

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE EQUINOS
SUBMETIDOS A SOBRECARGA DE AMIDO**

Caio Carvalho Bustamante
Médico veterinário

2019

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE EQUINOS
SUBMETIDOS A SOBRECARGA DE AMIDO**

Discente: Caio Carvalho Bustamante

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

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

2019

B982i

Bustamante, Caio Carvalho

Identificação da microbiota fecal de equinos submetidos a sobrecarga de amido / Caio Carvalho Bustamante. -- Jaboticabal, 2019
45 p. : il., fotos

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

Orientador: Carlos Augusto Araújo Valadão

1. Microbiota. 2. Metagenômica. 3. Exame fecal. 4. Lactobacillus.
5. Streptococcus. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE EQUINOS SUBMETIDOS A SOBRECARGA DE AMIDO

AUTOR: CAIO CARVALHO BUSTAMANTE

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO ARAÚJO VALADÃO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO ARAÚJO VALADÃO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO DE OLIVEIRA GOBESSO
Departamento de Nutrição e Produção Animal-FMVZ/USP / Pirassununga/SP


Prof. Dr. LUCAS JOSÉ LUDUÉRIO PIZAURO
Colégio Técnico Agrícola-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 24 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAIO CARVALHO BUSTAMANTE – nascido na cidade de Governador Valadares, Minas Gerais, no dia 03 de maio de 1991. Médico Veterinário graduado pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras, Minas Gerais, com início em agosto de 2009 e término em setembro de 2014. Realizou estágio curricular no ano de 2014 na área de Cirurgia Veterinária de Grandes Animais no Hospital Veterinário da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, Minas Gerais, sob orientação do Professor Doutor Rafael Faleiros Resende. Realizou residência pelo Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária e Saúde, na subárea de Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Grandes Animais no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp Câmpus de Jaboticabal, com início em março de 2015 e término em fevereiro de 2017, sob orientação do Professor Doutor Paulo Alécio Canola,. Atualmente é mestrando pelo programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária, com início em março de 2018, sob orientação do Professor Doutor Carlos Augusto Araújo Valadão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- A Deus, pelas oportunidades que surgiram ao longo desta caminhada, pelos pedidos e pela força concedidos em momentos difíceis;
- Aos meus pais, Maria Terezinha e Antônio Eduardo, e aos meus irmãos, Hugo e Mila, por todo o amor, apoio e confiança;
- Ao Prof. Dr. Carlos A. A. Valadão, pelas dicas, conselhos, ensinamentos, companheirismo e por ter aceitado me orientar nesta etapa acadêmica;
- À Prof^a. Dr^a. Eliana G. Macedo Lemos, pelo fornecimento do Laboratório Multiusuário de Sequenciamento para realização das análises experimentais;
- Aos amigos e colegas, Vanessa, Isabela, Camila e Luciano (Kishi) que foram fundamentais na execução desse projeto;
- Ao Prof. Dr. Paulo A. Canola, por todo o ensinamento desde a residência como orientador;
- Aos profissionais do Hospital Veterinário da UNESP Jaboticabal, pela parceria, mesmo que indireta, neste experimento;
- Aos animais, não só os que participaram do projeto, mas todos com que tive contato nesta caminhada, pelos conhecimentos adquiridos por meio de atendimento clínico, cirurgias e manejo;
- À Stella Habib, melhor amiga, por todos os momentos de alegrias e tristezas passados juntos desde 2009/2;
- Aos amigos feitos em Jaboticabal, principalmente à Júlia (Mojada) e à Marina, pelo apoio e companheirismo nesses anos de residência e mestrado.
- Ao Rodrigo Casarin (Tuitier) e à Fabiana Del Lama, por terem sido minha segunda família em Jaboticabal.
- Aos meus amigos de GV e aos que conheci em Lavras durante a graduação, pela verdadeira amizade que prevalece por mais que estejamos distantes;
- À FAPESP, pela concessão de auxílio ao projeto, processo n° 2015/24860-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);

- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
Certificado de Comissão de Ética no Uso de Animais.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo geral.....	6
3.2 Objetivos específicos.....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
4.1 Animais e delineamento experimental.....	7
4.2 Instalações e manejo.....	7
4.3 Formação de parcelas experimentais.....	8
4.4 Procedimentos.....	8
4.4.1 Pré-indução.....	8
4.4.2 Indução.....	9
4.4.3 Coleta das amostras.....	9
4.5 Avaliação clínica dos animais.....	10
4.6 Processamentos de dados.....	11
4.6.1 Extração e análises de integridade e quantificação do DNA metagenômico.....	11
4.6.2 Amplificação das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA.....	12
4.6.3 Purificação dos produtos da PCR, sequenciamento das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA e análise das sequências.....	12
4.7 Análises de bioinformática e estatística.....	13
5. RESULTADOS.....	13
5.1 Alterações clínicas dos animais.....	13
5.2 Informações de sequenciamento.....	15
5.3 Comparação das comunidades bacterianas.....	15
5.4 Composição taxonômica das comunidades bacterianas.....	18
6. DISCUSSÃO.....	24

7.	CONCLUSÕES.....	28
8.	REFERÊNCIAS.....	29


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

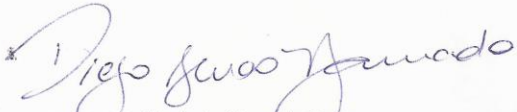
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Identificação genômica do microbioma cecal de cavalos com laminite induzida por oligofrutose. Efeitos do tamponamento cecal**", protocolo nº 23.391/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL -SP, em reunião ordinária de 07 de abril de 2016.

Vigência do Projeto	01/03/2016 a 30/02/2018
Espécie / Linhagem	Equina
Nº de animais	15
Peso / Idade	350 Kg
Sexo	Fêmeas e machos
Origem	Fazendas de criação

Jaboticabal, 07 de abril de 2016.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA



Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE EQUINOS SUBMETIDOS A SOBRECARGA DE AMIDO

RESUMO – A microbiota bacteriana intestinal dos equinos é heterogênea e complexa, podendo ser alterada por variações introduzida na dieta. A ingestão excessiva de carboidrato solúvel altera a microbiota intestinal com possíveis consequências catastróficas sistêmicas. Com este estudo, buscou-se avaliar as implicações da sobrecarga dietética experimental com amido sobre a microbiota fecal, correlacionando-a com a indução de laminite aguda. Foram utilizados 10 equinos (fêmeas ou machos castrados) SRD, idade média de $13 \pm 5,6$ anos, e peso médio de 353 ± 28 kg. Os animais foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x2 com medidas repetidas no tempo, sendo quatro grupos: controle (GC) - água (10L) por sonda nasogástrica e, após oito horas, solução fisiológica 0,9% (5L) pela cânula cecal; controle-tampão (GCT) - água (10L) por sonda nasogástrica e, após oito horas, solução alcalinizante (3,5g de $Al(OH)_3$, 65,6g de $Mg(OH)_2$ e 1,2g de simeticona pela cânula cecal; amido-controle (GAC) - amido (17,6g/kg) diluído em água (10L) e, após oito horas, solução fisiológica 0,9% (5L) pela cânula cecal; amido-tampão (GAT) - amido (17,6g/kg) diluído em água (10L) e, após oito horas, solução alcalinizante (3,5g de $Al(OH)_3$, 65,6g de $Mg(OH)_2$ e 1,2g de simeticona pela cânula cecal. Amostras de fezes foram colhidas da ampola retal em seis intervalos de tempo: T0 (basal); T8; T12; T24; T48; T72 horas, respectivamente, após a indução com amido. Em período imediato à colheita, avaliaram-se claudicação, sinais de desconforto abdominal, ingestão de água e feno, qualidade das fezes, temperatura e frequência cardíaca. Para a extração de DNA metagenômico, amplificação e sequenciamento das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA, empregaram-se “kits” específicos para sequenciador Illumina. As análises das sequências foram feitas pelo programa QIIME. Ocorreu proliferação de bactérias amilolíticas, principalmente das famílias Streptococcaceae e Lactobacillaceae, entre 12 e 48 horas após a ingestão do amido. Concomitantemente, houve diminuição da abundância relativa das bactérias fibrolíticas (*Ruminococcus*, *Clostridium* e *Eubacterium*). A sobrecarga dietética com amido induziu alterações clínicas de laminite aguda a partir de 12 horas da indução. Conclui-se que ocorreu disbiose intestinal com a predominância dos gêneros bacterianos *Streptococcus* e *Lactobacillus* associada ao aumento da sensibilidade dos cascos, visto que as alterações clínicas e mudanças na microbiota fecal foram temporalmente coincidentes.

Palavras-chave: Cavalos, intestino, laminite, sequenciamento de nova geração, sobrecarga de amido

EQUINE FECAL MICROBIOTA IDENTIFICATION AFTER STARCH OVERLOAD

ABSTRACT – The horses' intestinal bacteria microbiota is heterogeneous and complex and can vary according to diet changes. The excessive intake of soluble carbohydrate changes the intestinal microbiota with possible consequences systemic catastrophic. The goal of this study is to evaluate possible changes by starch overload in the fecal microbiota, correlating it with acute laminitis. Ten mixed breed horses (females and geldings), with age $13 \pm 5,6$ years and weighing 353 ± 28 kg, were used. They were distributed in a completely randomized design in 2x2 factorial arrangement with repeated measurements over time, being four groups: control (GC) - water (10L) by nasogastric tube and, after eight hours, physiological solution 0,9% (5L) by cecal cannula; buffer-control (GCT) - water (10L) by nasogastric tube and, after eight hours, buffer solution (3,5g of $\text{Al}(\text{OH})_3$, 65,6g of $\text{Mg}(\text{OH})_2$) and 1,2g of simethicone by cecal cannula; starch-control (GAC) - starch (17,6g/kg) diluted in water (10L) and, after eight hours, physiological solution 0,9% (5L) by cecal cannula; and buffer-starch (GAT) - starch (17,6g/kg) diluted in water (10L) and, after eight hours, buffer solution (3,5g of $\text{Al}(\text{OH})_3$, 65,6g of $\text{Mg}(\text{OH})_2$) and 1,2g of simethicone by cecal cannula. The fecal samples were collected from rectal ampoule in six different times: T0 (basal); T8; T12; T24; T48; T72 hours, respectively, after the starch overload. Following this, the lameness, the abdominal pain signs, the water and hay intake, the quality of the feces, the rectal temperature and the heart rate were evaluated. Specifics "kits" for Illumina platform were used for extraction and amplification of the metagenomic DNA, and sequencing of the V4-V5 regions of the gene 16S rRNA. All the sequences analysis was performed on QIIME program. There was proliferation of amilolytic bacteria, mainly from Streptococcaceae and Lactobacillaceae families, between 12 and 48 hours after starch overload. At the same time, there was decrease of the relative abundance of fibrolytic bacteria (*Ruminococcus*, *Clostridium* and *Eubacterium*). The starch overload induced clinical changes of acute laminitis 12 hours after induction. In conclusion, there was gut disbiose with predominance of genera Streptococcus and Lactobacillus in association with greater hoof sensitivity, since clinical and fecal microbiota changes were concomitant.

Keywords: Horses, gut, laminitis, NGS, starch overload

1. INTRODUÇÃO

Os cavalos estão presentes por todo o mundo, e estiveram com os humanos ao longo da história, servindo a uma variedade de propósitos práticos como meio de transporte, animal de trabalho na agricultura e na guerra. Ainda que sejam utilizados para a subsistência agrícola, nos dias de hoje, devido a sua graciosidade e agilidade, são voltados principalmente para lazer e esporte, representando um setor socioeconômico importante de um país (Khadka et al., 2010).

Sabendo da importância do cavalo para a economia, reforça-se a necessidade de cuidados diferenciados com essa espécie (Lima e Cintra, 2016), tendo em vista que sua domesticação a tornou vulnerável a distúrbios gastrintestinais com consequentes repercussões sistêmicas, como a laminite, e outras condições clínicas que apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade (Archer e Proudman, 2006; Proudman et al., 2015). Estas alterações no trato digestivo são as principais afecções que acometem os equinos, e, muitas vezes, relacionam-se à dieta, condições de estresse e uso de anti-inflamatórios ou antimicrobianos, os quais podem impactar negativamente a microbiota intestinal (Perkins et al., 2012; Harlow et al., 2013).

Em um estudo com cavalos de corrida, associou-se que a mudança dietética induz alterações nas comunidades da microbiota intestinal e, conseqüentemente, nos metabólitos produzidos no intestino (Proudman et al., 2015). Nesse caso, detectou-se que alguns componentes da dieta, não digeridos na porção inicial do trato gastrintestinal, passam diretamente para os segmentos distais, interferindo na homeostase microbiana por desequilíbrio de promotores e inibidores de crescimento bacteriano (Julliand e Grimm, 2017).

Garner et al. (1975) empregaram o modelo de indução experimental de laminite pela ingestão forçada de carboidrato solúvel, observando mudanças significativas no microbioma do ceco e cólon de cavalos, concomitantemente ao quadro de laminite aguda. Desde então, outros estudos demonstraram esse desequilíbrio microbiano, utilizando técnicas de cultivo e isolamento, após mudança dietética drástica por excesso de concentrado (Goodson et al., 1988; Moore e Dehority, 1993; De Fombelle et al., 2001; Respondek et al., 2008).

Sabe-se que os métodos de cultivo microbiológico, por vezes, não são suficientemente precisos no isolamento e identificação bacteriana, visto que muitas bactérias são difíceis de serem cultivadas (Costa, 2014). Entretanto, o avanço das técnicas moleculares favoreceu a caracterização microbiana e trouxe novas informações acerca da riqueza, diversidade e mudanças na microbiota intestinal (Daly et al., 2012; Hansen et al., 2015; Venable et al., 2017).

Até o momento, os estudos experimentais invasivos relacionados à mudança da dieta nos equinos vêm utilizando amostras de conteúdo de segmentos intestinais (ceco e cólon). Por conta disso, Sherpherd et al. (2012) têm preconizado o uso de técnicas moleculares para caracterizar as implicações dessas mudanças na microbiota do trato intestinal dos equinos. Com este estudo, considerou-se a obtenção de amostras fecais como um método não invasivo e prático (Julliard e Grimm, 2017), após a sobrecarga dietética de amido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os equinos, evolutivamente, são adaptados para pastagem, ingerindo de forma contínua pequenas quantidades de volumoso. No entanto, a suplementação com carboidratos de fácil digestão se tornou necessária para cavalos atletas, o que, conseqüentemente, os tornou mais vulneráveis aos distúrbios do sistema gastrintestinal, implicadas na alta de mortalidade dessa espécie. Sabe-se que o funcionamento adequado desse sistema em harmonia com a microbiota que o habita é essencial para manutenção da saúde e do desempenho equestre (Al Jassim e Andrews, 2009).

A microbiota engloba o conjunto de microrganismos de um bioma específico, sendo o microbioma os microrganismos e respectivo material genético interagido em um ambiente (Marchesi e Ravel, 2015). Neste sentido, a microbiota intestinal participa da digestão e da regulação do sistema imune do hospedeiro (Russell et al., 2013). Porém, nos equinos, a importância destes microrganismos intestinais tem sido subestimada, pois a correlação de dieta com a população microbiana ainda é pouco estudada (Furet et al., 2009; Harlow et al., 2013).

Sabe-se que o trato gastrointestinal dos cavalos possui uma microbiota complexa que inclui fungos, protozoários, vírus, com predominância de bactérias (Grimm et al., 2017). As bactérias fibrolíticas, que degradam os carboidratos da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e pectina), são integrantes essenciais desta microbiota, uma vez que convertem esses carboidratos em ácidos graxos de cadeia curta que suprem 60-70% das exigências energéticas dos equinos (Julliand e Grimm, 2016; 2017). Em associação, as bactérias amilolíticas degradam carboidratos solúveis da dieta para reforçar a suplementada fonte de energia (Julliand e Grimm, 2017).

O processo enzimático e de degradação bacteriana dos carboidratos ingeridos ocorre ao longo do trato gastrointestinal, e cria um gradiente propício para crescimento e atividade microbiana (Jouany et al., 2009; Julliand e Grimm, 2017). A degradação do amido acontece primeiro no compartimento gástrico, por fermentação bacteriana e ação enzimática, e no intestino delgado por ação da enzima alfa-amilase. No entanto, a pequena capacidade volumétrica do estômago e a baixa quantidade desta enzima intestinal limitam este processo de degradação (Al Jassim e Andrews, 2009). Sabe-se, ainda, que a diversidade microbiana desses segmentos iniciais é bem menor comparada à do intestino grosso, tornando-o principal local de fermentação no trato gastrointestinal dos equinos (Costa et al., 2015).

Quando há uma ingestão excessiva de carboidratos solúveis (amido, açúcares simples, frutana), a ação enzimática e microbiana nos compartimentos iniciais (estômago e intestino delgado) é reduzida, permitindo que ocorra passagem de grandes quantidades de ingesta para o intestino grosso (De Fombelle et al., 2001; Milinovich et al., 2008). Nesse segmento, o excesso de concentrado desequilibra a microbiota, instalando a disbiose, caracterizada pela proliferação de bactérias amilolíticas, como *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. (Grimm et al., 2017), e redução da população fibrolítica (Hansen et al., 2015; Jensen et al., 2016).

Potter et al. (1992) recomendaram que a ingestão de amido fosse de 3,5 a 4,0g/kg de peso corporal/refeição. Outros pesquisadores relatam que a quantidade de amido na dieta não deve exceder 2,0g/kg de peso corporal/dia (Julliand et al., 2006) sempre associada à ingestão de feno e/ou pastagem (Julliand e Grimm,

2017). Além disso, o fornecimento dessa dieta deve ser fracionado para estabilizar o crescimento de bactérias do gênero *Streptococcus* spp., já que a oferta de concentrado, uma vez ao dia, a longo prazo, pode modificar sua população e aumentar os riscos de distúrbios digestivos com repercussões sistêmicas, como a laminite (Venable et al., 2017).

Acredita-se que as alterações no microbioma intestinal causadas por mudanças na dieta possam induzir algumas afecções como colite (Daly et al., 2012), diarreia transitória em potros (Kuhl et al., 2011), além de induzir a síndrome lamelar equina que traz consigo eventos secundários complexos (Milinovich et al., 2010; Moreau et al., 2014). Esta síndrome fomentou pesquisas para melhor entendimento da sua fisiopatologia, empregando modelos experimentais dietéticos, como a sobrecarga de carboidrato solúvel (Garner et al., 1975)); o uso de extrato de noqueira preta (*Juglans nigra*) (True et al., 1978); e o uso de frutana (Pollitt e Van Eps, 2002).

A sobrecarga de carboidrato solúvel tem sido muito utilizada, devido à similaridade com a sobrecarga de grãos comumente relacionada aos casos clínicos de laminite, fornecendo informações sobre as mudanças na microbiota intestinal e das modificações hemodinâmicas (Garner et al., 1975; Weiss et al., 2000). Utilizando métodos de cultivo e isolamento, Garner et al. (1975) observaram, por meio desse modelo, que as alterações bacterianas do intestino funcionam como gatilho para a síndrome lamelar, e que bactérias do gênero *Streptococcus* spp. foram identificadas como os agentes prováveis na indução de resposta inflamatória desta doença. Posteriormente, Mackie e Wilkins (1988) estudaram a indução desta afecção por meio de ingestão abrupta de oligofrutose, e observaram proliferação de *Streptococcus bovis* e *S. equi*, na fase prodrômica da doença. No entanto, a comprovação da participação deste gênero bacteriano no processo inflamatório da laminite equina permanece inconclusiva (Milinovich et al., 2008), tendo em vista que outras bactérias da microbiota intestinal podem ter papel relevante nesta afecção (Al Jassim et al., 2005).

Desde então, foi sendo estudada a identificação microbiana intestinal, por meio de técnicas de cultivo, e sua relação com a síndrome laminite equina, utilizando o modelo experimental de indução alimentar com carboidratos solúveis

(De Fombelle et al., 2001; Respondek et al., 2008; Jouany et al., 2009). Esses autores observaram aumento de bactérias amilolíticas e diminuição das fibrolíticas no intestino após ingestão abrupta de concentrado quando comparada a uma dieta a base de fibras. No entanto, a caracterização de comunidades microbianas por essas técnicas de cultivo não representa, na maioria das vezes, a população bacteriana real, pois a cultura detecta uma pequena fração da microbiota, particularmente de microrganismos estritamente anaeróbios que são a maioria no trato gastrintestinal (Eckburg et al., 2005; Costa e Weese, 2012).

Tendo em vista as limitações da cultura e isolamento na identificação de muitos microrganismos gastrintestinais, com a evolução tecnológica alguns estudos identificaram a diversidade de bactérias amilolíticas nas fezes de equinos por meio de cultura seguida de sequenciamento Sanger (Willing et al., 2009). No entanto, num esforço para superar as limitações pelos métodos convencionais, as técnicas moleculares têm favorecido caracterização da microbiota intestinal, possibilitando identificar e entender melhor as interações entre a população bacteriana/hospedeiro ou ambiente (Costa e Weese, 2012; Costa, 2014).

Neste sentido, Endo et al. (2009) utilizaram o método de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação para avaliar e comparar a diversidade microbiana entre as amostras de fezes de equinos. Já Milinovich et al. (2008) e Perkins et al. (2012) avaliaram, pela hibridização fluorescente *in situ*, um microrganismo específico de um segmento do trato gastrintestinal de equinos, e Daly et al. (2012), pelo método de hibridização quantitativa de oligonucleotídeos, identificaram a população microbiana intestinal de cavalos sob influência de dieta rica em carboidrato solúvel. No entanto, são técnicas limitadas no âmbito da informação que podem fornecer, sendo bastante subjetiva quando se trata de caracterizar um microbioma (Costa e Weese, 2012).

Com o avanço tecnológico, a disponibilidade de sequenciamento de nova geração e plataformas bioinformáticas minimizou o tempo de resposta e otimizou os custos de estudos envolvendo o microbioma gastrintestinal (Costa e Weese, 2012; Costa, 2014). Por meio desta técnica, a análise do RNA ribossomal (rRNA) tem se mostrado como modelo fidedigno para identificação e quantificação de bactérias gastrintestinais, pautada no gene 16S rRNA bacteriano. Esse gene possui

sequências fixas e variáveis que possibilitam identificar e distinguir os níveis taxonômicos (Costa, 2014), dando suporte para a discriminação de bactérias na microbiota intestinal dos equinos, entre elas: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Treponema* e *Serratia* (Sherperd et al., 2012; Dougal et al., 2013), que são populações bacterianas importantes para a homeostase intestinal dos cavalos.

As fezes servem como marcadores de alterações na microbiota intestinal, repercutindo a composição ou mudanças nas microbiotas cecal e colônica (Dougal et al., 2013; Schoster et al., 2013; Sadet-Bougeteau et al., 2014; Costa et al., 2015). Tais modificações secundárias à ingestão abrupta de carboidrato solúvel mostraram similitude às populações bacterianas obtidas de outros segmentos intestinais (ceco e cólon), com redução da comunidade microbiana fibrolítica - Ruminococcacea e Lachnospiraceae (Daly et al., 2012; Fernandes et al., 2014; Hansen et al., 2015). Essas famílias bacterianas são consideradas marcadores da eubiose digestiva, pois participam da homeostase intestinal dos equinos (Ze et al., 2013).

Tanto as técnicas de cultivo e isolamento ou com métodos moleculares, em sua maioria, são conduzidos utilizando-se amostras de conteúdo de segmentos intestinais obtidos de animais fistulados, anestesiados ou mortos, inviáveis para a realização de estudos com plantéis (Julliand e Grimm, 2016). Assim, preconiza-se o uso de amostras fecais como alternativa ética por otimizar as colheitas e favorecer análises microbianas exequíveis e de baixo custo (Costa, 2014) para a monitoração da homeostase microbiana intestinal a longo prazo (Julliand e Grimm, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Empregar método de sequenciamento de nova geração e plataformas de bioinformática para caracterizar a microbiota fecal de equinos expostos à sobrecarga dietética de amido.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os gêneros bacterianos do microbioma fecal de equinos após sobrecarga dietética de amido.
- Associar as alterações clínicas em função do tempo da exposição à sobrecarga dietética de amido com as mudanças na microbiota fecal.
- Validar a análise microbiológica fecal como meio diagnóstico remoto das alterações no microbioma intestinal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e delineamento experimental

O ensaio foi realizado no setor de Equinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, campus Jaboticabal. Utilizaram-se 10 equinos (fêmeas ou machos castrados) mestiços, com idade média de $13\pm 5,6$ anos, e peso médio de 353 ± 28 kg. Foram realizados desvermifugação (Equalan[®]), vacinação (raiva - Rabmune[®]) e exame clínico prévios em todos os equinos, constatando nenhuma alteração sistêmica ou digestiva. Os animais foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado com quatro grupos (controle, controle-tampão, amido-controle, amido-tampão) em arranjo fatorial 2x2 com medidas repetidas no tempo.

4.2 Instalações e manejo

Em período anterior ao experimento, os equinos passaram por um processo de adaptação por 15 dias, sendo mantidos em baias individualizadas com fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*, e acesso a piquete com pastagem duas vezes ao dia, totalizando 3h/dia. A dieta fornecida constou-se de 2 kg de ração comercial (Selvagem[®] – Agromix) (Quadro 1 – Anexo), distribuída em duas porções de 1 kg/dia; e 4 kg de feno *Coast cross* (*Cynodon dactylon*), uma vez ao dia, disponibilizados nas redes próprias para feno penduradas nas baias. Esse período de adaptação teve como objetivo minimizar possíveis influências no consumo alimentar durante o período experimental. Já durante o experimento, todos os animais permaneceram em baias individuais, sem acesso ao piquete. A dieta foi

padronizada nas mesmas proporções do período pré-experimental, sendo o feno, no período experimental, fornecido duas vezes ao dia, totalizando 8 kg/dia.

4.3 Formação de parcelas experimentais e tratamentos

Os cinco cavalos presentes no grupo controle foram os mesmos do grupo amido/tampão, e os outros cinco animais foram dos grupos tampão/controle e amido/controle.

- A) Grupo Controle (GC) = administração de água (10L) por sonda nasogástrica e, decorridas oito horas, administração de solução fisiológica 0,9% (5L) por via intracecal.
- B) Grupo Amido/Controle (GAC) = sobrecarga de amido Maizena Duryea® (17,6g/kg de peso corpóreo) diluído em água (10L), via sonda nasogástrica (Garner et al., 1975). Após oito horas da sobrecarga, administração de solução fisiológica 0,9% (5L) via intracecal.
- C) Grupo Controle/Tampão (GCT) = administração de água (10L) por sonda nasogástrica. Decorridas oito horas, administração de uma solução tampão (3,5g de hidróxido de alumínio (Al(OH)_3), 65,6g de hidróxido de magnésio (Mg(OH)_2)) e 1,2g de simeticona, diluídas em solução fisiológica 0,9% (5L) por via intracecal.
- D) Grupo Amido/Tampão (GAT) = sobrecarga de amido Maizena Duryea® (17,6g/kg de peso corpóreo) diluído em água (10L), via sonda nasogástrica (Garner et al., 1975). Após oito horas, administração da solução tampão (3,5g de hidróxido de alumínio (Al(OH)_3), 65,6g de hidróxido de magnésio (Mg(OH)_2)) e 1,2g de simeticona, diluídas em solução fisiológica 0,9% (5L) por via intracecal.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Pré-indução

Todos os animais foram submetidos à tifloplexia (fixação do ceco na parede abdominal) na região paracostal direita após jejum alimentar de 12 horas. Os equinos foram tranquilizados com 0,05 mg/kg de acepromazina (Acepran 1%®), e, em seguida, sedados com 0,5 mg/kg de xilazina (Coopazine®), ambos administrados

por via intravenosa. Foi realizada a tricotomia da pele, na fossa paracostal direita, e anestesia local pela técnica de “L” invertido com administração de lidocaína (Xilestesin 2%®). Após a incisão da pele, a parede do ceco foi suturada junto a ela (Uribe Diaz et al., 2010), e o pós-operatório foi realizado com limpeza da ferida, antissépticos e repelentes.

Após 21 dias da tifloplexia, os animais foram submetidos à cateterização cecal para a administração de solução fisiológica 0,9% ou tampão. Os equinos foram sedados com 0,5 mg/kg de xilazina (Coopazine®) por via intravenosa e anestesiados no centro da fossa paracostal direita com lidocaína (Xilestesin 2%®). Em seguida, realizou-se incisão para acesso ao lúmen cecal, e introdução de sonda de Levine número 18 que foi fixada à pele por meio de sutura com fio de nylon 0,60. A tifloplexia e cateterização cecal foram realizados em período anterior ao processo de adaptação dos equinos.

4.4.2 Indução

As induções ocorreram após o período de adaptação, e em intervalos de 15 dias entre os grupos com as repetições de animais. A sonda nasogástrica foi previamente lubrificada, e a infusão realizada por gravidade, de forma lenta, para minimizar o desconforto do animal. No grupo controle, os cavalos receberam através da sonda nasogástrica, 10 litros de água. O mesmo volume foi usado na diluição de amido, administrado no grupo amido/controle. Após oito horas, foi lhes administrada solução fisiológica 0,9% (5L), em igual volume à solução tampão, por via intracecal, no grupo controle/tampão. No grupo amido/tampão, através da sondagem nasogástrica foi lhes administrado amido diluído em água totalizando 10 litros, e, oito horas após a indução com amido, foi lhes administrada solução tampão, via intracecal, diluída 5L de solução fisiológica 0,9%.

4.4.3 Coletas das amostras e momentos de avaliação

Por meio da palpação retal, com a mão enluvada, as amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos equinos, e colocadas em potes coletores esterilizados (Stewart et al., 2018). Colheu-se um total de 120 amostras em seis intervalos de tempo de avaliação: T0 – momentos antes da indução; T8h – oito

horas após a indução; T12h – doze horas após a indução; T24h – vinte quatro horas após a indução; T48h – quarenta e oito horas após a indução; T72h – setenta e duas horas após a indução. As amostras foram armazenadas e congeladas a -18°C até o momento do processo das extrações de DNA.

4.5 Avaliação clínica dos animais

Em período imediato à administração da sobrecarga dietética de amido, em intervalos de tempo pré-estabelecidos (T0-T72), foram realizadas avaliações da movimentação (claudicação e número de passos), sinais de desconforto abdominal, ingestão de água e alimento, e a produção de fezes. Adicionalmente, avaliaram-se coloração das mucosas oral e ocular, variações da temperatura retal (°C) e da frequência cardíaca (batimentos/minuto).

A ingestão de água e alimentos foi avaliada inspecionando a atitude e postura dos animais na baia, e presença de sobras alimentares no cocho e rede própria para feno. E a coloração das mucosas oral e ocular se deu por inspeção direta, após exposição ou compressão da pálpebra, com auxílio dos dedos indicadores e polegar.

A temperatura retal foi mensurada com termômetro clínico comercial, e a frequência cardíaca por meio de auscultação com estetoscópio. Já a produção de fezes teve como parâmetro a consistência, de forma subjetiva, em: cíbalas arredondadas de consistência firme (normal), e pastosa e líquida (diarreia) (Berg et al., 2005); o odor característico de alimentação com feno ou odor fétido; e a coloração podendo ser: esverdeada ou esbranquiçada.

A cada intervalo de avaliação, os animais eram conduzidos, ao passo, pelo cabresto, para que fosse anotado o número de passos realizados em piso de cimento plano em um espaço de seis metros. Os sinais inerentes da sensibilidade do casco ao passo e a intensidade do processo foram avaliados segundo a escala proposta por Obel (1948), descrita a seguir:

- A) Grau 1: O equino levanta os membros torácicos incessantemente, alternando o apoio no solo em intervalos de poucos segundos. A claudicação é pouco pronunciada e o animal retira rapidamente o membro do solo.

- B) Grau 2: O equino movimentar-se voluntariamente ao passo, encurtando ainda mais a fase de apoio ao solo. Ainda é possível erguer-se um dos membros torácicos do animal sem muita dificuldade.
- C) Grau 3: O equino reluta em locomover-se e reage, não permitindo qualquer tentativa de erguer um de seus membros torácicos.
- D) Grau 4: O equino somente inicia a locomoção se for forçado, e ao fazê-lo, projeta simultaneamente os dois membros torácicos para cima e para frente. Acima desse grau, dificilmente o animal conseguirá manter-se em posição quadrupedal passando a maior parte do tempo em decúbito.

4.6 Processamento de dados

Todo o processamento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Sequenciamento do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, campus Jaboticabal. Antes de realizar os processamentos, as amostras foram descongeladas, permanecendo à temperatura de 4° C, por 24 horas (Stewart et al., 2018).

4.6.1 Extração e análises de integridade e quantificação do DNA metagenômico

As 120 amostras de fezes tiveram seu DNA extraído, utilizando o kit de isolamento de DNA PowerLyzer® PowerSoil® (MO BIO Laboratories Inc.), e todo o processo de extração foi de acordo com as especificações do fabricante. O material extraído foi utilizado para a amplificação das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA.

A integridade do DNA metagenômico extraído foi estimada em gel de agarose 1%, com tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). Uma alíquota de 5µL da solução de DNA metagenômico, mais 3µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol (p:v) e 50% de glicerol (v:v)) foi submetida à eletroforese horizontal. A análise foi realizada em uma cuba (modelo Max Cell EC 360M) com tampão TBE 1X corado por *sybr gold* (0,5 µg/mL) (Invitrogen®), durante aproximadamente duas horas, à voltagem constante de 80 V. Os géis foram visualizados e documentados em Dual LED Blue/White Light Transilluminator – KASVI.

A qualidade do material genético extraído foi avaliada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, sendo a relação 260/280 utilizada para estimar a pureza do DNA. A concentração de DNA desse material foi feita no aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) com o kit Qubit™ DNA BR Assay Kit (Invitrogen®), seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.6.2 Amplificação das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA

A amplificação foi feita após a extração do DNA metagenômico, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) a 95°C por três minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 90 segundos e 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72°C por cinco minutos, utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para a região V4-V5: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGGCCTAA-3') e 926R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2011). As reações de PCR foram feitas em um volume total de 25 µL, contendo 8µL de KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) PCR kit (Kapa Biosystems, Boston, USA), 1µL de cada iniciador (10 µM), e 50 ng de DNA metagenômico.

Após a amplificação, a integridade dos fragmentos foi feita por meio do gel de agarose 2% em tampão TBE corado com *syber gold* (0,5 µg/mL) (Invitrogen®) submetido à eletroforese horizontal, utilizando-se um transiluminador ultravioleta e submetido à análise e foto documentação no Dual LED Blue/White Light Transilluminator – KASVI.

4.6.3 Purificação dos produtos da PCR, sequenciamento das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA e análise das sequências

Os produtos de PCR foram purificados a partir do gel de agarose 2% com o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery w/ Zymo-Spin™ IC Columns (Zymo Research, Irvine, CA) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação das amostras/bibliotecas utilizando o KAPA Library Quantification Kit Illumina® por reação em cadeia de polimerase quantitativa seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas purificadas e quantificadas foram misturadas de maneira equimolar e sequenciadas (2x250pb) com o MiSeq® Reagent

Kit v2 (500 ciclos) de acordo com as especificações do fabricante, utilizando-se a plataforma Illumina.

As sequências foram analisadas utilizando-se do programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) (Caporaso et al., 2011), sendo que sequências com tamanho menor que 150-200pb e quimeras detectadas foram eliminadas. Para alinhamento das sequências de alta qualidade e, conseqüentemente, obtenção da designação taxonômica e a abundância relativa dos diferentes grupos bacterianos, utilizou-se Ribosomal Database Project (RDP-II) (Cole et al., 2014) como banco de dados. Os alinhamentos resultantes foram utilizados na construção da matriz de distância e para agrupar as sequências em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs).

4.7 Análises de bioinformática e estatística

Os dados foram submetidos às análises de bioinformática pelo programa QIIME versão 1.9.1 (Caporaso et al., 2011) e resumidos nos níveis de filo, família e gênero. As análises de coordenadas principais (PCoA), pelo programa, foram conduzidas para avaliar as diferenças na estrutura de comunidades entre tratamentos e entre tempos de coleta. Por meio da análise estatística Kruskal-Wallis ($p < 0,05$ nível de significância) pelo website MicrobiomeAnalyst (Dhariwal et al., 2017), avaliou-se as diferenças significativas entre riqueza e diversidade das amostras de cada grupo, fornecidas pelo QIIME. Foi utilizado o PROC MIXED do SAS (SAS Inst. Inc, Cary, NC) na realização da análise de variância (ANOVA) para comparar as interações entre os tratamentos e os tempos, e, ao encontrar diferença pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$ nível de significância).

5. RESULTADOS

5.1 Alterações clínicas dos animais

Todos os animais foram avaliados clinicamente da mesma maneira, imediatamente após a indução via sonda nasogástrica e antes das coletas de fezes para cada tempo de avaliação. Nos grupos controle e controle-tampão, os animais

não apresentaram alterações comportamentais e nem sistêmicas. Por outro lado, os equinos presentes nos grupos amido-tampão e amido-controle apresentaram taquicardia (60 a 88 batimentos por minuto) a partir de oito horas em GAC e de 12 horas em GAT até 72 horas após a sobrecarga. Todos os animais dos grupos tratados com amido apresentaram início de febre em T8 (37,8 a 39,9°C) com resolução a partir de T24 e T48, e alguns animais de GAT a partir de T72.

Além das alterações cardíacas e de temperatura, a diarreia foi um dos principais sinais gastrintestinais observada em todos os animais do grupo amido-tampão, apresentando consistência pastosa, odor fétido e coloração esbranquiçada a partir de 12 horas e normalizando a partir de 48 horas após a indução (Figura 1). No grupo amido-controle a diarreia ocorreu em todos os equinos somente em T24, cessando nesse mesmo período de tempo.



Figura 1. Produção e características das fezes de equinos antes e após a sobrecarga dietética de amido: (A) antes da sobrecarga – fezes em formato de cíbalas e de coloração esverdeada; (B) 12 a 24 horas após sobrecarga – fezes pastosas com coloração esbranquiçada; (C) 48 horas após sobrecarga – fezes retornando ao formato de cíbalas e coloração esverdeada.

As claudicações no grupo amido-controle puderam ser observadas no momento das passadas a partir de 48 horas da indução com amido em dois animais, os quais apresentaram 10 passos, enquanto que os animais sem claudicação se movimentaram com oito passos no espaço de seis metros pré-estabelecido. Um, dos dois equinos com claudicação, apresentou encurtamento da fase cranial da passada no membro torácico esquerdo (MTE), caracterizando grau 2 de Obel (1948). No outro animal, observou-se movimentação da cabeça quando o MTE apoiava o chão em T48, e em T72 apresentava muita dor no membro pélvico esquerdo, caracterizando grau 3 de Obe (1948). No grupo amido-tampão, as claudicações

aconteceram a partir de T24 e T48, e todos os equinos apresentaram entre 10 e 14 passos em relação ao número de passadas. Um animal se recusava a se locomover, enquanto outros três apresentavam dores nos membros, dois com dor leve e outro com dor intensa nos membros esquerdos. Um dos cavalos deste grupo não conseguia se manter em estação após 48 horas de sobrecarga. O grau de Obel (1948) variou entre 2 e 4 nesses animais.

A desidratação e a falta de apetite foram observadas em todos os animais do GAT, sendo que a partir de T12/T48 os animais apresentavam 5-10% de desidratação, e, após 8-12 horas de sobrecarga, sobras de feno e ração eram deixados nos cochos das baias. Enquanto que em GAC essas alterações não foram observadas.

5.2 Informações de sequenciamento

Das 120 amostras sequenciadas, somente 118 foram analisadas. Duas amostras foram excluídas devido à baixa qualidade de sequenciamento. Analisaram-se 1.493.054 sequências, utilizando-se para normalização de todas as amostras 12.653 sequências/amostra. Foram identificadas 4.100 OTUs com 97% de similaridade de sequenciamento. As sequências representativas das OTUs foram atribuídas a 18 filos bacterianos, 108 famílias e 190 gêneros conhecidos. Dos gêneros encontrados, 79,47% foram classificados quanto a gênero e o restante foi atribuído à hierarquia taxonômica na qual foram identificados.

5.3 Comparação das comunidades bacterianas

As amostras de fezes dos animais dos grupos com amido apresentaram baixo grau de riqueza e menor diversidade ($p < 0,05$) quando comparadas as dos outros grupos. Essas informações foram observadas entre 12 e 72 horas após a sobrecarga no grupo amido-tampão, e entre T24 e T72 no grupo amido-controle (Figura 2).

A similaridade entre as comunidades bacterianas (β -diversidade) foi associada significativamente com os tratamentos, e com o tempo de coleta (Figura 3). Essas comunidades foram agrupadas por animal e, para cada um, obtiveram-se grupos por tratamento, observando que comunidades bacterianas em animais

tratados com amido tendem a ser diferentes daqueles não tratados. As alterações desta microbiota baseadas no tempo de coleta foram a partir de T12.

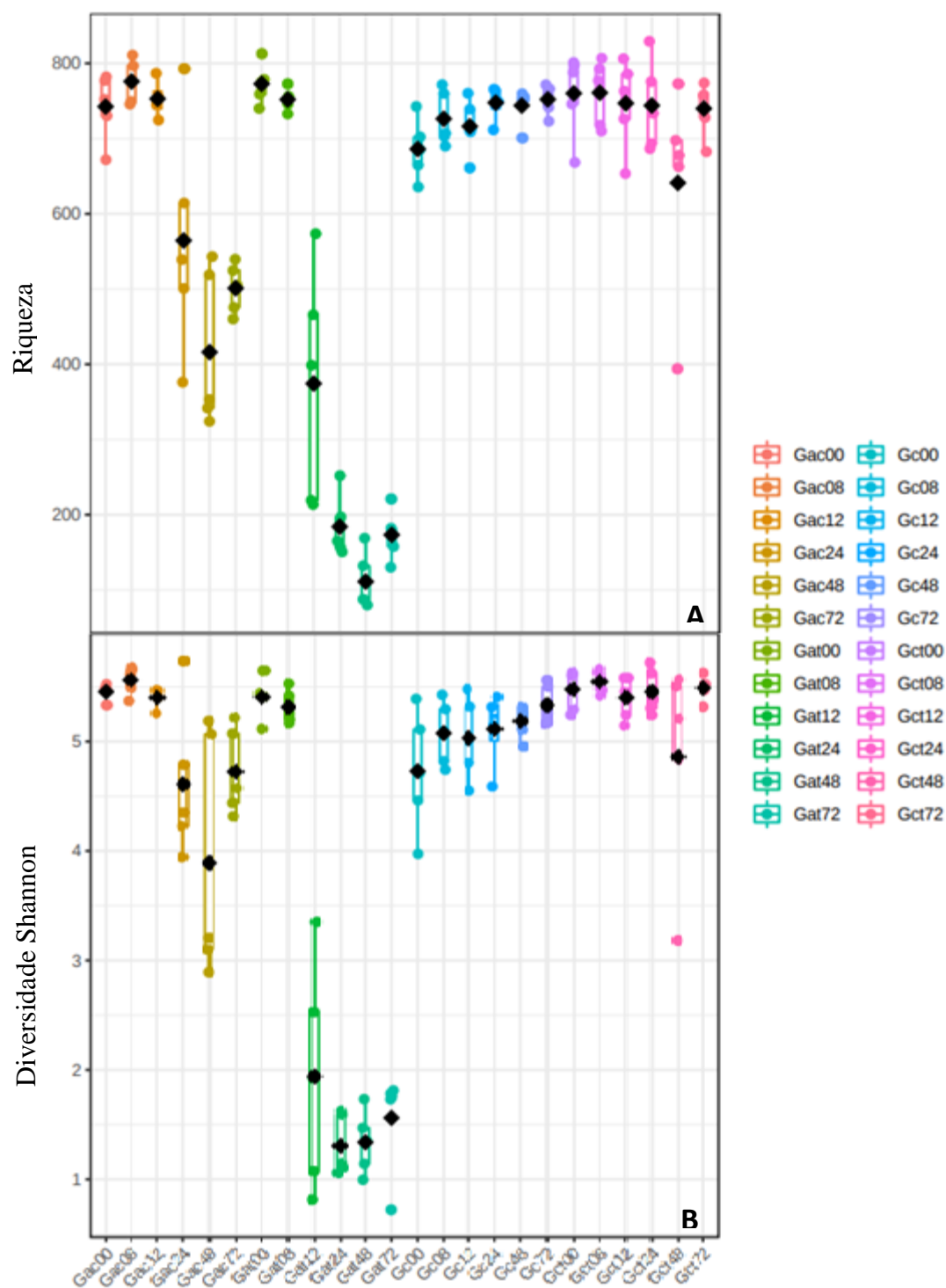


Figura 2. Gráficos “box-and-whisker” de riqueza (número de espécies observadas) (A) e diversidade (índice de diversidade Shannon) (B) das espécies

bacterianas para amostras de fezes extraídas dos equinos de cada grupo (grupo controle – GC; grupo controle-tampão – GCT; grupo amido-controle – GAC; grupo amido-tampão – GAT) para cada tempo de coleta de avaliação (T0 – 00; T8 – 08; T12 – 12; T24 – 24; T48 – 48; T72 – 72).

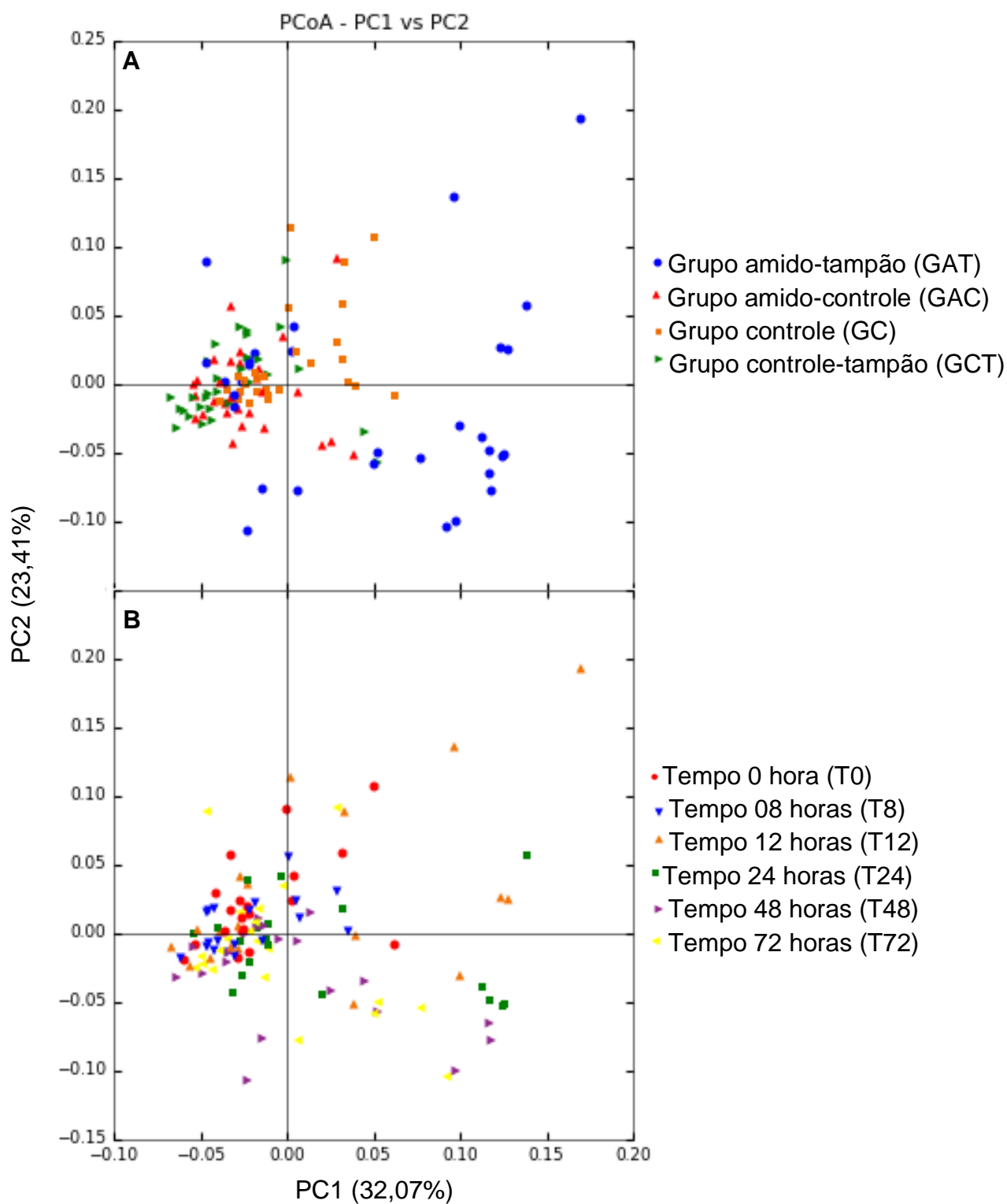


Figura 3. Gráficos de coordenadas principais da distância UniFrac ponderada para as comunidades bacterianas baseadas no tratamento (A) e no tempo de coleta (B). A distância UniFrac é uma mensuração de β -diversidade, ou a extensão da relação entre as comunidades bacterianas. As porcentagens entre parênteses nos títulos dos eixos representam uma variação de 55,48% explicada pelas coordenadas principais dadas.

5.4 Composição taxonômica das comunidades bacterianas

As comunidades microbianas das amostras fecais foram caracterizadas em níveis de filo, família e gênero bacterianos para cada grupo e tempo de coleta. Para esses níveis taxonômicos não houve diferença significativa entre os grupos controle e controle-tampão, e nem no momento T0 entre os tratamentos para as OTUs apresentadas ($p > 0,05$). No entanto, os grupos tratados com amido, quando comparados aos outros dois grupos, mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$).

O filo mais predominante, de forma geral, foi Firmicutes (42,0%), seguido de Bacteroidetes (3,7%), Euryarchaeota (3,2%), Actinobacteria (2,6%), Spirochaetes (2,2%), Proteobacteria (1,1%) e demais filios apresentados com abundância relativa mais baixa (<1%). Destes somente Euryarchaeota faz parte do reino Archaea, enquanto os outros pertencem ao reino Bacteria.

Os filios Bacteroidetes e Actinobacteria apresentaram maior abundância no grupo amido-tampão a partir de T48. Por outro lado, o filo Firmicutes aumentou abundância no GAT entre T12 e T24, com valores retornando aos iniciais (T0) em T48-T72. Já no GAC, somente esse filo e Proteobacteria foram mais prevalentes, entre 24 e 48 horas após a sobrecarga. Os filios Spirochaetes e Euryarchaeota foram menos abundantes nos grupos tratados com amido, apresentando menor prevalência no GAT entre T12-T72 e T48-T72, respectivamente (Figura 4).

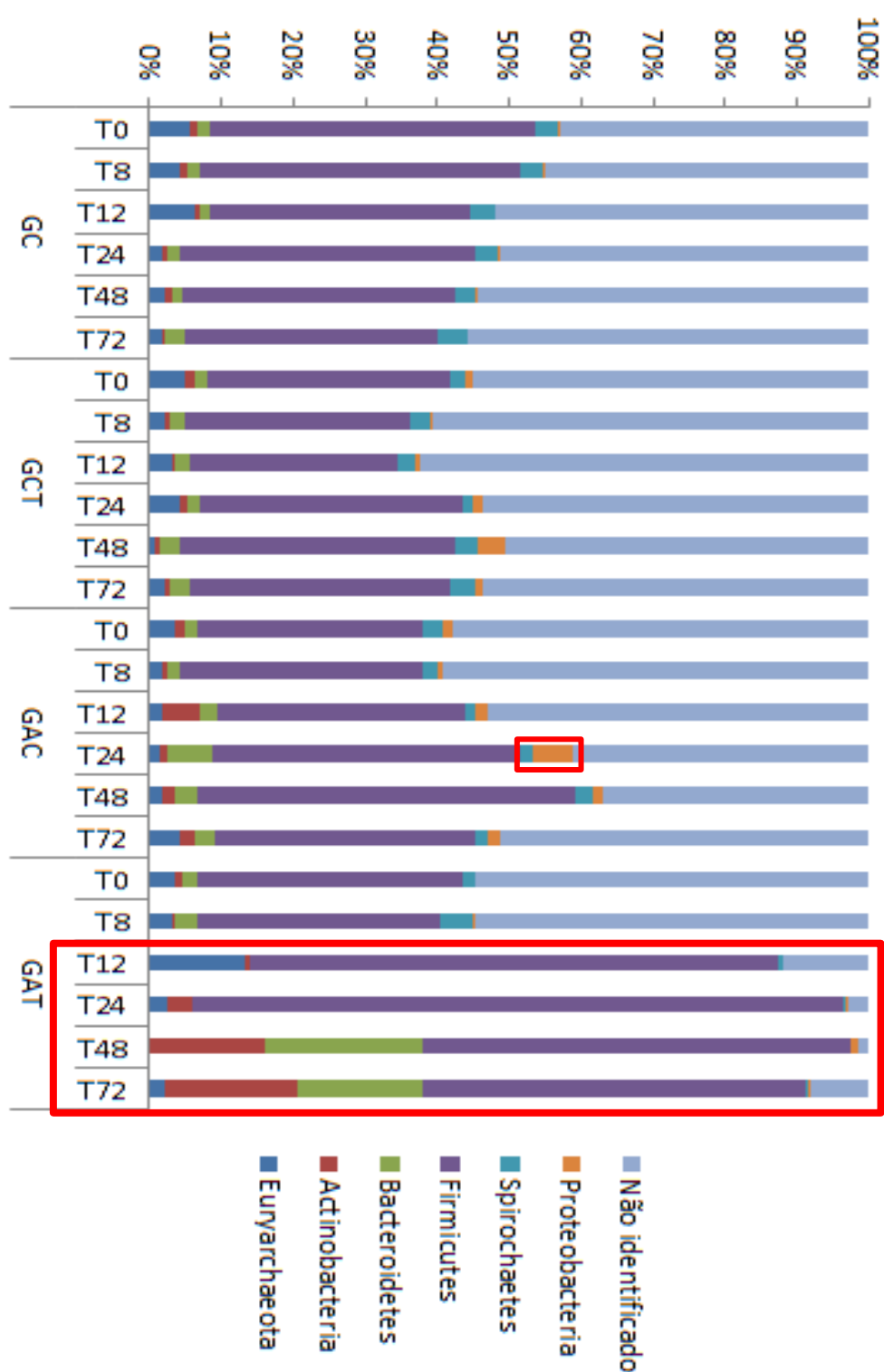


Figura 4. Gráfico representativo da abundância relativa dos Filos predominantes (>1%) nas amostras de fezes de equinos de cada grupo (GC – controle; GCT – controle/tampão; GAC – amido/controlado; GAT – amido/tampão) em cada tempo de avaliação (T0-T72). Os retângulos vermelhos representam onde ocorreram as diferenças significativas.

Das 108 famílias conhecidas classificadas, somente 10 apresentaram abundância relativa acima de 1% com maior prevalência de Streptococcaceae (12,3%), Ruminococcaceae (9,7%), Lachnospiraceae (9,1%), Lactobacillaceae (3,8%), Erysipelotrichaceae (1,7%) e Eubacteraceae (1,3%) pertencentes ao filo Firmicutes. Entre as Bacteroidetes somente a família Prevotellaceae (3,1%) se destacou, seguida das famílias dos outros filos, Methanobacteraceae (2,9%), Spirochaetaceae (2,2%) e Bifidobacteriaceae (1,9%). As famílias Ruminococcaceae, Spirochaetaceae, Eubacteraceae e Lachnospiraceae apresentaram menor abundância relativa entre T12 e T72 no grupo amido-tampão. Além disso, a família Eubacteriaceae também apresentou baixa prevalência no GAC entre 24 e 48 horas após a sobrecarga. Já a família Methanobacteriaceae foi menos abundante a partir de T48 no GAT (Figura 5).

Por outro lado, as famílias Bifidobacteriaceae, Prevotellaceae e Erysipelotrichaceae aumentaram a abundância relativa a partir de 48 horas de sobrecarga no grupo amido-tampão. Além disso, a família Streptococcaceae apresentou aumento da abundância entre T12-T24 com retorno dos valores semelhantes aos iniciais (T0) em T48; e a família Lactobacillaceae aumentou a prevalência entre T24-T48, ambos no GAT. No grupo amido-controle, esta última família apresentou maior abundância somente 48 horas após a sobrecarga (Figura 5).

Um total de 12 gêneros apresentou abundância relativa maior que 1%, sendo o mais prevalente *Streptococcus* (12,2%), pertencente à família Streptococcaceae. Da família Lachnospiraceae, os gêneros mais evidentes foram *Clostridium XIVa* (4,9%) e um não identificado (2,1%). Da mesma maneira, a família Ruminococcaceae apresentou um gênero não identificado (4,5%), além de *Clostridium III* (1,8%) e *Ruminococcus* (1,3%). As famílias Lactobacillaceae, Prevotellaceae, Methanobacteriaceae, Spirochaetaceae, Eubacteriaceae e Bifidobacteriaceae apresentaram somente um gênero prevalente cada, sendo eles *Lactobacillus* (3,8%), *Prevotella* (2,9%), *Methanobrevibacter* (2,9%), *Treponema* (2,2%), *Eubacterium* (1,2%) e *Bifidobacterium* (1,9%), respectivamente. Um gênero não identificado (1,6%) foi o único da família Erysipelotrichaceae.

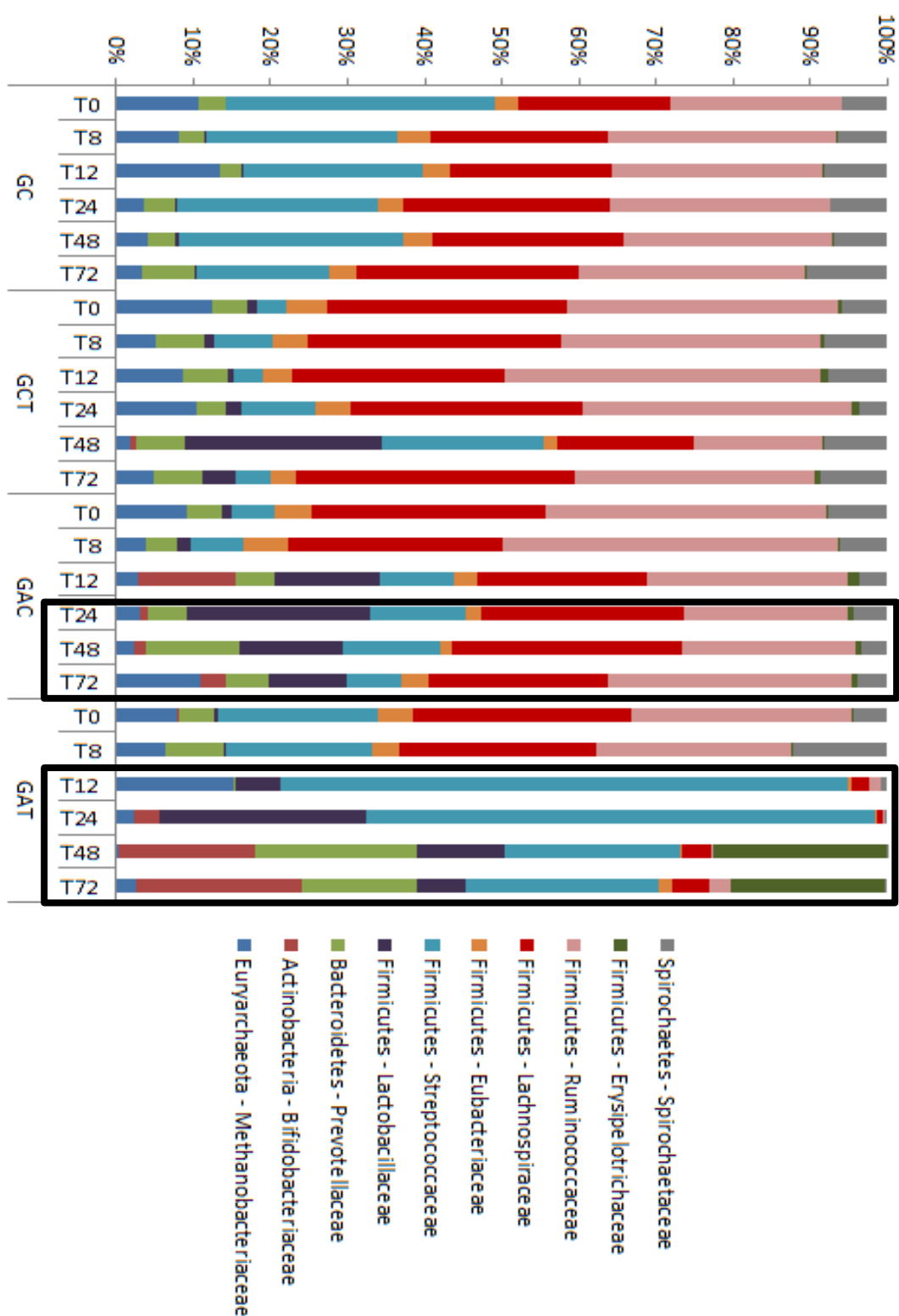


Figura 5. Gráfico representativo da abundância relativa das Famílias predominantes (>1%) nas amostras de fezes de equinos de cada grupo (GC – controle; GCT – controle/tampão; GAC – amido/controle; GAT – amido/tampão) em cada tempo de avaliação (T0-T72). Os retângulos pretos representam onde ocorreram as diferenças significativas.

Os gêneros *Bifidobacterium*, *Prevotella* e o da família Erysipelotrichaceae aumentaram a abundância relativa a partir de T48 no grupo amido-tampão. Já *Lactobacillus* apresentou maior prevalência em T24, retornando os valores aos valores basais em T48 no GAT, e aumentou após 48 horas de sobrecarga no grupo amido-controle. O gênero de *Streptococcus* foi mais abundante entre T12 e T24, e a partir de T48-T72 houve retorno dos valores àqueles iniciais (T0). *Clostridium XVIa*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium III* e o gênero não identificado da família Ruminococcaceae diminuíram a abundância relativa no grupo amido-tampão a partir de T12 até T72 (Figura 6).

Já no grupo amido-controle, o gênero *Ruminococcus* apresentou menor abundância a partir de T24 até T72, e *Clostridium III* e *Eubacterium* entre T24 e T48 com os valores retornando aos iniciais (T0) em T72 (Figura 3C). A diminuição da abundância relativa no GAC para *Clostridium III* foi menos intensa em relação à do GAT. O gênero não identificado da família Lachnospiraceae, no grupo amido-tampão, apresentou menor prevalência entre oito horas e 48 horas após a sobrecarga. Já no GAC, esse gênero bacteriano foi menos abundante entre T24 e T48. O gênero *Treponema* apresentou diminuição da abundância relativa entre 24 e 72 horas após a sobrecarga de amido; e *Methanobrevibacter* entre T48 e T72, ambos no GAT (Figura 6).

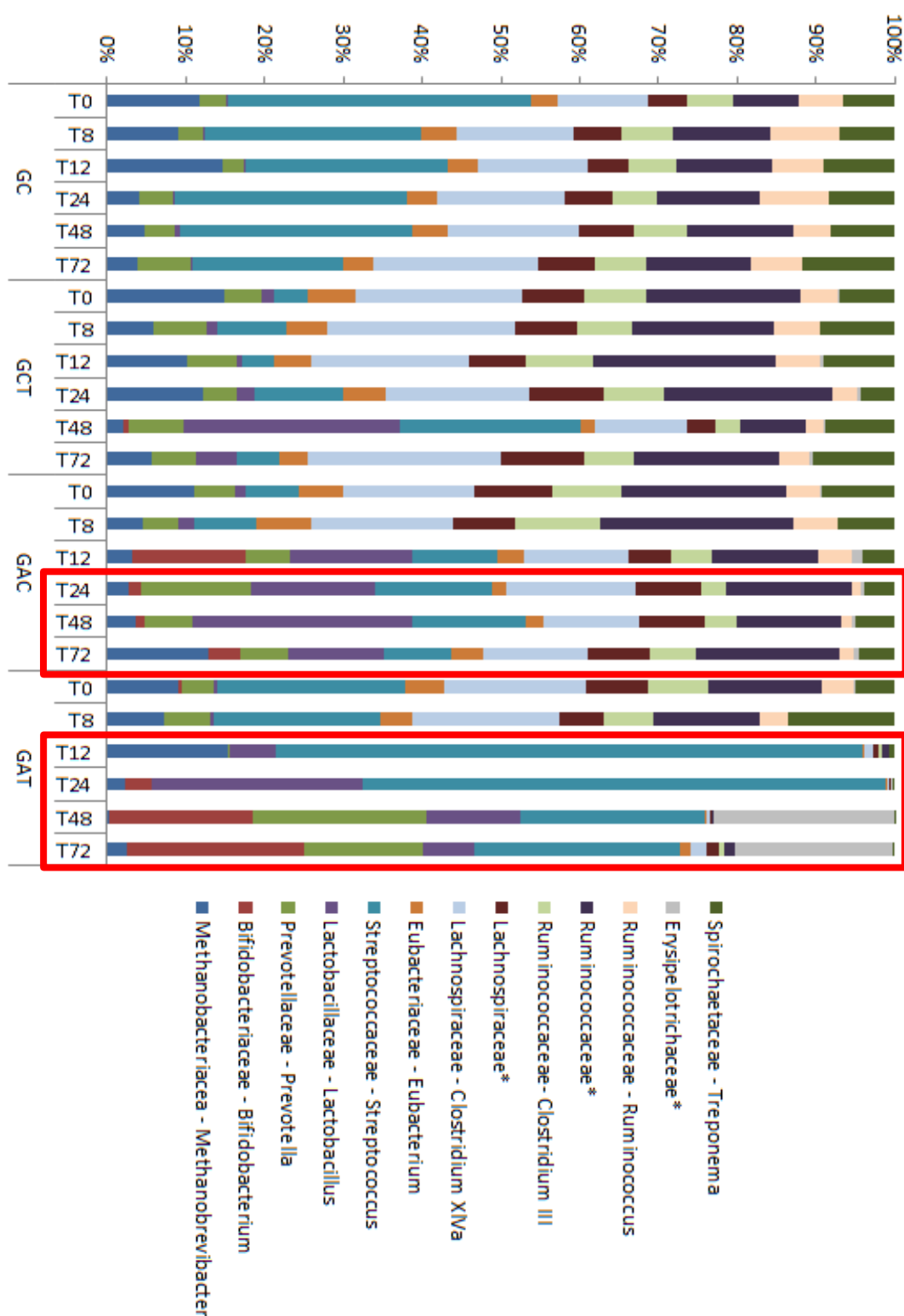


Figura 6. Gráfico representativo da abundância relativa dos Gêneros predominantes (>1%) nas amostras de fezes de equinos de cada grupo (GC – controle; GCT – controle/tampão; GAC – amido/controlado; GAT – amido/tampão) em cada tempo de avaliação (T0-T72). Os retângulos vermelhos representam onde ocorreram as diferenças significativas.

6. DISCUSSÃO

Sabe-se que a ingestão excessiva e abrupta de carboidrato solúvel sobrecarrega a porção inicial do trato gastrointestinal dos equinos, devido às limitações anatómicas, que permite que esse excesso de concentrado alcance o intestino grosso, onde será fermentado de forma intensa (Al Jassim e Andrews, 2009; Dyer et al., 2009). De fato, o excesso de amido ingerido pelos animais dos grupos amido-tampão e amido-controle, no presente estudo, alcançou o intestino grosso, e induziu alterações na microbiota fecal, caracterizadas pela redução na diversidade e riqueza microbianas quando comparada a dos cavalos dos grupos controle e controle-tampão. De acordo com Dougal et al. (2014), há redução na diversidade após ingestão de dieta rica em concentrado quando comparada com a de animais alimentados à base de fibra. Vale ressaltar que, tanto em humanos como em equinos, a população microbiana fecal está representada pelo conjunto de bactérias presentes na mucosa e no lúmen intestinais (Eckburg et al., 2005; Codling et al., 2010; Durbán et al., 2011; Costa et al., 2015).

Corroborando os estudos de Sherpherd et al. (2012), Fernandes et al. (2014), Costa et al. (2015) e Almeida et al. (2016), ocorreu predominância do filo Firmicutes (42%) em todos os grupos. Conforme relatado por esses últimos autores, também foi descrito por Dougal et al. (2013) e Fernandes et al. (2014) que o filo Bacteroidetes (9,7%) teve a segunda maior prevalência. Essa predominância se justifica, pois se sabe que esse filo e as famílias Lachnospiraceae e Spirochaetaceae (filo Firmicutes) têm maior densidade populacional na porção final do intestino dos equinos (Daly et al., 2001; 2003; Costa e Weese, 2018). As bactérias Gram-positivas do filo Firmicutes aumentam a abundância após a ingestão excessiva de amido (Garner et al., 1975; Millinovich et al., 2008; Moreau et al., 2014). De forma análoga, o filo Bacteroidetes, representado por bactérias amilolíticas (Salyers, 1990), exibiu predominância esperada para degradar os carboidratos solúveis. Tais achados, conforme observados nas fezes dos animais do presente estudo, após sobrecarga dietética com amido, corroboram a proliferação desses filos nas amostras fecais de cavalos à base de dieta rica em concentrado, discutido por Dougal et al. (2014).

O aumento da abundância relativa da família Streptococcaceae predominou entre 12 e 24 horas após a sobrecarga dietética com amido, enquanto que as famílias Lactobacillaceae, Prevotellaceae, Bifidobacteriaceae e Erysipelotrichaceae prevaleceram a partir de T48. Essas observações também foram descritas por Biddle et al. (2013) para a família Streptococcaceae, em amostras fecais de equinos após 24 horas da ingestão de amido, e subsequente maior prevalência da família Lactobacillaceae. As alternâncias dessas famílias nas amostras de fezes sugerem, provavelmente, competição ou pressão seletiva do meio com excesso de amido, ou podem ser justificadas pela proliferação de grupos bacterianos utilizadores de lactato, como já foi descrito para a família Veillonellaceae (Respondek et al., 2008; Biddle et al., 2013; Moreau et al., 2014). Talvez esse evento possa justificar que, a partir de T48-T72, algumas alterações clínicas foram menos intensas ou mesmo abolidas. Vale ressaltar que o lactato é o principal indicador de acidificação do meio pela redução do pH (Julliand e Grimm, 2016). No entanto, a família Veillonellaceae teve abundância pouco representativa, provavelmente devido a essa pressão seletiva ou a outros fatores externos, como condições ambientais, idade e raça (Costa e Weese, 2018). Ressalta-se que o presente estudo foi realizado em região de clima subtropical (Jaboticabal-SP; Pinheiros, 2010) com equinos mestiços, de forma pioneira, o que justifica outros estudos complementares para melhor caracterizar e estabelecer o padrão de relação da microbiota com ambiente/hospedeiro nessa região.

Fernandes et al. (2014) afirmam que a identificação de gênero e espécie revela maiores diferenças na estrutura de comunidades microbianas quando comparadas com a caracterização somente de filo ou família. Por conta disso, foram caracterizados gêneros na microbiota fecal, como *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., que proliferaram após a ingestão excessiva de amido, corroborando Millinovich et al. (2010), os quais observaram proliferação dessas bactérias, pertencentes às famílias Streptococcaceae e Lactobacillaceae, após sobrecarga dietética de carboidrato solúvel em equinos. Cabe ressaltar que as mudanças na prevalência desses microrganismos reportados ocorreram entre 12 e 48 horas, e, concomitantemente, ocorreu diminuição da abundância relativa de bactérias fibrolíticas, como *Ruminococcus* spp., *Clostridium* spp. e *Eubacterium* spp. Estes

achados reforçam Dougal et al. (2014) e Harlow et al. (2016) que relataram susceptibilidade destes gêneros, essencialmente fibrolíticos, à ingestão abrupta de amido, uma vez que a acidificação do meio luminal restringe sua multiplicação.

Os microrganismos fibrolíticos coabitam o conteúdo cecal e colônico (Dougal et al., 2013). Portanto, justifica-se que a mudança abrupta para dieta rica em concentrado desarmoniza a microbiota nestes segmentos intestinais como observado por Respondek et al. (2008), Moreau et al. (2014) e Hansen et al. (2015) que anotaram menor abundância destes gêneros e aumento na prevalência de bactérias amilolíticas no ceco e cólon ventral direito após cinco horas de sobrecarga dietética com amido. Assim, as alterações da microbiota fecal mencionadas no presente estudo foram semelhantes às observadas pelos autores acima, após a exposição dessa sobrecarga, o que reforça a hipótese de que a microbiota fecal pode ser reflexo da cecal e da colônica (Dougal et al., 2013; Schoster et al., 2013; Sadet-Bougeteau et al., 2014; Costa et al., 2015).

Além dos gêneros do reino Bacteria relatados acima, já foi descrito a presença de microrganismos do reino/domínio Archaea, como o gênero *Methanobrevibacter* spp., pertencendo à microbiota residente do cólon, do ceco (Dougal et al., 2012) e das fezes de equinos (Lwin e Matsui, 2014); e são bactérias produtoras de metano (Matarazzo et al., 2012). Neste sentido, ocorreu redução da prevalência desse gênero 48 horas após a ingestão com sobrecarga de amido, contrapondo Fernandes et al. (2014) que não detectaram alterações na abundância dessas bactérias nas fezes de equinos tratados com 35% de concentrado na dieta. De fato, o tipo de dieta e de manejo alimentar, e, também, outros fatores externos podem ter influenciado, uma vez que o estudo de Fernandes et al. (2014) foi realizado com outro microclima que pode modificar o tipo de pasto de forma sazonal, conseqüentemente, a microbiota intestinal. Sabe-se que o ambiente pode influenciar direta ou indiretamente nesta microbiota (Costa, 2014; Rodriguez et al., 2015). Isso sugere, mais uma vez, que existe a necessidade de estudos adicionais para estabelecer parâmetros da microbiota intestinal de cavalos criados em clima tropical/subtropical regional no continente brasileiro.

A sobrecarga de amido induziu hipertermia, diarreia, desidratação, perda de apetite e claudicação, principalmente nos intervalos de tempo T12 a T48. Estes

sinais clínicos estão associados, segundo Belknap e Balck (2012), à instalação de quadro de laminite. Corroboram, assim, Moreau et al. (2014) que observaram hipertermia, diarreia e claudicação (Obel 2) entre 26 e 29 horas após ingestão excessiva de carboidrato solúvel ou oligofrutose. De fato, no presente estudo, ocorreu dificuldade de locomoção detectada pelo aumento do número de passos, no espaço de seis metros demarcados, após 24 horas de sobrecarga dietética de amido, pois os cavalos aumentaram de oito para 10-14 passos. A verificação dos números de passos em um trajeto plano foi proposta no intuito de mostrar a relutância do animal em movimentar-se, pois, quando o fazia, encurtava a passada, donde se deduziu que o aumento no número de passos refletia diretamente uma maior sensibilidade dos cascos, sendo caracterizada pela claudicação (Obel 2-4). É provável que essa sensibilidade esteja relacionada com a absorção de endotoxinas transmural oriundas de bactérias fibrolíticas, principalmente Gram-negativas, mortas, possivelmente, pela acidificação do lúmen intestinal e redução do pH (Keller et al., 2011). Destaca-se que as claudicações foram coincidentes com a maior proliferação de bactérias amilolíticas (Gram-positiva), o que restringiu o crescimento das fibrolíticas (Gram-negativa).

A diarreia relatada aqui também foi descrita por Santos et al. (2009) que observaram alterações na consistência fecal de equinos a partir de 20 horas de sobrecarga de amido, e fluidificação das fezes após 36 horas da indução, de odor fétido conforme também observado entre T12 e T48 dos grupos com cavalos expostos à sobrecarga dietética de amido. Estas alterações da consistência fecal podem ser justificadas pelo aumento da produção de ácido láctico no intestino grosso, o que aumenta a pressão osmótica intraluminal, carreando maior fluxo de água para o lúmen intestinal (McGorum e Pirie, 2009).

Por outro lado, Souza e Valadão (2007) mencionam que a administração de $Mg(OH)_2$, agente osmótico catártico, induz diarreia e acelera o esvaziamento cecal, o que pode ter influenciado numa maior incidência de diarreia nos animais do grupo amido-tampão, já que ocorreu entre 12 e 48 horas após a sobrecarga de amido, enquanto que no grupo amido-controle foi somente observada no T24 após indução. No entanto, o $Mg(OH)_2$ também foi administrado ao grupo controle-tampão, e os equinos não apresentaram diarreia, indicando, provavelmente, que o composto

alcalinizante tem pouca influência nas alterações de consistência das fezes em animais submetidos a sobrecarga dietética de amido.

Em que pese, as alterações na microbiota fecal terem ocorrido após 48 horas da sobrecarga dietética, a diarreia e a hipertermia cessaram nesse mesmo período, e isso pode ser explicado pelo fornecimento de feno ao longo do experimento, o que manteve a quantidade de fibra na dieta, aumentando o pH intestinal e fecal. Sabe-se que o feno e forragens ricas em fibras podem tamponar os produtos da fermentação no intestino grosso, devido seu conteúdo ser rico em matéria seca (NRC, 1989). Neste sentido, pode-se justificar o retorno da abundância relativa de alguns grupos bacterianos aos valores anteriores à indução de sobrecarga de amido, como observado para a família Streptococcaceae a partir de T48. Além disso, esse fornecimento de fibra pode ter determinado atraso nas mudanças na microbiota fecal, iniciadas 12 horas da indução, por meio da atividade tamponante nas primeiras horas após a sobrecarga. De fato, Santos et al. (2009) descreveram que as fezes de equinos alimentados com feno apresentaram capacidade tamponante diminuída somente a partir de 16 horas após ingestão em excesso de amido, com a consequente redução de pH.

De acordo com Julliand e Grimm (2017), há variações na vulnerabilidade individual de equinos submetidos a tratamentos (dieta, medicamentos), e, conseqüentemente, nas doenças intestinais e sistêmicas. De fato, foi observado que nem todos os animais dos grupos tratados com amido apresentaram as alterações clínicas na mesma intensidade. Por exemplo, as claudicações, de acordo com a escala de Obel (1948), variaram entre os graus 2 e 4, embora esse achado possa estar relacionado às alterações nas abundâncias relativas bacterianas observadas em cada animal experimental. Por conta disso, entende-se que, também, há necessidade de estudos complementares para mensurar a susceptibilidade e as respostas da interação microbiota/hospedeiro como forma de subsidiar e consolidar o padrão de resposta do microbioma intestinal, visto que há inúmeras espécies bacterianas ainda não classificadas (44%) como já demonstrado por Shepherd et al. (2012) e Almeida et al. (2016).

7. CONCLUSÕES

Considerando as análises microbiológicas de amostras fecais de equinos, por meio do sequenciamento de nova geração, caracterizaram-se gêneros bacterianos envolvidos na instalação de disbiose devido à sobrecarga dietética de amido, com predominância de bactérias amilolíticas (*Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.) em detrimento de bactérias fibrolíticas (Lachnospiraceae e Ruminococcaceae), associada aos sinais clínicos de laminite aguda. Essa técnica evidenciou que a microbiota fecal pode ser um marcador confiável de distúrbios digestivos nos equinos, aplicável, por exemplo, em estudos com uso de probióticos.

Portanto, após sobrecarga dietética de amido nos equinos, foi possível:

- Discriminar populações bacterianos na microbiota fecal;
- Relacionar as alterações clínicas de laminite aguda com mudanças na microbiota fecal de equinos tratados com excesso de amido;
- Propor as análises da microbiota fecal para avaliar alterações no microbioma intestinal em condições clínicas e experimentais.

8. REFERÊNCIAS

Al Jassim RA, Andrews FM (2009) The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic and stomach ulcers. **Vet Clin Equine** 25:199-215.

Al Jassim RA, Scott PT, Trebbin AL, Trott DJ, Pollitt CC (2005) The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. **FEMS Microbiol Lett** 248:75–81.

Archer DC, Proudman CJ (2006) Epidemiological clues to preventing colic. **Vet Journal** 172, 29-39.

Belknap JK, Black SJ (2012) Sepsis-related laminitis. **Eq Vet J** 44:738-739.

Berg EL, Fu CJ, Porter JH, Kerley MS (2005) Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentrations. **Journal Animal Science** 83:1549–1553.

Biddle AS, Black SJ, Blanchard JL (2013) An *in vitro* model of the horse gut microbiome enables identification of lactate-utilizing bacteria that differentially respond to starch induction. **PLoS ONE** (8)10:e77599.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proc Natl Acad Sci** 108:4516–4522.

Codling C, O'Mahony L, Shanahan F, Quigley EM, Marchesi JR (2010) A molecular analysis of fecal and mucosal bacterial communities in irritable bowel syndrome. **Dig Dis Sci** 55:392-397.

Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Res** 42:D633–D642.

Costa MC, Weese JS (2012) The equine intestinal microbiome. **Animal Health Research Reviews** 13(1): 121-128.

Costa MC, Weese JS (2018) Understanding the intestinal microbiome in health and disease. **Vet Clin Equine** 34:1-12.

Costa MC (2014) **Characterization of the equine intestinal microbiota by high throughput sequencing**. 170 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – University of Guelph, Ontario, Canadá.

Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo G, Kim P, Weese JS (2015) Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. **Veterinary Journal** 205:74-80.

Daly K, Proudman CJ, Duncan SH, Flint HJ, Dyer J, Shirazi-Beechey SP (2012) Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. **Br J Nutrition** 107:989-995.

Daly K, Stewart CS, Flint HJ, et al. (2001) Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. **FEMS Microbiol Ecol** 38, 141-151.

De Fombelle A, Julliand V, Drogoul C, Jacotot E (2001) Feeding and microbial disorders in horses: 1-effects of na abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile na activities. **J Equine Vet Sci** 21:439-445.

Dhariwal A, Chong J, Habib S, King I, Agellon LB, Xia J (2017) “MicrobiomeAnalyst – a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data”. **Nucleic Acids Research** 45:W180-188.

Dougal K, De La Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Geor RJ, Nielsen BD, Schott II HC, Elzinga S, Newbold CJ (2014) Characterization of the faecal bacterial community in adult an elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. **PLoS ONE** 9:e87424.

Dougal K, Harris PA, Edwards A, Pachebat JA, Blackmore TM, Worgan HJ, Newbold CJ (2012) A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. **FEMS Microbiol. Ecol.** 82:642-652.

Dougal K, la Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Newbold CJ (2013) Identification of a core bacterial community within the large intestine of the horse. **PLoS One** 8(10):e77660.

Durbán A, Abellán JJ, Jiménez-Hernández N, Ponce M, Ponce J, Sala T, D'Auria G, Latorre A, Moya A (2011) Assessing gut microbial diversity from feces and rectal mucosa. **Microb Ecol** 61:123-133.

Dyer J, Al-Rammahi M, Waterfall L, Salmon KS, Geor RJ, Bouré L, Edwards GB, Proudman CJ, Shirazi-Beechey SP (2009) Adaptive response of equine intestinal Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) to an increase in dietary soluble carbohydrate. **Pflugers Arch** 458, 419-430.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science** 308:1635-1638.

Fernandes KA, Kittelmann S, Rogers CW, Gee EK, Bolwell CF, Bermingham EN, et al. (2014) Faecal microbiota of forage-fed horses in New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. **PLoS One** 9:e112846.

Furet JP, Firmesse O, Gourmelon ML, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Doré JL, Corthier GR (2009) Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. **FEMS Microbiol Ecol** 68:351–362.

Garner HE, Coffman JR, Hahn AW, Hutcheson D, Tumbleson ME (1975) Equine laminitis of alimentary origin: An experimental model. **Am J Vet Res** 36:441-449.

Goodson J, Tyznik WJ, Cline JH, Dehority BA (1988) Effects of an abrupt diet change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. **Appl Environ Microbiol** 54:1946-1950.

Grimm P, Philippeau C, Julliard V (2017) Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. **Animal** 1–10.

Hansen NC, Avershina E, Mydland LT, Naesset JA, Austibo D, Moen B, Måge I, Rudi K (2015) High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. **Microb Ecol Health Dis** 26:27216.

Harlow BE, Lawrence LM, Flythe MD (2013) Diarrhea-associated pathogens, lactobacilli and cellulolytic bacteria in equine feces: Responses to antibiotic challenge. **Veterinary Microbiology** 166(1-2):225–232.

Harlow BE, Lawrence LM, Hayes SH, Crum A, Flythe MD (2016) Effect of dietary starch source and concentration on equine fecal microbiota. **PLoS ONE** 11:e0154037.

Jensen R, Austbo D, Blache D, Knudsen KB, Tauson A-H (2016) The effect of feeding barley or hay alone or in combination with molassed sugar beet pulp on the metabolic responses in plasma and caecum of horses. **Anim Feed Sci Tech** 214:53-65.

Jouany JP, Medina B, Bertin G, Julliand V (2009) Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. **J Animal Science** 87:2844-2852.

Julliand V, De Fombelle A, Varloud M (2006) Starch digestion in horses: the impact of feed processing. **Livest Sci** 100:44–52.

Julliand V, Grimm P (2016) The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **J Animal Science** 94:2262-2274.

Julliand V, Grimm P (2017) The Impact of Diet on the Hindgut Microbiome. **Journal of Equine Veterinary Science** 52:23-28.

Khadka R, Thaller G, Philipsson J (2010) **Global horse population with respect to breeds and risk status**. 71 f. Thesis (Master in Animal Breeding and Genetics) – Swedish University of Agricultural Sciences.

Keller MD, Pollitt CC, Marx UC (2011) Nuclear magnetic resonance based metabonomic study of early time point laminitis in an oligo-fructose overload model. **Eq Vet J** 43:737-743.

Kuhl J, Winterhoff N, Wulf M, Schweigert FJ, Schwendenwein I, Bruckmaier RM, Aurich JE, Kutzer P, Aurich C (2011) Changes in faecal bacteria and metabolic parameters in foals during the first six weeks of life. **Veterinary Microbiology** 151(3-4):321–328.

Lima RAS, Cintra AG (2016) **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Brasília, 56 p. (MAPA).

Mackie RI, Wilkins CA (1988) Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. **Appl Environ Microbiol** 50:1439-1443.

Marchesi JR, Ravel J (2015) The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome** 3:31.

Matarazzo F, Ribeiro AC, Faveri M, Taddei C, Martinez MB, Mayer MPA (2012) The domain Archaea in human mucosal surfaces. **Clin Microbiol Infect** 18:834-840.

McGorum BC, Pirie RS (2009) Antimicrobial associated diarrhoea in the horse. Part 1: overview, pathogenesis and risk factors. **Equine Vet. Educ.** 21:610-616.

Milinovich GJ, Burrell PC, Pollitt CC, Klieve AV, Blackall LL, Ouwerkerk D, Woodland E, Trott DJ (2008) Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. **ISME Journal** 2:1089–1100.

Milinovich GJ, Klieve AV, Pollitt CC, Trott DJ (2010) Microbial events in the hindgut during carbohydrate-induced equine laminitis. **Vet Clin Equine** 26:79-94.

Moore BE, Dehority BA (1993) Effects of diet and hindgut defaunation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon of the horse. **J. Anim. Sci.** 71:3350-3358.

Moreau MM, Eades SC, Reinemeyer CR, Fugaro MN, Onishi JC (2014) Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse. **Veterinary Microbiology** 168(2-4):436–441.

NRC – National Research Council, 1989. Washington, 5ed. 100p. (Nutrient requirements of horses).

Obel N (1948) Studies on the histopathology of acute laminitis. **Almquist & Wiksells Boktrycker Ab**, Uppsala Sweden. Thesis.

Perkins GA, Den Bakker HC, Burton AJ, Erb HN, McDonough SP, McDonough PL, Parker J, Rosenthal RL, Wiedman M, Dowd SE, Simpson KW (2012) Equine stomachs harbor an abundant and diverse mucosal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology** 78:2522-2532.

Pinheiros J (2010) Análise das condições climáticas de Jaboticabal, SP. Disponível em: <https://www.webartigos.com/artigos/analise-das-condicoes-climaticas-de-jaboticabal-sp/31801> Acessado em: 20 de Agosto de 2019.

Pollitt CC, Van Eps AW (2002) Equine laminitis; a new induction model based on alimentary overload with fructan. In: INTERNATIONAL EQUINE COLIC RESEARCH SYMPOSIUM 7:87.

Potter GD, Arnold FF, Householder DD, Hansen DH (1992) Digestion of starch in the small or large intestine of the equine. **Pferdeheilkunde** 1(4):107- 111.

Proudman CJ, Hunter JO, Darby AC, Escalona E, Batty C, Turner C (2015) Characterization of the faecal metabolome and microbiome of Thoroughbred racehorses. **Equine Veterinary Journal** 47:580–586.

Respondek F, Goachet AG, Julliand V (2008) Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change diet. **J Anim Sci** 86:316-323.

Rodriguez C, Taminiau B, Brevers B, Abesani V, Van Broeck J, Leroux A, Gallot M, Bruwier A, Armony H, Delmee M, Daube G (2015) Faecal microbiota characterization of horses using 16S rRNA barcoded pyrosequencing, and carriage rate of *Clostridium difficile* at hospital admission. **BMC Microbiol** 15:181.

Russell SL, Gold MJ, Willing BP, Thorson L, McNagny KM, Finlay BB (2013) Perinatal antibiotic treatment affects murine microbiota, immune responses and allergic asthma. **Gut Microbes** 4:158–164.

Sadet-Bougeteau S, Philippeau C, Dequiedt S, Julliand V (2014) Comparison of the bacterial community structure within the equine hindgut and faeces using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). **Animal** 8:1928-1934.

Salyers AA (1990) Polysaccharide utilization by human colonic bacteria. **Adv Exp Med Biol** 270, 151-158.

Santos TM, Almeida FQ, Godoi FN, Silva VP, França AB, Santiago JM, Santos CS (2009) Capacidade tamponante, pH e consistência das fezes em equinos submetidos à sobrecarga dietética com amido. **Ciência Rural** 39(6):1782-1788.

Schoster A, Arroyo LG, Staempfli HR, Weese JS (2013) Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism. **BMC Res Notes** 6:91.

Shepherd ML, Swecker WSJ, Jensen RV, Ponder MA (2012) Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. **FEMS Microbiology Letters** 326(1):62–68.

Souza AH, Valadão CAA (2007) **Tamponamento cecal: Aspectos clínico, fisiopatológico e terapêutico na laminite experimental em equinos**. 241 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Stewart HL, Pitta D, Indugu N, Vecchiarelli B, Engiles JB, Southwood LL (2018) Characterization of the fecal microbiota of healthy horses. **AJVR** 79(8):811-819.

True RG, Lowe JE, Heissen J, Bradley W (1978) Black walnut shavings as a cause of acute laminitis. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners** 24:511-515.

Uribe Diaz AP, Santana AE, Valadão CAA, De Souza AH (2010) Canulação cecal em equinos. **Ciência Animal Brasileira** 11(2):357-362.

Venable EB, Fenton KA, Braner VM, Reddington CE, Halpin MJ, Heitz SA, Francis JM, Gulson NA, Goyer CL, Bland SD, Cross TL, Holscher HD, Swanson KS (2017)

Effects of feeding management on the equine cecal microbiota. **Journal of Equine Veterinary Science** 49:113-121.

Weiss DJ, Evanson OA, Green BT, Brown DR (2000) In vitro evaluation of intraluminal factors that may alter intestinal permeability in ponies with carbohydrate-induced laminitis. **Am J Vet Res** 61:858- 861.

Willing B, Vořrošs A, Roos S, Jones C, Jansson A, Lindberg JE (2009) Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. **Equine Veterinary Journal** 41:908–914.

Ze X, Le Mougén F, Duncan SH, Louis P, Flint HJ (2013) Some are more equal than others: The role of “keystone” species in the degradation of recalcitrant substrates. **Gut Microbes** 4:236-240.

ANEXO

Quadro 1. Composição nutricional e níveis de garantia dos componentes da ração comercial Selvagem® – Agromix.

Composição			
Ácido fólico		Metionina	
Antioxidante etoxiquin		Milho integral moído	
Aveia		Niacina	
Biotina		Óleo de soja degomado (2,5%)	
Calcáreo calcítico		Óxido de magnésio	
Cloreto de colina		Pantotenato de cálcio	
Cloreto de sódio (sal comum)		Semente de linhaça (0,3%)	
Enxofre ventilado (flor de enxofre)		Selenito de sódio	
Farelo de soja		Sulfato de cobalto	
Farelo de trigo		Sulfato de cobre	
Fosfato bicálcico		Sulfato de ferro	
Iodato de cálcio		Sulfato de manganês	
Levedura inativada		Sulfato de zinco	
Lisina		Vitaminas A, B1, B2, B12, B6, D3, E, K3	
Nível de garantia (mínimo)			
Ácido fólico	0,5 mg/kg	Matéria mineral**	100 g/kg
Antioxidante etoxiquin	65 mg/kg	Metionina	2100 mg/kg
Biotina	0,1 mg/kg	Niacina	30 mg/kg
Cálcio*	12 – 17 g/kg	Pantotenato de cálcio	16,5 mg/kg
Cobalto	0,5 mg/kg	Proteína bruta	120 g/kg
Cobre	13,5 mg/kg	Selênio	1,25 mg/kg
Colina	200 mg/kg	Sódio	2730 mg/kg
Enxofre	3,9 g/kg	Umidade**	120 g/kg
Extrato etéreo	38 g/kg	Vitamina A	8000 UI/kg
FDA**	140 g/kg	Vitamina B1	6 mg/kg
Ferro	40 mg/kg	Vitamina B12	16,5 mcg/kg
Fósforo	8000 mg/kg	Vitamina B2	8 mg/kg
Iodo	1,08 mg/kg	Vitamina B6	2,5 mg/kg
Lisina	5500 mg/kg	Vitamina D3	2000 UI/kg
Magnésio	1100 mg/kg	Vitamina E	180 UI/kg
Manganês	40 mg/kg	Vitamina K3	3,2 mg/kg
Matéria fibrosa**	140 g/kg	Zinco	63 mg/kg

*Componente que apresenta nível de garantia mínimo e máximo

**Componentes que apresentam nível de garantia máximo