogramas visualizados com o “software” FigTree (version 1.4.0, <http://tree.bio.ed.ac.uk/>). A estrutura e a composição das comunidades encontradas em cada grupo foram comparadas pelo teste de parsimonia. A análise de componentes principais (PCoA) foi usada para visualizar a comparação das amostras em 3 dimensões, o qual foi confeccionado pelo software “JMP” (SAS Institute Inc.). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância molecular (AMOVA).

Para avaliação das diferenças estatísticas ao longo do tempo (pré condicionamento e após o condicionamento) da quantidade de energia digestível de concentrado, quantidade de concentrado, peso corpóreo e biomarcadores plasmáticos e séricos (lactato, pH, CK e AST) foi

realizado análise de variância para amostras repetidas (ANOVA) seguido de teste de Holm-Sidak. Para determinação do impacto do efeito agudo do exercício (antes e na fadiga dos TEIs) utilizou-se teste t de student para amostras pareadas. Correlações de Pearson foram realizadas entre os índices de riqueza e diversidade, Catchall e inverso de Simpson, respectivamente, e as atividades da enzima CK e AST, concentração de lactato, pH plasmático e fecal. Para todas as análises estabeleceu-se o nível de significância em 5% ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Métricas

Após as etapas de controle de qualidade e limpeza das sequências, obteve-se um total de 5.224.389 sequências que foram utilizadas para as análises, a partir de 48 amostras (Mediana: 98.661,5; DP: 38.979,5) e que foram atribuídas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Uma sub-amostra de 16.656 sequências foi utilizada para normalizar o número de sequências entre todas as amostras para comparações posteriores. Os resultados do “Good’s coverage” atingidos após a sub-amostragem foram de $95 \pm 0,9\%$, indicando uma cobertura adequada. As curvas de rarefação podem ser observadas na Figura 1.

3.2 Abundância Relativa

O número de OTUs na sub-amostragem da população variou entre 1290 a 2296 (média: 1842 ± 256). Os filos e gêneros com abundância relativa acima de 1% podem ser observados na Figura 2A e 2B. As sequências obtidas foram classificadas num total de 19 filos, sendo que os mais abundantes foram Firmicutes (50,22%), Verrucomicrobia (15,13%), seguido por 13,80% de bactérias que não foram classificadas no nível de filo. Para os 19 filos foram atribuídos 165

gêneros, mas somente 14 apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Os três gêneros mais abundantes foram o Clostridiales não classificados ao nível do gênero (17,06%) seguidos por “5 genus *incertae sedis*” (12,98%) e bactérias não classificadas ao nível do filo (12,95%). Houve diminuição estatisticamente significativa do filo Chlamydiae ($P=0,031$) e do gênero *Mycobacterium* ssp. ($P=0,038$) quando comparadas as abundancias relativas entre os grupos E2-0 com E2-48 em resposta ao efeito agudo do exercício, TEI-2. Não houve mudanças entre os principais filos e gêneros em resposta ao condicionamento e às suplementações, como ou L-carnitina, imediatamente antes e 48 hs após os TEIs.

3.3 Análise de população

O grupo C revelou diferença na composição da comunidade, tanto na parsimonia quanto na AMOVA (C0 vs C42). Os resultados dos testes de parsimonia e da AMOVA, comparando os grupos experimentais que realizaram atividade física, antes e depois ao período de condicionamento e da suplementação ergogênica estão apresentados na Tabela 2. Sendo assim, os grupos foram avaliados em relação a estrutura e a composição da população microbiana. Considerando cada grupo, as potras que fizeram somente exercício (E0 vs E42) e aquelas que foram suplementadas com cromo (Cr0 vs Cr42), tiveram mudanças significativas na composição da comunidade independentemente do teste estatístico aplicado. A alteração na composição da comunidade no grupo carnitina (Car0 vs Car42) foi identificado pelo AMOVA. Para ambos os testes estatísticos aplicados, não foi observado diferença na comparação entre os grupos E42 vs Car42 e E42 vs Cr42 tanto para estrutura da população quanto para composição da comunidade. A partir desta igualdade estatística, avaliou-se somente o efeito do exercício agudo e do programa

de condicionamento físico, desconsiderando o efeito da suplementação. Deste modo as potras dos grupos E, Car e Cr passaram a compor o grupo ET.

Assim, os resultados da avaliação do efeito agudo e do condicionamento aeróbio, descartado o efeito da suplementação, na composição e na estrutura bacteriana são observados na Tabela 3. O resultado do teste de AMOVA mostrou que o exercício agudo modificou tanto a estrutura da população como a composição da comunidade (ET1-0 vs ET1-48 e ET2-0 vs ET2-48). Estas alterações, também foram observadas considerando o efeito do condicionamento quando aplicado o teste de AMOVA nos tempos, ET1-48 vs ET2-48. Para o teste de parsimonia também foram observadas alterações significativas para composição e estrutura da comunidade bacteriana, nos tempos, ET1-0 vs ET2-48. Dessa forma, para ambos os testes aplicados, a ação aguda do exercício e o condicionamento alteraram a composição da comunidade.

Os resultados do teste de parsimonia para Yue & Clayton também podem ser ilustrados na Figura 3A. A Figura 3B, do ponto de vista da composição da população é condizente com o teste de parsimonia que apresentou diferença ($P= 0,01$) para amostras que foram coletadas imediatamente antes a após 48 hs do TEI 2 (ET2-0 vs ET2-48) .

Considerando todos os animais que fizeram exercício, as Figuras 3A e 3B representam os dendrogramas obtidos por meio das análises de Yue & Clayton (estrutura da população) e Jaccard Clássico (composição da comunidade).

A representação gráfica do PCoA é revelada nas Figuras 4A e 4B, para Yue & Clayton e Jaccard Clássico, respectivamente. Pode-se observar que tanto do ponto de vista de estrutura da população quanto de composição da comunidade, houve a formação de agrupamentos para amostras coletadas antes e depois dos testes incrementais. Em ambos os gráficos, as amostras coletadas no início do experimento apresentaram maior similaridade com as amostras coletadas

ao final do período de condicionamento e após o último teste incremental. Dessa forma, os gráficos de PCoA são condizentes com os resultados do teste de AMOVA apresentados na Tabela 2.

Não foram observadas diferenças significativas nos índices de diversidade (inverse Simpson's) ou de riqueza (Catchall) em nenhum dos grupos experimentais.

3.4 Dieta e peso corpóreo

A quantidade de concentrado e a energia digestível fornecida e o peso corpóreo estão representados na Figura 5. Houve redução ($P < 0,001$) do fornecimento de concentrado (kg) e da energia digerível (Mcal) para as potras que compuseram o grupo controle a partir do 14º dia de condicionamento físico (Figura 5A e 5B). Nos momentos de avaliação, não houve alteração ($P = 0,306$) do peso corpóreo médio (Figura 5C) de nenhum dos grupos experimentais.

3.5 pH fecal

O pH fecal (Figura 6) manteve-se constante ($P = 0,67$) numa faixa média de $7,69 \pm 0,67$ (min-máx 6,41-8,87) no grupo controle ao longo do período experimental. Não houve diferença entre os grupos E, Car e Cr. Portanto a comparação foi realizada com o grupo ET vs controle em cada um dos momentos. Houve redução significativa ($P = 0,006$) do pH fecal, a partir da terceira semana (dia 21) do período experimental nas potras que compuseram o grupo ET em relação ao grupo controle ($7,85 \pm 0,48$ vs $6,90 \pm 0,38$). Esta redução também foi observada nos dias 28: $7,73 \pm 0,67$ vs $6,60 \pm 0,10$ ($P = 0,018$), 35: $7,89 \pm 0,68$ vs $6,63 \pm 0,37$ ($P = 0,002$) e 42: $8,04 \pm 0,14$ vs $6,75 \pm 0,44$ ($P = 0,001$). Imediatamente antes ao TEI 2 o pH fecal entre o grupo ET e controle não

diferiu: $7,06 \pm 0,72$ vs $7,04 \pm 0,59$ ($P=0,191$), voltando a reduzir 48h após TEI 2: $7,37 \pm 0,41$ vs $6,57 \pm 0,38$ ($P=0,012$).

3.6 Biomarcadores

No TEI-1, nos momentos imediatamente antes e na fadiga, o lactato aumentou significativamente em todos os grupos: $0,72 \pm 0,06$ para $22,76 \pm 4$ mmol/L ($P=0,017$) para as potras que fizeram exercício, de $0,78 \pm 0,29$ para $20,98 \pm 1,04$ mmol/L ($P<0,001$) para as potras do grupo cromo e de $0,67 \pm 0,13$ para $22,93 \pm 6,06$ mmol/L ($P=0,020$) para o grupo carnitina. O pH plasmático diminuiu para todos os grupos experimentais sendo de $7,44 \pm 0,01$ para $7,14 \pm 0,03$ ($P=0,048$) para as potras que fizeram somente atividade física, de $7,43 \pm 0,01$ para $7,24 \pm 0,02$ ($P=0,009$) para aquelas suplementadas com cromo e de $7,49 \pm 0,01$ para $7,18 \pm 0,02$ ($P=0,008$) para o grupo carnitina. No TEI-2, também o lactato aumentou em todos os grupos sendo de $1,48 \pm 1,06$ para $16,7 \pm 3$ mmol/L ($P=0,016$) para as potras que fizeram exercício, de $1,42 \pm 0,03$ para $24,66 \pm 4$ mmol/L ($P=0,014$) para as potras do grupo cromo e de $1,38 \pm 0,1$ para $16,60 \pm 0,6$ mmol/L ($P= <0,001$) para o grupo carnitina. O pH plasmático também diminuiu no TEI 2 para todos os grupos experimentais sendo de $7,44 \pm 0,01$ para $7,23 \pm 0,06$ ($P=0,031$) para as potras que fizeram somente atividade física; $7,45 \pm 0,01$ para $7,15 \pm 0,11$ ($P=0,037$) para aquelas suplementadas com cromo e de $7,45 \pm 0,01$ para $7,25 \pm 0,03$ no grupo carnitina ($P=0,008$).

O condicionamento não promoveu diferença entre a concentração de lactato plasmático no momento da fadiga ($P=0,223$) tanto na comparação inter-grupos como na intra-grupos. A atividade sérica das enzimas CK e AST nos dois testes de esforço estão reveladas na Figura 7. No grupo que realizou somente exercício a CK aumentou ($P=0,002$) 37% após 6h do TEI-1 ($258 \pm$

50 para 412 ± 97 UI/L) permanecendo elevada até 24 h após o TEI-1 (372 ± 85 UI/L). Já no TEI-2 não houve aumento ($P=0,078$) no grupo que realizou somente exercício. Para os grupos cromo ou carnitina não houve diferença estatística tanto no TEI-1 como no TEI-2. No caso da atividade da AST não houve alteração nos grupos experimentais. O condicionamento não alterou a atividade plasmática tanto da CK como da AST.

3.7 Correlações

Para todos os animais exercitados, houve correlação significativa e positiva ($R= 0,67$ e $P=0,04$) entre Simpson e o pH fecal antes do primeiro teste de esforço (TEI 1). A correlação entre os valores de pH plasmático (imediatamente antes e fadiga, TEI 1) e o inverso de Simpson (imediatamente antes e 48h, TEI 1) foi significativa e negativa ($R= -0,511$ e $P=0,02$)

4. Discussão

Embora a relação entre a MI e o metabolismo do hospedeiro seja evidente, o relacionamento entre a MI e a prática de atividade física está em fase inicial de exploração científica. No presente estudo os principais achados encontrados estão relacionados com as alterações na composição da comunidade (organismos presentes) e estrutura da população (organismos presentes e suas abundancias relativas) da microbiota fecal de potras que foram submetidas a atividade física aguda, relacionada aos testes de esforço incrementais, e ao programa de condicionamento. Além disso, as suplementações com carnitina e cromo revelaram potencial para modificar a composição da MI de potras. Porém, estes resultados, em particular, devem ser vistos com cautela, pois foram observados somente no índice de Jaccard, notadamente,

no AMOVA para o grupo suplementado com L-carnitina e no AMOVA e parsimônia para a suplementação com cromo. Isso pode ter ocorrido devido ao reduzido n amostral dos grupos suplementados.

Na espécie equina os estudos revelaram abundância alta do filo Firmicutes em cavalos sadios [3,6]. Nossos achados estão de acordo com estes estudos, pois foi observado abundância relativa alta de Firmicutes. Na espécie humana, a maior presença do filo Firmicutes pode estar relacionada a desordens metabólicas como diabetes [26,27]. Contudo, um trabalho produziu informações relevantes sobre a relação entre exercício vs MI e detectou em atletas da espécie humana de alto rendimento, maior abundância relativa de Firmicutes em relação a indivíduos com nível menor de condicionamento [15]. No contexto de proteção da saúde do hospedeiro, um estudo revelou que o exercício físico pode estar associado com altas concentrações de butirato [28], produzido por bactérias do filo Firmicutes como *Clostridium leptum* [29], que podem exercer efeitos benéficos como ação anti-inflamatória. Dessa forma, com o devido cuidado em promover generalizações em relação a espécie equina, a abundância alta de algumas bactérias do filo Firmicutes pode ser responsável pela produção de butirato, promovendo possível ação benéfica em cavalos. Como não foi avaliada a produção de metabólitos na presente pesquisa, este tema deve ser mais bem investigado em estudos futuros, principalmente relacionando cavalos mais condicionados e protocolos mais intensos de condicionamento físico com a composição da MI.

Ainda sobre a abundância relativa da MI em relação a atividade física, nos poucos estudos disponíveis podemos observar resultados conflitantes a respeito da modulação do exercício sobre a microbiota intestinal. Um estudo em camundongos verificou que a prática de exercício voluntário ou forçado, não alterou os dois principais filos de bactéria, Bacterioidetes e Firmicutes

[9]. Neste mesmo contexto, estudos avaliaram o efeito do exercício em ratos normais e o resultado foi uma abundância alta de Bacteroidetes e baixa de Firmicutes [8,30].

É conceito clássico que a beta diversidade determina o quanto a distância filogenética é compartilhada entre as amostras quantificando o número de comunidades distintas numa determinada região [31]. No nosso estudo, as diferenças mais marcantes podem ser visualizadas nos gráficos da PCoA evidenciadas pela formação de agrupamentos das amostras coletadas antes e depois dos testes incrementais. Curiosamente, as amostras coletadas no início do experimento apresentaram maior similaridade com as amostras coletadas ao final do período de condicionamento e após o último TEI-2, sugerindo que pode ter havido uma adaptação da MI em relação ao condicionamento aeróbio de 42 dias, no que tange a estrutura da população.

Nosso estudo também identificou uma abundância alta do filo Verrucomicrobia. Este resultado está em consonância com outros estudos realizados com a espécie equina utilizando metodologia semelhante [3,32,33]. O filo Verrucomicrobia apresenta uma subdivisão classe 5, para o gênero “5 genus *incertae sedis*”, que é apresentado em nossos resultados como um dos gêneros mais abundantes. Este gênero tem sido recentemente classificado e em equinos adultos saudáveis, tem sido encontrado em altas abundâncias em amostras de fezes [32;33], mas sua função no trato gastrointestinal de equinos permanece por ser investigada.

As alterações estatísticas mais significativas foram observadas no índice de Jaccard, que leva em conta a riqueza bacteriana presente em cada amostra. Dessa forma, nossos resultados sugerem que o exercício agudo teve um impacto maior sobre as espécies presentes em baixa abundância relativa (espécies raras). Os efeitos fisiológicos destas mudanças sobre a MI podem ser de fundamental importância, já que estas são espécies chaves que podem servir como “banco de sementes” microbianas que favorecem a adaptação da comunidade bacteriana em mudanças

em seu habitat e que espécies raras podem estar presentes para dar suporte para as bactérias com maior abundância [34,35].

Observou-se um total de 26,75% de sequências que não puderam ser classificadas pela base de dados RDP, o que pode estar relacionado com o fato da microbiota fecal de equinos, provavelmente, ser bem maior que a disponível nos bancos de dados. Além disso, para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a empregar sequenciamento de nova geração para avaliar fezes de equinos no Brasil e da raça Mangalarga Marchador, fatores estes que podem contribuir para a presença de tais organismos. Porém, não se pode descartar a falta de resolução para a classificação desses organismos ou a ineficiência na eliminação de erros de sequenciamento durante o processamento bioinformático.

O protocolo de condicionamento não alterou as concentrações de lactato das potras. Isso pode ser explicado por alguns fatores como o n amostral reduzido e ao possível fator comportamental/emocional apresentado por algumas potras. Por exemplo, o nervosismo e a dificuldade de manipulação/manejo, associado com o efeito antecipatório do exercício, podem elevar a produção de catecolaminas, que provoca a indução de glicólise/glicogenólise hepática e muscular que *per si* tem potencial em elevar a produção de lactato [36].

Uma outra abordagem que pode ser realizada é o possível impacto do programa de condicionamento físico, associado a dieta, sobre as possíveis alterações na MI. Em atletas da espécie humana altamente condicionados, que ingeriam uma dieta altamente calórica, rica em proteína, gordura e carboidratos, as variáveis relacionadas à α diversidade (Simpson, Chao 1, Shannon) foi maior quando comparados ao grupo controle, composto por indivíduos condicionados num nível menor [15]. As potras que realizaram atividade física, independente da suplementação, não apresentaram alterações significativas dos índices relacionados à α

diversidade (Simpson e Catchal), provavelmente devido ao fornecimento padronizado da dieta, que foi prescrita para a manutenção da estabilidade do peso corpóreo durante a realização do programa de condicionamento.

Com certeza a menor quantidade de ração oferecida para as potras, a partir da segunda semana de experimento, que compuseram o grupo controle pode explicar a diferença verificada para o índice de Jaccard. A prática de exercício é a maneira mais efetiva para provocar balanço energético negativo com consequente perda de peso, principalmente se a dieta não for ajustada. Estudos prévios descreveram que a redução do peso corpóreo pode alterar a composição da MI em ratos [8, 15]. Em contraste, a avaliação de indivíduos obesos demonstrou que o estilo de vida moderno, relacionado a um sedentarismo diário associado à ingestão alta e constante de alimentos ricos em energia, também pode alterar a microbiota intestinal, acarretando numa redução da riqueza e da diversidade da população microbiana intestinal [37]. Desta maneira, o protocolo de condicionamento físico associado ao ajuste da dieta, foi suficiente para controlar o peso corpóreo das potras tanto do grupo controle como nos animais que realizaram atividade física. Outro aspecto a ser considerado, é que o presente estudo teve a preocupação de constituir um grupo controle que foi sedentário. Entretanto, no presente delineamento experimental com avaliação do exercício agudo e principalmente da ação do condicionamento físico, necessariamente, a dieta teve que ser ajustada para que as potras do grupo controle não ganhassem peso ao final do experimento.

Outra questão recente que está sendo levantada pelos pesquisadores é a possível interferência da prática de atividade física sobre a MI. O mesmo estudo com jogadores de rugby revelou correlação positiva entre alguns índices de diversidade com a atividade plasmática da enzima CK sugerindo que o exercício pode ser considerado um indutor da diversidade no

intestino [15]. Entretanto, não houve correlação nem da CK nem da AST com os índices de diversidade e riqueza sendo que entre as variáveis estudadas, somente o pH plasmático no primeiro TEI revelou correlação negativa com Simpson. Portanto, a necessidade de utilização da via glicolítica anaeróbia para realização de determinada intensidade de esforço pode possuir potencial para interferir na microbiota intestinal. Este é sem dúvida um resultado interessante, sendo que mais estudos são necessários para o estabelecimento da relação causal da tríade exercício-fadiga-alteração da diversidade da microbiota.

O pH fecal e sua relação com populações microbianas foi estudada em potras da raça PSI, durante a transição alimentar a partir do fornecimento exclusivo de pastagem para o concentrado [2], sendo detectado relativa estabilidade do pH fecal ao longo do tempo, com o aumento da população bacteriana de *Streptococcus* spp and *Lactobacillus* spp, que foram encontrados por meio de cultura, conforme incrementou-se a razão concentrado:forragem (c:f). Contrariamente, as potras que fizeram exercício e receberam a mesma proporção c:f durante todo o período experimental, revelaram redução do pH fecal a partir do 14º dia de condicionamento, apesar dos valores permanecerem na faixa normal para a espécie equina, não caracterizando acidose fecal. A partir das alterações mínimas na abundância relativa e da beta diversidade, provavelmente, mudanças na comunidade bacteriana induzidas pela atividade física, podem ter contribuído com esta tendência a acidose subclínica [38].

Este trabalho é o primeiro a investigar um assunto de fundamental importância para a equinocultura mundial. No entanto, algumas limitações devem ser consideradas, como por exemplo o número reduzido de animais utilizados em cada grupo, diminuindo assim o poder das comparações estatísticas. Além disso, as alterações estatísticas observadas na microbiota do

grupo controle demonstrou que, apesar do período de adaptação, houve mudança da microbiota ao longo do período experimental. Vários fatores podem ter contribuído para tais mudanças, como a designação de potras que possuíam a microbiota alterada no início do experimento (“outliers”) para o grupo controle, além do ajuste da dieta durante o estudo, que logicamente acabou sendo maior para esse grupo. De qualquer forma, vale ressaltar que a dieta fornecida para o grupo exercitado foi consistente ao longo do tempo, o que permitiu a avaliação do efeito exclusivo do exercício sobre a microbiota desses animais.

Concluindo, os achados do presente estudo sugerem que a suplementação crônica com cromo ou L-Carnitina associada ao exercício intenso e a um programa de condicionamento físico podem modificar a composição da comunidade da MI de potras em estágio inicial de condicionamento físico. Este é o primeiro estudo que utilizou um modelo experimental de prescrição controlada da intensidade de esforço para avaliar alterações na população bacteriana em potras. A contribuição deste estudo foi mostrar o possível potencial do exercício e das suplementações ergogênicas em modificar a microbiota intestinal.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, (FAPESP), processo número 2013/14703-3. Nós também agradecemos a Associação Brasileira de Criadores do cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM) pelo apoio operacional.

6. Referências

1. Costa MC, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Stampfli HR, Kim PT, Sturgeon A, Weese JS. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. PLoS One. 2012;7: e41484. doi: 10.1371/journal.pone.0041484
2. 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
3. Costa, MC, Stämpfli HR, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Gomes RG, Weese JS. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. BMC Vet Res. 2015;11: 19. doi:10.1186/s12917-015-0335-7
4. Harlow BE, Lawrence LM, Flythe MD. Diarrhea-associated pathogens, lactobacilli and cellulolytic bacteria in equine feces: Responses to antibiotic challenge. Vet Microbiol. 2013;166: 225-232. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.05.003
5. Gronvold AMR, Trine ML, Sorum H, Skancke E, Yannarell AC, Mackie RI. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. FEMS Microbiol Ecol. 2010;71: 313-326. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00808.x>
6. Weese JS, Holcombe SJ, Embertson RM, Kurtz KA, Roessner HA, Jalali M, Wismer SE. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post partum colic. Equine Vet J. 2014. doi: 10.1111/evj.12361
7. Hold GL. The gut microbiota, dietary extremes and exercise. Gut. 2014;63: 1838-1839. doi:10.1136/gutjnl-2014-307305

8. Queipo-Ortuño MI, Seoane LM, Murri M, Pardo M, Gomez-Zumaquero JM, Cardona F, Tinahones FJ. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *Plos One*. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0065465

9. Allen JM, Miller MEB, Pence BD, Whitlock K, Nehra V, Gaskins HR, 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

10. Lambert JE, Myslicki JP, Bomhof MR, Belke DD, Shearer J, Reimer RA. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015;40: 1-4. doi: 10.1139/apnm-2014-0452

11. Ferraz GC, Soares OAB, Foz NSB, Pereir MC, Queiroz-Neto A. The workload and plasma ion concentration in a training match session of high-goal (elite) polo ponies. *Equine Vet J*. 2010;42: 191-195. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00278.x

12. Robergs, RA. Exercise-induced metabolic acidosis: where do the protons come from. *Sportscience*. 2001;5: 1-20.

13. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *British medical bulletin*. 2007;81: 209-230. doi: 10.1093/bmb/ldm014

14. O'Sullivan O, Cronin O, Clarke SF, Murphy EF, Molloy MG, Shanahan F, Cotter P D. Exercise and the microbiota. *Gut microbes*. 2015;6: 131-136. doi: 10.1080/19490976.2015.1011875

15. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan , Lucey, AJ, Humphreys M, Hogan A, Cotter P D. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*. 2014 *gutjnl*-2013. doi:10.1136/gutjnl-2013-306541
16. Pagan JD, Jackson SG, Duren SE. The effect of chromium supplementation on metabolic response to exercise in thoroughbred horses. *Equine Nutrition and physiology society*. 1995;14: 96-101.
17. Rivero JL, Sporleder HP, Quiroz-Rothe E, Vervuert I, Coenen M, Harmeyer J. Oral L-carnitine combined with training promotes changes in skeletal muscle. *Equine Vet J*. 2002;34: 269-274.
18. Fonseca MG, Rezende ASC, Jordão, LR, Lage J, Almeida MLM, Andrade JM, Ferraz GC. Chromium or L-carnitine supplementation during an aerobic conditioning program mildly modified the energy metabolism biomarker response in Mangalarga Marchador fillies. *Livest Sci*. 2015;177: 165-174. doi: 10.1016/j.livsci.2015.03.014
19. Nutrient Requirements of Horses. 6 ed. Washington: The National Academies Press; 2007.
20. Carroll CL, Huntington PJ. Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Vet J*. 1988;20: 41-45. doi: 10.1111/j.2042-3306.1988.tb01451.x
21. 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: 5112-5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13

22. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2012;doi: 10.1093/nar/gks1219
23. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Tiedje JM. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2013. doi: 10.1093/nar/gkt1244
24. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 2011;27: 2194-2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381
25. Bunge J. Estimating the number of species with CatchAll. *Pac Symp Biocomput.* 2011;121-130.
26. Zhang X, Shen D, Fa Z, Jie, Z, Qiu X, Zhang C, Ji L. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One.* 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0071108
27. Geurts L, Lazarevic V, Derrien M, Everard A, Van Roye M, Knauf C, Cani PD. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol.* 2011;2. doi: 0.3389/fmicb.2011.00149
28. Matsumoto M, Inou R, Tsukahara T, Ushida K, Chiji H, Matsubara N, Hara H. Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72: 572-576. doi: 10.1271/bbb.70474
29. Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., & Van Immerseel, F. (2010). From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, 23(02), 366-384.

30. Evans CC, LePard KJ, Kwak JW, Stancukas MC, Laskowski S, Dougherty J, Ciancio MJ. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One*. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0092193
31. Jost L. Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology*. 2007;88: 2427-2439. doi: <http://dx.doi.org/10.1890/06-1736>.
32. Shepherd ML, Swecker Jr WS, Jensen RV, Ponder MA. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;326: 62-68. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j1574-6968.2011.02434.x>
33. Steelman SM, Chowdhary BP, Dowd S, Suchodolski J, Janečka JE. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. *BMC Vet Res*. 2012;8: 231. doi: doi:10.1186/1746-6148-8-231
34. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10: 717-725. doi:10.1038/nrmicro2873
35. Lennon JT, Jones SE. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9: 119-130. doi: doi:10.1038/nrmicro2504
36. Ferraz GC, Teixeira-Neto AR, Mataqueiro MI, Lacerda-Neto J.C, Queiroz-Neto A. Effects of intravenous administration of caffeine on physiologic variables in exercising horses. *Am J Vet Res*. 2008;69: 1670-1675. doi: 10.2460/ajvr.69.12.1670
37. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500: 541-546. doi:10.1038/nature12506

38. Fernandes K, Kittelmann, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0112846

Tabelas

Tabela 1. Percentual em base de matéria seca (MS) de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), matéria mineral (MM), cálcio (Ca), fósforo (P), energia digestível (ED), nutrientes digestíveis totais (NDT) e em Mcal/Kg dos alimentos fornecidos durante o período experimental.

Alimento	MS (%)	PB (%)	FDN (%)	FDA (%)	MM (%)	Ca (%)	P (%)	ED Mcal/Kg	NDT (%)
Capim <i>Panicum maximum</i> cv. Massai	31,4	11,8	80,7	37,5	7,45	0,42	0,37	-	59,5
Feno Tifton 85 (<i>Cynodon</i> spp.)	94,9	9,4	80,7	39,9	10,02	0,48	0,27	2,50	56,0
Concentrado	90,2	14,2	13,9	5,4	8,00	1,32	0,55	3,15	-
Sal Mineral*	100,0	-	-	-	100,00	17,5	6,0	-	-

*Composição por Kg de sal mineral: Cálcio 175 g; Fósforo 60 g; Magnésio 13,6 g; Enxofre 12 g; Sódio 120 g; Zinco 2.200 mg; Cobre 1.200 mg; Manganês 970 mg; Ferro 2.000 mg; Cobalto 21 mg; Iodo 125 mg; Selênio 10 mg; Flúor (max.) 600 mg.

Tabela 2. Valores de P referentes à parsimônia e AMOVA dos grupos de potras da raça Mangalarga Marchador submetidas a condicionamento aeróbio e suplementadas pela via oral com carnitina ou cromo

Comparações	Testes			
	Yue and Clayton		Jaccard	
	Parsimônia	AMOVA	Parsimônia	AMOVA
C0 vs C42	0,926	0,196	0,031	0,04
E0 vs E42	0,562	0,522	0,023	0,009
Car0 vs Car42	0,151	0,098	0,16	0,047
Cr0 vs Cr42	0,29	0,147	0,041	0,034
C42 vs E42	0,572	0,301	0,014	0,077
C42 vs Car42	0,168	0,119	0,017	0,003
C42 vs Cr42	0,765	0,097	0,044	0,036
E42 vs Car42	0,572	0,86	0,938	0,771
E42 vs Cr42	0,751	0,745	0,295	0,692

C0= controle antes do condicionamento; C42= controle com 42 dias; E0= somente condicionamento (antes); E42= somente condicionamento por 42 dias; Car0= antes do condicionamento e da suplementação com carnitina; Car42= condicionados e suplementados com carnitina por 42 dias; Cr0= antes do condicionamento e da suplementação com cromo; Cr42= condicionados e suplementados com cromo por 42 dias.

Tabela 3. Valores de P referentes à parsimônia e AMOVA de potras da raça Mangalarga Marchador submetidas a teste de esforço incremental (TEI) e a um programa de condicionamento aeróbio.

Comparações	Testes			
	Yue and Clayton		Jaccard	
	Parsimônia	AMOVA	Parsimônia	AMOVA
C1-0 vs C1-48	0,615	0,094	0,619	0,196
C2-0 vs C2-48	0,602	0,087	0,595	0,225
C1-48 vs ET1-48	1,00	0,043	0,229	0,05
C2-48 vs ET2-48	1,00	0,238	0,199	0,035
ET1-0 vs ET1-48	0,690	0,027	0,096	0,022
ET2-0 vs ET2-48	0,219	0,002	0,011	0,001
ET1-48 vs ET2-48	0,082	0,003	0,096	0,005
ET1-0 vs ET2-48	0,043	0,124	0,045	0,017

C1-0 = potras do grupo controle antes do TEI1 e do período de condicionamento; C1-48 = potras do grupo controle após 48hs do TEI1 e antes do período de condicionamento; C2-0 = potras do grupo controle antes do TEI2 e após período de condicionamento; C2-48 = potras do grupo controle após 48hs do TEI2 e após o período de condicionamento; ET1-0= todos animais em exercício antes do TEI1 e do período de condicionamento; ET1-48 = todos animais em exercício após 48hs do TEI1 e antes do período de condicionamento; ET2-0 = todos animais em exercício antes do TEI2 e após ao período de condicionamento; ET2-48 = todos animais em exercício após 48hs do TEI2 e após o período de condicionamento.

Figuras

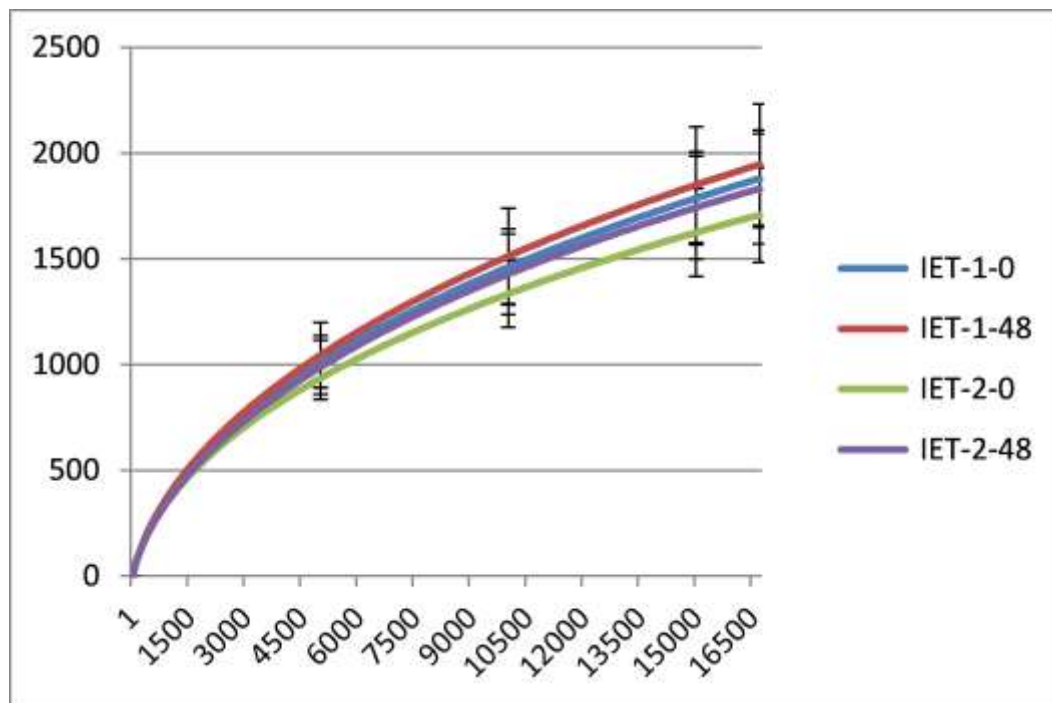


Figura 1. Curva de rarefação comparando o numero de sequencias com o numero de espécies encontradas em DNA de fezes de potras. Os grupos, C: grupo controle, ET: todos os animais que realizaram exercício agudo e condicionamento aeróbio. Para 1-0: imediatamente antes do primeiro teste incremental (TEI-1), 1-48: 48hs após o TEI-1, 2-0: imediatamente antes do segundo teste incremental (TEI-2), 2-48: 48hs após o TEI-2. Para C1-0: azul, C1-48: vermelho, C2-0: roxo, C2-48: verde, E1-0: marron, E1-48: pink, E2-0: verde claro, E2-48: preto.

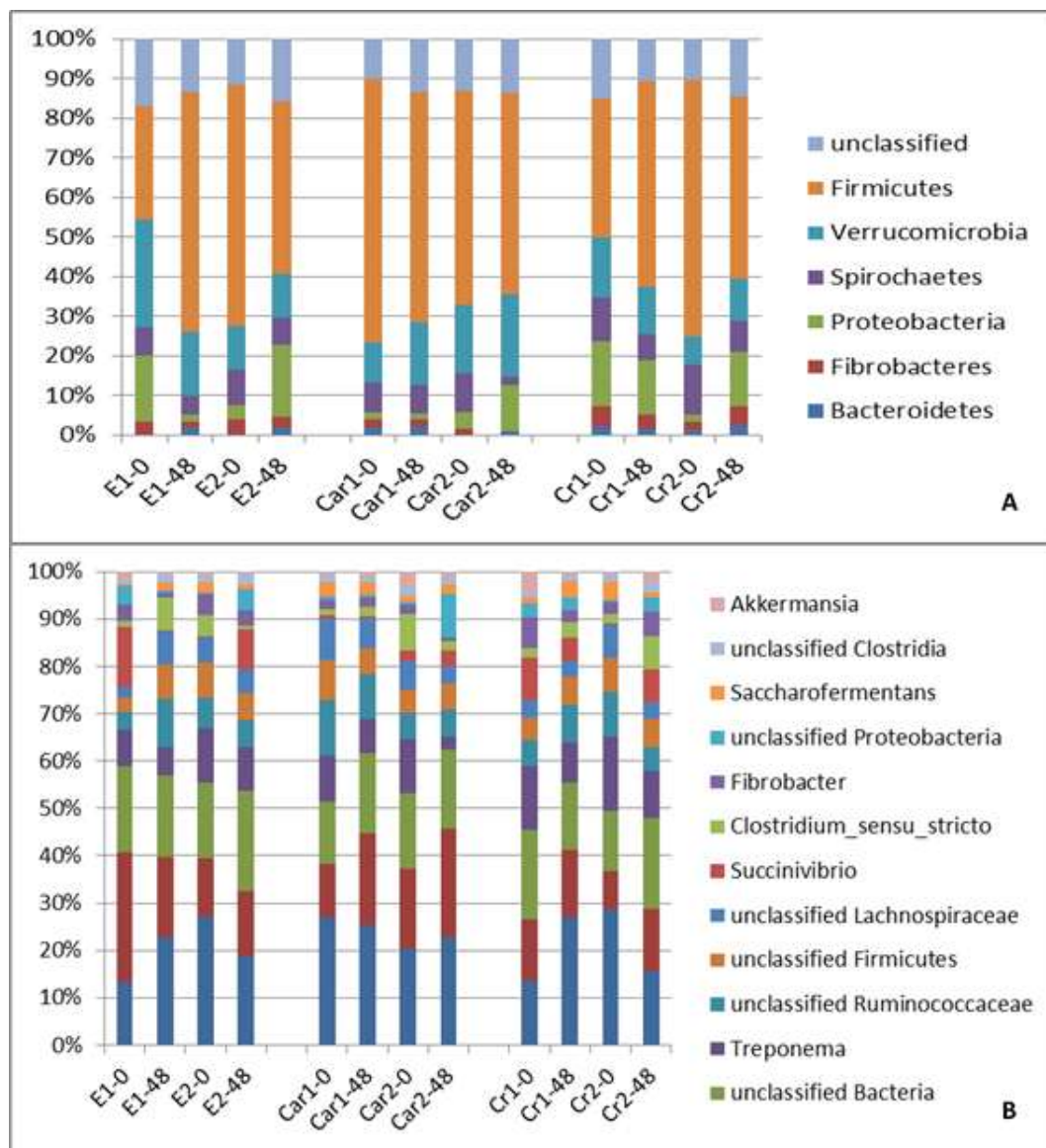


Figura 2. Em A, principais filos que apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Amostras coletadas nos respectivos grupos, E: realizou exercício, Car: realizou exercício e foi suplementado com L-carnitina, Cr: realizou exercício e foi suplementado com cromo. Para 1-0: imediatamente antes do primeiro teste incremental, 1-48: 48hs após o primeiro teste incremental, 2-0: imediatamente antes do segundo teste incremental, 2-48: 48hs após o segundo teste incremental. Em B, principais gêneros que apresentaram abundância relativa igual ou maior que 1%. Amostras coletadas nos respectivos grupos, E: realizou exercício, Car: realizou exercício e foi suplementado com L-carnitina, Cr: realizou exercício e foi suplementado com cromo. Para 1-0: imediatamente antes do primeiro teste incremental, 1-48: 48hs após o primeiro teste incremental, 2-0: imediatamente antes do segundo teste incremental, 2-48: 48hs após o segundo teste incremental.

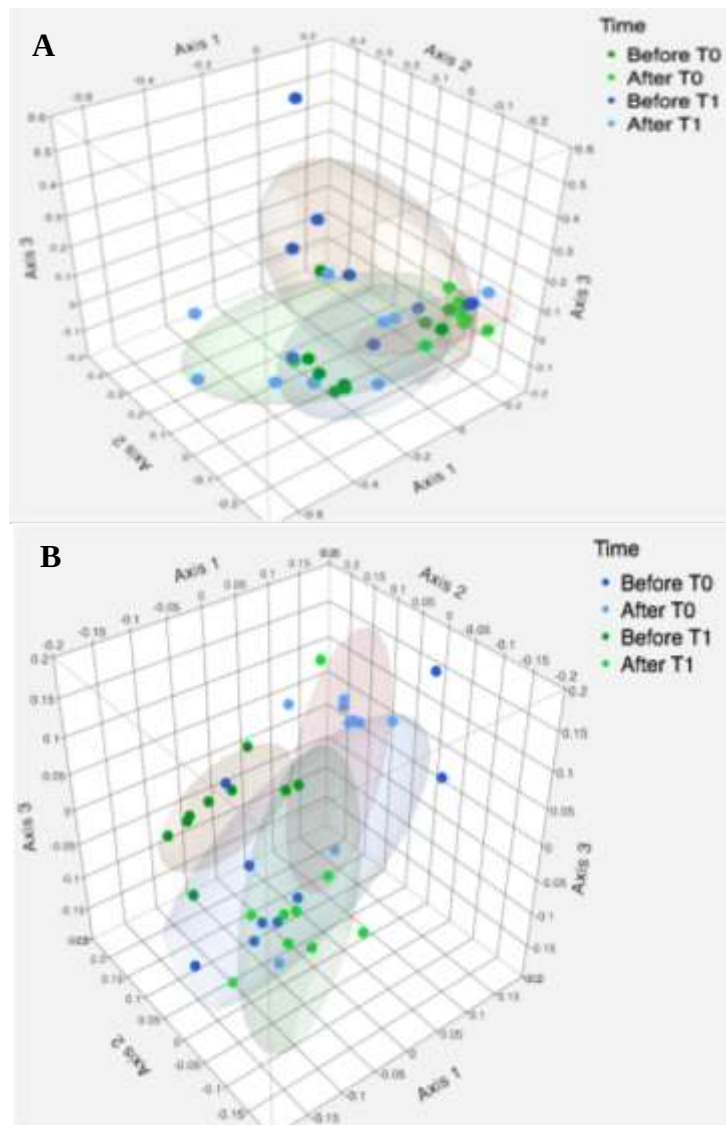


Figura 4. Análise de componentes principais (PCoA) considerando a microbiota fecal de potras submetidas a teste de esforço incremental, em esteira, e a condicionamento aeróbio. Em A, PCoA obtido a partir da análise de Yue & Clayton. Em B, PCoA obtido a partir da análise de índice Jaccard. Para A e B, amostras Before T0: antes do teste de esforço incremental 1 (TEI-1), After T0: 48hs após ao TEI-1; Before T1: antes do teste incremental 2 (TEI-2), After T1: 48hs após ao TEI-2.

