

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/07/2021.

**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

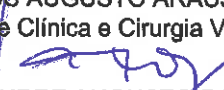
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE EQUINOS SUBMETIDOS A SOBRECARGA DE AMIDO

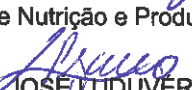
AUTOR: CAIO CARVALHO BUSTAMANTE

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 LUDUVERIO 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 Aléscio 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 (Tuter) 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

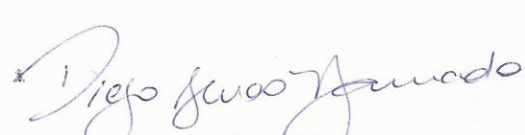
CERTIFICADO

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.


Profª Drª 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 $\text{Al}(\text{OH})_3$, 65,6g de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 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 $\text{Al}(\text{OH})_3$, 65,6g de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 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 variate 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 weighting 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 sings, the water and hay intake, the quality of the feces, the rectal temperature and the heart rate were evaluated. Specifics "kits" for Illumina plataform 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 QUIIME 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 fribolytic 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, consequentemente, 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 (Julliand e Grimm, 2017), após a sobrecarga dietética de amido.

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, DorÃ 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, Julliand 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.

Milnovich 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.

Milnovich 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. **Almqvist & 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.

Schooster 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, Voëro's 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.