

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

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA CECAL DE CAVALOS
APÓS SOBRECARGA DE AMIDO E ALCALINIZAÇÃO
DO CECO**

Caio Carvalho Bustamante

Médico Veterinário, Mestre em Cirurgia Veterinária

Jaboticabal - SP

2023

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

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA CECAL DE CAVALOS
APÓS SOBRECARGA DE AMIDO E ALCALINIZAÇÃO
DO CECO**

Discente: Caio Carvalho Bustamante

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

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

Jaboticabal - SP

2023

B982a Bustamante, Caio Carvalho
Avaliação da microbiota cecal de cavalos após sobrecarga de amido e alcalinização do ceco / Caio Carvalho Bustamante.
-- Jaboticabal, 2023
68 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Carlos Augusto Araújo Valadão

1. Laminite. 2. Metadados. 3. Seqüenciamento de nucleotídeo. 4. Hidroxidos. 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.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Estudos com microbiota intestinal ainda são limitados, principalmente quando relacionados à espécie equina. A avaliação da composição bacteriana intestinal é uma ferramenta diagnóstica pouca invasiva e com valor preditivo nas alterações gastrintestinais e suas consequências metabólicas. O uso de soluções alcalinizantes, como uma das formas de tratamento para algumas dessas alterações, tem efeito benéfico, dependendo da via de administração. O presente estudo demonstra inovação para a saúde animal ao caracterizar as principais bactérias de provável envolvimento nas alterações gastrintestinais após sobrecarga dietética com carboidrato solúvel (amido de milho), correlacionando com a presença de solução alcalina como prevenção à disbiose, condição clínica frequente no manejo de equinos.

POTENCIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Intestinal microbiota's studies are still limited, especially when related to horses. Assessment of intestinal bacterial composition is a low-invasive diagnostic tool with predictive value in gastrointestinal changes and their metabolic consequences. The use of alkaline solutions, as one of the treatments for some of these changes, has beneficial effect depending on the route of administration. The present study demonstrates innovation for animal health by characterizing the main bacteria likely to be involved in gastrointestinal changes after dietary soluble carbohydrate (corn starch) overload correlating with the presence of buffer solution as prevention of dysbiosis, a common clinical condition in the management of equines.

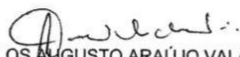
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

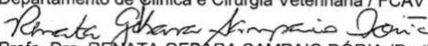
TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA CECAL DE CAVALOS APÓS SOBRECARGA DE AMIDO E ALCALINIZAÇÃO DO CECO

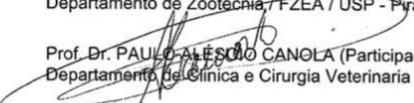
AUTOR: CAIO CARVALHO BUSTAMANTE

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO ARAÚJO VALADÃO

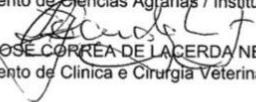
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Cirurgia Veterinária, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO ARAÚJO VALADÃO (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal


Profa. Dra. REMATA GEBARA SAMPAIO DÓRIA (Participação Presencial)
Departamento de Zootecnia / FZEA / USP - Pirassununga/SP


Prof. Dr. PAULO ALÉSSIO CANOLA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal


Prof. Dr. VINÍCIUS SILVEIRA RAPOSO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Agrárias / Instituto Federal de Minas Gerais


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

Documento assinado digitalmente

 VINÍCIUS SILVEIRA RAPOSO
Data: 01/09/2023 09:59:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

i/MG

Jaboticabal, 01 de setembro de 2023

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 – MG, 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 - MG, sob orientação do Professor Doutor Rafael Resende Faleiros. 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 - SP, com início em março de 2015 e término em fevereiro de 2017, sob orientação do Professor Doutor Paulo Alécio Canola. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Unesp Câmpus de Jaboticabal, com início em março de 2018 e término em julho de 2019, sob orientação do Professor Doutor Carlos Augusto Araújo Valadão. Atualmente é doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Unesp Câmpus de Jaboticabal – SP, com início em agosto de 2019, sob orientação do Professor Doutor Carlos Augusto Araújo Valadão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelas oportunidades que surgiram ao longo desta caminhada, pelos pedidos e pela força concedidos em momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais, Maria Terezinha C. Bustamante e Antônio Eduardo B. Barbosa, e aos meus irmãos, Hugo C. Bustamante e Mila C. Bustamante, por todo o amor, apoio e confiança por cada etapa dessa fase e por todas que já passei e irei passar. Mensagens que vinham deles como: “Você é foda!”, “Temos muito orgulho de você.”, “Te amamos muito.”, “Como anda o doutorado? Já marcou sua defesa? E o trabalho escrito?”; davam-me forças para continuar pelo carinho e preocupação que tinham em dar tudo certo. Amo vocês incondicionalmente.

Agradeço aos meus familiares, em geral, que mesmo de longe, com pouca comunicação e poucos encontro/visitas, torceram pelo meu sucesso e por todas as conquistas até hoje, comemorando cada uma.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos A. A. Valadão, pelas dicas, conselhos, ensinamentos, companheirismo e por ter aceitado me orientar desde o mestrado e, agora, no doutorado. Tenho uma admiração enorme pelo profissional que ele é, espelhando a minha carreira acadêmica na dele, com ética, respeito e responsabilidades que demanda essa escolha.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo A. Canola e à Profa. Dra. Eliana G. M. Lemos pelo auxílio e suporte durante a execução deste trabalho que estamos realizando desde o mestrado.

Agradeço aos amigos e colegas: Vanessa Barroso, Isabela R. Peixoto, Camila Fernandes e Luciano Kishi, que foram fundamentais na execução desse projeto, tendo paciência e empenho para auxiliar no manejo dos animais como para esclarecimento de dúvidas na parte laboratorial.

Agradeço à Pamela A. M. Pereira pela ajuda e companheirismo durante a realização deste trabalho. Ela foi fundamental para que pudéssemos construir uma tese de qualidade, e, ainda será, para a produção de artigos futuros.

Agradeço à todos os meus amigos que fiz até hoje, sejam eles de Gov. Valadares/Belo Horizonte, Lavras e Jaboticabal/São Paulo, que foram e são essenciais em minha vida, não somente pela torcida e apoio à distância, mas

pela importância de estarem presentes mesmo quando ficamos meses sem conversar.

Destes amigos, destaco de Gov. Valadares: Livia N. Fontes, Farley A. Sant'Ana, Fernando Evangelista e James R. Melo que me ajudam a enxergar situações de maneiras diferentes, abrindo a mente à novas opiniões, além de serem pessoas que eu possa confiar até mesmo meus piores momentos; De lavras: Elaine Makishi e Maíra Freitas que, apesar de hoje estarmos longe, mantemos ainda o carinho, respeito e amizade, pela qual estou sempre recorrendo; e De Jaboticabal: Rodrigo C. Costa, Fabiana Del Lana, Marina A. Lansarini, Julia R. G. Carvalho, Tryssia Moi e Igor Caetano que mantenho meu contato pessoal e profissional até hoje, sendo introduzidos na minha vida aos pouquinhos, e que fazemos questão de, quando estirvemos em Jaboticabal, encontrarmos para atualização de “fofocas”.

Agradeço, também, e não menos importante, aos amigos do vôlei UNESP Jaboticabal e Mintonette, os quais foram a válvula de escape durante essa “loucura” de pós-graduação. Em especial, ao amigo e treinador Filipe Giribola, por todo o conhecimento de vida e do esporte que é uma das minhas paixões, fazendo os treinos e jogos serem, ao mesmo tempo, rígidos e leves.

Agradeço à Stella H. Moreira, melhor amiga desde 2009/2, e ao Peterson D. Pacheco, melhor amigo que UNESP Jaboticabal e que o vôlei me trouxe. Eles foram e são fundamentais nessa caminhada acadêmica, quando dias ruins se tornavam mais leves na presença deles, e dias leves se tornavam extremamente alegres. São pessoas que me deram e dão apoio em todos os momentos, mesmo este sendo uma loucura, mas sei que estarão lá para puxar a mão quando eu cair. Sempre farão parte da minha vida.

Agradeço aos profissionais do Hospital Veterinário da UNESP Jaboticabal, pela parceria, mesmo que indireta, neste experimento.

Agradeço 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.

Agradeço, por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa – 2015/24860-4.

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.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo Geral.....	12
3.2 Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Animais, Manejo e Procedimentos.....	12
4.2 Delineamento, Avaliações Experimentais e Coleta Amostral.....	14
4.3 Processamentos de Dados.....	19
4.3.1 Extração e Análises do DNA Metagenômico.....	19
4.3.2 Amplificação das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA.....	19
4.3.3 Purificação e Sequenciamento das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA.....	20
4.4 Análises de Bioinformática e Estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Alterações clínicas.....	21
5.2 Análise e Comparação das Comunidades Bacterianas.....	26
5.3 Composição Taxonômica das Comunidades Bacterianas.....	27
5.4 Análise de Abundância Diferencial (LefSe).....	36
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

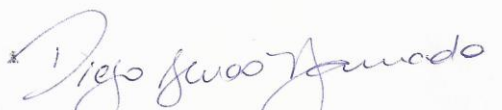
CERTIFICADO

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

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA CECAL DE CAVALOS APÓS SOBRECARGA DE AMIDO E ALCALINIZAÇÃO DO CECO

RESUMO – A diversidade microbiana intestinal dos cavalos tem a dieta como a maior fonte de influência. As mudanças dietéticas bruscas e a oferta de carboidratos solúveis em excesso são as principais causas de disbiose intestinal, alterando o processo fermentativo e o pH do meio. O uso de compostos alcalinizantes pode ser uma estratégia para minimizar essa alteração de microbiota. Objetivou-se caracterizar a microbiota cecal de cavalos após a sobrecarga dietética com amido de milho na presença ou não de solução alcalinizante ($Mg(OH)_2 + Al(OH)_3$) intracecal. Foram utilizados dez equinos (quatro machos castrados e seis fêmeas), submetidos à fistulação cecal. Após o procedimento e tempo de adaptação, os animais foram distribuídos ao acaso em dois grupos (I e II) com cinco cavalos em cada, e cada grupo foi submetido a dois tratamentos diferentes. Os animais do grupo I foram submetidos aos tratamentos água-salina (AgS – água por sonda nasogástrica e solução fisiológica via intracecal) e amido-tampão (AT – sobrecarga de amido de milho por sonda nasogástrica e solução alcalinizante via intracecal), com intervalo de 15 dias entre os tratamentos. Já os animais do grupo II receberam os tratamentos amido-salina (AS – sobrecarga de amido de milho por sonda nasogástrica e solução fisiológica via intracecal) e água-tampão (AgT – água por sonda nasogástrica e solução alcalinizante via intracecal), nas mesmas condições do grupo I. Foram, então, realizadas avaliações da condição clínica e coleta de amostras de conteúdo cecal em cinco intervalos de tempo (T0, T8, T24, T48, T72 horas). As amostras foram processadas e sequenciadas nas regiões V4-V5 do gene 16S rRNA pela plataforma Illumina. Observou-se redução da diversidade e riqueza microbianas nas amostras cecais de cavalos tratados com amido e tampão, onde as alterações da microbiota ocorreram entre oito e 48 horas após sobrecarga de amido. Neste intervalo de tempo, notou-se aumento da abundância relativa de bactérias amilolíticas como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Bacteroides*, principais gêneros associados ao tratamento AT, e decréscimo de bactérias fibrolíticas como membros da família Lachnospiraceae. Além disso, os animais tratados com amido apresentaram alterações clínicas como diarreia, claudicação, hipertermia e desidratação, entre T8 e T72, sendo mais intensas no tratamento amido-tampão. Concluiu-se, então, que a solução tamponante via intracecal não auxiliou na manutenção da microbiota cecal de equinos submetidos à sobrecarga dietética de amido, e quando associado à essa sobrecarga, as alterações na microbiota e condições clínicas dos cavalos foram intensificadas.

Palavras-chave: Laminite, metadados, seqüenciamento de nucleotídeo, hidroxidos

EVALUATION OF THE CECAL MICROBIOTA IN HORSES AFTER STARCH OVERLOAD AND CECAL ALCALINIZATION

ABSTRACT – The intestinal microbial diversity of horses has diet as the biggest contributing factor. Abrupt dietary changes and excessive supply of soluble carbohydrates are the main causes of intestinal dysbiosis, altering the fermentation process and the intraluminal pH. The use of alkalizing compounds can be a good strategy to minimize microbiota change. The objective was to characterize the cecal microbiota of horses after cornstarch overload with or without of intracecal buffer solution ($Mg(OH)_2 + Al(OH)_3$). Ten horses (four gelding males and six females) submitted to cecal fistulation were used. After the procedure and adaptation time, the animals were randomly distributed in two groups (I and II) with five horses each, and each group was submitted to two different treatments. The animals in group I were submitted to water-saline treatments (WS – water via nasogastric tube and saline solution intracecally) and buffer-starch (BS – cornstarch overload via nasogastric tube and buffer solution intracecally), with washout of 15 days between treatments. The animals in group II received the starch-saline treatments (SS – cornstarch overload by nasogastric tube and saline solution intracecally) and buffer-water (BW – water by nasogastric tube and buffer solution intracecally), under the same conditions from group I. Then, assessments of the clinical condition and collection of samples of cecal contents were performed at five-time intervals (T0, T8, T24, T48, T72 hours). The samples were processed and sequenced in the V4-V5 regions of the 16S rRNA gene by the Illumina platform. A reduction in microbial diversity and richness was observed in caecal samples from horses treated with starch and buffer, where changes in the microbiota occurred between eight and 48 hours after starch overload. In this time interval, there was an increase in the relative abundance of amylolytic bacteria such as *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Bacteroides*, the main genera associated with BS treatment, and a decrease in fibrolytic bacteria as members of the Lachnospiraceae family. In addition, animals treated with starch showed clinical changes such as diarrhea, lameness, hyperthermia and dehydration, between T8 and T72, being more intense in the starch-buffer treatment. It was concluded that the intracecal buffering solution did not help to maintain the cecal microbiota of horses subjected to starch overload, and when associated with this overload, changes in the microbiota and clinical conditions were intensified.

Keywords: Hidroxides, laminitis, metadata, nucleotide sequence

1. INTRODUÇÃO

O intestino grosso dos cavalos é uma câmara fermentativa anaeróbia que possui aproximadamente 10^9 microrganismos/grama de ingesta no ceco, incluindo pelo menos 108 gêneros e sete filos de bactérias, além de infinidade de protozoários, arqueas e fungos (Grimm et al., 2016; Venable et al., 2017). Essa microbiota promove digestão e absorção de nutrientes para produção de energia, estimula o sistema imune do trato gastrintestinal para a homeostase orgânica e restringe o crescimento de patógenos no hospedeiro (Milinovich et al., 2010; Kamada et al., 2013; Vieira et al., 2018).

A diversidade microbiana intestinal dos cavalos varia com a idade, o manejo, a raça e as condições ambientais do indivíduo (Costa e Weese, 2018; Garber et al., 2020). Já foi relatado que a variação da abundância das diferentes espécies está baseada nos fatores específicos de cada hospedeiro como a sua genética e a coabitação de parasitas e patógenos entéricos (Al Jassim e Andrews, 2009; Costa et al., 2012; Massacci et al., 2020). Foi descrito que as doenças gastrintestinais, causadas por patógenos, induzem alterações nas populações bacterianas de ceco e cólon (Al Jassim e Andrews, 2009; Costa e Weese, 2018; Stewart et al., 2020), modificando o padrão fermentativo nestes compartimentos intestinais que, às vezes, ativam respostas inflamatórias sistêmicas (Garner et al., 1978; Costa et al., 2012; Kamada et al., 2013; Moreau et al., 2014).

Há evidências de que a dieta é o maior fator contribuinte para a variação da microbiota intestinal em cavalos (Daly et al., 2012; Hansen et al., 2015; Destrez et al., 2019). De fato, mudanças dietéticas bruscas e oferta de carboidrato solúvel em excesso modulam negativamente a microbiota intestinal, reduzindo a diversidade microbiana, e, conseqüentemente, causando disbiose gastrintestinal (Grimm et al., 2016; Warzecha et al., 2017). Além disso, a inclusão abrupta de cereais na dieta de equinos gera proliferação de bactérias produtoras de ácido lático, o que acidifica o meio, reduzindo o pH no intestino grosso (Miller et al., 1993; Al Jassim e Andrews, 2009; Biddle et al., 2013).

A redução do pH intestinal pode induzir acidose subclínica (Biddle et al., 2013) e complicações metabólicas secundárias como síndrome cólica, laminite e morte (Kuhl et al., 2011; Daly et al., 2012; Park et al., 2021). Algumas estratégias para estabilizar o processo fermentativo, como a utilização de

compostos alcalinizantes, evitam variações súbitas do pH intestinal, e minimizam as complicações advindas do mal manejo alimentar. Tais compostos têm sido empregados como produtos antiácidos, a exemplo do bicarbonato de sódio que aumentou o pH cecal de cavalos entre 6 e 12 horas após administração oral (Taylor et al., 2014), e a associação de hidróxidos de alumínio e magnésio em humanos e em vacas leiteiras, aumentando o pH gástrico e rumenal (Maton e Burton, 1990; Miller et al., 1993; Ahmed et al., 2002).

Nos equinos, os compostos contendo hidróxidos de alumínio e magnésio têm sido utilizados no tratamento de úlceras gástricas (Clark et al., 1996) e nas compactações de intestino grosso (Tillotson e Traub-Dargatz, 2003), e já foi demonstrado seu efeito de aumento do pH intestinal por outros estudos (Clark et al., 1996; Ahmed et al., 2002; Maia et al., 2017). No entanto, estes trabalhos utilizaram esse produto alcalinizante via administração oral sem avaliação de mudanças na microbiota intestinal. Portanto, considerando que as alterações fermentativas do conteúdo cecal após a sobrecarga de amido podem deflagrar disbiose, hipotetizamos que a administração intracecal da solução contendo hidróxidos de alumínio e magnésio poderia estabilizar e/ou minimizar as alterações na microbiota cecal durante a sobrecarga com grãos.

2. Revisão de Literatura

Humanos e animais possuem um conjunto único de diversos microrganismos, sendo a microbiota uma impressão digital individual. As interações complexas entre esses microrganismos comensais com relação aos riscos de doença, preservação da saúde, imunidade e possibilidades terapêuticas estão atualmente expandindo os campos de pesquisa em medicina humana e veterinária (Kauter et al., 2019). Essa totalidade de diferentes microrganismos associados ao ambiente é conhecida como microbiota, enquanto o complexo de fatores bióticos e abióticos, todo o habitat, incluindo microrganismos e seus genomas, correspondem ao microbioma (Ursel et al., 2012; Marchesi, 2015). Embora essa composição microbiana inclua fornecedores de nutrientes essenciais e de suporte ao sistema imune do hospedeiro (Russel et al., 2013; D'Argenio e Salvatore, 2015), ela também contém taxons capazes de causar doenças (Young, 2017).

Os equinos pertencem a uma família de mamíferos herbívoros que possuem uma microbiota específica no intestino grosso (ceco e cólon), com capacidade para utilização de forragens para fornecimento de energia. Esses microrganismos convertem o material vegetal (celulose, hemicelulose e pectina), por meio de fermentação, em ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato, que podem suprir até 60-70% das exigências energéticas diárias dos cavalos (Biddle, 2013; Julliard e Grimm, 2016; 2017). Consequentemente, distúrbios gastrintestinais na microbiota equina podem resultar em alterações dos padrões de fermentação e distúrbios metabólicos (Dougal et al., 2013). No entanto, o conhecimento sobre o papel e a contribuição da microbiota intestinal nos equinos ainda é limitado se baseando em apenas alguns estudos (Daly et al., 2001; Ransom-Jones et al., 2012; Dicks et al., 2014; Harlow et al., 2016; Kristoffersen et al., 2016; Quercia et al., 2019).

Várias doenças, incluindo distúrbios cardiovasculares (Yoshida et al., 2018), doença inflamatória intestinal (Frank et al., 2007), diabetes (Zheng et al., 2018), artrite reumatóide (Scher e Abramson, 2011), depressão (Zalar et al., 2018) e progressão do câncer (Gopalakrishnan et al., 2018) têm sido associadas a mudanças na microbiota intestinal de humanos nos últimos anos. Alterações na composição microbiana de intestino de cavalos foram investigadas de forma semelhante com relação ao seu impacto em certas doenças, como colite e laminite (Milinovich et al., 2008; Costa et al., 2012). Além disso, os efeitos de diferentes dietas foram estudados em cavalos idosos e em treinamento (Dougal et al., 2014). Nos anos seguintes, mapas do microbioma equino (Costa et al., 2015; Ericsson et al., 2016) e o impacto de probióticos, como *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*, foram explorados (Schoster et al., 2014), além do uso de antimicrobianos e anestésicos na conformação da microbiota intestinal (Costa et al., 2015). Recentemente, foram realizadas tentativas em desvendar a composição do core microbiano do intestino grosso dos cavalos, que julgam espelhar os componentes bacterianos estáveis e consistentes, incluindo microrganismos-chave e suas funções (Costa et al., 2015; O'Donnell et al., 2017).

Para a interpretação sobre composição da microbiota intestinal, é necessário o entendimento das diferentes tecnologias atualmente usadas para geração e exploração de dados. Até recentemente, a identificação de

microrganismos do intestino era realizada por métodos dependentes de cultura, limitando os resultados apenas à espécies cultiváveis (Panek et al., 2018). Esses métodos, no entanto, vem sendo substituídos e/ou complementados por novas abordagens abrangentes como “Cultorômica”, uma técnica que inclui múltiplas condições de crescimento para uma amostra original subdividida. E, em combinação com métodos de identificação rápida de bactérias, é possível obter uma visão geral dos componentes microbianos cultiváveis, sendo que espécies até agora não identificadas podem ser geradas e atribuídas pelo uso adicional de sequenciamento do gene 16S rRNA (Larsen et al., 2010). No geral, as abordagens de sequenciamento de alto rendimento são atualmente as técnicas predominantes para investigar microbiotas, tanto em pesquisas clínicas quanto em ciências ambientais (Reuter et al., 2015; Lewis et al., 2019). Os desenvolvimentos recentes nas tecnologias de sequenciamento de DNA, também conhecidas como sequenciamento de próxima geração (NGS), permitem estudar amostras biológicas complexas com base em informações de sequência em grande escala (Quince et al., 2017), uma vez que o NGS fornece custo-efetividade, resolução suficiente e profundidade de sequenciamento (Panek et al., 2018). Em geral, o DNA é purificado das amostras e o seu sequenciamento é, então, usado para caracterizar os táxons associados, empregando um gene marcador, como o gene 16S rRNA para bactérias, o gene 18S rRNA para eucariotos ou um espaçador transcrito interno (ITS) de DNA presente entre genes de rRNA para fungos (Quince et al., 2017).

O método de utilização do NGS por meio do gene 16S rRNA baseia-se nas nove regiões hipervariáveis que ele apresenta (Neefs et al, 1993). Portanto, os primers são usados para definir as sequências resultantes cobrindo essas regiões que, então, diferem em quantidade e composição de base nucleotídica por amostra de sequência. Por meio da similaridade de sequência de nucleotídeos em bancos de dados de sequências já disponíveis, como Greengenes (DeSantis et al., 2006) e Silva (Quast et al., 2013), essas sequências são agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU; Cao et al., 2017). Atualmente, um amplo painel de ferramentas bioinformáticas projetadas para análise de dados de sequenciamento estão disponíveis, sendo o QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology; Caporaso et al., 2010), Mothur (Schloss et al., 2009) e USEAR (Ultra-fast Sequence Analysis; Edgar,

2010), os mais utilizados para analisar dados baseados no gene 16S rRNA (Cao et al., 2017). Essas ferramentas atribuem as sequências à níveis taxonômicos específicos com base no agrupamento de OTUs em diferentes limiares de identidade de sequência. A tecnologia de NGS tem apresentado grande progresso nos últimos anos, mas ainda existem questões técnicas a serem melhoradas, principalmente relacionadas à necessidade de bancos de dados continuamente atualizados, ferramentas específicas de bioinformática, e correlações funcionais (D'Argenio, 2018).

Um dos objetivos mais importantes das pesquisas de microbioma é explorar e descrever as diferenças nas abundâncias relativas da microbiota induzidas por mudanças ambientais. Como as abundâncias geradas pela tecnologia NGS são semiquantitativas por definição, as dinâmicas observadas podem não refletir com precisão as densidades reais dos táxons (Props et al., 2017). Para medir e analisar a variação e composição das comunidades microbianas, foram implementados índices que descrevem a diversidade. Em 1960, a diversidade alfa e beta foram definidas, onde a diversidade alfa permite estimar o número de espécies (riqueza) e a distribuição (igualdade) dentro de uma amostra particular, enquanto uma medida de diversidade beta age como uma similaridade entre populações de amostras diferentes. Entre os índices de diversidade mais comumente usados estão o índice de Simpson (Simpson, 1949), a “coverage” (cobertura) (Good, 1953), o estimador de riqueza Chao1 (Chao, 1984), o índice de Shannon (Ludwig e Reynolds, 1988) e as OTUs compartilhadas (“Shared OTUs”; Lindgreen et al., 2016).

Considerando os dados disponíveis sobre a composição das comunidades microbianas intestinais de diferentes espécies animais, o conhecimento atual expõe um microbioma gastrointestinal de acordo com as diferenças em sua microbiota para todos os carnívoros, herbívoros e onívoros (Ley et al., 2008). Por exemplo, a alimentação à base de proteína animal resulta em aumento do número de Firmicutes, enquanto as dietas à base de forragens resultam em mais fibras, aumentando o número de Bacteroidetes (Dougal et al., 2014). Estudos recentes revelaram ecossistemas distintos para cada compartimento do intestino equino, com mais semelhanças quanto à composição da microbiota em compartimentos vizinhos do que entre os mais distantes (Costa et al., 2015). O trato gastrintestinal (TGI) anterior (estômago,

jejuno e íleo) dos cavalos apresenta uma microbiota mais variável, devido a um alto rendimento de bactérias ambientais presentes na forragem. Além disso, membros das α -Proteobacteria, como *Methylobacterium* sp., *Rhizobium* sp. e *Sphingomonas* sp. são comumente abundantes nestas regiões (Ericsson et al., 2016). Em contraste, a composição da microbiota residente no TGI posterior (ceco e cólon) parece notavelmente estável, sendo Firmicutes, Bacteroidetes e Verrucomicrobia os filos predominantes, apesar de fatores como histórico individual, raça ou idade estarem envolvidos (Shepherd et al., 2012; Dougal et al., 2014; Costa et al., 2015; Zhao et al., 2016; Stewart et al., 2018).

Os cavalos têm um trato intestinal sensível, no qual mudanças significativas da sua composição microbiana podem ser influenciadas pelo exercício (Almeida et al., 2016), transporte, jejum (Schoster et al., 2016), antimicrobianos (Barr et al., 2013; Liepman et al., 2022), probióticos (Schoster et al., 2016; Lucassen et al., 2022) e dieta (Costa e Weese, 2012), sendo esta última o fator mais impactante para as alterações da microbiota. Uma dieta adequada e balanceada é essencial para a saúde dos equinos, e uma alimentação mal manejada altera a diversidade microbiana, podendo induzir disbiose (Costa e Weese, 2012; Warzecha et al., 2017).

Carboidratos da parede celular (celulose, hemiceluloses e pectinas) representam 35 a 60% de dietas comuns para equinos. Já os carboidratos solúveis (amido) representam 10-40% da fração diária (NRC, 2007). Apesar de uma maior fração, os carboidratos da parede celular são resistentes às enzimas hidrolíticas, podendo apenas serem quebrados por enzimas microbianas no intestino grosso, onde encontram um ambiente propício, com condições físico-químicas ideais para o crescimento de microrganismos e atividade fermentativa. Por outro lado, o amido não pode ser totalmente digerido no intestino delgado, devido à estrutura de seus grânulos e à capacidade limitada de enzimas como amilase e frutanasase, sendo, em parte, fermentado por bactérias no intestino grosso. A degradação de carboidratos envolve duas etapas: a hidrólise de polissacarídeos complexos e a fermentação dos açúcares simples (Julliard e Grimm, 2017).

A primeira etapa do processo de degradação dos polissacarídeos complexos consiste na ligação de microorganismos na parede celular vegetal. Essa adesão direciona as enzimas para os substratos, garantindo a hidrólise dos

polissacarídeos em açúcares simples (celobiose, glicose, xilose). Enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal e do amido se originam, principalmente, de bactérias ligadas à partículas tanto no ceco quanto no cólon dos equinos (Jouany et al., 2009). Espécies fúngicas do gênero *Piromyces* e espécies bacterianas dos gêneros *Ruminococcus* e *Fibrobacter* foram identificados como os principais microrganismos fibrolíticos responsáveis pela degradação da parede celular vegetal. Já as principais bactérias amilolíticas (degradadoras de amido) identificadas foram os gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*, dos quais algumas cepas foram isoladas: *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *Lactobacillus salivarius* e *L. mucosae*. Essas espécies fibrolíticas e amilolíticas fermentam os açúcares simples formados, sendo que os produtos finais são os ácidos graxos voláteis (AGV), lactato e gases (CO₂ e CH₄; Maczulak et al., 1985; Al Jassim et al., 2005).

O principal produto final medido após a fermentação da celobiose pelas quatro cepas cecais de *Ruminococcus* sp. isoladas por Julliard et al. (1999) foi acetato, enquanto nenhum lactato foi encontrado. O acetato é o AGV dominante no líquido cecal ou colônico, representando 74% do total, seguido por 17% de propionato, 6% de butirato e 3-4% de outros AGV (isobutirato, valerato e isovalerato; Geor, 2013). Por outro lado, o lactato foi o produto final a partir da fermentação das bactérias amilolíticas, também conhecidas como bactérias-produtoras de ácido láctico (Maczulak et al., 1985; Baruc et al., 1983). Além disso, o lactato é o substrato para bactérias-utilizadoras de lactato, que são capazes de convertê-lo em ácidos graxos voláteis, principalmente propionato. As principais bactérias que utilizam lactato pertencem à família Veillonellaceae (gêneros *Megasphaera elsdenii* e *Veillonella alcalescens*; Alexander e Davies, 1963). A atividade de microrganismos fibrolíticos induz altos níveis de acetato e em menor quantidade de butirato, enquanto a atividade de microrganismos amilolíticos induz grande aumento de propionato (Sauvant et al., 1994).

Os equinos, evolutivamente, são adaptados para o pastejo, ingerindo de forma contínua pequenas quantidades de volumoso (Archer e Proudman, 2006; Proudman et al., 2015). No entanto, com a domesticação, a inserção de novos alimentos na dieta, como carboidratos solúveis, se tornou prática comum na criação intensiva de cavalos, gerando problemas gastrintestinais e alterações na microbiota (Van den Berg et al., 2013). De acordo com Metcalf et al. (2017),

indivíduos de vida livre mostraram composição microbiana mais diversa comparada aos animais domesticados, devido à interferência nas estruturas sociais, como relacionamentos interindividuais, ambientes compartilhados e alimentação. Esses autores observaram menor diversidade na microbiota fecal de cavalos domesticados quando comparados aos de vida livre, vivendo na mesma área e com dietas forrageiras semelhantes. Portanto, para diminuir essas alterações microbianas e possíveis distúrbios intestinais, estudos afirmam que a quantidade de amido na dieta não deve exceder 2,0g/kg de peso corporal/dia (Julliard et al., 2006; Ker, 2011) acrescida da ingestão de forragem (Julliard e Grimm, 2017). Além disso, o seu fracionamento na dieta estabiliza o crescimento de cepas bacterianas relativas ao gênero *Streptococcus* sp., ao contrário da sua oferta uma vez ao dia a longo prazo, que modifica a população deste gênero e aumenta os riscos de distúrbios digestivos com repercussões metabólicas (Venable et al., 2017). Isso ocorre devido ao excesso de amido que chega ao intestino grosso, sendo fermentado e produzindo alta concentração de ácido láctico (Richards et al., 2006). Como resultado, o pH de 6,2-6,8 neste compartimento pode ser reduzido para menos de 5,0, criando condições indesejáveis para a proliferação de bactérias fibrolíticas benéficas intolerantes a ácidos, o que pode representar fator de risco para a saúde digestiva (Coenen e Vervuert, 2010). Warzecha et al. (2017) relataram maior abundância de membros das famílias Prevotellaceae, Veillonellaceae, Lactobacillaceae e Streptococcaceae, no ceco do cavalos alimentados com dieta rica em amido em comparação com aqueles alimentados com uma dieta pobre em amido, enquanto nestes, diminuição em Ruminococcaceae e *Fibrobacter* sp. foi observada.

Destrez et al. (2015) demonstraram que dietas ricas em amido além de induzirem mudanças na microbiota intestinal com consequências metabólicas, mas também alterações comportamentais, como estresse alimentar. Da mesma forma, Bulmer et al. (2019) estabeleceram correlação entre as alterações microbianas fecais induzidas pela dieta rica em amido e reatividade comportamental em pôneis. Em pesquisas relacionadas a humanos foi demonstrado que os microrganismos do TGI modulam o comportamento alimentar do hospedeiro (Alcock et al., 2014; Clarke et al., 2014). Por exemplo, bactérias que apresentam afinidade por certos substratos, como Prevotella aos

carboidratos solúveis, desenvolveram estratégias para manipular o comportamento do hospedeiro através de desejos e disforia até o substrato desejado ser consumido. Os possíveis mecanismos para manipular o comportamento do hospedeiro incluem a produção de neuroquímicos semelhantes a hormônios que alteram o estado emocional, alterando os receptores gustativos e sequestrando neurotransmissores do nervo vago (Alcock et al., 2014; O'Callaghan et al., 2016). Portanto, alterações comportamentais podem ser potencialmente usadas para prever e prevenir distúrbios intestinais causados pelo manejo nutricional em cavalos (Destrez et al., 2015).

Nas condições de uma ingestão excessiva de carboidrato solúvel, como amido, o órgão sede (intestino), ao sofrer a agressão da queda de pH sobre as mucosas e a microbiota fibrolítica, absorve os componentes da parede dessa microbiota lisada (LPS, ácido lipoprotéico) que ao entrarem em contato com os padrões moleculares associados a danos (DAMP), estimulam células inflamatórias, endoteliais e plaquetas, iniciando uma resposta inflamatória local. Entretanto, ao atingir a circulação sistêmica, o LPS pode estimular respostas por diversas vias e células do hospedeiro de uma única vez, iniciando assim, uma condição de reações exacerbada que se não tratada leva a falência múltipla de órgãos. Quando os macrófagos se ligam ao LPS, liberam citocinas (interleucinas e fator tumoral alfa) na corrente sanguínea, estimulando o endotélio a expressar moléculas de adesão. Tais moléculas se aderem aos leucócitos circulantes e subsequente migram para tecidos distantes do órgão sede, onde irão causar lesão tecidual, disfunção e morte celular devido à produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e proteases (metaloproteinasas; Faleiros e Belknap, 2017). Alguns pesquisadores acreditam que esse evento acontece concomitantemente nas lâminas digitais, dando início aos danos teciduais locais o que caracterizaria a laminite inflamatória (Faleiros et al., 2011; Lima, 2012).

O emprego de modelos experimentais com mudanças dietéticas, como a exposição aguda à 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 oligofrutose (Pollitt e Van Eps, 2002), buscam respostas para a prevenção e entendimento da fisiopatologia de algumas afecções, principalmente da laminite inflamatória (Belknap, 2017). O modelo de sobrecarga de carboidrato solúvel tem sido o mais utilizado, devido à sua similaridade com a sobrecarga de grãos

comumente relacionada aos casos clínicos, e à progressão do acompanhamento das mudanças na microbiota intestinal e nas alterações hemodinâmicas sistêmicas. Este modelo consiste da administração, por via nasogástrica, de uma ração com elevado teor de amido de milho (85%) e 15% de farinha de celulose de madeira, na dose de 17,6 g/kg de peso vivo (Garner et al., 1975). Por meio dele, esses autores descreveram as bactérias intestinais do gênero *Streptococcus* spp. como os agentes prováveis na indução de resposta inflamatória da doença laminar. Além disso, o crescimento exacerbado de *Streptococcus bovis* e *S. equi*, na fase prodrômica da doença foi descrito na ingestão abrupta de oligofrutose (Mackie e Wilkins, 1988). Em um estudo mais recente, houve aumento de *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Veillonella* sp. após sobrecarga de amido de milho e de oligofrutose na microbiota cecal de cavalos, os quais apresentaram sinais clínicos da laminite (Moreau et al., 2014).

Estratégias para estabilizar o processo fermentativo, evitando-se variações importantes do pH intestinal podem evitar a ocorrência de complicações decorrentes de erros alimentares. Em bovinos, o principal método de controle da acidose ruminal emprega substâncias alcalinizantes, visando ao tamponamento do conteúdo ruminal e impedindo o agravamento do quadro (Radostits et al., 2002). As principais substâncias alcalinizantes utilizadas na veterinária são o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e hidróxidos de magnésio/alumínio ($\text{Mg}(\text{OH})_2/\text{Al}(\text{OH})_3$).

O NaHCO_3 é usado há muito tempo em cavalos para a correção da acidose metabólica. Tem sido usado com segurança em até uma dose de 1,5 g/kg de peso, por via enteral, resultando em aumento significativo no pH do sangue e concentração de bicarbonato uma hora após a administração (Riva et al., 1997). Além disso, também foi observado aumento no pH cecal de cavalos entre 6 e 12 horas após administração oral de NaHCO_3 , concluindo que a administração de bicarbonato oral pode ser benéfica para o tamponamento de acidose cecal (Taylor et al., 2014). De fato, os principais sistemas-tampão que operam no intestino grosso de equinos e que podem influenciar o pH são os tampões bicarbonato (HCO_3) e fosfato (PO_4). O HCO_3 é secretado no duodeno pelo pâncreas, no íleo e em menor quantidade no intestino grosso. Além deste, o PO_4 , resultante do metabolismo da dieta também pode contribuir para a neutralização do conteúdo intestinal em equinos. O PO_4 é fracamente absorvido

pelo intestino. Portanto, à medida que a dieta é progressivamente absorvida, sua concentração aumenta nos conteúdos do lúmen (Argenzio, 1996).

Já o $Mg(OH)_2/Al(OH)_3$ são bases fracas que neutralizam íons hidrogênio de ácidos orgânicos normalmente presentes nos componentes alimentares ou produzidos durante a digestão e metabolismo dos nutrientes e por isso, são amplamente utilizados na manutenção do pH. O $Mg(OH)_2$ é pouco solúvel em água, sendo que sua suspensão oral, o leite de magnésia, é empregado como antiácido estomacal por neutralizar o excesso de ácido clorídrico no suco gástrico. O $Al(OH)_3$ é muito usado em medicamentos antiácidos estomacais também por suas características tamponante e antiácida (Staple e Lough, 1989). Em equinos, a utilização de antiácidos compostos por $Mg(OH)_2$ e o $Al(OH)_3$ auxilia no aumento do pH gástrico de animais adultos (Murray e Grodinsky, 1992; Clark et al., 1996) e constituem alternativa terapêutica nos casos de úlcera gástrica em neonatos (Lewis, 2003), sendo também indicados no tratamento de compactações do trato gastrintestinal dessa espécie (White e Dabareiner, 1997). De fato, Souza (2007) trabalhou com animais submetidos a indução experimental de laminite por sobrecarga de carboidrato solúvel, e observou queda menos acentuada do pH cecal em cavalos submetidos ao hidróxido de magnésio e alumínio. No entanto, o uso de sais de Mg está relacionado com o desenvolvimento de diarreias em função de seu efeito cartático, sendo frequentemente utilizados como purgantes salinos (Hintz e Schryver, 1972), já que o magnésio é absorvido no intestino delgado e aumenta o influxo de água para dentro do lúmen intestinal (Freeman et al., 1992). Normalmente, apenas 20% do magnésio é sistemicamente absorvido e eliminado pelos rins. Portanto, se a absorção é excessiva ou a eliminação renal é prejudicada, grave hipermagnesemia e alcalose metabólica pode se desenvolver (Schryver et al., 1987; Hintz e Cymbaluk, 1994). Apesar desses sais causarem diarreia, os sais de alumínio causam constipação, razão pela qual podem ser usados em associação para preservação da função intestinal normal (Colin-Jones, 1990).

Embora pesquisas envolvendo microbioma intestinal sejam consideradas uma ciência emergente, ainda existem muitas áreas a serem exploradas, mesmo o campo progredindo rapidamente. Atualmente, o objetivo mais importante é obter compreensão das complexas relações entre a microbiota intestinal, bem-estar e saúde.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a microbiota cecal de cavalos após a sobrecarga dietética com amido de milho na presença ou não de solução alcalinizante ($Mg(OH)_2$ + $Al(OH)_3$) intracecal.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar as alterações clínicas e da microbiota cecal de cavalos após sobrecarga dietética com amido de milho.

Avaliar os efeitos da solução alcalinizante ($Mg(OH)_2$ + $Al(OH)_3$), administrada por via intracecal, associada à sobrecarga de amido de milho, na microbiota cecal e na condição clínica de cavalos.

Associar as alterações da microbiota cecal com as alterações clínicas de cavalos submetidos à sobrecarga de amido de milho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais, Manejo e Procedimentos

O ensaio foi realizado no setor de Equinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, campus Jaboticabal, São Paulo. Utilizaram-se 10 equinos (quatro machos castrados e seis fêmeas) mestiços com idade média de $13 \pm 5,6$ anos, e peso médio de 353 ± 28 kg. Foram realizados desverminação (Eqvalan®; Boehringer Ingelheim Saúde Animal, Paulínia, SP), vacinação (raiva - Rabmune®; Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP) e exames clínico e laboratorial (hemograma) prévios em todos os equinos, constatando nenhuma alteração sistêmica ou digestiva. Os animais eram 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 de 2 kg de ração comercial (Selvagem®; Agromix, Jaboticabal, SP), distribuídos em duas porções de 1,0 kg/dia, e 4,0 kg em feno *Coast cross* (*Cynodon dactylon*), uma vez ao dia, disponibilizados nas redes próprias para feno, penduradas em ganchos nas baias.

Quarenta e três dias antes da fase experimental, todos os animais foram submetidos à tiflopectomia (fixação do ceco na parede abdominal) na região paracostal direita (Uribe Diaz et al., 2010) após jejum alimentar de 12 horas. Os equinos foram mantidos em apoio quadrupedal, sendo tranquilizados com 0,05 mg/kg de acepromazina (Acepran 1%®; E.H.G. Agrofarma, Mogi Mirim, SP), e, decorridos 15 minutos, sedados com 0,5 mg/kg de xilazina (Coopazine®; Schering-Plough S.A., Cotia, SP), ambos administrados por via intravenosa. Subsequentemente, foi realizada a tricotomia seguida da antisepsia da pele, na fossa paracostal direita, e anestesia local infiltrativa pela técnica de “L” invertido com administração de lidocaína (Xilestesin 2%® [sem vasoconstritor]; Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP), infiltrando pele, subcutâneo e planos musculares. A primeira linha de infiltração anestésica (10cm) foi aplicada 3cm abaixo dos processos transversos das vértebras lombares, paralela ao eixo da coluna vertebral. E a segunda linha de infiltração (10cm) foi realizada paralelamente a 2cm da última costela. Em seguida, o campo operatório foi preparado com panos fenestrados sobre a região. Após 15-20 minutos, a incisão foi realizada (8cm) a uma distância intermediária entre a tuberosidade ilíaca e a última costela, ventralmente ao músculo longo dorsal, incisionando a pele, o subcutâneo, a musculatura (músculos oblíquos abdominais externo e interno, e transversos abdominais) e o peritônio. Na sequência, introduziu-se a mão na cavidade abdominal, identificou-se o corpo do ceco por palpação e, mediante tração da tênia lateral, o órgão foi exteriorizado. A tênia lateral do ceco, então, foi fixada à base caudal da incisão, no subcutâneo ancorado na fáscia dorsal do músculo oblíquo abdominal externo, por meio de sutura simples contínua com catgut cromado nº2. Em seguida, a porção anterior à tênia lateral do ceco foi fixada, nas mesmas condições da tênia lateral, à borda cranial da incisão. Por fim, realizou-se a dermorráfia com sutura simples separada utilizando fio de náilon nº45 monofilamentar agulhado. No pós-operatório foram utilizadas solução de cloreto de sódio 0,9% e repelente para limpeza da ferida cirúrgica, uma vez ao dia, durante 10 dias, seguida da retirada dos pontos de sutura.

Decorridos 21 dias da tiflopectomia, os animais foram submetidos à cateterização cecal. Após oito horas de jejum alimentar, realizou-se sedação dos equinos com 0,5 mg/kg de xilazina (Coopazine®; Schering-Plough S.A., Cotia,

SP) por via intravenosa, mantendo-os em apoio quadrupedal. O centro da fossa paracostal direita, onde se encontrava a linha de incisão para tifloplexia, foi submetida à tricotomia, antissepia, e, posteriormente, anestesia local infiltrativa com lidocaína (Xilestesin 2%® [sem vasoconstritor]; Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP). A infiltração (3cm) foi realizada sob a linha de incisão pré-existente já cicatrizada. Em seguida, preparou-se a região com panos fenestrados. Decorridos 15 minutos, realizou-se uma incisão (2-3cm) sob o local anestesiado, por sobre a pele e a parede do ceco, fixado previamente, para introdução da sonda de Levine nº18. A sonda foi fixada à pele por meio de sutura bailarina com fio de náilon nº0,60 monofilamentar agulhado. O pós-operatório foi semelhante ao da tifloplexia, e, após sete dias, foi feita a retirada dos pontos de sutura.

Finalizados os procedimentos pós-cirúrgicos, os animais permaneceram nas suas respectivas baias, no entanto sem acesso ao piquete. A dieta foi padronizada nas mesmas proporções anteriormente mencionadas, sendo o fornecimento de feno aumentado para duas vezes ao dia, totalizando 8 kg/dia. Decorridos 15 dias desse novo manejo, deu-se início ao experimento.

4.2. Delineamento, Avaliações Experimentais e Coleta Amostral

Os animais foram distribuídos ao acaso em dois grupos (I e II) com cinco cavalos cada, e cada grupo foi submetido a dois tratamentos diferentes.

Os cinco animais do grupo I foram submetidos, inicialmente, ao tratamento água-salina (AgS), no qual, em T0 (tempo basal), eram administrados 10L de água por sonda nasogástrica e, após oito horas (T8), cinco litros de solução de cloreto de sódio 0,9% por via intracecal pela sonda de Levine. Em conjunto, os cinco equinos pertencentes ao grupo II foram submetidos ao tratamento amido-salina (AS) que constava, em T0, na administração, por sonda nasogástrica, de sobrecarga de amido de milho (17,6 g/kg de peso vivo; Maisena Duryea®; Indústria Unilever Brasil, Garanhuns, PE) diluída em água (10L) e, após oito horas (T8), cinco litros de solução de cloreto de sódio 0,9% por via intracecal. Nos tempos (T0 e T8) e em mais três tempos subsequentes à administração por sonda nasogástrica (T24 – 24 horas após; T48 – 48 horas após; T72 – 72 horas após) foram realizadas avaliações experimentais e coletas de amostras do conteúdo cecal.

Quinze dias após o último tempo experimental (T72), os mesmos animais do grupo I foram submetidos às mesmas condições experimentais, com o tratamento amido-tampão (AT) que constava na administração em T0, por sonda nasogástrica, de sobrecarga de amido de milho (17,6 g/kg de peso vivo; Maisena Duryea®; Indústria Unilever Brasil, Garanhuns, PE) diluída em água (10L) e, após oito horas (T8), por via intracecal, administrava-se solução tampão (3,5 g de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e 65,6 g de hidróxido de magnésio (Mg(OH)₂) diluída em cinco litros de solução de cloreto de sódio 0,9%. Neste período, os mesmo equinos do grupo II foram tratados com o tratamento água-tampão (AgT), no qual 10L de água foram administradas por sonda nasogástrica em T0, e, após 8 horas (T8), solução tampão (3,5 g de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e 65,6 g de hidróxido de magnésio (Mg(OH)₂) diluída em cinco litros de solução de cloreto de sódio 0,9% foi administrada por via intracecal.

As avaliações clínicas nos cinco intervalos de tempo (T0, T8, T24, T48, T72) foram realizadas às cegas, sendo executadas antes do início dos tratamentos e coletas das amostras. As avaliações foram baseadas no exame físico, seguindo os parâmetros para espécie (Feitosa, 2008), por meio de mensurações da frequência cardíaca utilizando-se estetoscópio, da temperatura retal com termômetro digital, do grau de desidratação observando-se o tempo de perfusão capilar (TPC) e a umidade da mucosa oral (úmida, pegajosa, seca), dos sinais de claudicação utilizando-se da escala de grau de Obel (Obel, 1948) e um espaço de seis metros pré-estabelecido para observação do número de passos, e dos sinais de dor abdominal (muita dor, pouca dor, ausência de dor). Além disso, foram avaliadas a ingestão de alimento (normorexia, anorexia), e a consistência das fezes produzidas (normal, pastosa; Tabela 1).

Após as avaliações clínicas em cada intervalo de tempo (T0, T8, T24, T48, T72), as amostras de conteúdo cecal foram obtidas por meio de uma seringa de 60mL acoplada na sonda de Levine, sendo coletados no mínimo 20mL. O conteúdo era colocado em tubos de Falcon estéreis e armazenado à -18° C até o processamento de dados.

Cavalos com grau 2 ou mais de Obel foram tratados imediatamente após a avaliação e coleta amostral do tempo T72 com 2-4 mg/kg de fenilbutazona (Equipalazone®; Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP) por via intravenosa, duas vezes por dia durante cinco dias, sendo, então, administrado via oral, 1g

de sachê do mesmo anti-inflamatório, uma vez por dia durante 10 dias; protetor gástrico manipulado (omeprazol) por via oral, uma vez por dia durante 21 dias, e crioterapia nas primeiras 72 horas pós-experimento.

Tabela 1. Parâmetros avaliados nos cinco intervalos de tempo (T0-T72) baseados no exame físico, na ingestão de água e alimento, e na consistência da produção de fezes dos cavalos submetidos aos tratamentos experimentais.

Exame Físico	
Frequência Cardíaca	<p>20-45 bpm = normalidade</p> <p>>45 bpm = taquicardia</p> <p><20 bpm = bradcardia</p>
Temperatura Retal	<p>37,2-38,5°C = normalidade</p> <p><37,2°C = hipotermia</p> <p>>38,5°C = hipertermia (febre)</p>
Tempo de Preenchimento Capilar (TPC)	<p><2s = normalidade (hidratado)</p> <p>2s = desidratação 5-8%</p> <p>>2s = desidratação >8%</p>
Mucosa Oral	<p>U = mucosa brilhante (hidratado)</p> <p>PU = mucosa pegajosa (desidratação 5-8%)</p> <p>AU = mucosa seca (desidratação >8%)</p>
Claudicação (grau de Obel; Obel, 1948)	<p>0 = O equino não apresenta alteração locomotora.</p> <p>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.</p> <p>2 = O equino movimenta-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.</p> <p>3 = O equino reluta em locomover-se e reage, não permitindo qualquer tentativa de erguer um de seus membros torácicos.</p>

	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.
Dor Abdominal	- = normalidade + = animal se apresenta cavando o chão com membros anteriores, olhando para a região das fossas paralombares (direita ou esquerda), andando constantemente dentro da baia ++ = animal se apresenta escoceando a região abdominal com membros posteriores, deitando e rolando no chão, mantendo-se em posição de cavalete (abertura dos quatros membros)
Ingestão de Alimento	
Inapetência	NE = ingestão normal de alimento (cocho de ração sem alimento e redes de feno sem feno ou em baixa quantidade) A = ausência de ingestão de alimento (cocho de ração com alimento e redes de feno cheias)
Produção de Fezes	
Consistência	N = formato de cíbalas (padrão da espécie) P = pastosa (sem formato de cíbalas)

4.3. Processamento de Dados

Todos os processamentos foram realizados no Laboratório Multiusuário de Sequenciamento do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, campus Jaboticabal. Antes de realizá-los, as amostras foram descongeladas, permanecendo à temperatura de 4° C, por 24 horas (Stewart et al., 2018).

4.3.1. Extração e Análises do DNA Metagenômico

As 100 amostras de conteúdo cecal tiveram seu DNA extraído, utilizando o kit de isolamento de DNA PowerLyzer® PowerSoil® (Quiagen, Solana Beach, CA), 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; Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 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 Fisher Scientific, MA, USA) 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 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) com o kit Qubit™ DNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.3.2. 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'-

GTGCCAGCMGCCGCGCTAA-3') e 926R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'; Caporaso et al., 2011). As PCR foram feitas em um volume total de 25 μ L, contendo 8 μ L de KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) PCR kit (Kapa Biosystems, Boston, USA), 1 μ L de cada iniciador (10 μ M), 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 μ g/mL; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) submetido à eletroforese horizontal, utilizando-se um transiluminador ultravioleta e submetido à análise e foto documentação no Dual LED Blue/White Light Transilluminator – KASVI.

4.3.3. Purificação e Sequenciamento das regiões V4-V5 do gene 16S rRNA

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® (Integrated DNA Technologies, NC, USA) 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.

4.4. Análises de Bioinformática e Estatística

Os dados foram submetidos à análise bioinformática usando a ferramenta Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME), versão 1.9.1 (Caporaso et al., 2011). Sequências menores que 200pb e aquelas detectadas com quimeras foram eliminadas. O Ribosomal Database Project II (Cole et al., 2014) foi usado para alinhar sequências de alta qualidade, obter a designação taxonômica e a abundância relativa de diferentes grupos bacterianos. Os alinhamentos resultantes foram usados para calcular a matriz de distância e grupos de sequências nas Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) providas pelo QIIME. Por meio da análise estatística Kruskal-Wallis foi avaliado as diferenças na alfa-diversidade (riqueza e diversidade Shannon) das amostras para cada tratamento usando a ferramenta MicrobiomeAnalyst (Dhariwal et al., 2017). Para

avaliar as diferenças na estrutura de comunidades (beta-diversidade) entre tratamentos e entre tempos de coleta comparando as amostras, matrizes de distância UniFrac ponderada foram calculadas e visualizadas com gráficos de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A análise discriminante linear (LDA) combinada com o algoritmo de tamanho de efeito (LefSe) foi utilizada para identificar diferenças taxonômicas a nível de gênero, utilizando os seguintes critérios: *a*) Nível taxonômico: gênero; *b*) Fator experimental: Tratamentos (AgS e AT); *c*) Log LDA score: >2.

Para as análises estatísticas, o PROC MIXED (SAS Inst. Inc. Cary, NC) foi utilizado para realização da Análise de Variância (ANOVA) a fim de comparar as interações entre os tratamentos (AgS, AgT, AS, AT) e tempos experimentais (T0, T8, T24, T48, T72). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de $p < 0,05$ para todas as análises.

5. RESULTADOS

5.1. Alterações Clínicas

Todos os animais foram avaliados clinicamente da mesma maneira para cada tempo experimental (T0, T8, T24, T48, T72), antes das coletas de conteúdo cecal. Nos tratamentos água-salina (AgS) e água-tampão (AgT), os animais não apresentaram alterações comportamentais e nem sistêmicas. Por outro lado, todos os equinos (100%) presentes nos tratamentos amido-tampão (AT) e amido-salina (AS) apresentaram taquicardia a partir de oito horas em AS e de 24 horas em AT, respectivamente, após a sobrecarga de amido. Quatro animais (80%) do tratamento AT apresentaram hipertermia a partir de T8 e T24 (Tabela 2).

Além das alterações cardíaca e de temperatura, as fezes pastosas foram um dos principais sinais gastrointestinais observado em todos os animais (100%) do tratamento AT a partir de 24 horas e normalizando a partir de 48 horas após a sobrecarga (Figura 1). No tratamento AS, a produção de fezes pastosas ocorreu em todos os equinos (100%) somente em T24, cessando nesse mesmo período de tempo. Ademais, os sinais de desconforto abdominal (dor), desidratação e falta de apetite (inapetência) também, e somente, foram observadas nos animais do tratamento AT, sendo que três cavalos (60%)

demonstraram dor abdominal em T8, T48 e T72. Cinco animais (100%) apresentaram 5-10% de desidratação (um em T8 e quatro a partir de T24), e também em 100% dos equinos observou-se inapetência a partir de oito e 24 horas após sobrecarga de amido de milho (Tabela 2).



Figura 1. Produção e características das fezes de equinos antes e após a sobrecarga dietética com amido de milho: (A) antes da sobrecarga (T0) – fezes em formato de cíbalas e de coloração esverdeada; (B) 24 horas após sobrecarga (T24) – fezes pastosas com coloração esbranquiçada; (C) 48/72 horas após sobrecarga (T48/T72) – fezes retornando ao formato de cíbalas e coloração esverdeada.

O número de passos no espaço de seis metros pré-estabelecidos foi normalizado em oito/nove passos por animal. Observou-se no tratamento AS que somente dois cavalos (40%) apresentaram aumento no número de passos (10 passos) em 48 horas após administração do amido. Um (50%) desses dois animais com aumento na passada, apresentou grau 3 de Obel em T72, demonstrando movimento de cabeça ao apoiar o membro torácico esquerdo no solo. Em nenhum outro equino deste tratamento foi observado grau de Obel igual ou superior a 1. Já no tratamento AT, todos os animais (100%) apresentaram aumento no número de passos, sendo um cavalo (20%) a partir de T24 e quatro (80%) a partir de T48, onde houve variação entre 10 e 14 passos. No entanto, em somente três (60%) desses cavalos foi observado algum grau de Obel, que variou de 2 a 4. Dois (67%) dos três equinos apresentando grau de Obel, alternavam os membros torácicos e pélvicos no solo, apresentando dor leve (grau 2-3). Em contrapartida, um (34%) desses três animais não conseguia se manter muito tempo em apoio quadrupedal, sendo encontrado, algumas vezes, em decúbito esternal dentro da baia (grau 4).

Tabela 2. Parâmetros avaliados (temperatura retal, frequência cardíaca, desidratação, sinais de claudicação e de desconforto abdominal, número de passos, consistência na produção de fezes, ingestão alimentar) para cada animal dos tratamentos amido-salina e amido-tampão, durante o período experimental.

Grupo II - AS						Grupo I - AT					
	T0	T8	T24	T48	T72		T0	T8	T24	T48	T72
ANIMAL 1						ANIMAL 1					
FC (bpm)	40	60	52	40	36		32	42	52	76	68
T°C	37.1	37.5	37.2	37.4	37.8		37.5	37.5	39.1	38.4	37.0
Consistência fezes	N	N	P	N	N		N	N	P	P	N
Inapetência	NE	NE	NE	A	NE		NE	NE	A	A	A
Dor abdominal	-	-	-	-	-		-	-	-	++	++
Desidratação	<2s/U	<2s/U	<2s/U	<2s/U	<2s/U		<2s/U	<2s/U	>2s/AU	>2s/AU	2s/PU
N° passos	9	9	9	10	9		8	8	8	11	12
Grau Obel	0	0	0	0	0		0	0	0	2	4
ANIMAL 2						ANIMAL 2					
FC (bpm)	36	56	40	44	80		36	44	48	80	68
T°C	37.1	37.9	37.1	38.4	38.5		37.4	38.7	38.0	38.6	39.3
Consistência fezes	N	N	P	N	N		N	N	P	P	N
Inapetência	NE	NE	NE	NE	NE		NE	NE	A	A	NE
Dor abdominal	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
Desidratação	<2s/U	<2s/U	<2s/U	<2s/U	<2s/U		<2s/U	<2s/U	>2s/AU	>2s/AU	<2s/U
N° passos	8	8	8	10	9		8	9	10	14	12
Grau Obel	0	0	0	0	3		0	0	0	2	3
ANIMAL 3						ANIMAL 3					
FC (bpm)	40	56	56	52	64		50	50	60	60	44
T°C	37.4	37.6	38.0	37.6	37.3		37.9	38.4	38.7	38.2	36.7
Consistência fezes	N	N	P	N	N		N	N	P	N	N
Inapetência	NE	NE	NE	NE	NE		NE	A	A	A	NE
Dor abdominal	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
Desidratação	<2s/U	<2s/U	<2s/U	<2s/U	<2s/U		<2s/U	<2s/U	2s/PU	<2s/U	<2s/U
N° passos	8	8	8	8	8		9	9	9	12	10
Grau Obel	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
ANIMAL 4						ANIMAL 4					
FC (bpm)	44	60	56	60	64		46	42	58	88	72

T°C	37.4	37.6	37.4	37.7	37.5	37.4	37.4	37.9	37.8	37.2
Consistência fezes	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N
Inapetência	NE	NE	NE	NE	NE	NE	A	A	A	A
Dor abdominal	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++
Desidratação	<2s/U	<2s/U	2s/PU	<2s/U	<2s/U	<2s/U	<2s/U	2s/PU	2s/PU	>2s/AU
Nº passos	8	8	8	8	8	8	9	9	12	10
Grau Obel	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
ANIMAL 5						ANIMAL 5				
FC (bpm)	36	56	48	48	52	36	44	52	44	44
T°C	37.2	37.9	37.5	37.4	37.4	38.1	38.8	38.5	37.5	37.5
Consistência fezes	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N
Inapetência	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	A	NE
Dor abdominal	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Desidratação	<2s/U	<2s/U	2s/PU	<2s/U	<2s/U	<2s/U	2s/PU	2s/PU	<2s/U	<2s/U
Nº passos	9	8	8	8	9	8	8	9	10	8
Grau Obel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

AS = amido-salina; AT = amido-tampão; T0 = tempo basal; T8 = oito horas após administração por sonda nasogástrica; T24 = 24 horas após administração por sonda nasogástrica; T48 = 48 horas após administração por sonda nasogástrica; T72 = 72 horas após administração por sonda nasogástrica; FC (bpm) = frequência cardíaca (batimentos por minuto); T°C = temperatura retal C°; Nº passos = número de passos; N = formato de cibalas; P = pastosa; NE = normorexia; A = anorexia; - = ausência de dor; + = pouca dor; ++ = muita dor; s = segundos; U = úmida; PU = pouco úmida; AU = ausência de umidade

5.2. Análise e Comparações das Comunidades Bacterianas

Das 100 amostras sequenciadas, somente 97 foram analisadas. Três amostras foram excluídas devido à baixa qualidade de sequenciamento. Analisaram-se 4.559.749 sequências, utilizando-se para normalização de todas as amostras 47.393 sequências/amostra. Foram identificadas 2.290 OTUs com 97% de similaridade de sequenciamento. As sequências representativas das OTUs foram atribuídas a 17 filos, 96 famílias e 176 gêneros bacterianos conhecidos. Dos gêneros encontrados, 81,25% foram classificados quanto a gênero e o restante foi atribuído à hierarquia taxonômica na qual foram identificados.

As amostras de cecos dos animais do tratamento amido-tampão apresentaram baixo grau de riqueza ($p < 0,01$) e menor diversidade ($p < 0,001$) quando comparado aos demais tratamentos (Figura 2A). Essas diferenças na alfa-diversidade foram observadas a partir de oito horas após a sobrecarga de amido de milho (Figura 2B).

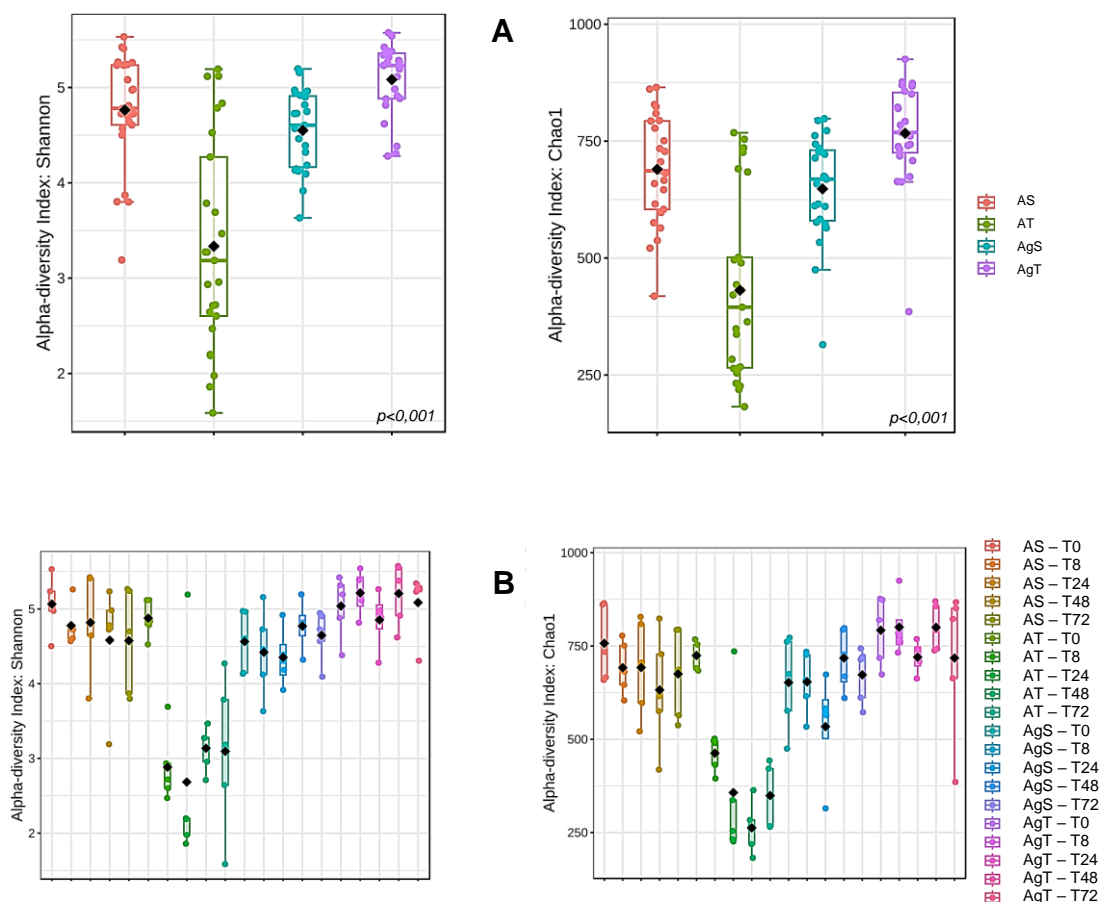


Figura 2. Gráficos box-plot da alfa-diversidade (índices Chao1 e Shannon) em nível de OTUs para os tratamentos (A) e intervalos de tempo (B) avaliados. As caixas representam o intervalo interquartil, a linha interna indica a mediana, e o diamante preto representa a média. AS = amido-salina; AT = amido-tampão; AgS = água-salina; AgT = água-tampão. T0 (tempo basal), T8 (oito horas após administração por sonda nasogástrica), T24 (24 horas após administração por sonda nasogástrica), T48 (48 horas após administração por sonda nasogástrica), T72 (72 horas após administração por sonda nasogástrica).

A similaridade entre as comunidades bacterianas (beta-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 associação amido e tampão tendem a ser diferentes dos demais tratamentos. As alterações desta microbiota baseadas no tempo de coleta foram entre T8 e T48.

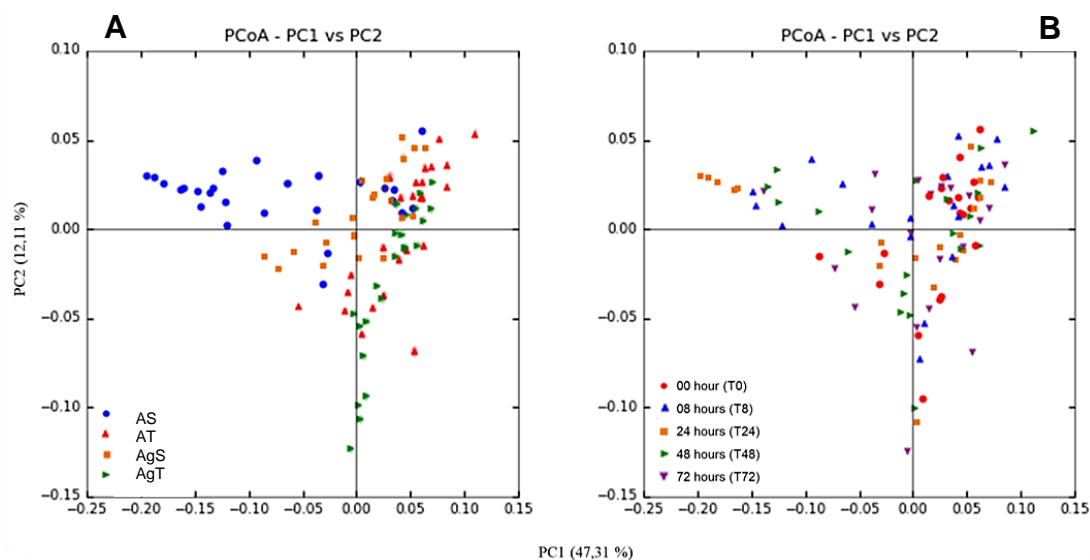


Figura 3. Gráficos de coordenadas principais da distância UniFrac ponderada para as comunidades bacterianas baseadas no tratamento (A) e no tempo de coleta (B). A distância UniFrac é uma mensuração de β -diversidade, ou a extensão da relação entre as comunidades bacterianas. As porcentagens entre parênteses nos títulos dos eixos representam 59,42% da variabilidade amostral. AT = amido-tampão; AS = amido-salina; AgT = água-tampão; AgS = água-salina.

5.3. Composição Taxonômica das Comunidades Bacterianas

As comunidades microbianas das amostras de ceco 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 nos tratamentos água-salina, água-tampão e amido-salina, e nem no momento T0 entre eles ($p > 0,05$). No entanto, o tratamento com amido e tampão

simultaneamente, quando comparados aos outros, mostrou diferenças significativas (Tabelas 3-5).

Tabela 3. Variação da abundância relativa dos filos bacterianos no conteúdo cecal de cavalos durante o período de 72 horas.

Filo	Tratamentos	Tempos					Tempo	T*T
		T0	T8	T24	T48	T72		
Firmicutes	AT	0,285 c	0,662 Ab	0,935 Aa	0,646 Ab	0,411 Ac	< ,0001	< ,0001
	AS	0,212	0,242 B	0,270 B	0,214 B	0,239 AB		
	AgS	0,343	0,309 B	0,291 B	0,284 B	0,351 AB		
	AgT	0,186	0,233 B	0,191 B	0,230 B	0,192 B		
Bacteroidetes	AT	0,058 b	0,032 b	0,001 b	0,198 Aa	0,291 Aa	0,0001	< ,0001
	AS	0,044	0,061	0,089	0,034 B	0,043 B		
	AgS	0,034	0,074	0,06	0,041 B	0,025 B		
	AgT	0,031	0,04	0,041	0,039 B	0,048 B		
Proteobacteria	AT	0,047	0,073	0,021	0,039	0,025	0,0332	0,1105
	AS	0,053 ab	0,014 a	0,019 ab	0,028 ab	0,115 b		
	AgS	0,035	0,032	0,042	0,031	0,069		
	AgT	0,08	0,054	0,063	0,061	0,09		

AT = amido-tampão; AS = amido-salina; AgS = água-salina; AgT = água-tampão. T*T = interação tratamento/tempo. T0 (tempo basal), T8 (oito horas após administração por sonda nasogástrica), T24 (24 horas após administração por sonda nasogástrica), T48 (48 horas após administração por sonda nasogástrica), T72 (72 horas após administração por sonda nasogástrica). As medias foram representadas: diferentes letras minúsculas na mesma linha, e diferentes letras maiúsculas na mesma coluna diferiram estatisticamente ($p < 0,05$; teste de Tukey).

Tabela 4. Variação da abundância relativa das famílias bacterianas no conteúdo cecal de cavalos durante o período de 72 horas.

Família	Tratamentos	Tempos					Tempo valor p	T*T
		T0	T8	T24	T48	T72		
<i>Streptococcaceae</i>	AT	0,031 c	0,413 Aab	0,458 Aa	0,237 Abd	0,154 cd	<,0001	<,0001
	AS	0,011	0,018 B	0,004 B	0,011 B	0,003		
	AgS	0,077	0,079 B	0,072 B	0,049 B	0,084		
	AgT	0,005	0,012 B	0,009 B	0,007 B	0,002		
<i>Lachnospiraceae</i>	AT	0,116 a	0,014 Bbc	0,006 b	0,071 cd	0,111 ad	0,0003	<,0001
	AS	0,084	0,102 A	0,09	0,04	0,072		
	AgS	0,127	0,122 A	0,106	0,108	0,123		
	AgT	0,073	0,088 AB	0,063	0,097	0,073		
Firmicutes <i>Ruminococcaceae</i>	AT	0,085 a	0,01 b	0,003 Bb	0,008 Bb	0,045 ab	0,1128	0,0049
	AS	0,063	0,078	0,111 Aa	0,099 Aa	0,114		
	AgS	0,065	0,056	0,067 ABa	0,089 Aa	0,091		
	AgT	0,055	0,065	0,075 Aa	0,080 ABa	0,068		
<i>Lactobacillaceae</i>	AT	0,031 d	0,413 Ab	0,458 Aa	0,237 Abc	0,154 Acd	<,0001	<,0001
	AS	0,011	0,018 B	0,004 B	0,011 B	0,003		
	AgS	0,077	0,079 B	0,072 B	0,049 B	0,084		
	AgT	0,005	0,012 B	0,009 B	0,007 B	0,002		
<i>Veillonellaceae</i>	AT	0,006 b	0,006 b	0,046 b	0,115 Aa	0,019 b	0,0031	<,0001
	AS	0,007	0,002	0,005	0,002 B	0,003		
	AgS	0,005	0,005	0,004	0,005 B	0,004		
	AgT	0,004	0,005	0,003	0,003 B	0,003		
Bacteroidetes <i>Prevotellaceae</i>	AT	0,054 ac	0,029 ab	0,001 Bb	0,007 bc	0,063 a	0,1407	0,0001
	AS	0,039	0,06	0,078 A	0,029	0,039		
	AgS	0,033	0,071	0,051 AB	0,038	0,022		

		AgT	0,027	0,033	0,033 AB	0,032	0,04		
		AT	0,001 b	0,001 b	0,001 b	0,184 Aa	0,214 Aa		
	<i>Bacteroidaceae</i>	AS	0	0	0	0 B	0 B		
		AgS	0,001	0,001	0,001	0,001 B	0 B	<,0001	<,0001
		AgT	0	0	0	0 B	0 B		
		AT	0,022 a	0,02 ab	0,001 Bab	0,001 b	0,002 Bab		
Proteobacteria	<i>Desulfovibrionaceae</i>	AS	0,012	0,006	0,007 B	0,003	0,008 AB	0,0856	0,001
		AgS	0,017	0,026	0,031 A	0,023	0,027 A		
		AgT	0,011	0,014	0,014 AB	0,008	0,005 B		

AT = amido-tampão; AS = amido-salina; AgS = água-salina; AgT = água-tampão. T*T = interação tratamento/tempo. T0 (tempo basal), T8 (oito horas após administração por sonda nasogástrica), T24 (24 horas após administração por sonda nasogástrica), T48 (48 horas após administração por sonda nasogástrica), T72 (72 após administração por sonda nasogástrica). As medias foram representadas: diferentes letras minúsculas na mesma linha, e diferentes letras maiúsculas na mesma coluna diferiram estatisticamente ($p < 0.05$; teste de Tukey).

Tabela 5. Variação da abundância relativa dos gêneros bacterianos no conteúdo cecal de cavalos durante o período de 72 horas.

Família	Gênero	Tratamentos	Tempos					Tempo valor p	T*T
			T0	T8	T24	T48	T72		
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	AT	0,031 c	0,412 Aab	0,458 Aa	0,237 Abd	0,154 cd	< ,0001	< ,0001
		AS	0,011	0,018 B	0,004 B	0,011 B	0,003		
		AgS	0,076	0,079 B	0,072 B	0,049 B	0,083		
		AgT	0,005	0,012 B	0,008 B	0,007 B	0,002		
	<i>Clostridium_XIVa</i>	AT	0,034	0,004 B	0,002 B	0,012	0,028	0,061	0,0045
		AS	0,042	0,047 A	0,05 A	0,016	0,037		
		AgS	0,037	0,029 AB	0,041 AB	0,037	0,035		
		AgT	0,038	0,047 A	0,027 AB	0,043	0,039		
Lachnospiraceae	<i>Blautia</i>	AT	0,026 Aa	0,004 b	0,001 b	0,025 ab	0,014 ab	0,0743	0,027
		AS	0,009 AB	0,016	0,012	0,006	0,007		
		AgS	0,027 AB	0,018	0,017	0,018	0,023		
		AgT	0,002 B	0,006	0,006	0,013	0,004		
	<i>Lachnospiraceae*</i>	AT	0,032 ABa	0,003 b	0,002 b	0,015 ab	0,035 a	0,0036	0,0025
		AS	0,016 AB	0,024	0,018	0,01	0,013		
		AgS	0,042 A	0,03	0,024	0,03	0,039		
		AgT	0,009 B	0,013	0,012	0,018	0,013		
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae*</i>	AT	0,056	0,006	0,002 B	0,006	0,025	0,2151	0,0069
		AS	0,041	0,054	0,084 A	0,061	0,083		
		AgS	0,039	0,036	0,044 AB	0,069	0,065		
		AgT	0,032	0,04	0,052 A	0,056	0,04		
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	AT	0,007 d	0,194 Ab	0,402 Aa	0,135 Abc	0,044 cd	< ,0001	< ,0001
		AS	0,006	0,002 B	0,012 B	0,01 B	0,005		
		AgS	0,019	0,018 B	0,01 B	0,005 B	0,012		

		AgT	0,001	0,002 B	0,003 B	0,008 B	0,004		
		AT	0,011	0,011	0,001 B	0,001	0,002		
Acidaminococcaceae	<i>Acidaminococcaceae*</i>	AS	0,016 ab	0,022 a	0,019 Aab	0,01 ab	0,008 b	0,0066	0,0413
		AgS	0,005	0,01	0,005 AB	0,01	0,007		
		AgT	0,02	0,023	0,021 A	0,018	0,02		
		AT	0,053 a	0,029 ab	0,001 Bb	0,007 ab	0,053 a		
Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	AS	0,037 ab	0,059 ab	0,076 Aa	0,026 b	0,034 ab	0,1424	0,0001
		AgS	0,031	0,057	0,048 AB	0,036	0,021		
		AgT	0,023	0,032	0,032 AB	0,031	0,039		
		AT	0,001 b	0,001 b	0,001 b	0,181 Aa	0,213 Aa		
Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	AS	0	0	0	0 B	0 B	< ,0001	< ,0001
		AgS	0,001	0,001	0,001	0,001 B	0 B		
		AgT	0	0	0	0 B	0 B		
		AT	0,022 a	0,020 ab	0,001 Bab	0,001 b	0,002 Bab		
Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	AS	0,012	0,006	0,007 B	0,003	0,008 AB	0,0881	0,0012
		AgS	0,017	0,026	0,031 A	0,023	0,026 A		
		AgT	0,011	0,014	0,014 AB	0,008	0,005 B		

AT = amido-tampão; AS = amido-salina; AgS = água-salina; AgT = água-tampão. T*T = interação tratamento/tempo. T0 (tempo basal), T8 (oito horas após administração por sonda nasogástrica), T24 (24 horas após administração por sonda nasogástrica), T48 (48 horas após administração por sonda nasogástrica), T72 (72 após administração por sonda nasogástrica). As medias foram representadas: diferentes letras minúsculas na mesma linha, e diferentes letras maiúsculas na mesma coluna diferiram estatisticamente ($p < 0.05$; teste de Tukey).

O filo mais predominante, de forma geral, foi Firmicutes (33,6%), seguido de Bacteroidetes (6,4%), Proteobacteria (4,9%), Spirochaetes (2,8%), e demais filios apresentados com abundância relativa mais baixa (<1%). Os dois primeiros filios apresentaram predominância no tratamento amido-tampão a partir de 8 horas (Firmicutes) e 48 horas (Bacteroidetes) após a sobrecarga de amido (Figura 4A).

Das 104 famílias conhecidas classificadas, somente 11 apresentaram abundância relativa acima de 1% com maior prevalência de Streptococcaceae (8,7%), Lachnospiraceae (8,4%), Ruminococcaceae (6,6%), Lactobacillaceae (4,5%), Acidaminococcaceae (2,1%), Veillonellaceae (1,3%) pertencentes ao filo Firmicutes. Entre as Bacteroidetes somente as famílias Prevotellaceae (3,9%) e Bacteroidaceae (2,0%) se destacaram, seguida das famílias dos outros filios, Spirochaetaceae (2,5%), Succinivibrionaceae (2,1%) e Desulfovibrionaceae (1,9%). Destas famílias, Streptococcaceae, Lactobacillaceae, Bacteroidaceae e Veillonellaceae aumentaram suas abundâncias entre T8 e T48 na microbiota de cavalos tratados com amido e tampão simultaneamente. Enquanto, no mesmo intervalo de tempo, houve redução da prevalência das famílias Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Prevotellaceae e Desulfovibrionaceae (Figura 4B).

Um total de 13 gêneros apresentou abundância relativa maior que 1%, sendo o mais prevalente *Streptococcus* (8,7%), pertencente à família Streptococcaceae. Da família Lachnospiraceae, os gêneros mais evidentes foram *Clostridium XIVa* (3,2%), um não identificado (2,0%), *Roseburia* (1,5%) e *Blautia* (1,3%). Da mesma maneira, as famílias Ruminococcaceae e Acidaminococcaceae apresentaram um gênero não identificado cada (4,4% e 1,2%, respectivamente). As famílias Lactobacillaceae, Prevotellaceae, Spirochaetaceae, Succinivibrionaceae, Bacteroidaceae, e Desulfovibrionaceae apresentaram somente um gênero prevalente cada, sendo eles *Lactobacillus* (4,5%), *Prevotella* (3,6%), *Treponema* (2,8%), *Succinivibrio* (2,2%), *Bacteriodes* (2,0%), e *Desulfovibrio* (1,3%), respectivamente. Como suas respectivas famílias, os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Bacteriodes* aumentaram a abundância relativa entre 8 e 48 horas após a sobrecarga de amido no tratamento amido-tampão. Por outro lado, os gêneros *Blautia*, *Prevotella*, *Desulfovibrio* e um não identificado da família Lachnospiraceae reduziram a prevalência no mesmo intervalo de tempo (Figura 4C).

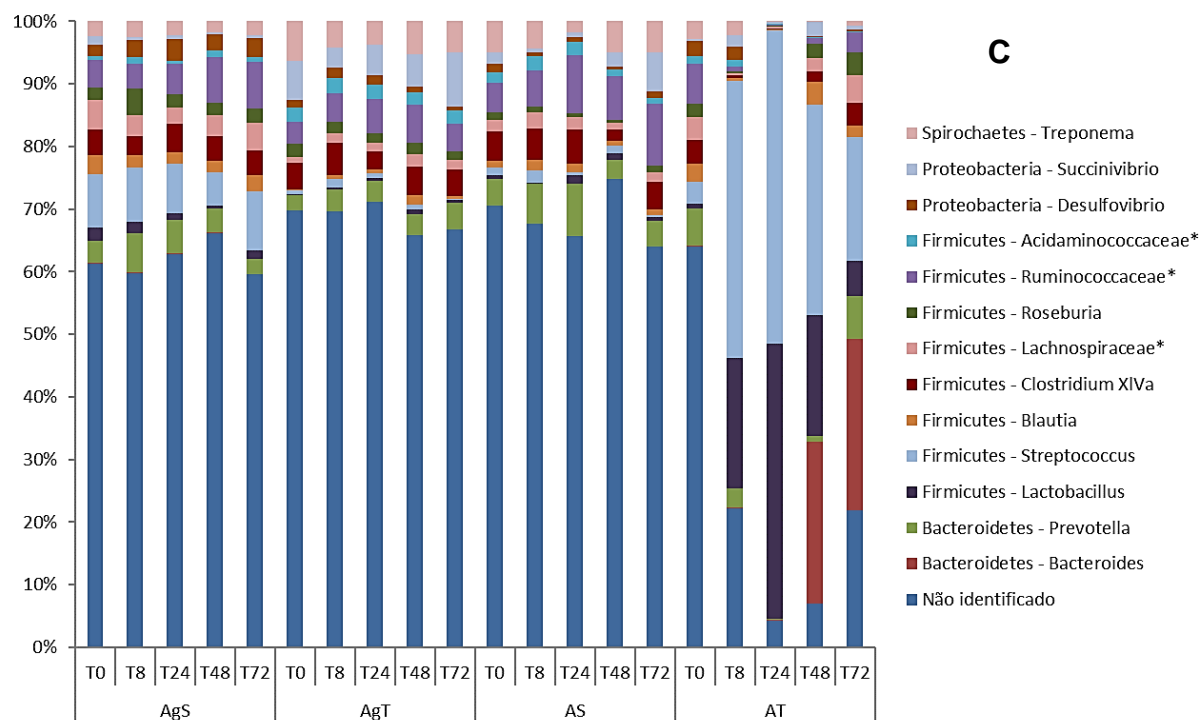


Figura 4. Gráfico representativo da abundância relativa dos Filos (A), Famílias (B) e Gêneros (C) predominantes (>1%) nas amostras de ceco de equinos de cada grupo (AgS = água-salina; AgT = água-tampão; AS = amido-salina; AT = amido-tampão) em cada tempo de avaliação: T0 (tempo basal), T8 (oito horas após administração por sonda nasogástrica), T24 (24 horas após administração por sonda nasogástrica), T48 (48 horas após administração por sonda nasogástrica), T72 (72 após administração por sonda nasogástrica).

5.4. Análise de Abundância Diferencial (LefSe)

Por meio da análise LefSe, investigou-se a composição da microbiota cecal entre os animais dos tratamentos amido-salina (AS) e amido-tampão (AT; Figura 5), pela qual foram detectados 43 gêneros bacterianos associados a esses tratamentos, sendo 18 gêneros exclusivamente relacionados à microbiota cecal de cavalos tratados com amido e tampão.

Os principais gêneros positivamente associados ao tratamento AT foram *Actinobacillus*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, enquanto que os gêneros *Clostridium_XIVa*, *IV* e *III*, *Desulfovibrio*, *Roseburia*, *Treponema* e *Blautia* foram associados aos animais do tratamento AS.

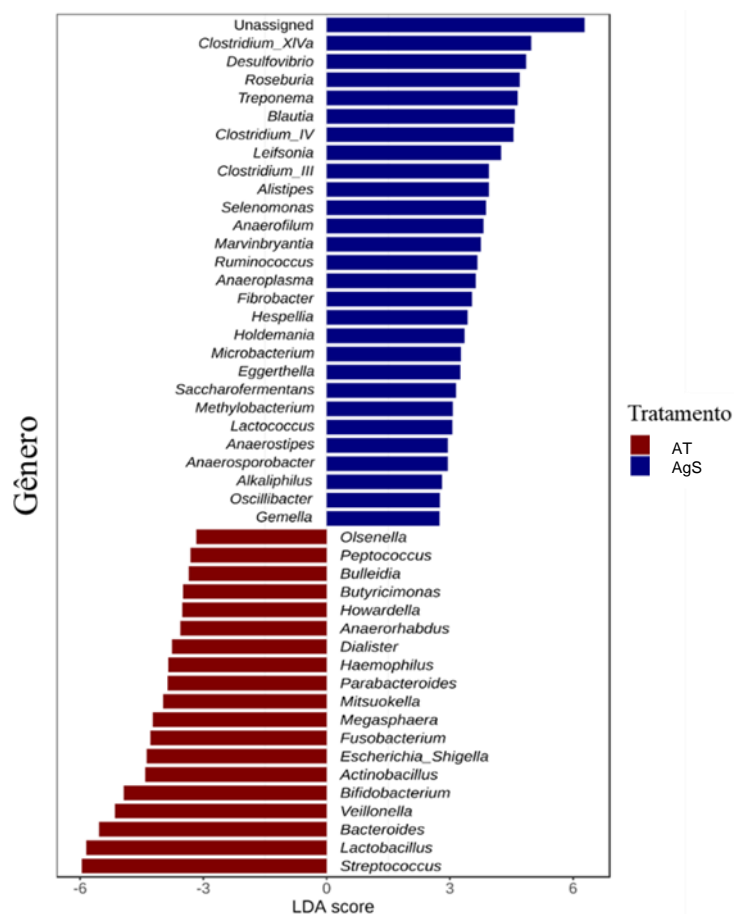


Figura 5. Análise LefSe da microbiota cecal de equinos representando os gêneros com diferença significativa para os tratamentos água-salina (AgS, azul) e amido-tampão (AT, vermelho). LDA >2, p -value <0,05.

6. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, notou-se que a abundância relativa das bactérias foi afetada no tratamento que continha amido e tampão (AT), diminuindo a riqueza e a diversidade microbianas (Warzecha et al., 2017). Além disso, foi evidente o aumento na prevalência bacteriana amilolítica em detrimento de bactérias fibrolíticas, cujos principais gêneros impactados pela combinação amido-tampão foram, principalmente, das famílias Streptococcaceae, Lactobacillaceae, Desulfovibionaceae e Lachnospiraceae.

Níveis elevados de carboidratos não estruturais, como o amido, quando administrados repentinamente e em quantidades acima da capacidade fisiológica do intestino delgado, não são totalmente digeridos e são transferidos para o intestino grosso. Quando chegam neste compartimento, o amido em excesso é fermentado elevando a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) e de ácido lático, reduzindo o pH cecal, o que resulta na proliferação de bactérias

ácido-láticas (De Fombelle et al., 2001; Al Jassim et al., 2005; Maia et al., 2017; Colombino et al., 2022). Este grupo bacteriano inclui microrganismos homo e hetero-fermentadores, como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Weissella* sp. (Stiles e Holzapfel, 1997), o que justifica o aumento da abundância relativa de *Lactobacillus* e *Streptococcus* sp. nas primeiras 24 horas após a sobrecarga de amido de milho no tratamento AT, corroborando outros estudos (Milinovich et al., 2008; Respondek et al., 2008; Biddle et al., 2013; Moreau et al., 2014). Embora alguns membros desses gêneros bacterianos sejam considerados probióticos benéficos para cavalos (Schoster et al., 2018), as suas proliferações em excesso podem estar entre as principais causas de disbiose intestinal e cólica (Park et al., 2021).

As bactérias ácido-láticas (LAB) são bactérias Gram-positivas que produzem ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos como principal ou única fonte de carbono e se proliferam rapidamente à medida que os níveis de ácido láctico aumentam e o pH luminal é reduzido (Wang et al., 2021; Biddle et al., 2013). Além da produção de ácido láctico, as LAB produzem AGV, como acetato, propionato, 3-hidroxipropionato, formato e succinato (Wang et al., 2021). Embora não tenhamos analisado o pH cecal e os metabólitos produzidos, o aumento das bactérias amilolíticas e de bactérias utilizadoras de lactato, como membros da família Veillonellaceae (Biddle et al., 2013), nas primeiras 48 horas após sobrecarga de amido de milho no tratamento AT, sugerem queda no pH cecal pela produção excessiva de ácido láctico. Nestas condições, bactérias sensíveis a ambientes ácidos são lisadas liberando endotoxinas e aminas vasoativas que, quando absorvidas, podem danificar a mucosa intestinal, comprometer a barreira intestinal e provocar inflamação sistêmica (Park et al., 2021), que estão associadas a um maior risco de laminite em cavalos (Costa e Weese, 2012; Colombino et al., 2022). De fato, observou-se diminuição na abundância relativa de bactérias principalmente da família Lachnospiraceae, sensíveis à redução de pH intestinal (Harlow et al., 2016; Park et al., 2021), entre T24 e T48 no tratamento AT, além do quadro de diarreia em todos os animais deste tratamento, corroborando achados de Santos et al. (2009) e Onishi et al. (2012), associado a outros sinais clínicos como taquicardia, hipertermia, claudicação e desidratação, caracterizando quadro de inflamação sistêmica (Onishi et al., 2012).

Vale destacar que a relação entre a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e a laminite já está bem documentada, onde a SIRS é uma condição anterior aos danos laminares sob modelos experimentais de sobrecarga de carboidrato solúvel (Faleiros e Belknap, 2017). Em tais modelos, a febre e a taquicardia antecedem à claudicação (Leise et al., 2011; Lima et al., 2013), corroborando nossos achados, nos quais observaram-se hipertermia e aumento de frequência cardíaca a partir de T8, enquanto a claudicação foi observada após 24 horas da sobrecarga de amido. Além disso, French e Pollitt (2004) e Lima et al. (2016) também observaram sinais de SIRS e inflamação (diarreia, depressão, inapetência, desidratação, febre e taquicardia), como em nosso trabalho, nos equinos submetidos à sobrecarga de carboidrato solúvel em período experimental de 12 a 48 horas. Isso reforça a hipótese que a principal repercussão da alteração da microbiota cecal caracteriza-se por aumento da permeabilidade da parede e absorção de toxinas bacterianas fibrolíticas (LPS), através da mucosa danificada (Faleiros e Belknap, 2017), justificando os sinais de SIRS. Já que os mesmos autores identificaram elevações nas concentrações plasmáticas de LPS após oito horas da administração de oligofrutose, condizente com o início da diminuição da abundância relativa de bactérias fibrolíticas, como da família Lachnospiraceae, e prevalência das amilolíticas. Portanto, a redução na população desta família na microbiota dos animais do tratamento AT, explica as alterações clínicas sistêmicas apresentadas pelos cavalos.

Além disso, a família Lachnospiraceae, considerada essencial ao hospedeiro, uma vez que ela mantém o equilíbrio metabólico intestinal (Costa et al., 2012; Engels et al., 2016; Schoster et al., 2017; Li et al., 2022), já que hidrolisa açúcares para produção de AGV, principalmente o butirato (Biddle et al., 2013; Vacca et al., 2020). Os AGV são a principal fonte de energia para as células epiteliais intestinais e também são considerados importantes para a saúde intestinal do hospedeiro (Schoster et al., 2017). O butirato, por sua vez, é necessário para a saúde do tecido epitelial colônico e é considerado potente inibidor da inflamação (Weese et al., 2015; Li et al., 2022). Portanto, mais uma vez, a redução dessa família na microbiota intestinal explica as alterações clínicas sistêmicas apresentadas pelos cavalos. Ademais, gêneros dessa e da família Ruminococcaceae (*Clostridium_XIVa*, *Blautia*, *Roseburia* e *Ruminococcus* sp.) foram associados fortemente, pela análise LefSe, com o

tratamento água-salina (AgS), o qual pode ser considerado o tratamento controle (sem administração de amido de milho e/ou solução tampão), com nenhuma alteração significativa na microbiota intestinal.

Em contrapartida, o tratamento amido-tampão foi associado com gêneros amilolíticos, principalmente *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Veillonella* sp., os quais foram prevalentes durante o experimento, corroborando Onishi et al. (2012) e Moreau et al. (2014). Tais gêneros pertencem aos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Verrucomicrobia, predominantes do intestino grosso de equinos (Kauter et al., 2019). Alguns dos membros de Bacteroidetes atuam na degradação de fibras dietéticas e outros na degradação de amido como o gênero *Bacteroides* sp. (Flint e Duncan, 2014), o que justifica sua maior abundância nas primeiras 48 horas na microbiota dos cavalos tratados com amido e tampão. A digestão de polissacarídeos por este gênero resulta, principalmente, na produção de propionato, e também na liberação de produtos tóxicos advindos da quebra de proteínas (Zafar e Saier, 2021), sugerindo provável inflamação na mucosa intestinal e, por consequência, quebra da sua barreira protetora contra toxinas para a circulação sistêmica, o que pode ter auxiliado no desencadeamento das alterações clínicas apresentadas pelos cavalos (Faleiros e Belknap, 2017). Apesar desse gênero não ter sido observado por Moreau et al. (2014), todos os equinos, submetidos à sobrecarga de amido de milho, deste trabalho apresentaram grau 2 de Obel, sendo considerados com quadro de laminite aguda em estágio inicial entre 26-29 horas pós-sobrecarga, o que também pôde-se notar em nosso experimento a partir de T24, com o aumento da abundância de *Streptococcus* e *Lactobacillus* sp.

Vale ressaltar que os sinais clínicos observados nos cavalos tratados com amido e salina foram pontuais, como a alteração na consistência das fezes (pastosas) somente em T24, e menos intensos, como claudicação somente em dois animais com grau de Obel leve, quando comparado aos achados no tratamento amido-tampão. 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, justificando as diferenças nas apresentações clínicas entre os cavalos do tratamento AS, e entre os tratamentos (AS e AT). Além disso, sabe-se que forragens ricas em fibras podem tamponar os produtos da fermentação no

intestino grosso, devido seu conteúdo ser rico em matéria seca (NRC, 2007). Portanto, o fornecimento de feno ao longo do experimento manteve a quantidade de fibra na dieta, aumentando o pH intestinal, o que pode ter permitido redução e/ou impedimento de mudanças microbianas e, por consequência, intensidade dos sinais clínicos nos animais do tratamento AS, mesmo na presença da sobrecarga de amido. Em contrapartida, a forragem fornecida aos cavalos tratados com amido e tampão pode ter assegurado o início do retorno ao nível basal (T0) nas abundâncias relativas da microbiota intestinal, bem como desaparecimento e/ou diminuição dos sinais clínicos, a partir de 48-72 horas pós sobrecarga de amido.

É importante destacar, também, que a associação da solução tampão (hidróxidos de alumínio e magnésio) com amido de milho pode ter sido um fator intensificante das alterações na microbiota intestinal e no quadro clínico nos animais do tratamento AT. Esta solução tem sido administrada por via oral para tratar compactação de intestino grosso em cavalos (Tillotson e Traub-Dargatz, 2003; Lopes et al., 2004), aumentando a osmolalidade e o influxo de água intraluminal, o que carrega o conteúdo compactado ao longo do trato intestinal até ser eliminado (McGorum e Pirie, 2009). Por outro lado, sais de magnésio causam irritação da mucosa intestinal que gera inflamação local e mudanças na microbiota comensal (Belkaid e Hand, 2014; Milani et al., 2015). Embora a concentração desses sais não tenham sido mensuradas, sabe-se que 20% de magnésio é absorvido no intestino delgado quando solução de hidróxidos de alumínio e magnésio é administrada por via oral (Schryver et al., 1987; Hintz e Cymbaluk, 1994), o que não podemos assumir no nosso estudo, já que esta solução foi administrada diretamente no ceco, permitindo que todos os íons de magnésio chegassem até o intestino grosso. Isso nos permite reafirmar a possível contribuição do tampão nas alterações microbianas e clínicas, principalmente fezes pastosas, desidratação e apatia. Já que a chegada abrupta de grandes quantidades de carboidratos solúveis ao ceco e cólon, também desencadeia essas alterações (Milinovich et al., 2010; Lima et al., 2013).

Por conta disso, entende-se que há necessidade de estudos complementares envolvendo a mensuração de íons magnésio para complementar todos os passos da ação dos sais de magnésio no trato gastrointestinal de cavalos e as alterações que possam vir a ocasionar na sua

microbiota. Ademais, observou-se inúmeras espécies bacterianas ainda não classificadas como já demonstrado por Sherpherd et al. (2012) e Almeida et al. (2016), necessitando, também, de pesquisas para mensurar as respostas da interação microbiota/hospediero como forma de subsidiar e consolidar o padrão responsivo do microbioma intestinal.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a solução tamponante não auxilia na manutenção da microbiota cecal de equinos submetidos à sobrecarga dietética de amido quando administrada intracecal. Ao contrário, em associação ao amido, a presença da solução tamponante pode acarretar a redução da riqueza e diversidade de espécies bacterianas e intensificar a disbiose. Nesta condição, foram observadas alterações mais expressivas na abundância relativa dos principais táxons microbianos, refletidas no aumento de bactérias amilolíticas, como *Streptococcus* e *Lactobacillus* sp., em detrimento de bactérias fibrolíticas pertencentes às famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae. Vale ressaltar que a disbiose observada pode estar relacionada aos sinais clínicos da fase aguda de laminite apresentados pelos cavalos do tratamento amido-tampão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed AE, Constable PD, Misk NA (2002) Effect of an orally administered antacid agent containing aluminum hydroxide and magnesium hydroxide on abomasal luminal pH in clinically normal milk-fed calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 1(220):74-79.

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 D, Pollitt CC (2005) The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. **FEMS Microbiol Lett** 248:75-81.

Alcock J, Maley CC, Aktipis CA (2014) Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms. **Bioessays** 36:940e9.

Alexander F, Davies ME (1963) Production and fermentation of lactate by bacteria in the 5 alimentary canal of the horse and pig. **J Comp Pathol** 73:1-8.

Almeida MLM, Feringer WHJ, Carvalho JRG, Rodrigues IM, Jordão LR, Fonseca MG, Rezende ASC, Neto AQ, Weese JS, Costa MC, Lemos EGM, Ferraz GC (2016) Intense exercise and aerobic conditioning associated with Chromium or L-Carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. **PlosOne** 11(12):e0167108.

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

Argenzio RA (1996) Digestão e absorção dos carboidratos, gorduras e proteínas. In: Dukes HH **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 330-342.

Barr BS, Waldrige BM, Morresey PR, Reed SM, Clark C, Belgrave R (2013) Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. **Equine Vet J.** 45:154-8.

Baruc CJ, Dawson KA, Baker JP (1983) The characterization and nitrogen metabolism of equine caecal bacteria. In: 8th ENPS. Lexington, KY: University of Kentuck, p. 151-6.

Belkaid Y, Hand TW (2014) Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. **Cell** 157:121-141.

Belknap, JK (2017) Laminitis: an overview. In:_____. (1. ed.) **Equine Laminitis**. Hoboken, NJ: Wiley, p. 152-158.

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.

Bulmer LS, Murray J-A, Burns NM, Garber A, Wemelsfelder F, McEwan NR (2019) High-starch diets alter equine faecal microbiota and increase behavioural reactivity. **Sci Rep** 9:18621.

Bustamante CC, de Paula VB, Rabelo IP, Fernandes CC, Kishi LT, Canola PA, Melos EGM, Valadão CAA (2022) Effects of Starch Overload and Cecal Buffering on Fecal Microbiota of Horses. **Animals** 12:3135.

Cao Y, Fanning S, Proos S, Jordan K, Srikumar S (2017) A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. **Front Microbiol** 8(21):1829.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Meth** 7:335-6.

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.

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

Clark CK, Merritt AM, Burrow JA, Steible CK (1996) Effect of aluminum hydroxide/magnesium hydroxide antacid and bismuth subsalicylate on gastric pH in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 8(10):1687-1691.

Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG (2014) Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. **Mol Endocrinol** 28:1221e38.

Coenen M, Vervuert I (2010) A minimum of roughage and a maximum of starch necessary benchmarks for equine diets. **Pferdeheilkunde** 26:147e51.

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.

Colin-Jones DG (1990) Acid suppression – how much is needed. **British Medical Journal** 301(6752):564-565.

Colombino E, Pezzotti G, Pagliuca G, Bassols A, Carmona E, Panu R, Spissu N (2022) Gut health of horses: effects of high fibre vs high starch diet on histological and morphometrical parameters. **BMC Veterinary Research** 18(1):338.

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.

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 RS, Botteon PT, Ferraz V, Leme FOP, Faleiros RR, Alves GES (2012) Variações plasmáticas de animais vasoativos em equinos sob efeito de sobrecarga de carboidratos e anti-inflamatórios não esteroidais. **Ciência Animal Brasileira** 13(1):93-98.

D'Argenio V (2018) Human microbiome acquisition and Bioinformatic challenges in metagenomic studies. **Int J Mol Sci** 19:383.

D'Argenio V, Salvatore F (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. **Clin Chim Acta.** 451:97-102.

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, Shirazi-Beechey SP (2001) Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. **FEMS Microbiol Ecol.** 38:141-51.

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

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Appl Environ Microbiol** 72:5069-72.

Destrez A, Grimm P, Cezilly F, Julliand V (2015) Changes of the hindgut microbiota due to high-starch diet can be associated with behavioral stress response in horses. **Physiol Behav** 149:159e64.

Destrez A, Grimm P, Julliand V (2019) Dietary-induced modulation of the hindgut microbiota is related to behavioral responses during stressful events in horses. **Physiol. Behav.** 202:94-100.

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.

Dicks LMT, Botha M, Dicks E, Botes M (2014) The equine gastro-intestinal tract: an overview of the microbiota, disease and treatment. **Livestock Sci.** 160:69-81.

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 elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. **PLoS ONE** 9:e87424.

Dougal K, de 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:e77660.

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.

Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics** 26:2460-1.

Engels C, Ruscheweyh HJ, Beerenwinkel N, Lacroix C, Schwab C (2016) The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. **Frontiers in Microbiology** 7:713.

Ericsson AC, Johnson PJ, Lopes MA, Perry SC, Lanter HR (2016) A microbiological map of the healthy equine gastrointestinal tract. **PLoS One** 11:e0166523.

Faleiros RR, Belknap JK (2017) Leukocytes and Inflammatory signaling in laminitis. In: _____. (1. ed.). **Equine Laminitis**. Hoboken, NJ: Wiley, p. 401-436.

Faleiros RR, Johnson PJ, Nuovo GJ et al. (2011) Lamella leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. **Journal Vet Internal Medicine** 25:107-115.

Feitosa FLF (2008) Exame Físico Geral ou de Rotina. In: _____. (2. ed.). **Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico**. São Paulo: Roca, p. 65-86.

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.

Flint HJ, Duncan SH (2014) Bacteroides and Prevotella. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. Academic Press, p. 203-208.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proc Natl Acad Sci**. 104:13780-5.

Freeman DE, Ferrante PL, Palmer JE (1992) Comparison of the effects of intragastric infusions of equal volumes of water, dioctyl sodium sulfosuccinate, and magnesium sulfate on fecal composition and output in clinically normal horses. **Am J Vet Res** 53(8):1347-53.

French KR, Pollitt CC (2004) Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. **Equine Vet J** 36(3):230-235.

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.

Garber A, Hastie P, Murray JA (2020) Factors influencing equine gut microbiota: Current knowledge. **Journal of Equine Veterinary Science** 88:102943.

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.

Garner HE, Moore JN, Johnson JH, Clark L, Amend JF, Tritschler LG, Coffman JR, Sprouse R, Hutcheson DP, Salem CA (1978) Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. **Equine Veterinary Journal** 10:249-252.

Geor RJ (2013) Endocrine and metabolic physiology. In **Equine Applied and Clinical Nutrition** 33-63.

Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika** 40:237-64.

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.

Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA (2018) The influence of the gut microbiome on Cancer, immunity, and Cancer immunotherapy. **Cancer Cell** 33:570-80.

Grimm P, Julliand V, Philippeau C, Sadet-Bourgeteau S (2016) Effect of yeast supplementation on hindgut microbiota and digestibility of horses subjected to an abrupt change of hays. **Livestock Science** 186:34-40.

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(4):e0154037.

Harris P, Dunnett C (2018) Nutritional tips for veterinarians. **Equine Veterinary Education** 30:486-96.

Hintz HF, Cymbaluk NF (1994) Nutrition of the horse. **Annual Review of Nutrition** 14(1):243-267.

Hintz HF, Schryver HF (1972) Magnesium metabolism in the horse. **Journal of Animal Science** 35(4):755-759.

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 Vaux A, Millet L, Fonty G (1999) Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the Predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. **Appl Environ Microbiol** 65:3738-41.

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.

Kamada N, Seo SU, Chen GY, Nuñez G (2013) Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology** 13(5):321-335.

Kauter A, Epping L, Semmler T, Abdulmawjood A, Tedin K (2019) The gut microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives. **Animal Microbiome** 1(1):14.

Kristoffersen C, Jensen RB, Avershina E, Austbø D, Tauson A-H, Rudi K (2016) Dietdependent modular dynamic interactions of the equine Cecal microbiota. **Microb Environments** 31:378-86.

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.

Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreassen AS, Pedersen BK (2010) Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **PLoS One** 5:e9085.

Lewis RW, Islam AA, Dilla-Ermita CJ, Hulbert SH, Sullivan TS (2019) Highthroughput Siderophore screening from environmental samples: plant tissues, bulk soils, and rhizosphere soils. **J Vis Ex** 144.

Lewis S (2003) Gastric ulceration in an equine neonate. **Can. Vet. J.** 44(5):420-421.

Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. **Science** 320:1647-51.

Li Y, Lan Y, Zhang S, Wang X (2022) Comparative analysis of gut microbiota between healthy and diarrheic horses. **Frontiers in Veterinary Science** 9:882423.

Liepman RS, Swink JM, Habing GG, Boyaka PN, Caddey B, Costa M, Gomez DE, Toribio RE (2022) Effects of intravenous antimicrobial drugs on the equine fecal microbiome. **Animals** 12:1013.

Lindgreen S, Adair KL, Gardner PP (2016) An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. **Sci Rep** 6:19233.

Lima LR (2012) **Avaliação histológica e imunohistoquímica das lâminas do casco de equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2.** 51 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Lima LR, Mendes HMF, Magalhães JF, Markowicz IC, et al. (2013) Avaliação clínica e hematológica de equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofrutose, tratados ou não com um agente antagonista de receptores CXCR1/2. **Pesq Vet Bras** 33(8):992-998.

Lima LR, Mendes HMF, Soriani FM, et al (2016) Histologic and inflammatory lamellar changes in horses with oligofrutose-induced laminitis treated with a CXCR1/2 antagonist. **Pesq Vet Bras** 36(1):13-18.

Leise BS, Faleiros RR, Watts SM, et al (2011) Lamellar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis. **Equine Vet J** 43(1):54-61.

Lopes MAF, White IINA, Donaldson L, Crisman MV, Ward DL (2004) Effects of enteral and intravenous fluid therapy; magnesium sulfate; and sodium sulfate on colonic contents and feces in horses. **American Journal of Veterinary Research** 65(5):695-704.

Lucasse A, Hankel J, Finkler-Schade C, Osbelt L, Strowig T, Visscher C, Schuberth HJ (2022) Feeding a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (Olimond BB) does not alter the fecal microbiota of Thoroughbred Racehorses. **Animals** 12:1496.

Ludwig JA, Reynolds JF (1988) Statistical ecology - a primer on methods and computing. **New York: Wiley Inc.**

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

Maczulak AE, Dawson KA, Baker JP (1985) Nitrogen utilisation in bacterial isolates from the equine cecum. **Appl Environ Microbiol** 50:1439-43.

Maia MA, Botteons PTL, Spindola BF, Botteon RCCM (2017) Alteration of the fecal pH of the equines by oral administration of alkalizing agents. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine** 39(1):1-6.

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

Massacci FR, Clark A, Ruet A, Lansade L, Costa MC, Mach N (2020) Inter-breed diversity and temporal dynamics of the faecal microbiota in healthy horses. **J. Anim. Breed. Genet.** 00:1-18.

Maton PN, Burton ME (1999) Antiacids revisited: a review of their clinical pharmacology and recommended therapeutic use. **Drugs** 57(6):855-870.

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

Metcalf JL, Song SJ, Morton JT, Weiss S, Seguin-Orlando A, Joly F (2017) Evaluating the impact of domestication and captivity on the horse gut microbiome. **Sci Rep.** 7:15497.

Milani C, Lugli GA, Duranti S, Turrone F, Mancabelli L, Ferrario C, Mangifesta M, Hevia A, Viappiani A, Scholz M (2015) Bifidobacteria exhibit social behavior through carbohydrate resource sharing in the gut. **Scientific Reports** 5:15782.

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.

Miller JK, Slebondzinska-Brzezinska E, Madsen FC (1993) Oxidative stress; antioxidants; and animal function. **Journal of Dairy Science** 76(9):2812-2823.

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.

Murray MJ, Grodinsky C (1992) The effects of famotidine, ranitidine and magnesium hydroxide/aluminium hydroxide on gastric fluid pH in adult horses. **Equine Vet. J. Suppl** 11:52-55.

Neefs JM, Van de Peer Y, De Rijk P, Chapelle S, De Wachter R (1993) Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. **Nucleic Acids Res** 21:3025-49.

NRC – National Research Council, 2007. Nutrient requirements of horses. Washington: The National Academies Press, 6ed. 100p. (Nutrient requirements of horses).

O' Donnell MM, Harris HMB, Ross RP, O'Toole PW (2017) Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. **MicrobiologyOpen** 6:e00509-n/a.

O'Callaghan TF, Ross RP, Stanton C, Clarke G (2016) The gut microbiome as a virtual endocrine organ with implications for farm and domestic animal endocrinology. **Domest Animal Endocrinol** 56(Suppl):S44e55.

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

Onishi JC, Park JW, Prado J, Eades SC, Mirza MH, Fugaro MN, Häggblom MM, Reinemeyer CR (2012). Intestinal bacterial overgrowth includes potential pathogens in the carbohydrate overload models of equine acute laminitis. **J. Vet. Mic.** 159:3-4.

Panek M, Čipčić Paljetak H, Barešić A, Perić M, Matijašić M, Lojkić I (2018) Methodology challenges in studying human gut microbiota – effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. **Sci Rep** 8:5143.

Park T, Cheong H, Yoon J, Kim A, Yun Y, Unno T (2021) Comparison of the fecal microbiota of horses with intestinal disease and their healthy counterparts. **Veterinary Sciences** 8:113.

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.

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.

Props R, Kerckhof F-M, Rubbens P, De Vrieze J, Hernandez Sanabria E, Waegeman W (2017) Absolute quantification of microbial taxon abundances. **ISME J** 11:584-7.

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.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and webbased tools. **Nucleic Acids R** 41:D590-D6.

Quercia S, Freccero F, Castagnetti C, Soverini M, Turrone S, Biagi E (2019) Early colonisation and temporal dynamics of the gut microbial ecosystem in Standardbred foals. **Equine Vet J.** 51:231-7.

Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N (2017) Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nat Biotechnol** 35:833.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW, McKenzie RA (2002) *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737p.

Ransom-Jones E, Jones DL, McCarthy AJ, McDonald JE (2012) The Fibrobacteres: an important phylum of cellulose-degrading Bacteria. **Microbial Ecol.** 63:267-81.

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.

Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP (2015) High-throughput sequencing technologies. **Mol Cell** 58:586-97.

Richards N, Hinch GN, Rowe JB (2006) The effect of current grain feeding practices on hindgut starch fermentation and acidosis in the Australian racing Thoroughbred. **Aust Vet J** 84:402e7.

Rivas LJ, Hinchcliff KW, Kohn CW, Sams RA, Chew DJ (1997) Effect of sodium bicarbonate administration on blood constituents of horses. **Am. J. Vet. Res.** 58:658-663.

Rowe JB, Pethick DW, Johnson KG (1995) Controlling acidosis in the equine hindgut. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia** 136-142.

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.

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.

Sauvant D, Chapoutot P, Archimède H (1994) La digestion des amidons par les ruminants et ses conséquences. **INRA Prod Animales** 7:115-24.

Scher JU, Abramson SB (2011) The microbiome and rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol.** 7:569-78.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, communitysupported software for describing and comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol** 75:7537-41.

Schoster A (2018) Probiotic Use in Equine Gastrointestinal Disease. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 34(1):13-24.

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.

Schoster A, Guardabassi L, Staempfli HR, Abrahams M, Jalali M, Weese JS (2016) The longitudinal effect of a multi-strain probiotic on the intestinal bacterial microbiota of neonatal foals. **Equine Vet J.** 48:689-96.

Schoster A, Mosing M, Jalali M, Staempfli HR, Weese JS (2016) Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. **Equine Vet J.** 48:595-602

Schoster A, Staempfli HR, Guardabassi LG, Jalali M, Weese JS (2017) Comparison of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic foals at two and four weeks of life. **BMC veterinary research** 13(1):144.

Schoster A, Weese JS, Guardabassi L (2014) Probiotic use in horses - what is the evidence for their clinical efficacy? **J Vet Intern Med** 28:1640-52.

Schryver HF, Parker MT, Daniluk PD, Pagan KI, Williams J, Soderholm LV, Hintz HF (1987) Salt consumption and the effect of salt on mineral metabolism in horses. **The Cornell Veterinarian** 77(2):122-131.

Shepherd ML, Swecker WS Jr, Jensen RV, Ponder MA (2012) Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. **FEMS Microbiol Let** 326:62-8.

Simpson EH (1949) Measurement of diversity. **Nature** 163:688.

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

Staple CR, Lough DS (1989) Efficacy of supplemental dietary neutralizing agent for lactating dairy cows: a review. **Anim. Feed Sci. Technol.** 277-303.

Stewart HL, Pitta D, Indugu N, Vecchiarelli B, Engiles JB, Southwood LL (2018) Characterization of the fecal microbiota of healthy horses. **Am J Vet Res** 79:811-9.

Stewart HL, Pitta D, Indugu N, Vecchiarelli B, Hennessy ML, Engiles JB, Southwood LL (2020) Changes in the faecal bacterial microbiota during hospitalization of horses with colic and the effect of different causes of colic. **Equine Veterinary Journal** 1-13.

Stiles ME, Holzapfel WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International journal of food microbiology** 36(1):1-29.

Taylor EA, Beard WL, Douthit T, Pohlman L (2014) Effect of orally administered sodium bicarbonate on caecal pH. **Equine Veterinary Journal** 46(2):23-226.

Tillotson K, Traub-Dargatz JL (2003) Gastrointestinal protectants and cathartics. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 19(3):599-615.

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.

Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R (2012) Defining the human microbiome. **Nutr Rev.** 70:38-44.

Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobbetti M, De Angelis M (2020) The controversial role of human gut Lachnospiraceae. **Microorganisms** 8(4):573.

Van den Berg M, Hoskin SO, Rogers CW, Grinberg A (2013) Fecal pH and microbial populations in thoroughbred horses during transition from pasture to concentrate feeding. **Journal of Equine Veterinary Science** 33:215-22.

Venable EB, Fenton KA, Braner VM, Reddington CE, Halpin MJ, Heitz SA, Francis JM, Gulson NA, Goyer CL, Bland SD, Cross TW, Holscher HD, Swanson KS (2017) Effects of Feeding Management on the Equine Cecal Microbiota. **J. Equine Vet. Sci.** 49:113-121.

Vieira SM, Hiltensperger M, Kumar V, Zegarra-Ruiz D, Dhner C, Khan N, Costa FRC, Tiniakou E, Greiling T, Ruff W, Barbieri A, Kriegel C, Mehta SS, Knight JR, Jain D, Goodman AL, Kriegel MA (2018) Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. **Science** 359:1156-1161.

Wang Y, Chen X, Yu X, Wu Y, Shen Y, Lu H, Zhang H (2021) Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** 9:612285.

Warzecha CM, Coverdale JA, Janecka JE, Leatherwood LL, Pinchak WE, Wickersham TA, McCann JC (2017) Influence of short-term dietary starch inclusion on the equine cecal microbiome. **Journal of Animal Science** 95:5077-5090.

Weese JS, Holcombe SJ, Embertson RM, Kurtz KA, Roessner HA, Jalali M, Linklater KA (2015) Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post-partum colic. **Equine Veterinary Journal** 47(6):641-649.

White NA, Dabareiner RM (1997) Treatment of impaction colics. **Vet. Clin. North Am. Equine Practice** 13(2):243-259.

Yoshida N, Yamashita T, Hirata KI (2018) Gut microbiome and cardiovascular diseases. **Diseases** 6(3):56.

Young VB (2017) The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. **BMJ** 356:j831.

Zafar H, Saier Jr MH (2021) Gut Bacteroides species in health and disease. **Gut Microbes** 13(1):1-20.

Zalar B, Haslberger A, Peterlin B (2018) The role of microbiota in depression - a brief review. **Psychiatr Danub**. 30:136-41.

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.

Zhao Y, Li B, Bai D, Huang J, Shiraigo W, Yang L (2016) Comparison of fecal microbiota of Mongolian and thoroughbred horses by high-throughput sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene. **Asian-Australas J Anim Sci** 29:1345-52.

Zheng P, Li Z, Zhou Z (2018) Gut microbiome in type 1 diabetes: a comprehensive review. **Diabetes Metab Res Ver** 34:e3043.