

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
ANIMAL

TESE

Dietas, Prebiótico e Probiótico e Seus Efeitos Sobre o
Microbioma Intestinal de Equinos

Bruna Caroline Franzan

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DIETAS, PREBIÓTICO E PROBIÓTICO E SEUS EFEITOS SOBRE O
MICROBIOMA INTESTINAL DE EQUINOS**

BRUNA CAROLINE FRANZAN

Sob a Orientação do Professor

Vinicius Pimentel Silva

e Co-orientação do Professor

Fernando Queiroz de Almeida

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora** no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Zootecnia.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2021

F837d Franzan, Bruna Caroline, 1991-
Dieta, prebiótico e probiótico e seus efeitos sobre o
microbioma intestinal de equinos / Bruna Caroline
Franzan. - Seropédica, 2021. 141 f.

Orientador: Vinicius Pimentel Silva.

Coorientador: Fernando Queiroz de Almeida.

Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal, 2021.

1. microbiota. 2. fermentação. 3. fibra. 4. dieta
completa. 5. simbiótico. I. Silva, Vinicius Pimentel,
1981-, orient. II. Almeida, Fernando Queiroz de, 1959
, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 3260 / 2021 - PPGZ (12.28.01.00.00.00.61)

Nº do Protocolo: 23083.017800/2021-25

Seropédica-RJ, 11 de março de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
BRUNA CAROLINE FRANZAN

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Zootecnia.

TESE APROVADA EM 26/02/2021.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Banca Examinadora:

Vinicius Pimentel Silva, Dr. UFRRJ - (Presidente) Hélio

Cordeiro Manso Filho, Dr. UFRPE

Márcio Carvalho Costa, Dr. University of Montreal - Canadá

Irene da Silva Coelho, Dr.^a UFRRJ

Maria Izabel Vieira de Almeida, Dr.^a UFRRJ

(Assinado digitalmente em 11/03/2021 20:49)

IRENE DA SILVA COELHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: 1815763

(Assinado digitalmente em 12/03/2021 09:50)

MARIA IZABEL VIEIRA DE ALMEIDA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
IZ (12.28.01.29)
Matrícula: 1350303

(Assinado digitalmente em 15/03/2021 09:50)

VINICIUS PIMENTEL SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptNAP (12.28.01.00.00.00.62)
Matrícula: 1899630

(Assinado digitalmente em 11/03/2021 17:00)

HELIO CORDIERO MANSO FILHO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 455.564.744-00

(Assinado digitalmente em 11/03/2021 16:49)
MARCIO CARVALHO DA COSTA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 249.943.648-42

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **3260**,
ano: **2021**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: **11/03/2021** e o
código de verificação: **9259ffbdcd**

Dedico este trabalho a todos os animais, em especial, aos equinos, que são fascinantes por sua força e beleza, e aos gatos, que são ótimos companheiros para aqueles que trabalham com pesquisa. No meu caso, a Jack e Brad.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha Mãe por ser minhas costas, meu suporte durante todos esses anos.

De uma forma especial eu agradeço à EQUIAB/LADEq por oito anos de crescimento e aprendizado. Agradeço aos bolsistas de IC que fizeram tudo acontecer, que mantiveram o gás, e me ajudaram a medir muito gás (não aguentei com o trocadilho). Mais que especial, eu agradeço à Marina Monteiro, Marina Chiarinha (Torres), Emily e Ana Rúbia, que viraram um quarteto fantástico para execução do primeiro experimento do meu Doutorado. Agradeço também a Laryssa, Ada Morgana, Isabela, Ananda (Linda), Dafny, Maria Rosa (Siqueira) e Brenda, responsáveis pelo segundo experimento.

Agradeço ao professor Vinicius Pimentel pela oportunidade e pelos oito anos de orientação, de aprendizado mútuo, de construção.... resumidamente, não sei colocar no papel o quanto sou grata.

Junto com o professor Vinicius, conheci o professor Fernando Queiroz, pessoa pela qual tenho uma grande admiração. Se você não aprender amor pelo trabalho com ele, você não aprenderá com mais ninguém. Porque a ciência não para, e o trabalho também não! Esse é o segredo. Na vida não existe “tem que...”, se tem que, você vai e faz.

Agradeço a professora Irene Coelho, por me apresentar oportunidades maravilhosas de conhecimento e trabalho, pelos desenhos explicativos, pelas palavras de apoio e incentivo.

Agradeço a todos do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos/UFRRJ, em especial a Karen, Eliene, Camila e Gustavo pela ajuda e paciência para me ensinar a extração de DNA, eletroforese...

Agradeço a professor Caio Rachid por me apresentar o mundo do Microbioma e pela paciência com todas as minhas dúvidas durante o processo.

Agradeço também as pessoas que me apoiaram nos bastidores durante essa jornada...

As minhas amigas de Muzambinho, Kess, Larissa, Jussara e Alice, que de alguma forma mantêm contato comigo, mesmo depois de tantos anos da minha ausência.

Ao meu amigo Neilton, meu eterno Mimi, que acompanhou todo o desenrolar da minha vida.

A família F3 302, Camila, Pâmela, Thaís e Cíntia, porque sempre fomos família.

Ao meu amigo Diogo, que plantou em mim a sementinha da Rural.

A Zootecnia 2009, Lívia, Vanessa, Luana, Gilsinei e Guilherme. Morro de saudade de vocês!

Aos amigos da pós-graduação, Felipe Dilelis e Túlio Leite, que me salvaram diversas vezes com o projeto, metodologias, referências, desabafos, cervejas...

Agradeço à Tatiana Werneck pelas inúmeras vezes que nos reunimos para falar de microbiologia, DNA, ciência, sentido da vida...

Acredito que a essência da ciência está no pouquinho de todo dia, da observação e perseverança no cultivo da curiosidade de aprender. Também acredito que a semente da curiosidade é plantada ainda quando criança, talvez junto com um pé de feijão. Eu fui uma pessoa de sorte que tive ótimos Professores, por isso eu agradeço a todos que me apresentaram a ciência ao longo da vida e regaram essa semente em mim.

Por fim, agradeço ao programa PPZG/UFRRJ por todo suporte dado ao longo do curso, e a Rural que foi minha casa por mais de 11 anos.

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

BIOGRAFIA

Bruna Caroline Franzan, filha de Lúcia de Fátima Aguiar e Moacir Franzan, nasceu no dia 13 de junho de 1991, na cidade de São Paulo. Ingressou na Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho, MG em 2006, formando-se em Técnico em Agropecuária no ano de 2008.

Iniciou o Curso de graduação de Zootecnia da UFRRJ, em 2009, onde desenvolveu diversas atividades acadêmicas tendo sido Primeira Tesoureira do Diretório Acadêmico de Zootecnia e Monitora de Bioquímica. Foi bolsista de Iniciação Científica, sob orientação do Prof. Vinicius Pimentel Silva. Graduou-se em Zootecnia no ano de 2014. Ainda em 2014 ingressou no Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na UFRRJ, sob orientação do Prof. Vinicius Pimentel Silva, obtendo o título de Mestrado em Zootecnia no ano de 2016. Em agosto de 2016, iniciou o Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na UFRRJ, sob orientação do Prof. Vinicius Pimentel Silva, concluindo o Doutorado em Zootecnia em fevereiro de 2021.

RESUMO GERAL

FRANZAN, Bruna Caroline. **Dietas, prebiótico e probiótico e seus efeitos sobre o microbioma intestinal de equinos.** 2021. 141p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A microbiota intestinal tem importância fundamental na nutrição e na saúde dos equinos e é influenciada por diversos fatores. Esse trabalho teve como objetivo avaliar uma dieta completa extrusada (CED) na alimentação de equinos e os fatores dietéticos que influenciam o microbioma fecal. Os equinos alimentados com a CED tiveram menor consumo de água e fibra, maior consumo de matéria seca (MS), extrato etéreo e energia bruta, menor produção e pH fecal. A digestibilidade da MS, matéria orgânica, extrato etéreo, proteína bruta e energia bruta foram superiores na CED. O tempo médio de retenção da digesta (TMR) da CED foi menor quando comparado a dieta de feno de Coastcross (CHD) quando estimado pelo marcador LIPE[®]. A abundância relativa do filo Actinobacteria foi maior após 28 dias de consumo de CHD comparado a 7 dias de consumo. A adaptação gradual de equinos ao consumo de CED afetou os filos Verrucomicrobia, Synergistetes, Tenericutes e Lentisphaerae. A inclusão de 30% de CED na dieta afeta a abundância de grupos bacterianos relacionados a atividade fermentativa, entretanto, a diversidade de espécies bacterianas das fezes foi mantida até o momento de consumo de 60% CED e 40% de CHD. A troca abrupta do CHD para CED resultou em redução do pH fecal 96 horas após a troca e redução da diversidade de espécies bacterianas 24 horas após a troca. Além disso, afetou os filos Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Elusimicrobia e Actinobacteria. A troca abrupta da CED para CHD resultou em redução do pH fecal em 24 horas após a troca e aumento da diversidade de espécies bacterianas 96 horas após a troca. Além disso, afetou os filos Synergistetes e Lentisphaerae. Por fim, ambas as trocas de dietas resultaram no aumento da abundância relativa de OTUs classificadas como Bacteroidetes e *Treponema* 24 horas após a troca. A suplementação com prebiótico inulina (PRE), probiótico *Saccharomyces cerevisiae* (PRO) e simbiótico inulina + *Saccharomyces cerevisiae* (SIM) não influenciou os índices de diversidade bacteriana observadas nas fezes de potros no período de desmame. A suplementação com PRE aumentou a classe Bacilli nas fezes dos potros lactentes em comparação ao grupo controle. O pH fecal dos potros suplementados com PRE foi superior ao grupo controle. A suplementação com PRO e SIM aumentou as classes Erysipelotrichia e Saccharimonadia, respectivamente, após três dias de consumo, entretanto, o efeito não foi prolongado. Além disso, houve diferença dos microbiomas fecais entre os sexos dos potros. Portanto, conclui-se que a CED pode ser usada na alimentação de equinos, desde que seja feita adaptação gradual. A composição da dieta e a suplementação com aditivos afetam o microbioma fecal de equinos e sua resposta a mudanças dietéticas.

Palavras-chave: dieta completa, fermentação, fibra, microbiota, simbiótico

GENERAL ABSTRACT

FRANZAN, Bruna Caroline. **Diets, prebiotic and probiotic in the intestinal microbiome of equines**. 2021. 141p. Thesis (Doctorate in Animal Science). Animal Science Institute. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The intestinal microbiota plays important role in horse's nutrition and health. This work aimed to evaluate a complete extruded diet (CED) to fed horses and the dietary factors that influence the faecal microbiome. Horses fed a CED had lower water and fiber intakes, higher dry matter (DM), ether extract and gross energy intakes, and lower production and fecal pH. The DM, organic matter, ether extract, crude protein and crude energy digestibility were superior in the CED. The CED mean retention time (MRT) was shorter compared to the Coastcross hay diet (CHD), when obtained by LIPE[®] marker. CHD intake for 21 days increased the abundance of Actinobacteria. The gradual adaptation of horses to the CED intake affected the phylum Verrucomicrobia, Synergistetes, Tenericutes and Lentisphaerae. The inclusion of 30% CED in the diet affects the abundance of bacterial groups in the fermentative activity, however, the diversity of bacterial species in the feces was maintained until the moment of 60% CED and 40% CHD intakes. The abrupt diet change from CHD to CED resulted in a reduction in faecal pH 96 hours after change and a bacterial diversity reduction 24 hours after change. In addition, it affected the phyla Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Elusimicrobia and Actinobacteria. The abrupt change from CED to CHD resulted in a reduction in fecal pH 24 hours after the change and a bacterial species diversity increases of 96 hours after change. In addition, it affected the phyla Synergistetes and Lentisphaerae. Finally, both diet changes resulted in an increase in the abundance of OTUs classified as Bacteroidetes and *Treponema* 24 hours after change. Supplementation with prebiotic inulin (PRE), probiotic *Saccharomyces cerevisiae* (PRO) and symbiotic inulin + *S. cerevisiae* (SIM) did not influence the bacterial diversity species observed in the feces of foals during weaning. The supplementation with PRE increased the Bacilli class in the feces of suckling foals. The fecal pH of foals supplemented with PRE was higher than the control group. PRO and SIM supplementation increased the classes Erysipelotrichia and Saccharimonadia, respectively, after three days, however, the effect was not prolonged. In addition, there was a difference in fecal microbiomes between the sexes of foals. Therefore, it is concluded that CED can be used to feed horses, as long as a gradual adaptation is made. The composition of the diet and additives supplementation affect the fecal microbiome of horses and their response to dietary changes.

Keywords: complete diet, fermentation, fiber, microbiota, simbiotic

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	Dieta Completa Extrusada na Alimentação de Equinos: Consumo e Digestão Dos Nutrientes	
Tabela 1.	Composição química do feno de Coastcross (<i>Cynodon</i> spp. cv Coastcross) e da dieta completa extrusada, na base da matéria seca	24
Tabela 2.	Consumo dietético diário e de água dos equinos alimentados com feno de Coastcross e dieta completa extrusada	28
Tabela 3.	Consumo diário de nutrientes e energia bruta dos equinos alimentados com feno de Coastcross ou dieta completa extrusada	28
Tabela 4.	Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes (%) das dietas de feno de Coastcross e dieta completa extrusada	29
Tabela 5.	Tempo médio de retenção (TMR; horas) e taxa de passagem (TxP; % h ⁻¹) da fase sólida da digesta de equinos alimentados com feno de Coastcross e dieta completa extrusada estimados com os marcadores Cromo mordente e LIPE [®]	29
Tabela 6.	Parâmetros físico-químicos e de contagem bacteriana fecal de equinos alimentados com feno de Coastcross e dieta completa extrusada (CED)	30
Tabela 7.	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), produção total de gases (mL/g MS) e degradação da matéria seca dos substratos feno de Coastcross, feno de <i>Brachiaria brizantha</i> , dieta completa extrusada e dieta completa sem extrusão	30
CAPÍTULO II	Dieta Completa Extrusada Para Equinos: Impactos Sobre o Microbioma Fecal	
Tabela 1.	Composição química do feno de Coastcross e da dieta completa extrusada, na base da matéria seca	46
Tabela 2.	Consumo estimado de nutrientes durante o período experimental: dieta exclusiva de feno de Coastcross (CHD) e inclusões crescentes da dieta completa extrusada (CED)	47
Tabela 3.	Comparação dos índices de diversidade da comunidade bacteriana fecal de equinos alimentados com feno de Coastcross (CHD) ou inclusões crescentes da dieta completa extrusada (CED) nos diferentes momentos de adaptação	50
Tabela 4.	Valores médios dos parametros de fermentação <i>in vitro</i> dos substratos feno de Coastcross e concentrado incubados com fezes de equinos alimentados com feno de Coastcross (CHD) ou níveis crescentes de dieta completa extrusada (CED) em diferentes momentos de adaptação	57

CAPÍTULO III Respostas do Microbioma Fecal de Equinos Mangalarga Machador a Trocas Abruptas de Dietas

Tabela 1. Composição química do feno de Coastro e da dieta completa extrusada, na base da matéria seca 73

CAPÍTULO IV Desmame de Potros Suplementados com Prebiótico, Probiótico e Simbiótico: Efeitos no Microbioma Fecal

Tabela 1. Abundância relativa dos 13 principais filos bacterianos observados nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico *Saccharomyces Cerevisiae* Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) reagrupadas com base no período em relação ao desmame 103

Tabela 2. Abundância relativa das 9 principais classes bacterianas observadas nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico *Saccharomyces Cerevisiae* Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) reagrupadas com base no período em relação ao desmame 104

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	Dieta Completa Extrusada na Alimentação de Equinos: Consumo e Digestão Dos Nutrientes	
Figura 1.	Curvas de produção cumulativa de gases dos substratos feno de Coastcross (A), feno de <i>Brachiaria brizantha</i> (B), dieta completa extrusada (C) e dieta completa antes da extrusão (D) inoculados com fezes de equinos alimentados com feno de Coastcross ou dieta completa extrusada	31
CAPÍTULO II	Dieta Completa Extrusada Para Equinos: Impactos Sobre o Microbioma Fecal	
Figura 1.	Cronograma da coleta de amostras fecais para o ensaio de fermentação <i>in vitro</i> e análise de microbioma	46
Figura 2.	Curvas de rarefação do números de OTUs observadas em fezes de equinos alimentados com feno de de feno de Coastcross (CHD) ou inclusões crescentes de dieta extrusada completa (CED). Tons verdes (F) representam equinos alimentados CHD na semana 1; tons amarelos (H): equinos alimentados com CHD na semana 4; tons azuais (M): equinos alimentados com CHD na semana 1; tons de cinza (S): equinos alimentados com 30% de CED na semana 2; tons pretos (T): equinos alimentados com 60% CED na semana 3; tons laranjas (W): equinos alimentados com 100% CED na semana 4	49
Figura 3.	Filos bacterianos com abundância relativa superior a 1% observados nas fezes de equinos alimentados com dieta de feno de Coastcross (CHD) ou inclusões crescentes de dieta extrusada completa (CED) ...	51
Figura 4.	Filos bacterianos com abundância relativa menor que 1% observado em fezes de equinos alimentados com feno de Coastcross (CHD) ou inclusões crescentes de dieta extrusada completa (CED)	52
Figura 5.	Escala multidimensional não métrica (NMDS) da distribuição de OTUs pelo índice de similaridade Bray-Curtis com parâmetros de fermentação <i>in vitro</i> , pH e degradação de matéria orgânica, plotados como vetores. Escala de estresse expresso variando de 0 a 1. Verde: equinos alimentados com dieta de feno de Coastcross (CHD) na semana 1; Amarelo: equinos alimentados com CHD na semana 4; Azul: equinos alimentados com CHD na semana 1; Cinza: equinos alimentados com 30% de dieta extrusada completa (CED) na semana 2; Cinza escuro: equinos alimentados com 60% CED na semana 3; Laranja: equinos alimentados com 100% CED na semana 4	53
Figura 6.	Comparação da abundância relativa de todas as OTUs entre os dois grupos de equinos alimentados com dieta de feno de Coastcross (CHD) na semana 1 (A); equinos alimentados com CHD entre semana 1 e 4 (B); equinos alimentados com dieta extrusada completa (CED) entre as semanas 1 e 2 (C); equinos alimentados com CED entre as semanas 2 e 3 (D); equinos alimentados com CED entre as semanas 3 e 4 (E) e entre equinos alimentados com CHD e alimentados com CED na semana 4 (F). Apenas OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor do indicador maior que	54

60 foram representadas. A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G – Gênero

CAPÍTULO III Respostas Do Microbioma Fecal De Equinos Mangalarga Machador a Trocas Abruptas De Dietas

Figura 1.	Esquema de coleta de amostras fecais para análise do microbioma. As setas indicam o momento de coleta de fezes em 0, 24 e 96 horas após a mudança abrupta de dieta (T0, T24 e T96, respectivamente)	74
Figura 2.	Curvas de rarefação do número de OTUs observadas em fezes de equinos submetidos a troca abrupta da dieta. Linhas em tons de verde, azul e roxo são dos animais do Grupo A após 0, 24 e 96 horas, respectivamente, da mudança abrupta da dieta feno de Coastcross para a dieta completa extrusada; Linhas em tons de vermelho, laranja e amarelo são dos animais do Grupo B após 0, 24 e 96 horas, respectivamente, da adaptação abrupta da dieta completa extrusada para a dieta feno de Coastcross	76
Figura 3.	Número de OTUs observadas (A), índices de alfa diversidade de Chao1 (B), Shannon (C) e Simpson (D) da comunidade bacteriana de fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta do feno de Coastcross (CHD) para dieta completa extrusada (CED) e da dieta CED para CHD nos tempos 0 e 24 e 96 horas após a mudança abrupta da dieta (T0, T24 e T96, respectivamente)	78
Figura 4.	Ordenação multidimensional não-métrica (NMDS) usando o índice de similaridade de Bray-Curtis da distribuição de OTUs observadas nas fezes de equinos submetidos a uma mudança abrupta de dieta com valor de pH fecal plotado como vetor. A T0, amostras do Grupo A 0 horas após a mudança abrupta da dieta de feno de Coastcross (CHD) para dieta completa extrusada (CED); A T24, amostras do Grupo A 24 horas após a mudança abrupta de CHD para CED; A T96, amostras do Grupo A 96 horas após a mudança abrupta de CHD para CED; B T0, 0 horas após a mudança abrupta de CED para CHD; B T24, 24 horas após a mudança abrupta de CED para CHD; B T96, 96 horas após a mudança abrupta de CED para CHD	79
Figura 5.	<i>Heatmap</i> ilustrando filós bacterianos caracterizados com sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA (região v4) de amostras fecais coletadas de equinos após a troca abrupta de dieta entre feno de Coastcross e dieta completa extrusada (Grupo A) e entre a dieta completa extrusada e o feno de Coastcross (Grupo B) nos tempos 0 e 24 e 96 horas após a mudança abrupta da dieta (T0, T24 e T96, respectivamente). Escala à direita indica abundância relativa normalizada	80
Figura 6.	Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação entre as fezes de equinos após a adaptação (T0) às dietas feno de Coastcross (Grupo A) e dieta completa extrusada (Grupo B). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G – Gênero	81
Figura 7.	Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação das fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta entre feno de Coastcross para uma dieta completa extrusada nos tempos 0 e 24 horas após a mudança (T0 e T24, respectivamente). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G – Gênero	82

Figura 8.	Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação das fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta entre feno de Coastcross para uma dieta completa extrusada nos tempos 24 e 96 horas após a mudança (T24 e T96, respectivamente). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G - Gênero	82
Figura 9.	Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação das fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta entre uma dieta completa extrusada para feno de Coastcross nos tempos 0 e 24 horas após a mudança (T0 e T24, respectivamente). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G - Gênero	83
Figura 10.	Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação das fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta entre uma dieta completa extrusada para feno de Coastcross nos tempos 24 e 96 horas após a mudança (T24 e T96, respectivamente). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G - Gênero	83
Figura 11.	Ordenação multidimensional não-métrica (NMDS) usando o índice de similaridade de Bray-Curtis dos metagenomas funcionais preditos da comunidade bacteriana de fezes de equinos submetidos a uma mudança abrupta de dieta. Verde - amostras do Grupo A após a adaptação (T0) a dieta feno de Coastcross (CHD); Azul - amostras do Grupo A 24 horas após a mudança abrupta (T24) de CHD para a dieta completa extrusada (CED); Roxo - amostras do Grupo A 96 horas após a mudança abrupta (T96) de CHD para CED; Vermelho - amostras do Grupo B após a adaptação a CED (T0); Laranja - amostras do Grupo B 24 horas após a mudança abrupta de CED para CHD (T24); Amarelo - amostras do Grupo B 96 horas após a mudança abrupta de CED para CHD (T96)	84
Figura 12.	Abundância relativa das funções preditas da comunidade bacteriana de fezes de equinos submetidos a uma mudança abrupta de dieta entre feno de Coastcross para dieta completa extrusada (A) e entre dieta completa extrusada para feno de Coastcross (B)	85
CAPÍTULO IV	Desmame de Potros Suplementados com Prebiótico, Probiótico e Simbiótico: Efeitos no Microbioma Fecal	
Figura 1.	Esquema do período experimental e coleta de fezes dos potros para análise de microbioma	101
Figura 2.	Histograma geral da abundância relativa das 13 principais classes bacterianas observadas nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) coletadas em diferentes períodos em relação ao desmame agrupadas de acordo com o grau de similaridade. O Dendrograma	105

	foi pelo método UPGMA com base na matriz de Bray-Curtis calculada com base nos dados de abundância	
Figura 3.	Dispersões dos índices de diversidade bacteriana observados nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico <i>Saccharomyces Cereviseae</i> Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) agrupadas de acordo com o período em relação ao desmame	106
Figura 4.	Dispersões dos índices de diversidade bacteriana observados nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico <i>Saccharomyces Cereviseae</i> Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) agrupadas de acordo com o tempo de suplementação	106
Figura 5.	Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) de microbiomas bacterianos das fezes de potros do sexo masculino e feminino quando considerada a matriz de presença e ausência de ASVs	107
Figura 6.	Abundância diferencial de ASVs do microbioma bacteriano fecal entre potros machos e fêmeas testados utilizando a análise permutacional ANOVA (PERMANOVA). Apenas ASVs com variações significativas ($p < 0,01$) foram demonstradas (A). Famílias que predominam dentro de cada ordem (B)	108
Figura 7.	pH das fezes de potros do grupo controle e suplementos com probiótico probiótico <i>Saccharomyces Cereviseae</i> Sc47 (Sc47) a partir do dia 7 após o desmame (linha preta) comparado as fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS) até o dia 7 após o desmame e simbiótico (FOS + Sc47) do dia 7 ao 21 pós desmame (linha vermelha)	109
Figura 8.	Correlações dos 50 principais táxons bacterianos atribuídos a famílias com a idade e pH fecal de potros. Foi utilizado o coeficiente de correlações de Spearman, onde os valores de ρ foram calculados usando o algoritmo AS 89 e o p-value exato computado por Spearman's ρ , caso contrário, através da aproximação t assintótica. Códigos de significância (p): ‘****’ 0,001, ‘***’ 0,01, e ‘*’ 0,05	110

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem
AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
AOAC – Association of Official Analytical Chemistry
AVS – Variantes de sequência de amplicon
CED – Dieta completa extrusada
CHD – Dieta de feno de Coastcross
CNF – Carboidratos não fibrosos
CO₂ – Dióxido de carbono
CV – Coeficiente de variação
DGGE – Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EB – Energia bruta
ED – Energia disgestível
EE – Extrato etéreo
FB – Fibra bruta
FDA – Resíduo insolúvel em detergente ácido
FDN – Fibra insolúvel em detergente neutro
g – Grama
H₂ – Hidrogênio gasoso
Kg – Kilograma
Lig – Lignina
LIPE – Lignina Isolada, Purificada e Enriquecida
mL – Mililitro
MM – Matéria mineral
MO – Matéria orgânica
MS – Matéria seca
NMDS – Escalonamento multidimensional não métrico
O₂ – Oxigênio gasoso
OTU – Unidade taxonômica operacional
p – Valor de significância
PB – Proteína bruta
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial hidrogeniônico
PRE – Prebiótico inulina de chicória
PRO – Probiótico *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47
PV – Peso vivo
rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico
SIM – Simbiótico inulina de chicória + *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47
SNK – Student Newman Keuls
T0 – 0 horas após a troca abrupta da dieta
T24 – 24 horas após a troca abrupta da dieta
T96 – 96 horas após a troca abrupta da dieta
TGI – Trato gastrointestinal
TMR – Tempo médio de retenção
UFC – Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Dieta Completa na Alimentação de Equinos	02
2.2 Metodologias Utilizadas para Análise da Microbiota do Trato Gastrointestinal de Equinos	04
2.3 Microbioma do Trato Digestório dos Equinos	05
2.3.1 Microbiota no estômago	06
2.3.2 Microbiota no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo)	06
2.3.3 Microbiota no intestino grosso (ceco e cólon)	06
2.3.4 Microbiota fecal	08
2.4 Microbioma Intestinal dos Potros	09
2.5 Fatores que afetam o Microbioma do Trato Digestório dos Equinos	13
2.5.1 Composição das dietas	13
2.5.2 Probióticos	16
2.5.3 Prebióticos	16
2.5.4 Doenças	17
2.5.5 Antimicrobianos	18
2.5.6 Individualidade dos animais	18
CAPÍTULO I - Dieta Completa Extrusada na Alimentação de Equinos: Consumo e Digestão Dos Nutrientes	
1 Introdução	23
2 Material e Métodos	23
3 Resultados	28
4 Discussão	43
5 Conclusão	47
6 Referências Bibliográficas	47
CAPÍTULO II – Dieta Completa Extrusada para Equinos: Impactos sobre o Microbioma Fecal	
1 Introdução	55
2 Material e Métodos	56
3 Resultados	59
4 Discussão	69
5 Conclusão	74
6 Referências Bibliográficas	75
CAPÍTULO III – Respostas do Microbioma Fecal de Equinos Mangalarga Machador à Trocas Abruptas de Dieta	
1 Introdução	83
2 Material e Métodos	83
3 Resultados	87
4 Discussão	97

5 Conclusão	102
6 Referências Bibliográficas	102
CAPÍTULO IV – Desmame de Potros Suplementados com Prebiótico, Probiótico e Simbiótico: Efeitos no Microbioma Fecal	
1 Introdução	110
2 Material e Métodos	110
3 Resultados	113
4 Discussão	121
5 Conclusão	124
6 Referências Bibliográficas	125
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
ANEXOS	
A – Números de Acesso	140
B – Protocolo da Comissão de Ética no Uso Animal referente aos Capítulos I, II e III	140
C – Protocolo da Comissão de Ética no Uso Animal referente ao Capítulo IV	141

1 INTRODUÇÃO GERAL

Ao analisar o complexo produtivo de equinos, é possível observar que os setores de alimentação/nutrição e medicamentos veterinários estão envolvidos em todas as fases da produção. Estima-se que o setor de alimentação dos equinos movimentava valores superiores a R\$ 1,4 bilhão, enquanto o setor de medicamentos veterinários movimentava cerca de R\$ 220,5 milhões por ano, com potencial de crescimento (MAPA, 2016). Dada a importância econômica da equinocultura no cenário nacional, é de suma importância o aprimoramento desses setores na cadeia produtiva.

Os equinos são classificados como herbívoros não ruminantes que evoluíram consumindo uma dieta com alto teor de fibra e baixo teor de nutrientes solúveis rapidamente fermentescíveis (JULLIAND e GRIMM, 2017). Desse modo, a espécie é dependente da relação simbiótica com a microbiota intestinal para o aproveitamento da energia oriunda dos polissacarídeos da parede celular vegetal (COSTA et al., 2012). Estima-se que 50-70% da exigência energética dos equinos é oriunda dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos na fermentação que ocorre no intestino grosso (NRC, 2007). O manejo alimentar inadequado, sobretudo a mudança nesse manejo, foi associado a um aumento do risco de distúrbios gastrointestinais por causar disbiose intestinal (CURTIS et al., 2019; GARBER et al., 2020). Assim, o conhecimento da ecologia microbiana do trato gastrointestinal e dos gêneros e espécies de interesse nutricional e sanitário é fundamental na produção de equinos.

Os estudos sobre a microbiota do trato gastrointestinal de equinos se intensificaram a partir da década de 90, até então era considerada como uma caixa preta (JULLIAND e GRIMM, 2016). À medida que novas tecnologias de sequenciamento se tornaram mais acessíveis, houve um aumento na compreensão da microbiota intestinal dos equinos (COSTA et al., 2016). O termo “microbioma” foi introduzido nos estudos de equinos em 2012 (COSTA et al., 2012; 2018). Desde então, estudos foram realizados para investigar potenciais fatores de modulação do microbioma intestinal equino. Por definição, o termo “microbioma” refere-se ao conjunto de microrganismos que habitam um nicho biológico específico, incluindo seu conteúdo genômico e produtos metabólicos (MARCHESI e RAVEL, 2015). O microbioma do trato gastrointestinal de equinos, conhecido atualmente, é composto por protozoários, fungos, bactérias, arqueias e bacteriófagos (JULLIAND e GRIMM et al., 2016; EDWARDS et al., 2020). Entretanto, os estudos focaram principalmente na avaliação da comunidade bacteriana por acreditar-se que é a comunidade mais importante na manutenção da homeostase do ecossistema intestinal (COSTA e WEESE, 2018).

A presente tese é composta por quatro capítulos que tiveram como objetivo: I) avaliar uma dieta completa extrusada na alimentação de equinos; II) caracterizar a microbiota fecal de equinos adultos em manutenção alimentados com dieta completa extrusada; III) avaliar os efeitos da troca abrupta entre dieta exclusiva de feno de Coastcross e dieta completa extrusada sobre o microbioma fecal de equinos; IV) descrever mudanças do microbioma fecal de potros suplementados com prebiótico, probiótico e simbiótico no período de desmame.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dieta Completa na Alimentação de Equinos

O conceito de dietas completas na alimentação de equinos é conhecido há muito tempo. Os primeiros registros do uso desse tipo de dieta são de 1936, onde foram utilizadas para alimentação dos cavalos dos exércitos alemão e russo (EARLE, 1950). Entre as vantagens do uso desse tipo de dieta, foram destacadas: a economia de trabalho na alimentação, especialmente quando há um grande número de animais, economia de espaço no armazenamento e transporte, praticabilidade de utilização de subprodutos na formulação da dieta, homogeneização de nutrientes e redução de partículas finas e mofo (EARLE, 1950; NAGATA, 1970). Assim, esses produtos ricos em fibra devem ser considerados, em termos de digestibilidade, aceitabilidade, como alimentos diferentes dos cereais e alimentos concentrados tradicionais (MIRAGLIA et al., 2006).

Hintz & Loy (1966) estudaram o efeito da peletização da ração completa destinada ao consumo de potros sobre a digestibilidade, taxa de passagem da digesta e o tempo de consumo e o ganho de peso. Após 63 dias, os autores não observaram diferença no ganho de peso dos animais e na digestibilidade da proteína bruta (PB), fibra bruta (FB) e carboidratos não fibrosos (CNF) da ração. Entretanto, observaram aumento da digestibilidade do extrato etéreo (EE) e da taxa de passagem e menor tempo de consumo quando a ração foi peletizada, além de fezes com menor teor de matéria seca (MS). Assim, os autores destacaram que a moagem para confecção dos pellets acarretou menor tempo de consumo e maior taxa de passagem da digesta o que levaria a um aumento no consumo da ração. Por isso, a dieta completa foi muito utilizada posteriormente para estudar os efeitos do tamanho de partícula da dieta nos parâmetros nutricionais em equinos.

Em outro experimento, pellets completos a base de alfafa e milho com 19 mm de diâmetro foram comparados com feno prensado em bolachas e feno de alfafa solta na alimentação de pôneis. Após 28 dias, os autores observaram que os animais alimentados com os pellets tiveram maior ganho de peso do que quando o feno foi ofertado solto, o que foi creditado ao aumento do consumo voluntário diário de 24% a mais (3,9 kg de MS). Apesar da redução da digestibilidade da FB, outros nutrientes não foram afetados pelo aumento do consumo. Além disso, a ração peletizada foi associada ao comportamento estereotipado de mastigação de madeira (HAENLEIN et al. 1966).

Levando em consideração a exigência nutricional de cavalos de corrida em crescimento e consumo ideal de ração em cada estágio de crescimento, Nagata (1970) sugeriu o uso e descreveu ingredientes e a formulação de rações completas peletizadas, assim como o tamanho dos pellets (10 mm de diâmetro e 12 mm de comprimento). Posteriormente, Nagata et al. (1970) relataram que a ração completa foi bem aceita pelos equinos, que não apresentaram comportamento estereotipados com o consumo de 2% do peso vivo (PV), fornecidos quatro vezes ao dia.

Uma década depois, a digestão de uma dieta completa por ponês foi descrita (WOLTER et al., 1980). A dieta formulada continha 42% de alimento volumoso e 55% de alimento concentrado (12,8% de PB e 18,2% de celulose) e os autores observaram digestibilidade aparente total de 63,4% para MS, 74,1% para PB, 51,2% para celulose e 98% para o amido. Foi observado alta concentração de ácido láctico (21,1 mM L⁻¹) no estômago que foi creditada à fermentação inicial dos carboidratos rapidamente fermentescíveis da dieta pela microbiota láctica que se beneficia de um pH suficientemente baixo no órgão. E, apesar do fornecimento da dieta ter sido calculado em 3% do PV dos animais e oferecida em apenas duas refeições, os pôneis foram capazes de digerir 93% do amido fornecido até o intestino delgado, onde a proporção de ácido propiônico foi maior. Além disso, foi observado redução do pH entre o ceco

e o cólon distal de 6,61 para 6,08, apesar das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) de 164,9 mM L⁻¹ no ceco e 86,6 mM L⁻¹ no cólon distal, onde a proporção de ácido acético foi predominante. Além disso, pelas características da digesta após o consumo de dietas completas, foi demonstrado que esse tipo de dieta resulta em maior secreção de insulina e maior e mais prolongada secreção de gastrina em equinos em manutenção (SMYTH et al., 1989).

Entretanto, a digestibilidade aparente da dieta completa depende dos ingredientes utilizados na formulação do alimento. Utilizando o método de coleta total de fezes e o indicador óxido de cromo, a digestibilidade aparente de uma dieta completa comercial (11,3% de PB e 22,7% de FB) foi avaliada em equinos adultos. Desse modo, os coeficientes de digestibilidade da MS, matéria orgânica (MO) e energia bruta (EB) observados foram de cerca de 50%, os coeficientes de digestibilidade da PB e EE foram de 70%, enquanto a digestibilidade da FB foi de 24%, o que resultou em um consumo de proteína e energia digestível (ED) de 83 g e 2180 kcal por kg de MS (PARKINS et al., 1982).

O padrão normal de alimentação dos equinos é de pequenas refeições em intervalos frequentes. Os equinos soltos pastam cerca de 12 horas dia⁻¹, divididos em refeições de 2 a 3 horas. Os períodos de pastoreio são separados por períodos de repouso e de atividade locomotora ou social (RALSTON, 1984). Quando estabulados, mas com livre acesso à alimentação, adotam padrões de alimentação semelhantes aos descritos em condições de vida livre (RALSTON, 1984). Em um experimento utilizando uma ração completa peletizada *ad libitum* na alimentação de pôneis, foi observado que os animais passaram 38% de um período de 24 horas (9,12 horas) em atividade alimentar, consumindo 10 refeições dia⁻¹, onde, cada refeição teve em média 0,5 kg e durou cerca de 45 minutos (RALSTON et al., 1979). Por isso a redução no tempo de consumo causada pelo fornecimento de uma dieta mais densa, como a dieta completa, foi associada a comportamentos estereotipados (HAENLEIN et al. 1966; PARKINS et al., 1982). Além disso, os equinos não pôneis jejuam voluntariamente por mais de 3 a 5 horas (RALSTON, 1984), dessa forma, o pequeno número de refeições por dia pode exacerbar esses comportamentos (ELIA et al., 2010). Ainda assim, o alimento completo foi recomendado na nutrição clínica em algumas situações, como equinos com sepse, traumas ou queimaduras, diarreia crônica, ressecção cirúrgica do intestino, casos de enterolitos, e equinos idosos (RALSTON, 1990).

Uma das alternativas de utilização do alimento completo na produção de equinos é a utilização de sistemas de alimentação. Para funcionar como um produto de livre escolha, o alimento extrusado deve ter baixa densidade energética e fornecer o volumoso ou densidade aparente adequada ao sistema digestivo equino (OTT et al., 1999). Apesar da redução da digestibilidade da fibra em detergente ácido (FDA), os autores sugerem a utilização do alimento completo extrusado para éguas desde que seja controlado o fornecimento e que os animais estejam em ambientes espaçosos que ofereçam condições de atividade voluntária.

A dieta completa também foi avaliada na alimentação de equinos de tração do exército suíço (RIOND et al., 2000). A dieta completa foi comparada com uma dieta a base de feno e aveia e outra à base de concentrado peletizado e feno. Os autores não observaram diferenças significativas na digestibilidade de nutrientes entre as três dietas, apesar da dieta completa ter sido consumida mais rápido e em maior quantidade. Argo et al. (2002) testaram o consumo da dieta completa peletizada comparada a mesma dieta sem processamento e observaram que os pôneis consumiam mais a dieta completa (11,40 kg dia⁻¹) comparado a dieta sem processamento (9,85 kg dia⁻¹). Além disso, a dieta completa acarretava em maior taxa de consumo de MS, pois exigia um menor número de movimentos mastigatórios (ARGO et al., 2002).

Como os ingredientes utilizados na formulação da dieta completa tem efeito no consumo e digestibilidade, foi demonstrado que, quando aumenta a inclusão de polpa de beterraba na dieta completa, o consumo voluntário pode diminuir em cerca de 50%, mesmo quando a dieta é oferecida *ad libitum*. Além disso, a redução do consumo de MS é acompanhada pelo aumento

da digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN), FDA e EB e da redução da digestibilidade de PB (HYSLOP, 2002).

A dieta completa também foi avaliada na alimentação de potros desmamados, onde os animais alimentados com essa dieta apresentaram maior ganho de peso, quando comparados aos potros alimentados com feno e concentrado separadamente (ANDREW et al., 2006). Os autores evidenciam que pesquisas usando dietas completa na alimentação de equinos são muito limitadas.

Como apontado no NRC (2007), o processamento físico das dietas completas pode aumentar a utilização da ração. As diferenças no tamanho de partícula da ração podem influenciar a eficiência de ganho, digestibilidade e consumo. Entretanto, é necessário avaliar a complexidade da tecnologia de processamento da dieta e as condições em que cada ensaio foi conduzido para concluir sobre a utilização da dieta completa em sistemas de criação de equinos, pois a resposta dos animais pode ser influenciada por diferenças nos ingredientes da ração, manejo alimentar e tecnologias de processamento.

2.2 Metodologias Utilizadas para Análise da Microbiota do Trato Gastrointestinal de Equinos

Atualmente não existe um Padrão Ouro para avaliação da microbiota e os testes disponíveis têm vantagens e limitações inerentes. Entretanto, é inegável que a evolução da metodologia de teste independente de cultura expandiu a compreensão da ecologia microbiana. A compreensão da composição e função da microbiota intestinal de equinos é limitada quando comparação a outras espécies de animais de produção. Entretanto, à medida que os métodos de caracterização da microbiota e sua composição genética evoluíram, a complexidade dessa microbiota passou a ser conhecida (COSTA e WEESE, 2012).

Os estudos iniciais que avaliaram a microbiota intestinal dos equinos basearam-se na cultura bacteriana, apesar da suposição de que uma porcentagem significativa de organismos não era cultivável usando técnicas padrão (COSTA e WEESE, 2012). Logo, tornou-se difícil saber se a incapacidade de detectar mudanças ou diferenças na microbiota realmente reflete uma falta de diferenças entre as amostras ou populações ou limitações na sensibilidade do teste. Ainda assim, estudos baseados em cultura foram utilizados para testar a influência de inúmeros fatores sobre a microbiota intestinal, como dieta, suplementos, transporte, antimicrobianos (JULLIAND e GRIMM, 2016).

Posteriormente, abordagens híbridas com a associação do cultivo preliminar seguido da identificação dos microrganismos por meio de técnicas moleculares deram um pequeno avanço na compreensão de diversidade microbiana intestinal de equinos. Willing et al. (2009) identificaram espécies de bactérias do ácido láctico por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA após cultivo em meio seletivo.

Posteriormente, métodos moleculares completamente independentes de cultura foram utilizados para recuperar as informações de microrganismos não cultiváveis. Em um estudo que avaliou a diversidade bacteriana intestinal de equinos por meio da clonagem de produtos de PCR, foi observado predominância de dois filos principais, bactérias Gram-positivas de baixo G-C% (Firmicutes) e o grupo Cytophaga / Flexibacter / Bacteroides (CFB) após a avaliação de 272 sequências (DALY et al., 2001). O estudo de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição terminal (TRFLP) também foi utilizado na pesquisa com equinos, entretanto, apenas 67 sequências foram recuperadas (WILLING et al., 2009).

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) de produtos de PCR do 16S rRNA fornece informações para comparar amostras ou populações, mas é limitado quanto a informação das diferenças identificadas. Esse método foi utilizado para avaliar a diversidade de bactérias do ácido láctico (ENDO et al., 2007; 2009), os efeitos da penicilina ou anestesia na riqueza bacteriana fecal, onde não apontou variações após a aplicação dos tratamentos

(GRØNVOLD et al., 2010). Além disso, o método foi utilizado para aumentar a compreensão sobre a colonização do trato gastrointestinal (TGI) de potros, onde foi possível observar o aumento da riqueza de espécies até 60 dias de idade, momento que o número de bandas se assemelhava com o observado em éguas adultas (FAUBLADIER et al., 2013; 2014).

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada em um estudo do estômago de equinos, que relatou diferenças significativas da distribuição de *Streptococcus* spp. em diferentes regiões do estômago, devido sua maior sensibilidade de avaliação de microrganismos específicos de baixa abundância. Além disso, foi utilizada para avaliar alterações na microbiota cecal em laminite induzida por oligofrutose, onde foi observado a proliferação de *Streptococcus lutetiensis* antes do início da laminite, seguida de alterações nas populações de *Lactobacillus* e *Escherichia coli* após o início da doença (MILINOVICH et al., 2007; 2008).

Finalmente, a disponibilidade de sequenciamento de nova geração e refinamento de plataformas de bioinformática revolucionou o estudo da microbiologia gastrointestinal. Nos últimos anos foram publicados artigos que utilizaram várias plataformas de sequenciamento para avaliar a influência temporal (SALEM et al., 2018), tipo e composição da dieta (SHEPHERD et al., 2012; FERNANDES et al., 2014; HANSEN et al., 2015; MORRISON et al., 2020), suplementos, clima (SALEM et al., 2018), domesticação (METCALF et al., 2017), interações sociais (ANTWIS et al., 2018), idade (ELZINGA et al., 2016), condição de escore temporal (ELZINGA et al., 2016; MORRISON et al., 2018), antimicrobianos (COSTA et al., 2015b), exercício (ALMEIDA et al., 2016), entre outros.

2.3 Microbioma do Trato Digestório dos Equinos

Os equinos são animais herbívoros, pastejadores e dependentes da simbiose com os microrganismos do TGI para digestão dos polissacarídeos da parede celular vegetal, e consequentemente, para obtenção de energia. A disbiose no ecossistema do intestino grosso está relacionada a distúrbios como a cólica e laminite (COSTA e WEESE, 2018). A composição específica da microbiota difere de acordo com a localização no TGI. Além disso, a microbiota intestinal equina pode ser alterada por inúmeros fatores, incluindo idade, dieta e doença (COSTA e WEESE, 2018). Por inúmeros fatores, ainda não está claro qual é a composição específica de uma comunidade microbiana equina normal (STEELMAN et al., 2012). Por exemplo, pode haver diferença quanto a variações individuais na composição do microbioma intestinal de equinos sob as mesmas condições ambientais e de manejo (PROUDMAN et al., 2015; SALEM et al., 2018).

O microbioma do TGI é composto por protozoários, fungos, bactérias, arqueias e bacteriófagos (JULLIAND e GRIMM et al., 2016). Entretanto, a presença desses microrganismos não foi demonstrada em cada segmento do TGI (CANN et al., 2005; SADET-BOURGETEAU et al., 2010). Cada compartimento do intestino equino constitui um ecossistema individual como uma entidade dinâmica composta por seus próprios componentes biológicos e ambientais. O componente biológico engloba os diferentes microrganismos que vivem dentro desses ecossistemas intestinais, e seus genomas compõem o microbioma do intestino grosso. Assim, o microbioma pode ser caracterizado pela composição da comunidade microbiana, sua diversidade e estrutura e, as funções metabólicas e produtos finais resultantes do metabolismo microbiano (JULLIAND e GRIMM, 2016). Devido as dificuldades metodológicas, a informação sobre a microbiota de alguns segmentos anatômicos é limitada. Alguns estudos foram conduzidos em equinos abatidos, ou anestesiados, e até mesmo em animais equipados com cânulas permanentes colocadas cirurgicamente (SADET-BOURGETEAU et al., 2010).

2.3.1 Microbiota no estômago

As informações disponíveis sobre os microbiomas do TGI dos equinos reportam principalmente os relacionados aos processos de fermentação no intestino grosso, entretanto, a fermentação que ocorre no estômago também pode se mostrar extensa em determinadas condições dietéticas, além de apresentar correlação com a saúde desse órgão (AL JASSIM e ANDREWS, 2009). Não há relatos de bacteriófagos, fungos e protozoários no estômago, mas esse segmento pode apresentar concentrações de bactérias anaeróbias totais entre 10^6 - 10^9 UFC mL⁻¹ de conteúdo gástrico (DE FOMBELLE et al., 2003; VARLOUD et al., 2007).

As bactérias envolvidas no metabolismo do amido e carboidratos rapidamente fermentescíveis (produtoras e utilizadoras de lactato) constituem a microbiota predominante (concentração), e é reconhecido que o *Lactobacillus* e o *Streptococcus* são os principais gêneros (VARLOUD et al., 2007). As bactérias celulolíticas foram observadas no estômago equino em números muito baixos (menos de 10^2 UFC mL⁻¹) (KERN et al., 1974; DE FOMBELLE et al., 2003). Além disso, existe especificidade entre as bactérias que colonizam o estômago. Yuki et al. (2000) destacaram que *L. crispatus*, *L. reuteri* e *L. s. agilis* foram específicos para a mucosa do estômago e não foram encontrados no conteúdo estomacal. Enquanto, *L. mucosae* e *L. delbrueckii* seriam exclusivos do suco gástrico (AL JASSIM et al., 2005). A espécie *Lactobacillus salivarius* foi observado tanto na mucosa do estômago como no quimo (YUKI et al., 2000; AL JASSIM et al., 2005).

2.3.2 Microbiota no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo)

Não há relatos de bacteriófagos, fungos e protozoários nos segmentos do intestino delgado, duodeno, jejuno e íleo, mas esses segmentos podem apresentar concentrações de bactérias estritamente anaeróbias entre 10^6 a 10^9 UFC mL⁻¹ de digesta (DE FOMBELLE et al., 2003), onde o duodeno é o segmento do intestino delgado que apresenta menor contagem (MACKIE e WILKINS, 1988).

Assim como no estômago, as bactérias envolvidas no metabolismo do amido e carboidratos rapidamente fermentescíveis (produtoras e utilizadoras de lactato), como as dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterobacteria*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, são predominantes no intestino delgado (KOLLARCZIK et al., 1992). As concentrações de *Lactobacillus* são menores no intestino delgado do que no estômago, enquanto as contagens de *Streptococcus* são maiores. Segundo De Fombelle et al. (2003), essa diferença está relacionada ao maior valor do pH no conteúdo ileal comparado ao estômago. Também como no estômago, as bactérias celulolíticas foram observadas no jejuno-íleo equino em números muito baixos ($3,0 \times 10^2$ UFC mL⁻¹) (KERN et al., 1974; DE FOMBELLE et al., 2003). Além disso, o intestino delgado é um local importante para a proteólise microbiana (KERN et al., 1974). As concentrações de bactérias proteolíticas foram encontradas entre 10^6 - 10^7 UFC mL⁻¹ de conteúdo do intestino delgado (MACKIE e WILKINS, 1988). No duodeno, essas bactérias representam cerca de 58% das bactérias cultiváveis, ao passo que seriam 19 e 42% no jejuno e no íleo, respectivamente (MACKIE e WILKINS, 1988).

2.3.3 Microbiota no intestino grosso (ceco e cólon)

Os componentes do alimento não digeridos no intestino delgado (15% para amido, 5% a 10% de extrato etéreo, 10% a 70% de proteína, 85% a 95% para carboidratos da parede celular) são fermentados por uma população microbiana no intestino grosso para a produção de AGCC (acetato, butirato e propionato, principalmente), massa microbiana, metano e calor de fermentação (SANTOS et al., 2011). De forma geral, o intestino grosso oferece um ambiente propício com características físico-químicas ideais para o crescimento e atividade fermentativa de microrganismos, possui um pH perto da neutralidade e uma taxa de passagem mais lenta do que a do intestino delgado (JULLIAND et al., 2001; VAN WEYENBERG et al., 2006).

Os bacteriófagos foram descritos no conteúdo intestinal de equinos pela primeira vez em 1970 por Alexander et al. (1970), porém, nesse estudo não foi detectado a quantidade.

Os protozoários foram descritos no ceco equino por Gruby e Delafond em 1843. Observações microscópicas mostraram que a maioria dos protozoários intestinais equinos eram ciliados e próximos aos encontrados no rúmen (GEYER e DREPPER, 1973). A concentração, composição e abundância dos protozoários varia de acordo com a região do intestino grosso. De acordo com Dougal et al. (2012), o cólon dorsal direito possui maior concentração de DNA ribossômico de protozoários do que o ceco. As contagens de células nesse segmento é de 10^3 a 10^6 células mL^{-1} de conteúdo cecal ou colônico (KERN et al., 1973, 1974). Até o momento, cerca de trinta gêneros foram identificados no intestino grosso dos equinos: *Allantosoma*, *Alloiozona*, *Bleoharconus*, *Blepharocorys*, *Blepharoprosthium*, *Bundleia*, *Cycloposthium*, *Didesmis*, *Holophryoides* e *Paraisotricha* encontrados no ceco, no cólon e nas fezes equinas. *Ampullacula*, *Blepharosphaera*, *Ditoxum*, *Prorodonopsis*, *Spirodinium*, *Tetratoxum*, *Triadinium* e *Tripalmaria* encontrados no cólon e nas fezes equinas (SADET-BOURGETEAU et al., 2010). Apesar da existência de protozoários em todos os compartimentos do intestino grosso dos equinos, sua função pode não estar associada à digestão da fibra e permanece desconhecida (JULLIAND e GRIMM, 2016).

Os dados sobre a população fúngica do intestino grosso equino permaneceram inconsistente por muito tempo. Em 1961, leveduras pertencentes aos gêneros *Candida* e *Torulopsis* e *Geotrichum candidum* foram isolados a partir do conteúdo do ceco de equinos (BATISTA et al., 1961). Posteriormente, outros fungos estritamente anaeróbicos foram isolados do intestino grosso (ORPIN, 1981; GAILLARD-MARTINIE et al., 1995; JULLIAND et al., 1998). No ceco, foram contados de 10^2 a 10^4 zoósporos mL^{-1} (ORPIN, 1981; JULLIAND et al., 1998). Os fungos observados foram classificados como microscópicos, anaeróbios e pertenciam à classe Phycomycetes, gênero *Piromyces* (ORPIN, 1981). As cepas equinas de *Piromyces citronii* apresentaram características morfológicas, metabólicas e genéticas específicas (GAILLARD-MARTINIE et al., 1995; JULLIAND et al., 1998). Elas exibiram uma taxa de crescimento *in vitro* mais rápida em comparação com cepas do rúmen (JULLIAND et al., 1998), o que poderia estar relacionado a uma adaptação fisiológica da espécie equina ao menor tempo de retenção de partículas no intestino equino comparado ao rúmen. Além disso, foi relatado que *P. equi* possuía a região de codificação para a exoglucanase, enzima importante na hidrólise de celulose (HARHANGI et al., 2003). Mais recentemente, Dougal et al. (2012), utilizaram primers que anelam na região conservada do gene do RNAr 5.8S e detectaram fungos em todas as amostras de conteúdo do ceco e cólon. Além disso, não foi encontrada diferença significativa entre as diferentes regiões intestinais ou entre animais. Apesar da baixa concentração, os fungos anaeróbicos são potencialmente capazes de desempenhar um papel importante na degradação da fibra que ocorre no intestino grosso dos equídeos (ORPIN, 1981). Entretanto, a sua implicação na degradação da fibra necessita de mais estudos (JULLIAND e GRIMM, 2016).

Assim como os fungos, existem poucos estudos sobre a população de arqueias no intestino grosso de equinos. Segundo Morvan et al. (1996), há cerca de 10^4 a 10^6 células g^{-1} de conteúdo cecal úmido. Em um estudo mais recente descobriu-se que arqueias metanogênicas são mais abundantes no cólon do que no ceco (DOUGAL et al., 2012). Acredita-se que a sua função está associada com aumento da atividade de degradação de carboidratos das bactérias celulolíticas no intestino grosso, assim como no rúmen, mas há necessidade de mais estudos com equinos (JULLIAND e GRIMM, 2016).

Nos diferentes segmentos do intestino grosso (ceco, cólon ventral direito e esquerdo, cólon dorsal esquerdo e direito, cólon transversal e cólon descendente) foi relatada uma grande quantidade de bactérias anaeróbias totais, que variaram entre 10^7 a 10^{11} células mL^{-1} de conteúdo cecal ou colônico. Assim, em termos de quantidade, a comunidade bacteriana

representa a maioria da microbiota intestinal (SADET-BOURGETEAU e JULLIAND, 2012). No ceco equino, algumas bactérias colonizam o meio líquido enquanto outros aderem a fragmentos de plantas (BONHOMME, 1986). As polissacaridasas envolvidas na degradação da fibra originam-se principalmente de bactérias ligadas a partículas no conteúdo do ceco e do cólon (JOUANY et al., 2009). Até 2001, a comunidade bacteriana era sub representada, pois apenas 5% das sequências bacterianas correspondiam a organismos conhecidos cujas sequências estavam disponíveis em bancos de dados públicos (DALY et al., 2001).

Atualmente, com as técnicas independentes de cultura, estudos filogenéticos mostraram que dentro do conteúdo do ceco e do cólon, Firmicutes e Bacteroidetes são os dois filos mais abundantes (DOUGAL et al., 2013; MOREAU et al., 2014; HANSEN et al., 2015), que representam de 20-59% e 2-65%, respectivamente, do total de bactérias. Além desses, também são encontrados Proteobacteria (0-14%), Verrucomicrobia (0-24%), Spirochaetes (1- 9%), Fibrobacteres (1-7%), Actinobacteria (0-2%) e Tenericutes (JULLIAND e GRIMM 2016). A prevalência numérica de Firmicutes sugere que este seja o maior grupo funcional dentro dos ecossistemas intestinais; e, de fato, contém a maioria dos organismos fibrolíticos, tais como *Clostridium* spp., *Ruminococcus* spp., *Butirivibrio* spp. e *Eubacteria* spp. A diversidade bacteriana parece ser diferente entre o cólon e o ceco e parece ser maior no cólon. As espécies *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* foram consideradas as principais bactérias celulolíticas (em ordem decrescente) identificadas no intestino grosso dos equinos (JULLIAND et al., 1999; DALY et al., 2001; HASTIE et al., 2008). Os membros da família Spirochaetaceae demonstraram ser os principais produtores de acetato usando H₂/CO₂ como substrato para a acetogênese (DALY e SHIRAZI-BEECHEY, 2003).

Além disso, a concentração de vários grupos funcionais de bactérias no ceco e cólon equino é conhecida: glicolíticas (10⁸ UFC mL⁻¹, para ambos), amilolíticas (10⁸ UFC mL⁻¹, para ambos), bactérias utilizadoras de lactato (10⁵ a 10⁸ UFC mL⁻¹, para ambos), celulolíticas (10⁴ a 10⁷ e 10⁴ a 10⁸ UFC mL⁻¹, respectivamente), hemicelulolíticas (10⁷ a 10⁸ e 10⁶ a 10⁸ UFC mL⁻¹, respectivamente), pectinolíticas (10⁷ a 10⁸ e 10⁶ a 10⁷ UFC mL⁻¹, respectivamente) e proteolíticas (10⁸ e 10⁶ a 10⁸ UFC mL⁻¹, respectivamente (SADET-BOURGETEAU e JULLIAND, 2012).

Os gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus* juntamente com as bactérias utilizadoras de lactato são considerados as principais bactérias glicolíticas e amilolíticas (JULLIAND et al., 2001; DE FOMBELLE et al., 2003). Assim atualmente, são enumerados em placas de Petri como indicativos do metabolismo bacteriano no intestino grosso. As espécies *Streptococcus bovis*, *S. equinos*, *Lactobacillus salivarius*, *L. mucosae*, *L. delbrueckii* e *Mitsuokella jalaludinii* foram descritas como as principais bactérias produtoras de ácido láctico do intestino grosso (AL JASSIM et al., 2005; JULLIAND e GOACHET, 2005). Enquanto *Veillonella* spp. e *Megasphaera* seriam as principais bactérias que utilizadoras de lactato no intestino grosso dos equídeos (BARUC et al., 1983; MACZULAK et al., 1985). Em geral, as populações bacterianas encontradas na parte proximal do intestino grosso diferem das encontradas na parte distal, com a mudança ocorrendo na flexura pélvica (HASTIE et al., 2008; DOUGAL et al., 2012, 2013; SADET-BOURGETEAU et al., 2014; COSTA et al., 2015a).

2.3.4 Microbiota fecal

Na última década houve aumento no número de estudos que avaliaram o microbioma do TGI de equinos através das fezes como um indicativo da atividade fermentativa no ceco e cólon (ENDO et al., 2009; GOACHET et al., 2010; EARING et al., 2012; BIDDLE et al., 2013; BLACKMORE et al., 2013; FAUBLADIER et al., 2013, 2014; FERNANDES et al., 2014; COSTA et al., 2016; ELZINGA et al., 2016; FLIEGEROVA et al., 2016; KABE et al., 2016; DOUGAL et al., 2014, 2017; JULLIAND e GRIMM, 2016, 2017; GRIMM et al., 2016; 2018).

A localização anatômica do reto permite a fácil coleta de seu conteúdo limitando o uso de equinos fistulados, anestesiados ou eutanasiados, conseqüentemente, tornando o estudo experimental mais aceitável do ponto de vista ético (JULLIAND e GRIMM, 2016). Entretanto, embora numerosos estudos sejam derivados de observações fecais, eles podem não representar com precisão a microbiota intestinal, quantitativa ou qualitativamente (SADET-BOURGETEAU et al., 2010). Em contrapartida, Julliand e Grimm, (2016) afirmaram que as bactérias fecais seriam um bom marcador do metabolismo microbiano do intestino grosso.

As partículas fágicas estão presentes em cerca de 10^{10} a 10^{11} por grama de fezes (CANN et al., 2005; GOLOMIDOVA et al., 2007). Foram identificados nas fezes mais de sessenta tipos de fagos morfologicamente distintos (KULIKOV et al., 2007). Entre eles, *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Ortopoxvirus* (CANN et al., 2005). Segundo Julliand e Grimm (2016), o papel exato dos bacteriófagos ainda é desconhecido. Além dos gêneros encontrados no ceco e no cólon (ver tópico acima), também foram encontrados nas fezes protozoários dos seguintes gêneros: *Chlamydoxum*, *Charonnavirus*, *Charonina*, *Circodinium*, *Cochliatoxum*, *Hemiprorodon*, *Ochoterenaia*, *Paraisotrichopsis*, *Polymorphella* e *Walskana*.

As bactérias totais no conteúdo fecal foram determinadas como 10^{10} a 10^{12} UFC g⁻¹, concentração maior que as encontradas no ceco e cólon equino. Entre os representantes do gênero *Lactobacillus* encontrados nas fezes estão: *Lactobacillus hayakitensis*, *L. johnsonii*, *L. equigenosus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*, *L. buchneri*, *L. vitulinus*, *L. gastricus*, *L. agilis* (ENDO et al., 2007; 2008; 2009; MORITA et al., 2007; 2009) e *L. equi*, esse sendo específico das fezes (MOROTOMI et al., 2002). Entre os representantes do gênero *Streptococcus* estão o *Streptococcus bovis*, *S. equinus* e *S. equi*. O gênero *Bifidobacterium* é o menos abundante, com contagem entre 10^3 a 10^5 UFC g⁻¹ de fezes, e as principais espécies encontradas são *Bifidobacterium boum* e *Parascardovia denticolens*. Além disso, foram encontrados também nas fezes, arqueias metanogênicas dos seguintes gêneros: *Methanobrevibacter*, *Methanocorpusculum*, *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanobacterium*, *Sulfolobus* e *Methanosarcina* (FERNANDES et al., 2014, LWIN e MATSUI, 2014).

2.4 Microbioma Intestinal dos Potros

A microbiota intestinal tem um papel essencial na manutenção da saúde no hospedeiro e na degradação da fibra dietética (COSTA e WEESE, 2018). Os AGCC produzidos no intestino grosso representam a maior parte da energia absorvida pelos equinos sob algumas circunstâncias dietéticas (NRC, 2007). À medida que novas tecnologias de sequenciamento se tornaram mais disponíveis, houve um aumento na compreensão da microbiota intestinal dos equinos (COSTA et al., 2016). Entretanto, os estudos que caracterizam as bactérias intestinais que colonizam os potros e seu desenvolvimento ao longo do tempo ainda são limitados (BORDIN et al., 2013; COSTA e WEESE, 2018).

O ambiente intrauterino é estéril, logo pressupõe que os recém-nascidos tenham o TGI livre de bactérias. A primeira exposição a bactérias ocorre durante o nascimento devido à exposição às microbiotas vaginais, perineais e cutâneas da mãe (EARING et al., 2012; COSTA et al., 2016). Desse modo, alterações na composição e estrutura das bactérias intestinais observadas em éguas no final da gestação podem afetar o recém-nascido pela exposição inicial durante o nascimento e início da vida (WEESE et al., 2015; COSTA e WEESE, 2018). Logo após o nascimento, a colonização do trato intestinal continua com o contato do potro com a microbiota de outros locais da égua (a pele do úbere, através do comportamento de busca antes da amamentação) e ao ambiente geral (COSTA e WEESE, 2018). Assim, uma microbiota rica e diversa já está presente no mecônio de lactentes (COSTA et al., 2016), diferente do que se pensava sobre o mecônio ser livres de bactérias (JOHN et al., 2015). No estudo de Earing et al., (2012) que utilizaram uma técnica de *fingerprinter*, eletroforese em gel com gradiente de

desnaturação (DGGE), três animais não apresentaram nenhuma banda no mecônio, outros três animais apresentaram 2, 4 e 12 bandas, respectivamente, o que significou baixa riqueza de espécies bacterianas no mecônio em comparação às mães (até 64 bandas).

Há um consenso que as maiores mudanças da microbiota de do trato gastrointestinal de potros ocorre durante os três dias de vida. Porém, a presença de bactérias comensais no mecônio ainda é controversa. Aparentemente, existem diferenças no tempo de coleta do mecônio. Faubladiet et al. (2013) consideraram o mecônio até 3 horas após o parto, e apesar de não ser estéril não apresentou bactérias celulolíticas no mecônio, entretanto o estudo de Earing et al. (2012) classifica o mecônio como as fezes coletadas até 24 horas após o parto. Como o TGI de lactentes é um ambiente que tem condições ideais para o crescimento da maioria das bactérias, se torna altamente competitivo e várias espécies tentarão estabelecer residência. Assim, os potros recém-nascidos podem possuir uma microbiota altamente dinâmica em comparação com os animais mais velhos (EARING et al., 2012). De forma contrária, Costa et al., (2016) descrevem as primeiras fezes dos potros como rica e adversa, onde vários gêneros de baixa abundância desapareceram após o primeiro dia de vida.

Em potros alimentados ao nascer com um suplemento comercial de colostro foram observados menor concentração de bactérias celulolíticas e *Lactobacillus* nas fezes durante as primeiras 2 semanas de vida, sugerindo que a composição do leite poderia ter um impacto no estabelecimento intestinal bacteriano em potros (JULLIAND et al., 1996). Entretanto, a composição bacteriana do leite de égua e sua influência na microbiota intestinal em desenvolvimento no equino ainda não foram determinadas (SHARE et al., 2015). Segundo Urbaniak et al., (2016), o leite materno humano é dominado pelos filos Proteobacteria e Firmicutes. Ambos são encontrados em maior abundância no início da vida dos potros, diminuindo com o passar dos meses. Considerando os hábitos coprofágicos dos potros, era de se esperar que esse fator contribuísse para a colonização inicial do trato gastrointestinal desses animais. Entretanto, Strasinger et al. (2013) sugeriram que a coprofagia não é essencial para o estabelecimento da microbiota bacteriana em tratos gastrintestinais de potros neonatais, pois, observaram baixa similaridade de bandas entre os potros de 1 dia e suas éguas mesmo após a coprofagia. Ainda assim, há necessidade de mais trabalhos que avaliem o hábito de coprofagia e colonização inicial de potros, pois o estudo de Strasinger foi limitado ao número de animais (n=5) e a técnica utilizada (DGGE).

Aos dois dias de vida dos potros, Bordin et al. (2013) encontraram bactérias de cinco filos diferentes, Firmicutes (40,4%), Proteobacteria (36,3%), Bacteroidetes (16,7%), Fusobacteria (0,8%), Actinobacteria (0,2%). No filo Firmicutes, as classes mais representativas foram a Clostridia (30,1%) e Bacilli (4,8%). Os filos mais abundantes, Firmicutes e Proteobacteria, foram detectados em todas as amostras de potros de 2 dias (n=37), entretanto, Bacteroidetes e Actinobacteria não estavam presentes em todos os potros estudados. Costa et al. (2016) também estudaram a colonização do trato gastrointestinal de potros do nascimento até os nove meses de idade e observaram bactérias pertencentes a 29 filos diferentes. Em concordância com o trabalho de Bordin et al. (2013), o filo Firmicutes foi o principal filo encontrado em todas as idades e, apesar da menor abundância em potros de 2-30 dias de vida, não foram observadas diferenças estatísticas em relação a outras idades. Porém, pela dificuldade da coleta das fezes dos potros no primeiro mês de vida, Costa et al. (2016), agruparam fezes coletadas no dia 2 ao dia 30, o que pode ter mascarado as diferenças na microbiota, visto que Bordin et al. (2013) encontraram diferenças marcantes nessas duas idades.

Segundo Earing et al. (2012) existe uma sucessão de espécies bacterianas nas fezes dos potros ao longo do desenvolvimento do animal. Costa et al. (2016) observaram a nível de filo, que os potros recém-nascidos apresentaram Proteobacteria mais abundante em comparação a outras idades. Os potros jovens (dia 2-30) apresentaram Verrucomicrobia mais abundantes em comparação com os potros de 121 a 180 dias. Além disso, Fibrobacteres e Spirochaetes foram

mais abundantes em potros com idade entre 121-180 dias e 181-240 dias de vida quando comparados às éguas adultas.

Após a colonização pelas bactérias pioneiras, a microbiota presente durante o primeiro mês de vida é bastante distinta, o que pode estar relacionado à influência do colostro, do leite, da introdução da fibra e, em alguns casos, carboidratos solúveis na dieta (COSTA e WEESE, 2018). No entanto, estudos controlados que investigam o impacto de cada um desses fatores devem ser realizados. Após 30 dias do nascimento, 17 filos de bactérias passaram a ser identificados nas fezes de potros, entre eles, Bacteroidetes em maior abundância que passa a apresentar 40,6% do total de bactérias, Firmicutes (23,3%), Proteobacteria (2,7%), Actinobacteria (1,2%), Verrucomicrobia (1%), Fusobacteria (0,8), Acidobacteria, Chlamydiae, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deferribacteres, Fibrobacteres, Planctomycetes, Spirochaetes, Bactéria TM7, Tenericutes (BORDIN et al., 2013). Entretanto, apenas os filos Bacteroidetes e Firmicutes foram detectados nas fezes de todos os animais. De forma geral, a abundância dos filos aumenta com a idade dos potros, com exceção do Proteobacteria, que diminui. Além disso, há presença da classe Methanobacteria do filo Archae em alguns animais que não foram detectadas em potros de 2 dias.

A mudança na abundância do filo Firmicutes do primeiro dia após o nascimento até os 30 dias de idade é importante para comprovação da teoria de que a colonização inicial ocorre pela presença de bactérias anaeróbias facultativas como a *Escheria coli* e o gênero *Streptococcus* spp. Tal teoria foi confirmada pela redução das famílias Enterobacteriaceae (*E. coli*) e Streptococcaceae, ambas do filo Firmicutes, após 30 dias do nascimento (COSTA et al., 2016). A presença dessas bactérias pode contribuir para a geração de um ambiente anaeróbio. Essa afirmação está de acordo com Jullian et al. (1996) que observaram cepas bacterianas anaeróbias facultativas, como *Lactobacilli*, *Enterococci* e *Enterobacteria*, colonizaram o TGI do potro. Adicionalmente, a rápida colonização por *Lactobacillus* é importante, pois produzem compostos antimicrobianos que também ajudam na prevenção da colonização de bactérias patogênicas (FOOKS e GIBSON, 2002). Ainda sobre estudo de Costa et al. (2016), quase 40% das sequências obtidas de potros com idade entre 2-30 dias foram classificadas no gênero *Akkermansia*. Este organismo do filo Verrucomicrobia é uma bactéria que degrada mucina, e seu papel na adaptação de microbiota durante este período em equinos permanece desconhecido. Em resumo, os microrganismos pioneiros modificam o ambiente intestinal em desenvolvimento para torná-lo acessível à colonização por espécies anaeróbicas obrigatórias que predominarão ao longo da maturidade (COSTA et al., 2016).

As espécies *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* e *Fibrobacter succinogenes* foram descritos como as principais espécies de bactérias celulolíticas encontradas no intestino de equinos adultos (JULLIAND et al., 1999; HASTIE et al., 2008). Em potros, há evidências de que as bactérias celulolíticas e *F. succinogenes* aparecem durante a primeira semana de vida e atingem valores iguais ao de adultos aos 30 e 60 dias de vida, respectivamente (JULLIAND et al., 1996, FAUBLADIER et al., 2013). Para confirmar a atividade das bactérias fibrolíticas presentes nas fezes, Hayes et al. (2003) estudaram a atividade *in vitro* dos microrganismos fibrolíticos fecais de potros de 1 dia de idade e constataram que a degradação da fibra foi aproximadamente metade das éguas, mas às 4 semanas de idade não houve diferença entre os potros e as éguas.

De forma geral, os últimos deslocamentos da comunidade bacteriana foram detectados por Faubladiet et al. (2014) após 30 dias de idade. Foi demonstrado no estudo de Earing et al. (2012) que a semelhança de bandas dos potros mais velhos com as éguas e a aparente redução na aquisição de novas bandas (espécies) foi alcançada em aproximadamente 6 semanas. Costa et al. (2016) também relataram que a microbiota intestinal se torna estável e mais semelhante à encontrada em adultos após 60 dias de vida.

Firmicutes, Verrucomicrobia e bactérias não classificadas no nível de filo compreendem quase 90% das bactérias encontradas nas fezes de potros com mais de 60 dias (COSTA et al., 2016). O filo Firmicutes possui membros que estão relacionados a degradação da fibra (FLINT e BAYER, 2008). No entanto, esse filo também contém vários agentes patogênicos, como *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens*. Apesar de *C. perfringens* estar associado a patologias, ele é encontrado em 60% dos potros de 1 dia, aumenta até 90% até os 9 dias, e decresce a 20% quando os potros estão com 58 dias de idade (JOHN et al., 2015). Apesar do pouco conhecimento sobre o Verrucomicrobia, esse filo parece ser um componente comum da microbiota intestinal equina. Outro fator importante é a diferença individual do microbioma de cada indivíduo, não houve OTUs com mais de 1% de abundância compartilhadas entre as 9 amostras de potros recém-nascidos. Quando 4 indivíduos foram considerados para a análise, não houve nenhuma microbiota básica em idades entre 20, 45 e 120 dias. Na idade de 120 dias, 6 OTUS passam a ser microbiota central, e aos 170 dias há adição de um Clostridiales não classificado. E mesmo assim, não foram observados em todos os potros (COSTA et al., 2016).

Dos três meses em diante, o perfil bacteriano segue semelhante a animais adultos (EARING et al., 2012). Entretanto, a microbiota pode não estar madura quanto a sua função, uma vez que a concentração de AGCC quantificados nas fezes dos potros eram menores do que nas éguas (FAUBLADIER et al., 2013). O consumo progressivo de alimentos não leite acontece a partir do primeiro dia de vida dos potros. O desmame é a maior mudança na dieta de um mamífero e em equinos é caracterizado pela separação entre égua e potro, onde o potro deixa de consumir o leite da égua (ERBER et al., 2012). Na criação de equinos, a idade mais comum para desmamar os potros é entre 4 e 6 meses (WARAN et al., 2008; EARING et al., 2012). Como dito anteriormente, os AGCC representam a maior parte da energia absorvida pelos equinos sob algumas circunstâncias dietéticas (NRC, 2007). Assim, era esperado que a colonização do trato gastrointestinal do potro ocorresse entre o nascimento e o desmame.

Em potros desmamados com 180 dias de idade, Costa et al. (2016) observaram maiores abundância nos gêneros *Cellulosilyticum* em potros com idade entre 181-240 dias, e Desulfovibrionaceae não classificados em potros com idade entre 241-270 dias. Evidenciando que, apesar da composição ter chegado ao clímax aos 60 dias de idade, a estrutura do microbioma permanece em mudança ao longo do primeiro ano de idade. Finalmente, *Fibrobacter*, *Treponema*, *Ruminococcus* e *Papillibacter* foram significativamente mais abundantes nos potros com idade entre 121-180 e 181-240 dias (COSTA et al., 2016) quando comparados às éguas maduras. Após o desmame, pode ocorrer mudanças marcantes nas comunidades bacterianas, o que pode estar relacionado ao estresse (MACH et al., 2017). Além disso, diferentes padrões de microbiota intestinal parecem ter diferentes respostas de adaptação ao estresse. De forma contrária, Faubladiet et al. (2014) não observaram efeito do desmame aos 180 dias na microbiota fecal dos potros estudados. É importante ressaltar, que a técnica de *fingerprinter* utilizada no estudo que fundamentaram a conclusão desses autores, pode subjugar a diversidade bacteriana.

Faubladiet et al. (2017) estudaram em 5 potros, o efeito do desmame abrupto ao longo do tempo, e concluíram que o desmame não induziu grandes distúrbios nos potros, pois os potros já estavam adaptados a ingerir alimento concentrado antes de tal evento. Após 180 dias do desmame, ainda foi possível notar a redução gradual de bactérias utilizadoras de lactato e amilolíticas. Enquanto as bactérias celulolíticas e anaeróbias totais se apresentaram estáveis já no período de desmame dos potros (180 dias de vida). Além disso, Faubladiet et al. (2017) avaliaram a concentração de *F. succinogenes* em potros analisado através da PCR em tempo real e não observaram efeito da idade sobre a concentração dessas bactérias, apresentando valor de 8,02 log₁₀ UFC g⁻¹ de fezes. Entretanto, outras cepas bacterianas fibrolíticas, como *R. albus* e *R. flavefaciens* que foram relatadas em equinos adultos, podem estar presentes em potros, porém ainda não foram estudadas. Faubladiet et al. (2014) utilizaram uma técnica de

fingerprinter da comunidade para avaliar as diferenças no número de espécies de bactérias pré e pós-desmame e não observaram alterações significativas. A proporção de *F. succinogenes* nas fezes foi em média $2,6 \pm 1,6\%$ do total de bactérias.

Apesar do desmame de potros ocorrer entre os quatro e seis meses de idade, Mach et al., (2017) avaliaram o efeito do tipo de desmame (abrupto *versus* progressivo) em potros de 8 meses de idade. Os resultados demonstraram que a separação materna ao desmame modificou a composição da microbiota intestinal em todos os potros estudados, independentemente do método de desmame. As alterações mais acentuadas foram encontradas três dias após o desmame, quando a abundância relativa de membros dos gêneros *Prevotella*, *Oscillibacter*, *Streptococcus*, *Anaerovibrio*, *Lactobacillus* aumentaram significativamente e as abundâncias relativas dos membros dos gêneros *Fibrobacter*, *Clostridium* XIVa, *Ruminococcus*, *Treponema* diminuíram. A riqueza de espécies microbianas não diferiu entre os dois métodos, entretanto, as espécies benéficas pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Paraprevotella* e *Ruminococcus* eram mais abundantes antes do desmame no grupo de desmame abrupto. Além disso, também avaliaram as cargas fúngicas, que seria um indicativo de maior capacidade fermentativa de polissacarídeos complexos da dieta, e constataram que o grupo que foi desmamado progressivamente apresentou maior quantidade. Curiosamente, Mach et al. (2017) são os únicos que comentam sobre os membros do Reino Fungi em amostra de potros. Ainda assim, foi um estudo geral e pouco focado sobre o papel, funções e colonização fúngica do trato gastrointestinal de potros. Além dos efeitos dos métodos de desmame, não há informações do efeito da idade de desmame sobre o microbioma fecal de potros.

2.5 Fatores que Afetam o Microbioma do Trato Digestório dos Equinos

2.5.1 Composição das dietas

O tipo de microrganismos e sua atividade no intestino grosso dos equinos são dependentes de diferentes aspectos da dieta. Os carboidratos da parede celular (incluindo celulose, hemiceluloses e pectinas) representam cerca de 35 a 60% na dieta equina. Esses carboidratos possuem ligações resistentes às enzimas hidrolíticas de equinos (JULLIAND e GRIMM, 2017). Os principais microrganismos envolvidos na degradação de carboidratos estruturais são espécies de fungos do gênero *Piromyces* e as espécies bacterianas dos gêneros *Ruminococcus* e *Fibrobacter*. O amido dietético e os carboidratos solúveis em água representam de cerca de 10% a 40% da dieta de equinos (JULLIAND e GRIMM, 2017). As principais espécies de bactérias amilolíticas identificadas no intestino do equino pertencem aos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*.

A alimentação em si já altera as concentrações de microrganismos presentes no quimo. Na primeira hora pós-prandial, a concentração de anaeróbios totais aumentam de $5,8 \times 10^5$ para $1,7 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ e atingiram $3,7 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, 3,5 h pós-prandial (VARLOUD et al., 2004). Em equinos mantidos com um consumo restrito de matéria (1,25% PV) pode haver uma redução no filo Bacteroidetes com um aumento concordante do filo Firmicutes ao longo do tempo (DOUGAL et al., 2017). Diferentes dietas influenciam o equilíbrio entre as espécies especializadas na fermentação de diferentes substratos dentro da comunidade microbiana. Assim, as alterações dietéticas podem influenciar fortemente o microbioma intestinal equino. Em equinos, a dieta é o fator que altera o microbioma mais amplamente estudado, onde a maioria dos estudos examinou o impacto de mudanças, progressiva e abruptas entre as dietas de alto teor de amido *versus* alto teor de fibras, enquanto o efeito da forma de alimentação e processamento ou frequência de alimentação foi pouco explorado. (JULLIAND e GRIMM, 2017).

A mudança abrupta entre dietas baseadas em forragens foi pouco estudada e pode apresentar efeitos imediatos e/ou a longo prazo (JULLIAND e GRIMM, 2017). A mudança abrupta de dietas baseadas na mesma forrageira conservada de diferentes maneiras foi

investigada por Muhonen et al. (2009) sob a hipótese que a mudança do feno de capim (81% MS), para *haylage* (pré-sacado; 55% MS) ou silagem (36% MS) alteraria as atividades da microbiota do cólon. As contagens de bactérias anaeróbias totais, celulolíticas e utilizadoras de lactato e *Lactobacillus* e *Streptococcus* não diferiram entre as dietas e permaneceram inalteradas durante as primeiras 28 h após a troca abrupta da alimentação do feno para a *haylage* e silagem. Os resultados indicaram que equinos alimentados a nível de manutenção podem ser submetidos a uma mudança alimentar de feno a silagem ou *haylage* mesma cultura, desde que a qualidade sanitária seja semelhante. Após 21 dias da troca da dieta, a concentração de *Lactobacillus* do cólon foi maior nos equinos que consumiram silagem. Enquanto a concentração de *Streptococcus* foi menor nos equinos que consumiram *haylage*. Os autores creditaram essa mudança a longo prazo à sobrevivência da espécie *Lactococcus lactis* presente no inoculo utilizado para produzir a silagem.

A troca abrupta entre duas silagens de capim com diferentes teores de proteína altera a microbiota intestinal. O aumento do consumo de PB estimulou o aumento nas concentrações de bactérias anaeróbias totais, *Lactobacillus* no cólon após 24 horas da mudança. Entretanto, esse efeito não foi observado na população celulolítica (MUHONEN, et al., 2008). Em estudo mais aprofundado sobre os grupos bacterianos funcionais, Grimm et al. (2016) não observaram diferença nas concentrações de bactérias celulolíticas, xilanolíticas e pectinolíticas no ceco e no cólon ventral direito, nas primeiras 28 horas após uma mudança entre dois fenos de composição botânica e bromatológica semelhante. Um dia após a mudança, a concentração de Bacteroidetes e Firmicutes tenderam aumentar no ceco. Após 8 dias da mudança, foi observada redução de Bacteroidetes enquanto Firmicutes e bactérias pectinolíticas aumentaram. Julliand e Grimm (2017) sugeriram que as mudanças de dietas a base de forragens devem ser mais exploradas com auxílio de técnicas independentes de cultura.

A adição de pequenas quantidades de amido, na forma de alimento concentrado, pode aumentar a quantidade de bactérias celulolíticas, como *Fibrobacter* e *Ruminococcus*, no intestino grosso. Entretanto, a adição de uma grande quantidade de concentrado na dieta, pode ultrapassar a capacidade de digestão e absorção do equino, permitindo que o amido chegue no intestino grosso (JULLIAND et al., 2001; BIDDLE et al., 2013). O efeito do consumo de alimentos concentrados passou a ser constantemente estudado a partir de 1988, onde foi demonstrado que 24 horas após a troca abrupta de 100% de feno de alfafa picado para uma dieta concentrada composta por 86,7% de milho moído e 13,3% de farelo de soja, a concentração de bactérias amilolíticas aumentou (GOODSON et al., 1988).

A introdução de alimentos concentrados modifica rapidamente a microbiota intestinal de equinos. Logo após 5 horas da introdução abrupta de cevada em uma dieta de feno, foi observado um aumento nas concentrações de *Lactobacillus* e *Streptococcus* no conteúdo do ceco e do cólon (DE FOMBELLE et al., 2001) e na concentração de bactérias utilizadoras de lactato no cólon (RESPONDEK et al., 2008). Em contraste, a concentração de bactérias celulolíticas no ceco e cólon não são alteradas nas primeiras 29 horas após uma alteração na dieta (DE FOMBELLE et al., 2001), as concentrações de bactérias xilanolíticas e pectinolíticas diminuíram acentuadamente nos primeiros dias após a troca (MOORE e DEHORITY, 1993). Além disso, a população de protozoários diminuiu (GOODSON et al., 1988). Confirmando a sensibilidade da microbiota a mudança abrupta da dieta, De Fombelle et al. (2001) observaram que as alterações na contagem microbiana dentro de 24 horas eram temporárias e que, aos 7 dias, não havia mais diferenças entre as dietas.

Com estudos utilizando sequenciamento de nova geração, foi atribuído uma menor riqueza e diversidade de bactérias do ceco e cólon ventral direito à uma dieta com alto teor de amido comparação a uma dieta baseada em alimento volumoso (HANSEN et al., 2015). Ao diminuir a riqueza e diversidade bacteriana, o amido causa potencialmente redução concomitante da resiliência do ecossistema microbianos do intestino grosso, uma vez que

diferentes espécies podem ter funções semelhantes. De forma geral, a introdução de grandes quantidades de amido na dieta de equinos aumenta a concentração de bactérias amilolíticas e gêneros associados ao metabolismo desse substrato, como *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Essa mudança aumenta a produção de ácido láctico, conseqüentemente, diminui o pH luminal (KERN et al., 1973; JULLIAND et al., 2001). Juntamente com o crescimento das bactérias produtoras de lactato foi associado a um crescimento de bactérias utilizadoras de lactato e família Veillonellaceae (HANSEN et al., 2015). Por sua vez, as bactérias fibrolíticas, que são intolerantes a ácidos, diminuíram (JULLIAND et al., 2001; DE FOMBELLE et al., 2003).

Com técnicas independentes de cultura foi observado que as famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae e o gênero *Fibrobacter* spp. têm menor abundância no intestino grosso de equinos alimentados com uma dieta com alto teor de amido em comparação com aqueles alimentados com dieta de alta fibra (DALY et al., 2012; HANSEN et al., 2015). Poucos estudos estão disponíveis na literatura sobre o impacto do processamento de cereais na microbiota do intestino grosso (JULLIAND e GRIMM, 2017). Philippeau et al. (2015) avaliaram o efeito do processamento da cevada sobre a microbiota do cólon. Foi fornecido aos equinos uma dieta a base de feno mais cevada de 4 maneiras diferentes: grãos inteiros, moídos a 2,5 mm, floculada ou peletizada. Não houve diferença significativa das concentrações de bactérias anaeróbias totais, celulolíticas, amilolíticas e utilizadoras de lactato no conteúdo colônico. Porém, os autores destacaram uma menor contagem de bactérias celulolíticas nos equinos que consumiram cevada moída a 2,5 mm e sugeriram que os processos termomecânicos poderiam limitar o potencial impacto negativo do amido na atividade fibrolítica no cólon de equinos alimentados com um alto teor de amido.

Além a proporção de alimento concentrado na dieta, a origem botânica do amido também tem influência no microbioma. O amido de milho é menos suscetível à digestão do intestino delgado equino do que o amido de aveia. Quando o inóculo fecal foi incubado com milho moído a contagem de bactérias amilolíticas foi maior do que quando incubado com aveia moída (HARLOW et al., 2016). De forma contrária, havia mais bactérias utilizadoras de lactato e *Lactobacillus* quando incubados com aveia moída do que com milho moído (HARLOW et al., 2016). Da mesma forma foi observado *in vivo*, equinos alimentados com aveia apresentaram maior contagem de *Lactobacillus* nas fezes do que equinos alimentados com milho, enquanto havia menos bactérias celulolíticas nas fezes de equinos alimentados com milho e farelo de trigo do que equinos alimentados com aveia (HARLOW et al., 2017a).

Os efeitos do tamanho e da frequência de alimentação de concentrado na microbiota cecal foram relatados por Venable et al., (2017). Foi fornecido aos animais o mesmo concentrado peletizado em uma única refeição ou fracionado em duas ou três vezes. Não foi observado diferença na riqueza de espécies bacterianas entre os tratamentos, entretanto, os animais alimentados com três refeições diárias tiveram menor abundância de organismos do metabolismo de amido e lactato. Alterações foram observadas no nível do gênero (*YRC22*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Coprococcus* e *Phascolarctobacterium*).

Na última década aumentou o número de estudos que utilizaram as fezes como marcador do ecossistema microbiano do intestino grosso de equinos e as suas variações sob mudanças na dieta. A partir de 4 dias da troca abrupta da dieta pode-se observar nas fezes a mudança de riqueza de espécies (FERNANDES et al., 2014). Equinos consumindo dietas com alto teor de amido apresentaram uma diversidade de bactérias fecais reduzida (DOUGAL et al., 2014). Nessas condições de alimentação, filo Proteobacteria aumentou pelo aumento do gênero *Succinivibrio*. De forma contrária, a ordem Clostridiales e a família Lachnospiraceae, importantes na degradação da fibra, diminuíram. A observação de tais mudanças na população bacteriana fecal só foi possível com o uso de técnicas independentes de cultura. Até então não era relatado mudanças de bactérias celulolíticas em fezes de animais consumindo dietas com

alto teor de amido, era observado apenas o aumento das concentrações de bactérias amilolíticas (*Streptococcus* e *Lactobacillus*) e de utilizadoras de lactato.

As informações sobre a comparação da microbiota fecal com a microbiota de conteúdos intestinais sob efeito de diferentes dietas são escassas. Grimm et al. (2016) avaliaram equinos em transição de uma dieta alta fibra para dieta de alto teor de amido e observaram que as concentrações de grupos bacterianos funcionais (celulolíticos, amilíticos e utilizadoras de lactato) estavam significativamente correlacionadas entre o ceco e as fezes e entre o cólon ventral direito e as fezes. Esses resultados demonstraram que as fezes podem ser utilizadas para representar também o microbioma proximal do intestino grosso em termos de variações durante a mudança de dietas.

O nível de extrato etéreo na dieta também pode afetar a microbiota do intestino grosso de equinos, em especial, a população fibrolítica (JANSEN et al, 2007), pois os ácidos graxos não digeridos que chegam no intestino grosso podem ter um efeito tóxico em certos microrganismos, bem como um efeito negativo de revestimento sobre os microrganismos (JENKINS e PALMQUIST, 1984).

2.5.2 Probióticos

Probióticos podem ser definidos como um suplemento de microrganismos vivos, que quando administrados por via oral em concentrações adequadas, fornecem um efeito benéfico para o hospedeiro (FAO/WHO, 2002). É relatado que o uso de probióticos pode estabilizar a microbiota durante eventos estressantes como o desmame, a lactação e mudanças na dieta. Apesar de existir numerosos suplementos probióticos para equinos disponíveis no mercado, atualmente há pouca pesquisa sobre a eficácia do uso (SCHOSTER et al., 2014).

A maioria dos estudos envolvendo a suplementação de probióticos em equinos usa a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto, os resultados são controversos sobre a possível melhoria da fermentação da fibra (COVERDALE, 2016; HARLOW et al., 2017b). A suplementação com *S. cerevisiae* pareceu limitar a extensão das alterações indesejáveis no ecossistema do ceco e cólon de equinos desafiados com uma dieta com teor de amido próxima a saturação de digestão do intestino delgado (3,4 g de amido / Kg de PV), pois modificou o pH e as concentrações de ácido láctico, amônia, acetato e butirato. Entretanto, não foi observado alterações nos perfis microbianos (MEDINA, et al., 2002).

Grimm et al. (2016) não observaram efeito na microbiota do ceco e cólon após a suplementação com levedura *Saccharomyces cerevisiae* na mudança abrupta entre dois fenos. Em 2014, 101 potros foram suplementados com probiótico desde o nascimento até as 20 semanas de idade para avaliar se o probiótico teve efeito positivo na incidência de diarreia. Segundo os pesquisadores, o aditivo previniu e reduziu a severidade da diarreia (TANABE et al., 2014). Algumas cepas de *Lactobacillus* também foram utilizadas como probiótico, entretanto, pouca ou nenhuma colonização foi observada após cinco dias de suplementação, mesmo em doses de diferentes concentrações (WEESE e ROUSSEAU, 2005). Segundo Covardale (2016), o aumento da compreensão da microbiota intestinal equina melhorará o desenvolvimento de probióticos eficazes. Além disso, mais estudos precisam ser feitos para determinar potenciais cepas probióticas e a dosagem.

2.5.3 Prebióticos

Os prebióticos podem ser definidos como “ingredientes seletivamente fermentados que permitem mudanças específicas, tanto na composição e/ou atividade na microbiota gastrointestinal que conferem benefícios ao bem-estar e saúde do hospedeiro” (GIBSON et al., 2004). Desse modo, os prebióticos são não digeríveis para o animal hospedeiro, mas são fermentáveis por uma microbiota gastrointestinal específica. Certas bactérias, como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*, fermentam os prebióticos para produzir energia e carbono para

o crescimento. O aumento dessas bactérias pode inibir o crescimento de bactérias comensais potencialmente patogênicas por meio da produção de bacteriocinas e outras substâncias (SCHOSTER et al., 2018). A concentração de *Streptococcus* também tende a aumentar após o consumo de frutooligosacarídeos, entretanto, a alta concentração desse gênero no intestino grosso equino está associada a distúrbios, como a acidose (MILINOVICH et al., 2008). Apesar da população de *Bifidobacteria* ser pouco expressiva e não ser presente em todos os equinos (ENDO et al., 2009), ainda há necessidade de mais estudos para entender a função e importância desse gênero.

Proudman et al. (2015) detectaram alterações na microbiota fecal após suplementação dietética com extrato de malte rico em amilase. Houve mudanças em certos táxons de menor abundância, incluindo o aumento na família Veillonellaceae (bactérias utilizadoras de lactato), que poderiam ser benéficas para tamponar o pH no ceco causado pelo aumento de carboidratos solúveis e rapidamente fermentescíveis (PROUDMAN et al., 2015). Em uma revisão, Covardale (2016) relata que a ação de prebiótico em equinos ainda permanece pouco documentada e controversa. Alguns estudos descreveram alterações na microbiota de fezes de equinos suplementos com prebiótico (PELLEGRINI et al., 1999; BERG et al., 2005). Um dos efeitos da suplementação com frutooligosacarídeo é o aumento da tolerância a introdução abrupta de amido a dieta. Nessas condições, as populações de *Lactobacillus* e *Streptococcus* não aumentaram em equinos recebendo o prebiótico (RESPONDEK et al., 2008). Além disso, foi observado que a suplementação com frutooligosacarídeo pode diminuir a concentração de *E. coli* junto com o pH do conteúdo fecal (BERG et al., 2005). Os efeitos do frutooligosacarídeo também foi observado no estômago de equinos, onde as concentrações de bactérias totais, *Streptococcus* e bactérias utilizadoras de lactato foram maiores após a suplementação (NADEAU et al., 2000).

2.5.4 Doenças

Alterações no microbioma equino, devido ao estresse ou como resposta a certos fatores, podem estar associadas ao início da doença (COSTA e WEESE, 2012). A laminite é caracterizada pela inflamação das lâminas no casco e sua causa é multifatorial. A queda do pH intestinal após a sobrecarga de carboidratos solúveis e rapidamente fermentescíveis dietéticos causa aumento súbito na concentração de *Streptococcus*, quadro que está associado a laminite (MILINOVICH et al., 2006; 2007; 2008; AL JASSIM e ANDREWS, 2009). Alterações na microbiota cecal associada à laminite foram documentadas pela primeira vez por Garner et al. (1978) usando métodos baseados em cultura. Os autores observaram um grande crescimento nas concentrações de *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Milinovich et al. (2006; 2007; 2008) induziram laminite em equinos, após o fornecimento de altas concentrações de frutooligosacarídeos e observaram que a população de *Streptococcus* aumentou rapidamente antes do início da laminite, além disso, aumento na concentração de lactato no ceco também foi relatado. O aumento nas concentrações de bactérias produtoras de lactato tem impacto direto no pH do ceco, e pode levar à acidose láctica, danos na mucosa, além da laminite (MILINOVICH et al., 2007). Posteriormente, Steelman et al (2012) observaram um aumento na diversidade bacteriana em amostras fecais de equinos com laminite crônica utilizando tecnologia de sequenciamento de nova geração.

Existem inúmeras causas potenciais de cólicas, incluindo parasitas, mudança na dieta e transporte (AL JASSIM e ANDREWS, 2009). Mudanças na composição microbiana foram associadas com cólica em equinos. Costa et al. (2012) encontraram Bacteroidetes como o filo dominante juntamente com um aumento na abundância de Fusobacteria nas fezes de equinos com cólica, enquanto o filo Firmicutes e a classe de Clostridiales foram os táxons mais abundantes nas fezes equinos saudáveis. As diferenças entre equinos com cólica e saudáveis podem ser creditadas a disbiose, um desequilíbrio da microbiota presente, em vez de um

aumento em bactérias patogênicas específicas (COSTA et al., 2012). Entretanto, há necessidade de mais estudos, para determinar qual é a causa e qual é a consequência da ocorrência de cólica.

Mudanças metabólicas e hormonais que ocorre antes do parto, pode ocasionar cólica em éguas. Wesse et al. (2015) observaram mudanças na microbiota fecal em éguas pós-parto antes do desenvolvimento de cólica, os resultados mostraram que a abundância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes diminui enquanto a abundância de Proteobacteria aumentou. Além disso, devido à alta variação individual (HANSEN et al., 2015), não se sabe se essas mudanças na microbiota fecal seriam observadas em equinos de uma categoria de produção diferente ou apenas em éguas pós-parto (WEESE et al., 2015). As alterações na microbiota fecal observadas antes de um episódio de cólica poderiam ser usadas na escolha de probióticos capazes de estabilizar a microbiota intestinal (AL JASSIM et al., 2009).

2.5.5 Antimicrobianos

Uma das mudanças mais aparentes na microbiota equina fecal é vista com o uso de substâncias antimicrobianas. Mudanças significativas ocorreram na microbiota fecal de equinos após a administração de antimicrobianos (HARLOW et al., 2013). Costa et al. (2015b) relataram que a administração oral de trimetoprim sulfadiazina, um antibiótico de amplo espectro, teve a maior redução no número total de espécies bacterianas na microbiota fecal, com redução proeminente na abundância relativa de Verrucomicrobia. Após o término do tratamento com o antimicrobiano, os perfis bacterianos não retornaram completamente à composição até 30 dias após a administração. Isso sugere que é necessário um período de recuperação para a microbiota retorne seu estado saudável normal (COSTA et al., 2015b). Além disso, foi descrito que pode haver diferenças nas respostas aos antimicrobianos devido a alta variabilidade entre animais, o que também foi demonstrado em outros estudos (SALEM et al., 2018).

2.5.6 Individualidade dos animais

Como mencionado anteriormente, o microbioma do intestino do equino é específico dentro de cada compartimento, entretanto, ele pode variar entre indivíduos. A diferença da microbiota entre indivíduos tem sido sugerida na literatura há muito tempo, onde havia relatos de que alguns pôneis e cavalos que eram mais susceptíveis a doenças intestinais que outros sob a hipótese de abrigar uma microbiota intestinal específica (COSTA e WEESE, 2018).

Blackmore et al. (2013) identificaram a presença de uma população bacteriana específica de cada indivíduo dentro da mesma raça de pôneis que recebem uma dieta similar. Salem et al. (2018) relataram que além da individualidade, a microbiota intestinal de equinos mantidos em pastagem varia ao longo das estações do ano. Assim, concluíram que as mudanças na microbiota fecal são uma adaptação normal às mudanças dietéticas e ambientais, as quais os equinos são manejados.

Atualmente, alguns estudos focaram em identificar um fator comum no microbioma entre indivíduos equinos, que é chamado de “microbiota compartilhada” (COSTA et al., 2012). Desde que o conceito de microbioma foi introduzido na pesquisa equina, vários outros autores tentaram definir o microbioma central dos equinos (COSTA et al., 2012; DOUGAL et al., 2013, 2014; O’DONNELL et al., 2013; COSTA et al., 2015a).

Esses fatos destacam a importância de usar cada equino como seu próprio controle em ensaios experimentais testando os efeitos de um tratamento específico, especialmente quando poucos animais são utilizados no estudo. Várias famílias bacterianas são cotadas a serem membros do núcleo do microbioma ao longo do intestino grosso. Todos os autores supracitados observaram que Lachnospiraceae pertenciam ao microbioma central das fezes. Outras famílias relatadas como parte do núcleo fecal foram Erysipelotrichaceae, Fibrobacteraceae, Ruminococcaceae e Prevotellaceae (DOUGAL et al., 2013, 2014, O’DONNELL et al., 2013). Curiosamente, as famílias Ruminococcaceae e Fibrobacteraceae parecem ser membros do

núcleo ao longo do intestino grosso equino, apesar de representarem uma pequena proporção da comunidade. Além disso, é necessário verificar se todos os membros do microbioma central são espécies chave do metabolismo, ou do status de saúde e/ou doença.

Por fim, nenhum estudo foi realizado em comunidades de bacteriófagos, arqueias ou fungos para verificar diferença entre indivíduos, o efeito geográfico, assim como a existência de uma comunidade central e espécies chave.

CAPÍTULO I

DIETA COMPLETA EXTRUSADA NA ALIMENTAÇÃO DE EQUINOS: CONSUMO E DIGESTÃO DOS NUTRIENTES

RESUMO

A dieta total extrusada pode ser uma alternativa prática para alimentação de equinos. Avaliou-se a dieta completa extrusada na alimentação de equinos em manutenção por meio de ensaios de consumo, da digestão de nutrientes, da cinética de passagem, ensaios de digestão e fermentação *in vitro*, bem como a avaliação da concentração de grupos funcionais de microrganismos presentes nas fezes. Foram utilizados 12 equinos. Os ensaios de consumo, digestão de nutrientes e cinética de passagem foram avaliados em delineamento inteiramente ao acaso, onde os tratamentos consistiram em duas dietas, dieta completa extrusada ou feno de Coastcross. Os ensaios de digestão e fermentação *in vitro* avaliaram quatro substratos: dieta completa extrusada; dieta completa antes da extrusão; feno de Coastcross, feno de *Urochloa brizantha* (Syn. *Brachiaria brizantha*). Os resultados foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste SNK ($\alpha = 0,05$). O consumo de água e de fibra foi maior nos animais alimentados com feno de Coastcross, enquanto o consumo de matéria seca (MS), extrato etéreo e energia bruta foi maior nos equinos alimentados com a dieta completa extrusada. A digestibilidade da MS, matéria orgânica, extrato etéreo, proteína bruta e energia bruta foram superiores na dieta completa extrusada. O tempo médio de retenção da digesta (TMR) da dieta completa extrusada foi menor quando comparado a dieta de feno de Coastcross quando estimado pelo marcador LIPE[®], entretanto, não foi observado diferença no TMR entre as dietas quando utilizado o cromo mordente. A produção e o pH das fezes dos equinos alimentados com a dieta completa extrusada foi menor quando comparado aqueles alimentados com o feno de Coastcross. A digestibilidade da MS *in vitro* distinguiu os alimentos volumosos dos concentrados, entretanto, a digestibilidade do FDN não diferiu entre os substratos incubados. O feno de *Brachiaria brizantha* apresentou degradação da MS inferior aos outros substratos. O processo de extrusão ao qual a dieta completa foi submetida diminuiu o volume de gases produzidos durante a fermentação *in vitro*. Conclui-se que a dieta extrusada completa é uma prática alternativa de alimentação de curto prazo para equinos de manutenção.

Palavras-chave: cinética de passagem, concentrado, fibra, volumoso

ABSTRACT

Complete extruded diet (CED) can be a practical alternative for feeding horses. The CED to fed maintenance horses was evaluated through dietary intake trials, nutrient digestion and kinetics of passage, *in vitro* digestion and fermentation, and fecal evaluation of functional microorganisms' groups. Twelve horses were used. The intake, nutrient digestion and passage kinetics trials were evaluated in a completely randomized design, where treatments consisted of two diets: (CED) or Coastcross hay diet. The *in vitro* digestion and fermentation assays were used to evaluate four substrates: complete extruded diet; complete diet before extrusion; Coastcross hay, *Urochloa brizantha* hay (Syn. *Brachiaria brizantha*). The results were submitted to ANOVA and the means compared by the SNK test ($\alpha = 0.05$). The water and fiber intakes were higher in horses fed a Coastcross hay, while the dry matter (DM), ether extract and gross energy intakes was higher in horses fed CED. The DM, organic matter, ether extract, crude protein and crude energy digestibility was higher in the CED. The CED mean retention time (MRT) was shorter compared to the Coastcross hay diet, when obtained by LIPE[®] marker, however, no difference on MRT was observed between diets when mordent chromium was used. The pH and feces production of horses fed a CED was lower than those horses fed a Coastcross hay. The *in vitro* DM digestibility distinguished the roughage substrates from those concentrates, however, the *in vitro* NDF digestibility did not differ among incubated substrates. The *Brachiaria brizantha* hay presented reduced *in vitro* DM degradation compared to other substrates. The extrusion process to which the complete diet was subjected decreases the volume of gases produced from *in vitro* fermentation. It is concluded that the complete extruded diet is an alternative short-term feeding practice for maintenance horses.

Keywords: concentrate, fiber, passage kinetics, roughage

1 INTRODUÇÃO

A dieta completa é um alimento nutricionalmente adequado, formulado para ser fornecido como alimento único e é capaz de manter a vida e/ou promover a produção sem que nenhuma substância adicional seja consumida, exceto água (NRC, 2007). O conceito não é novo na alimentação de equinos (EARLE, 1950), mas com a evolução dos processos de produção e a possibilidade de utilização de matérias-primas distintas, proporcionaram novas perspectivas do seu uso na produção de equinos. Além disso, por se tratar de um alimento misto contendo concentrados e volumosos em um só produto, devem ser considerados em termos de consumo e digestão, como alimentos diferentes dos cereais e alimentos concentrados tradicionais (MIRAGLIA et al., 2006).

A expansão da indústria equestre estimulou a manutenção de equinos próximos aos centros urbanos, com consequentes desafios ao setor de alimentação no desenvolvimento de formas de processamento das forragens que resolvessem problemas relacionados com espaço de armazenamento e facilidade de manuseio (PIMENTEL et al., 2009). O processamento dos alimentos, principalmente dos volumosos, por meio da moagem ou peletização, reduzem substancialmente o volume, o que por sua vez facilita a estocagem e o manuseio (HILL, 2007). Entretanto, a forma física em que o volumoso é fornecido influencia o comportamento ingestivo, com efeitos sobre o consumo, tempo de duração da refeição, velocidade e dinâmica do fluxo da digesta nas diferentes porções e em todo trato gastrointestinal (ARGO et al., 2002; SILVA et al., 2014), e consequentemente, sobre a eficiência da ação microbiana sobre o substrato degradado no intestino grosso (DROGOUL et al., 2000ab).

O processamento industrial modifica as propriedades químicas, físicas e microbiológicas dos alimentos (NRC, 2007). O objetivo do processamento de extrusão é atingir o máximo do potencial de gelatinização do amido dos grãos inclusos na formulação do concentrado, pois melhora a digestibilidade e altera o local da digestão. A melhora da digestibilidade depende da origem botânica do grão (ROSENFELD e AUSTBØ, 2009). A inclusão de uma fonte de fibra no *kibble* é um dos benefícios do processamento da dieta (HILL, 2007). Entretanto, os efeitos do processamento térmico sobre a fração fibrosa do alimento completo, consequentemente, na digestão e utilização da dieta, são menos conhecidos na nutrição de equinos.

O presente estudo teve como objetivos avaliar a dieta completa extrusada na alimentação de equinos em manutenção por meio de ensaios do consumo dietético, da digestão de nutrientes e da cinética de passagem da digesta no trato digestório e, ensaios de digestão e fermentação *in vitro*, bem como a avaliação da concentração de grupos funcionais de microrganismos presentes nas fezes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Setor de Equideocultura da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRRJ e, nos Laboratórios de Pesquisas em Saúde Equina (EQUILAB) do Instituto de Veterinária e Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia, em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da UFRRJ sob número de protocolo 3083.029756/2017-10.

2.1 Animais

Foram utilizados 12 equinos machos castrados saudáveis da raça Mangalarga Machador em manutenção, com idade média de $4,4 \pm 1$ anos e peso vivo médio de 367 ± 22 kg. Antes do início do experimento, os equinos foram mantidos em pastagem mista de *Urochloa brizantha*

(Syn. *Brachiaria brizantha*) e grama Batatais (*Paspalum notatum*). Quando transferidos para as instalações experimentais, foram submetidos ao controle de parasitas com ivermectina (EQVALAN, Boehringer Ingelheim, Alemanha), e cipermetrina (CIPERALLVET, Eurofarma, Brasil). Exames clínicos e hematológicos foram realizados com vistas à higidez. Os equinos foram mantidos em baias individuais providas de bebedouros e comedouros com livre acesso a água e ao sal mineral.

2.2 Delineamento Experimental

Os ensaios do consumo, digestão e cinética de passagem foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, com dois tratamentos, sendo os tratamentos a dieta controle composta exclusivamente por feno de Coastcross (*Cynodon* spp. cv Coastcross) e a dieta completa extrusada (FORRAGE HORSE, Nutratta, Brasil), com seis repetições. O ensaio de digestão *in vitro* foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso com quatro tratamentos caracterizados pelos substratos incubados (feno de Coastcross, feno de *Brachiaria brizantha*, dieta completa extrusada e a dieta completa antes da extrusão) com três repetições. O ensaio de fermentação *in vitro* foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso com arranjo fatorial 2×4, caracterizados pelas duas dietas dos equinos doadores de inóculo fecal e quatro substratos incubados (feno de Coastcross, feno de *Brachiaria brizantha*, dieta completa extrusada e a dieta completa antes da extrusão).

Tabela 1. Composição química do feno de Coastcross (*Cynodon* spp. cv Coastcross) e da dieta completa extrusada, na base da matéria seca

Item	Dietas	
	Feno de Coastcross	Dieta completa extrusada
Matéria seca, g/Kg	900	888
Composição química, g/Kg MS		
Matéria mineral	58	46
Extrato etéreo	23	33
Proteína bruta	157	114
Fibra em detergente neutro	823	446
Fibra em detergente ácido	392	255
Celulose	319	200
Lignina ¹	73	55
Carboidratos não fibrosos ²	0	362
Conteúdo energético		
Energia bruta, kcal/Kg MS	4421	4572

¹ Lignina determinada por oxidação de permanganato

² CNF = 100 - (%PB + %FDN + %EE + % MM)

2.3 Condução dos Ensaios Experimentais

Os equinos passaram por um período de adaptação às instalações e às dietas com duração de 28 dias. Na primeira semana, todos os equinos foram alimentados com feno de Coastcross (*Cynodon* spp. cv Coastcross) *ad libitum*. Na segunda semana, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos. O grupo controle (n=6) foi alimentado exclusivamente com o feno de Coastcross por mais 21 dias (CHD), enquanto o segundo grupo foi alimentado com a dieta completa extrusada (CED) em substituição ao feno de Coastcross (Tabela 1). A proporção de feno de Coastcross: dieta completa extrusada na dieta dos animais foi ajustada semanalmente: 70:30 na segunda semana, 40:60 na terceira semana e 0:100% na quarta semana. A dieta completa extrusada foi fracionada em três refeições diárias, fornecidas às 06:00, 12:00 e as 18:00 horas, enquanto o feno foi disponibilizado *ad libitum* em redes tipo

porta feno. Ao final das quatro semanas foi considerado que os animais estavam adaptados às respectivas dietas experimentais e que o consumo de matéria seca (MS) atingido supria as exigências da categoria equinos em manutenção segundo o NRC (2007).

2.4 Ensaio de Consumo Voluntário

O consumo voluntário foi determinado após o período de adaptação às dietas. As dietas foram calculadas para serem oferecidas em 3% do peso vivo dos animais, na base na MS e oferecidas fracionadas em três refeições diárias, às 08:00, 13:00 e 18:00 horas. As sobras de alimentos, se presentes, foram retiradas antes do fornecimento da próxima refeição e pesadas. O consumo de água foi mensurado utilizando bebedouros tipo balde de volume conhecido. As mensurações foram anotadas em intervalos de seis horas durante três dias.

2.5 Ensaio de Digestão de Nutrientes

Após a determinação do consumo, realizou-se o ensaio de digestão pelo método de coleta total de fezes. A coleta das fezes foi realizada diretamente no piso das baias imediatamente após a defecação, durante 24 horas, por cinco dias (ALMEIDA et al., 1999b).

Neste período, o consumo diário de MS foi reduzido em 10% com o intuito de evitar sobras. Quando houve sobras de alimento, as mesmas foram pesadas e congeladas para análise posterior. Após a coleta, as fezes de cada animal foram pesadas e mantidas em sacos plásticos. A cada seis horas, as amostras fecais coletadas no período foram homogeneizadas e uma subamostra de 10% do peso foi separada e congelada para análise posterior. Ao final do ensaio, as amostras de fezes e as sobras de alimentos foram descongeladas à temperatura ambiente, pesadas e homogeneizadas para retirada em uma amostra composta de cada dia para as análises bromatológicas.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CD) dos nutrientes foram calculados de acordo com a seguinte equação (SCHNEIDER e FLATT, 1975):

$$CD = \frac{MS \text{ consumida} \times \% \text{ do nutriente na dieta} - MS \text{ fecal} \times \% \text{ do nutriente nas fezes}}{MS \text{ consumida} \times \% \text{ de nutriente na dieta}} \times 100$$

2.6 Cinética de Passagem

Os indicadores de cinética de passagem da digesta, cromo mordente em fibra de detergente neutro (Cr-FDN) e o LIPE[®] em pó, foram utilizados durante o ensaio de digestão. Os indicadores da cinética de passagem da fase sólida da digesta foram fornecidos, em dose única, no primeiro dia de coleta de fezes. O Cr-FDN foi fornecido aos animais na dose de 25 g diretamente no cocho e o LIPE[®] na dose de 0,25 g adicionado ao concentrado fornecido às 06:00. Amostras de aproximadamente 200g de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos equinos imediatamente antes da administração do indicador (tempo zero) e nos tempos 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72 e 78 horas após a administração.

As amostras fecais foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos devidamente etiquetados e, em seguida, armazenadas a -10 °C. Após o período experimental, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C, durante 48 horas e moídas. A concentração de Cr nas amostras fecais foi determinada por espectrometria em espectrômetro de emissão por plasma com detecção ótica (BOLIN e KING, 1952; KIMURA e MILLER, 1957), e determinou-se a concentração de LIPE[®] por espectroscopia de infravermelho (SALIBA et al., 2015).

O tempo médio de retenção (TMR) da digesta em todo o trato digestivo foi calculado de acordo com a seguinte equação (FAICHNEY, 1975):

$$\text{TMR (horas)} = \frac{\sum mi \times ti}{\sum mi}$$

Onde: mi = concentração de indicador excretado no i intervalo de tempo;

ti = intervalo de tempo entre o fornecimento do indicador e i tempo da coleta fecal;

A taxa de passagem ($T \times P$) da digesta em todo o tubo digestivo foi estimado como o inverso do TMR:

$$T \times P (\% h^{-1}) = \frac{1}{\text{TMR}}$$

2.7 Concentração de Bactérias Celulolíticas e Anaeróbios Totais

Ao final do ensaio de digestão, as fezes foram coletadas para a determinação do pH e da concentração de bactérias anaeróbias totais e celulolíticas. As fezes foram coletadas após a primeira refeição do dia. O pH foi avaliado imediatamente após a coleta. As concentrações de bactérias anaeróbias totais viáveis foram determinadas com meio ágar completo modificado (LEEDLE e HESPELL, 1980) após 48 horas de incubação à 39 °C em jarros de anaerobiose, com três tubos de ensaio com tampa (réplicas) nas diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Em cada tubo de ensaio foram adicionados 4 mL do meio de cultura, com o pH ajustado a 7,3, sob CO_2 . Foram contabilizados tubos positivo para anaeróbios totais aqueles que apresentavam cor mais clara que o tubo “branco” que continha somente meio de cultura estéril.

As concentrações de bactérias celulolíticas foram determinadas com um meio de cultura líquido (HALLIWELL e BRYANT, 1963) modificado (BARUC et al., 1983; JULLIAND et al., 1999), após 15 dias de incubação à 39 °C em jarros de anaerobiose, com três tubos de ensaio incubados nas diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Os tubos de ensaio foram preenchidos com papel filtro de celulose Whatman nº1 de tamanho 8x1cm e, em seguida, adicionado 8 mL do meio de cultura, com pH ajustado a 7,3, sob CO_2 . Para bactérias celulolíticas, foram contabilizados tubos positivos somente aqueles que obtiveram degradação total da tira de celulose após o período de incubação. As concentrações de bactérias anaeróbias totais e celulolíticas foram determinadas utilizando o método do número mais provável (CLARKE e OWENS, 1983).

2.8 Análise do pH Fecal

Ao final do ensaio de digestão, o pH do líquido fecal obtido a partir da compreensão de 100 g de fezes coletadas diretamente do reto foi mensurado com um aparelho pHmetro de bancada previamente calibrado.

2.9 Ensaio de Digestão *in vitro* com Incubadora DAISY^{II} ANKOM

O ensaio de digestão *in vitro* foi conduzido em duas etapas (TILLEY e TERRY, 1963). Os substratos utilizados foram: feno de Coastcross, o feno de *Brachiaria brizantha*, a dieta completa extrusada e a dieta completa antes da extrusão. Em cada saco foi pesado 0,25 g de substrato moído a 1 mm que em seguida foi selado. Na primeira etapa, cada substrato foi incubado em triplicata com líquido ruminal de um bovino em uma incubadora Daisy^{II} (ANKOM®) à 39,5 °C por 48 horas. O líquido ruminal foi coletado de um bovino às 7 horas, imediatamente filtrado e reservado no jarro para a digestão. O bovino foi alimentado com dieta na proporção volumoso e concentrado de 80:20, sendo o volumoso o feno de Coastcross. Após 48 horas, na segunda etapa, a solução de HCl 6N foi adicionada aos jarros de digestão com intuito de baixar o pH da solução. Em seguida, foi adicionada a solução de pepsina 5% recém preparada, seguindo a digestão por mais 24 horas. Ao final da digestão, os jarros foram drenados e os sacos foram lavados com água destilada quente e secos.

Os sacos para determinação de FDN, foram pesados e seguiram para digestão de fibras em detergente neutro por uma hora no digestor de fibras (MARCONI®, Brasil). Após uma

hora, os sacos foram novamente lavados com água destilada quente e secos na estufa à 105 °C. Assim, foram estimados os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e do FDN (DIVFDN).

2.10 Ensaio de Fermentação *in vitro*

As amostras de fezes foram coletadas às 8:00 horas (duas horas após a primeira refeição), diretamente da ampola retal de quatro equinos: dois equinos alimentados com feno de Coastcross e dois equinos alimentados com a dieta completa extrusada (1º fator). Amostras do feno de Coastcross, do feno de *Brachiaria brizantha*, da dieta completa extrusada e da dieta completa antes da extrusão (2º fator) foram moídos a 1 mm e utilizados como substratos. Os frascos de fermentação contendo 90 ml de solução nutritiva (THEODOROU et al., 1994) e 1 g de substrato foram preparados 12 horas antes da inoculação (FRANZAN et al., 2018). O ensaio foi realizado utilizando o método de produção de gases semi-automático (MAURÍCIO et al., 1999).

Aliquotas de 300 gramas de fezes frescas por animal foram pesadas e diluídas em solução nutritiva na proporção 1:1 (peso:peso), separadamente, e homogeneizadas por um minuto no liquidificador. A mistura foi mantida em banho maria à 39 °C, constantemente agitadas e borrifadas com CO₂ (DESROUSSEAU et al., 2012). Após uma hora, o inóculo fecal foi filtrado e usado para inocular os frascos previamente preparados. Vinte réplicas foram incubadas para cada tratamento e mantidos em banho-maria à 39 °C por 72 horas.

A produção de gases foi mensurada utilizando um transdutor de pressão (LOGGER AG100, Datalogger Universal) nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 52, 56, 60, 64, 68 e 72 h, totalizando 32 leituras. O volume de gases (mL g MS⁻¹) foi obtido utilizando a equação específica para as condições experimentais no EQUILAB-UFRRJ (2°45'S, 43°41'O Gr e 33 m altitude) na qual cada psi corresponde a 3,80 mL (MARTINS, 2012):

$$\hat{y} = -0.07 + 3.79x + 0.77x^2$$

Após 72 horas de incubação, os resíduos de cada frasco foram analisados para MS a fim de estimar a degradação (FRANZAN et al., 2018).

2.11 Análise Bromatológica

Amostras do feno de *Brachiaria brizantha* e da dieta completa antes da extrusão foram analisados quanto à MS e FDN. Amostras do feno de Coastcross, da dieta completa extrusada, das fezes e das sobras de alimentos foram analisados quanto: matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e cinzas (MM) (AOAC, 1995), extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB) (SILVA e QUEIROZ, 2006). A fibra foi determinada em detergente neutro (FDN) e detergente ácido (FDA) (VAN SOEST et al., 1991) e lignina analisada por oxidação da lignina com permanganato (VAN SOEST e ROBERTSON, 1980).

2.12 Análises Estatísticas

Os resultados do consumo de volumoso, água e nutrientes, digestibilidade dos nutrientes, tempo médio de retenção, taxa de passagem, produção, pH e concentrações de bactérias anaeróbias totais e celulolíticas das fezes, volume total de gases, degradação de MS, digestibilidade *in vitro* de MS e FDN foram testados para homoscedasticidade das variâncias e normalidade. Atendendo às premissas, foram submetidos à ANOVA ($\alpha = 0,05$). Transformações logarítmicas foram realizadas nas concentrações de bactérias anaeróbias totais e celulolíticas antes da realização dos testes estatísticos.

Os valores médios da degradação da MS, volume final de gases e digestibilidade *in vitro* da MS e FDN foram comparados pelo teste de Student Newman Keuls ($\alpha = 0,05$). As análises foram realizadas com o pacote estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS

3.1 Consumo de Nutrientes e de Água

Os equinos alimentados com feno de Coastcross consumiram 2,51% do peso vivo em MS, enquanto os equinos alimentados com dieta completa extrusada consumiram 2,95% do peso vivo em MS (Tabela 2). O consumo de volumoso em relação ao peso vivo foi de 2,51% pelos equinos alimentados com feno de Coastcross e de 1,27% nos equinos alimentados com dieta completa extrusada. Além disso, foi observada diferença significativa no consumo diário de água ($p=0,0136$), onde os equinos alimentados com feno de Coastcross consumiram maior volume de água comparados aos equinos alimentados com dieta completa extrusada.

Tabela 2. Consumo dietético diário e de água dos equinos alimentados com feno de Coastcross e dieta completa extrusada

Item	Consumo dietético			CV %
	Feno de Coastcross	Dieta completa extrusada	<i>p</i>	
Matéria Seca, % Peso Vivo	2,51 ^b	2,95 ^a	0,0375	11,58
Volumoso, % Peso Vivo	2,51 ^a	1,26 ^b	<0,0001	16,18
Volumoso, Kg/dia	9,09 ^a	4,71 ^b	<0,0001	17,23
	Consumo de água			
Água, litros/dia	33,79 ^a	23,85 ^b	0,0136	19,97
Água, litros/Kg MS	3,74 ^a	2,17 ^b	<0,0001	14,46

Médias com letras diferentes dentro da linha diferem significativamente pelo teste de Fisher ($\alpha=0,05$)

Não foi observada diferença significativa no consumo diário de PB ($p=0,0868$) entre os equinos alimentados com feno de Coastcross ou dieta completa extrusada (Tabela 3). Entretanto, foi observada diferença significativa no consumo diário de MS ($p=0,0302$), MO ($p=0,0225$), EE ($p<0,0001$), FDN ($p=0,0009$), FDA ($p=0,0148$), celulose ($p=0,0145$) e EB ($p=0,0130$). Os equinos alimentados com feno de Coastcross consumiram maior quantidade de FDN, FDA e celulose, enquanto os equinos alimentados com dieta completa extrusada consumiram maiores quantidades de MS, EE e EB.

Tabela 3. Consumo diário de nutrientes e energia bruta dos equinos alimentados com feno de Coastcross ou dieta completa extrusada

Item	Consumo dietético (Kg/dia)			CV %
	Feno de Coastcross	Dieta completa extrusada	<i>p</i>	
Matéria seca	9,09 ^b	10,95 ^a	0,0302	12,70
Matéria orgânica	8,62 ^b	10,50 ^a	0,0225	12,65
Extrato etéreo	0,19 ^b	0,31 ^a	<0,0001	11,35
Proteína bruta	1,29	1,10	0,0868	14,51
Fibra em detergente neutro	6,74 ^a	4,34 ^b	0,0009	16,06
Fibra em detergente ácido	3,21 ^a	2,48 ^b	0,0148	15,04
Celulose	2,53 ^a	1,96 ^b	0,0145	15,05
Energia bruta (Mcal)	40,20 ^b	50,05 ^a	0,0130	12,54

Médias com letras diferentes dentro da linha diferem significativamente pelo teste de Fisher ($\alpha = 0,05$)

3.2 Digestibilidade Aparente Total

Não foi observada diferença da digestibilidade aparente da FDN ($p=0,7946$), FDA ($p=0,9264$) e celulose ($p = 0,7754$) entre nos equinos alimentados com feno de Coastcross ou dieta completa extrusada. Entretanto, foi observada diferença na digestibilidade aparente da MS ($p<0,0001$), MO ($p<0,0001$), PB ($p<0,0001$), EE ($p<0,0001$) e EB ($p<0,0001$). Os coeficientes de digestibilidade da dieta completa extrusada foram superiores, quando comparados aos do feno de Coastcross (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes (%) das dietas de feno de Coastcross e dieta completa extrusada

Nutriente (%)	Dietas		<i>p</i>	CV %
	Feno de Coastcross	Dieta completa extrusada		
Matéria seca	53,4 ^b	73,6 ^a	<0,0001	5,84
Matéria orgânica	53,4 ^b	74,8 ^a	<0,0001	5,71
Extrato etéreo	64,2 ^b	86,1 ^a	<0,0001	4,62
Proteína bruta	71,5 ^b	79,9 ^a	0,0001	3,11
Fibra em detergente neutro	55,8	55,1	0,7946	8,08
Fibra em detergente ácido	47,2	47,5	0,9264	11,02
Celulose	52,8	51,9	0,7754	9,72
Energia bruta	50,9 ^b	73,8 ^a	<0,0001	6,87
Fósforo disponível	25,1	28,7	0,4969	32,96

Médias com letras diferentes dentro da linha diferem significativamente pelo teste de Fisher ($\alpha = 0,05$)

3.3 Cinética de Passagem

Não foi observada diferença no TMR ($p=0,3853$) e na taxa de passagem ($p=0,4271$) da fase sólida da digesta estimados por meio do marcador Cromo mordente nos equinos alimentados com as dietas feno de Coastcross e dieta completa extrusada (Tabela 5). Entretanto, foi observada diferença no TMR ($p=0,0053$) e na taxa de passagem ($p=0,0046$) da fase sólida da digesta entre as dietas quando estimados por meio do marcador LIPE[®].

Tabela 5. Tempo médio de retenção (TMR; horas) e taxa de passagem (TxP; % h⁻¹) da fase sólida da digesta de equinos alimentados com feno de Coastcross e dieta completa extrusada estimados com os marcadores Cromo mordente e LIPE[®]

Parâmetros	Dietas		<i>p</i>	CV %
	Feno de Coastcross	Dieta completa extrusada		
TMR Cromo	39,62	41,48	0,3853	8,76
TxP Cromo	2,54	2,43	0,4271	9,24
TMR LIPE	36,18 ^a	34,54 ^b	0,0053	2,26
TxP LIPE	2,76 ^b	2,90 ^a	0,0046	2,34

Médias com letras diferentes dentro da linha diferem significativamente pelo teste de Fisher ($\alpha = 0,05$)

3.4 Características Fecais

Foi observada diferença na produção fecal ($p=0,0002$) e no pH fecal ($p<0,0001$) entre equinos alimentados com feno de Coastcross e dieta completa extrusada (Tabela 6). Entretanto, não foi observada diferença nas concentrações de bactérias anaeróbias totais ($p=0,3466$) e celulolíticas ($p=0,1413$) observadas nas fezes de equinos alimentados com as distintas dietas.

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos e de contagem bacteriana fecal de equinos alimentados com feno de Coastcross e dieta completa extrusada (CED)

Parâmetros	Dietas		p	CV %
	Feno de Coastcross	Dieta completa extrusada		
Produção fecal, Kg MS/dia	3,01 ^a	2,00 ^b	0,0002	12,12
pH	6,63 ^a	5,86 ^b	<0,0001	3,02
Bactérias anaeróbias, log ₁₀ UFC/g	7,41	7,60	0,3466	3,46
Bactérias celulolíticas, log ₁₀ UFC/g	4,60	4,05	0,1413	10,57

Médias com letras diferentes dentro da linha diferem significativamente pelo teste de Fisher ($\alpha = 0,05$)

3.5 Digestão *in vitro*

Foi observada diferença na digestibilidade *in vitro* da matéria seca ($p < 0,0001$) entre os substratos incubados, entretanto, não foi observada diferença na digestibilidade *in vitro* da FDN entre os substratos ($p = 0,4337$) (Tabela 7).

Tabela 7. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), produção total de gases (mL/g MS) e degradação da matéria seca dos substratos feno de Coastcross, feno de *Brachiaria brizantha*, dieta completa extrusada e dieta completa sem extrusão

Variáveis	Substratos incubados <i>in vitro</i>				p
	Feno de Coastcross	<i>Brachiaria brizantha</i>	Dieta completa extrusada	Dieta completa sem extrusão	
DIVMS, %	49,34 ^b	47,71 ^b	70,52 ^a	71,00 ^a	<0,0001
DIVFDN, %	57,43	54,45	64,59	58,70	0,4337
Volume total de gases, mL/g MS	73,41 ^c	57,85 ^c	121,94 ^b	153,66 ^a	<0,0001
Degradação de MS, mg/g MS	342 ^b	260 ^c	462 ^a	504 ^a	0,0001

Médias com letras diferentes dentro da linha diferem significativamente pelo teste de Student-Newman Keuls ($\alpha = 0,05$)

3.6 Fermentação *in vitro*

Não houve interação entre os fatores dieta dos equinos doadores de inóculo e o substrato incubado sobre o volume final de gases ($p = 0,6134$) e a degradação da MS ($p = 0,9129$). Além disso, não houve efeito da dieta dos equinos doadores de inóculo sobre o volume final de gases ($p = 0,6203$) e na degradação da MS ($p = 0,3419$) após 72 horas de incubação. Entretanto, houve efeito simples dos substratos incubados sobre o volume final de gases ($p < 0,0001$) e na degradação de matéria seca ($p = 0,0001$) (Tabela 7).

As curvas de produção cumulativa de gases possibilitam a análise gráfica da cinética de fermentação dos substratos comparadas em diferentes fases da fermentação (Figura 1). Observa-se que os substratos concentrados apresentaram maior produção de gases desde o início da curva, além disso, possuem taxa de fermentação acelerada até as 24 horas de incubação, onde a produção de gases se estabiliza.

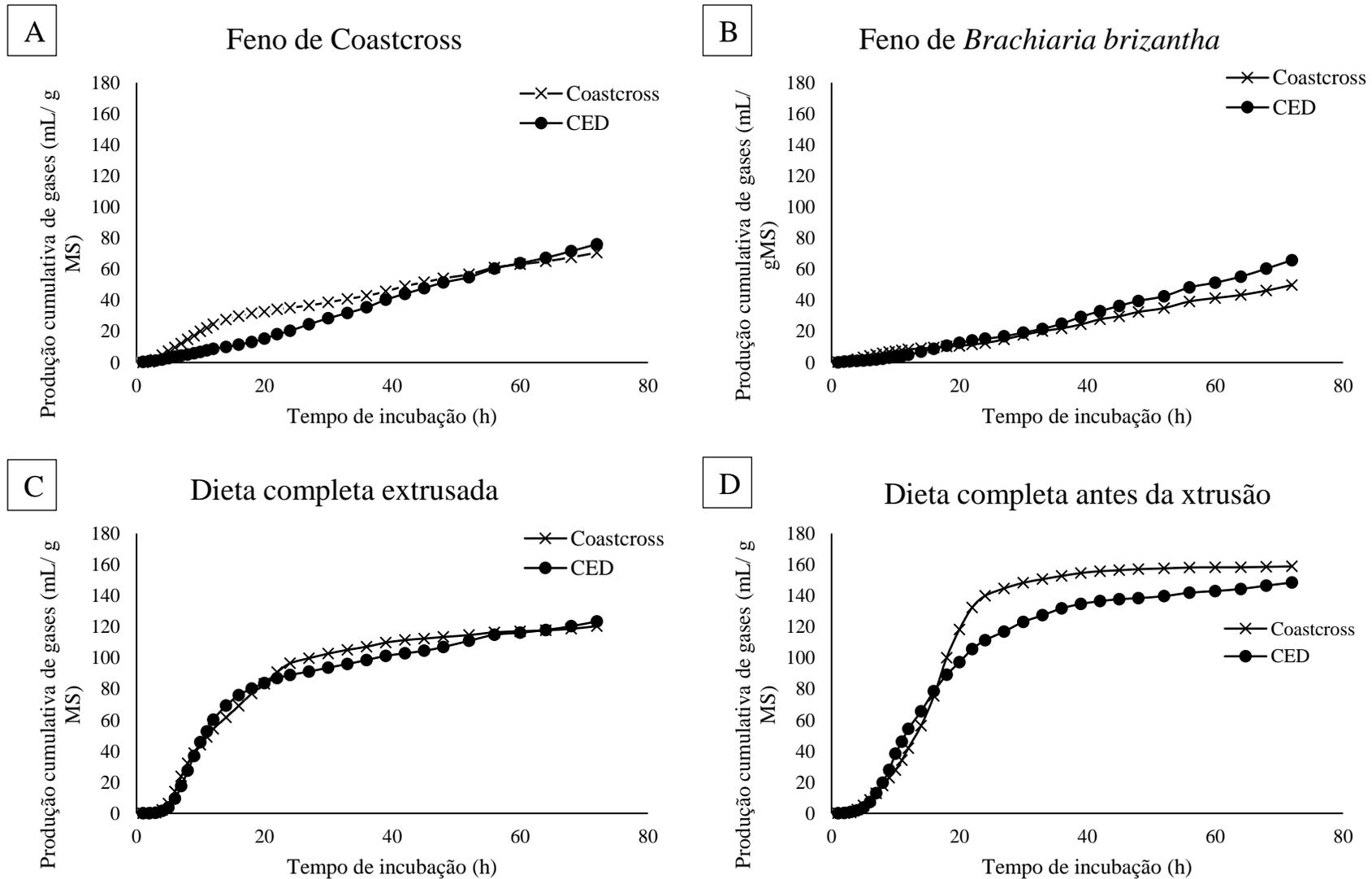


Figura 1. Curvas de produção cumulativa de gases dos substratos feno de Coastcross (A), feno de *Brachiaria brizantha* (B), dieta completa extrusada (C) e dieta completa antes da extrusão (D) inoculados com fezes de equinos alimentados com feno de Coastcross ou dieta completa extrusada.

4 DISCUSSÃO

Os equinos são animais herbívoros e suas exigências nutricionais podem ser atendidas pelo consumo de alimentos volumosos. O capim do gênero *Cynodon* Cv. Coastcross é comumente utilizado para a formação das pastagens destinadas aos equinos e apresenta características morfológicas e nutricionais adequadas para a conservação e utilização na forma de feno (BOTT et al., 2013). Assim, o feno de Coastcross pode ser utilizado como alimento único na dieta de equinos em manutenção (ALMEIDA et al., 1999b). Ao mesmo tempo, a expansão e a intensificação da produção de equinos demandou o desenvolvimento de novas formas de processamento e conservação das forragens para facilitar o manuseio e o armazenamento (PIMENTEL et al., 2009). A dieta completa pode ser recomendada para casos específicos, como potros desmamados, animais idosos, alguns casos clínicos relacionados a doenças gastrointestinais (RALSTON, 1990; ANDREW et al., 2006; ARGO, 2016). Contudo, a dieta completa está associada a problemas digestivos e comportamentais, devido ao menor tempo de alimentação (ARGO et al., 2002; ELIA et al., 2010). Ainda assim, poucos estudos foram realizados para desenvolver a aplicação da dieta completa na alimentação de equinos, levando em consideração o manejo alimentar, composição nutricional da dieta, diferenças nos ingredientes da ração, fonte de volumoso utilizado, além das tecnologias de processamento e apresentação do produto final (NAGATA, 1970; ANDREW et al., 2006; NRC, 2007; FELTRE et al., 2019).

Estima-se que o consumo voluntário de feno de gramíneas pelos equinos seja cerca de 2% do peso vivo do animal (NRC, 2007). No entanto, ressalta-se que o consumo voluntário de MS do feno é controlado por uma série de fatores, entre eles a forma física de fornecimento, onde o consumo é maior quando uma forma mais densa é oferecida comparado ao feno oferecido solto (HAENLEIN et al., 1966; NRC, 2007). Além disso, quando a ingestão do alimento é facilitada, como em equinos alimentados com dietas completas peletizadas, o consumo voluntário pode ser maior do que a mesma dieta oferecida separadamente (ARGO et al., 2002), desse modo, pode chegar até 3,2% do peso vivo em equinos adultos (NRC, 2007; PIMENTEL et al., 2009). Portanto, os valores observados estavam dentro do limite normal de consumo de equinos em manutenção, de 2,51% do peso vivo em MS com feno de Coastcross e, de 2,95% do peso vivo em MS com dieta completa extrusada.

Equinos estabulados que possuem livre acesso à alimentação, adotam padrões de alimentação semelhantes aos descritos em condições de vida livre (RALSTON, 1984). Pôneis alimentados com dieta completa peletizada *ad libitum*, gastam 9 horas em atividade alimentar, consumindo cerca de 10 refeições diárias (RALSTON et al., 1979). Desse modo, o aumento do número de refeições e a utilização de artifícios para enriquecimento ambiental (HENDERSON e WARAN, 2001; SARRAFCHI e BLOKHUIS, 2013) podem ser alternativas para uso dessa dieta. Além disso, para funcionar como um produto de livre escolha, a dieta completa extrusada deve ter baixa densidade energética e fornecer a densidade aparente adequada ao sistema digestivo equino (OTT et al., 1999).

O consumo de água é influenciado pelo estado fisiológico dos equinos, duração e intensidade de trabalho e/ou exercícios, a dieta consumida, além da temperatura e umidade do ambiente (NRC, 2007). Em relação à dieta, tanto o total de alimento quanto a composição da matéria seca consumida influenciam o consumo de água pelos equinos (CYMBALUK, 1989). O consumo de dietas predominantemente de alimentos volumosos, conseqüentemente, que fornecem maior quantidade de fibra, foram associadas ao maior consumo de água (WARREN et al., 1999). O NRC (2007) estima o consumo de água de 9,6 L / 100 Kg de peso vivo por equinos em manutenção alimentados exclusivamente com feno na quantidade 1,5 kg / dia / 100 kg de peso vivo em ambientes com temperatura de 30 °C. Enquanto para equinos alimentados com 2 kg / dia / 100 kg de peso vivo de uma dieta mista composta por feno e grãos, a estimativa de

consumo de água foi de 6,2 L / 100 de peso vivo. Assim, observou-se que equinos alimentados com feno de Coastcross consumiram maior volume de água comparado aqueles alimentados com a dieta completa extrusada, 33,79 e 23,85 L / dia, respectivamente. Além disso, a proporção de água por quilo de alimento consumido, de 3,74 e 2,17, para as respectivas dietas estão de acordo ao observado por Cymbaluk (1989), de 3,3 para feno de alfafa e 2 L de água / kg de alimento completo peletizado. A composição química da dieta está relacionada ao consumo de água pelos equinos, uma vez que os polissacarídeos não amiláceos possuem propriedade hidrofílica (PARSONS et al., 2011). Desse modo, o aumento do teor de fibras do intestino grosso pode atuar como um reservatório de água para os equinos (PARSONS et al., 2011), entretanto, depende do tipo de fibra e do tamanho da partícula (WARREN et al., 1999; PARSONS et al., 2011). Quatro fontes diferentes de fibra comuns na alimentação de equinos foram testadas para capacidade de adsorção de água, feno de gramínea, polpa de beterraba, feno de alfafa e uma mistura de feno de gramínea com casca de soja, o feno de gramínea demonstrou superior capacidade de adsorção de água em comparações as outras fontes (PARSONS et al., 2011). Além disso, a redução da partícula de 5 para 1 mm diminuiu a capacidade de hidratação da partícula (PARSONS et al., 2011).

Os equinos alimentados com a dieta completa extrusada consumiram menor conteúdo dos componentes fibrosos e maior conteúdo de energia quando comparado aos equinos alimentados com o feno de Coastcross, por se tratar de uma dieta mista, contendo ingredientes concentrados e volumoso. Embora se saiba sobre a importância do consumo da fibra, existem poucas referências práticas para a aplicação deste conceito de forma quantitativa e qualitativa nas dietas. A definição da exigência diária de fibras pelos equinos não está estabelecida, ainda assim, o consumo da dieta completa extrusada incluiu a recomendação de Hintz (2000) com 45% de FDN e 25% de FDA como o mínimo para proteger contra distúrbios intestinais em equinos alimentados com dietas com grãos de cereais. Devido a sua importância na produção de saliva, tempo de consumo e no comportamento ingestivo, existem indicações práticas para o fornecimento de volumoso de fibras longas aos equinos, de 1 a 1,5% do peso vivo (NRC, 2007; COENEN e VERVUERT, 2010). Contudo, esse tema é foco de discussão quanto à manutenção da saúde do trato gastrointestinal e do bem-estar da espécie.

A avaliação da digestibilidade dos nutrientes na espécie equina deve considerar diversos fatores que podem afetar o processo digestivo, como o efeito individual, quantidade de alimento consumido, conteúdo de fibra e tamanho de partícula dos alimentados da dieta, teor de água, tempo de trânsito do alimento pelo trato digestivo (NRC, 2007). No presente estudo, os coeficientes de digestibilidade da MS, MO, EE e PB foram maiores na dieta completa extrusada, conseqüentemente, o coeficiente de digestibilidade da energia bruta foi maior quando comparado ao feno de Coastcross, resultado esperado devido a menor concentração dos componentes fibrosos presentes na dieta completa extrusada (ALMEIDA et al., 1999a). Contudo, não foi observado diferença significativa nos coeficientes de digestibilidade dos componentes fibrosos entre as duas dietas.

Estudos de digestibilidade dos nutrientes de dietas completas descreveram resultados contraditórios no que se refere ao aproveitamento dos nutrientes. Parkins et al. (1982) observaram coeficientes de digestibilidade da MS, MO e EB em cerca de 50%, enquanto para a PB e o EE foram de 70%, mas a digestibilidade da fibra bruta foi de 24%. Enquanto Hintz e Loy (1966) observaram apenas aumento da digestibilidade do EE quando a dieta foi peletizada, Haenlein et al. (1966) observaram redução da digestibilidade da fibra bruta. Destaca-se que a composição de ingredientes utilizados na formulação da dieta completa utilizada em muitos trabalhos não é informada, o que dificulta a comparação entre estudos. Além disso, o tipo de processamento a que a dieta foi submetida também influencia na digestibilidade dos nutrientes (OTT et al., 1999). Hintz et al. (1985) relataram que uma dieta contendo concentrado extrusado foi digerida com maior eficiência do que dietas contendo concentrados peletizados.

As principais preocupações na formulação de dietas concentradas para equinos são a quantidade de carboidratos hidrolisáveis, o fornecimento de fibra ao intestino grosso e o tempo de permanência das partículas de alimento em cada compartimento do trato digestivo, uma vez que a ação dos microrganismos do ceco e cólon equino, que resulta na eficiência de digestão dos constituintes da parede celular do alimento volumoso depende desses fatores (DROGOUL et al., 2000ab; HILL, 2007). Apesar do uso de dietas peletizadas e extrusadas conseguir alcançar os objetivos quanto às concentrações de carboidratos hidrolisáveis e fibras, a redução do tamanho de partícula necessária aos respectivos processamentos pode alterar o tempo de mastigação e, conseqüentemente, o tempo de consumo (PIMENTEL et al., 2009). O tamanho de partícula, tem importância no controle da taxa de passagem dos alimentos no trato gastrointestinal e, portanto, no tempo de permanência em cada compartimento do intestino (VAN WEYENBERG et al., 2006) Partículas menores e ração com maior capacidade de retenção de água movem-se mais lentamente através do intestino, entretanto, a redução do tamanho da partícula, além da realizada pela mastigação dos equinos pode interferir nos mecanismos de separação de partículas do cólon (DROGOUL et al., 2000ab). A mastigação dos equinos consegue reduzir a partícula do alimento de forma eficiente, entretanto, a digesta possui um padrão de distribuição de partículas de diferentes tamanhos, resultando no mecanismo fisiológico da cinética de passagem da digesta (VAN WEYENBERG et al., 2006; HILL, 2007).

Apesar da tecnologia de processamento de alimentos ter como objetivo romper a parede celular o máximo possível, a redução do comprimento da fibra pode acelerar a taxa de passagem (VAN WEYENBERG et al., 2006), assim, existe a necessidade de um tamanho de partícula ideal para manter a funcionalidade do trato digestivo, entretanto, destaca-se que ainda não há a definição do tamanho ideal de partículas em alimentos processados para equinos (HILL, 2007). Desse modo, o desenvolvimento de processos que não tenham necessidade de redução de partícula que destrua a integridade física da fibra, assim como o de produtos multiparticulados, que tenham inclusão de fibras longas, são alternativas para manter o tempo de mastigação e cinética de passagem naturalmente fisiológicos dos equinos. Silva et al. (2014) observaram que a moagem do feno de Coastcross aumentou o tempo de trânsito da fase líquida no trato digestório dos equinos, mas não interferiu na cinética da fase sólida da digesta, onde a média do TMR e da taxa de passagem foram 36,6 h e 2,7 h⁻¹, respectivamente, valores próximos aos observados no presente estudo, de 39,62 h e 2,54 h⁻¹ para a dieta com feno de Coastcross quando o marcador cromo mordente foi utilizado. Destaca-se que não houve diferença significativa entre as dietas quando o cromo mordente em fibra foi utilizado, entretanto, houve diferença no TMR e na taxa de passagem quando utilizado o indicador LIPE[®].

O conhecimento e avaliação das características físico-químicas das fezes pode facilitar o diagnóstico de distúrbios gastrointestinais (SANTOS et al., 2009), uma vez que refletem o equilíbrio do ecossistema microbiano do intestino grosso dos equinos (GRIMM et al., 2017). A avaliação do pH fecal, por exemplo, é considerada a quantificação indireta da acidificação do intestino grosso. Equinos alimentados com dietas ricas em carboidratos hidrolisáveis apresentam redução no pH fecal (WILLIAMSON et al., 2007). Santos et al. (2009) observaram pH 6,1 nas fezes de equinos alimentados com dieta composta por feno de Coastcross e ração concentrada na proporção de 60:40. De fato, os equinos alimentados com a dieta completa extrusada apresentaram pH fecal menor do que aqueles alimentados com feno de Coastcross, de 5,86 e 6,63, respectivamente, possivelmente, consequência da redução do pH cecal e colônico. Também foi observado nas fezes de equinos alimentados com dietas ricas em carboidratos hidrolisáveis aumento da concentração de bactérias anaeróbias totais e redução das celulolíticas, assim como ocorre nos segmentos do intestino grosso (GRIMM et al., 2017). Entretanto, não foi observado diferença das concentrações dessas bactérias nas fezes dos equinos alimentados com as respectivas dietas. É importante ressaltar que foi utilizada técnica

dependente de cultura, que é limitada na representação da microbiota local (JULLIAND e GRIMM, 2016). A utilização de técnicas independentes de cultura poderia apontar as mudanças quanto à estrutura de comunidade microbiana causada pela dieta completa extrusada. Outro parâmetro importante a ser avaliado é a consistência fecal. Ott et al. (1999) observaram que não houve formação de sibalas típicas quando éguas foram alimentadas com ração extrusada, apesar de permanecerem macias. Essa característica não foi incluída nas variáveis de parâmetros fecais, mas foi observada durante o experimento.

Estudos de digestão *in vivo* são essenciais para validar a utilização de uma dieta para determinada espécie, entretanto, requerem recursos consideráveis em termos de trabalho, alimentação, animais e tempo. Em equinos, ainda existe a capacidade analítica limitada de avaliar muitos tipos de alimentos sem a utilização de animais fistulados. Desse modo, a utilização de ensaios *in vitro* é uma alternativa aos ensaios *in vivo* para avaliar a cinética de fermentação de alimentos separadamente (FRANZAN et al., 2018). Dois ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar quatro substratos, o feno de Coastcross, a dieta completa extrusada, feno de *Brachiaria brizantha* e a mistura de ingredientes da dieta completa antes da extrusão. Os coeficientes de digestibilidade da MS e FDN obtidos por meio da incubadora Ankom Daisy II classificam dietas na mesma ordem do que ensaio de digestão *in vivo*, apesar de não ser o suficiente para estimar a digestibilidade *in vivo* com acurácia (TASSONE et al., 2020). Observou-se que o ensaio de digestão *in vitro* realizado na incubadora Daisy II separou os alimentos volumosos e concentrados, entretanto, assim como no ensaio *in vivo*, não houve diferença entre a digestibilidade do FDN entre os substratos avaliados.

A origem botânica e a maturidade da planta influenciam a digestibilidade do alimento volumoso (ALMEIDA et al., 1999b), pois influenciam diretamente a composição bromatológica do substrato. O capim *Brachiaria brizantha*, fonte de fibra da dieta completa extrusada, possui cultivares que diferem entre si quanto à composição bromatológica mesmo quando são avaliadas no mesmo estágio de maturação, com conteúdo de FDN entre 70 a 80% (EUCLIDES et al., 2009). Além disso, uma mesma cultivar pode variar seu conteúdo em FDN de 57 a 70% de acordo com a idade de corte da planta (COSTA et al., 2007). As informações quanto a cultivar ou idade de corte não estavam disponíveis, entretanto, a degradação da MS do feno de *Brachiaria brizantha* foi inferior comparada aos demais alimentos avaliados, possivelmente, devido ao maior conteúdo de FDA (ELGHANDOUR et al., 2014). Essa diferença foi evidenciada na degradação de MS obtida através do ensaio de fermentação. Segundo Kienzle et al. (2002), a adição de concentrado a uma dieta composta de volumoso de qualidade nutritiva inferior, pode aumentar a digestibilidade do volumoso e melhorar o suprimento de energia para a microbiota intestinal. Diferente da digestão realizada na incubadora Daisy II, o ensaio de fermentação isola o substrato avaliado, assim não há possibilidade de interações com os produtos gerados de outros substratos.

É conhecido que a extrusão de alimentos concentrados aumenta a digestibilidade pré-cecal do amido (JULLIAND et al., 2006). Entretanto, em uma avaliação *in vitro*, o alimento pode ser fermentado na sua forma *in natura*. Após a incubação, os componentes solúveis são fermentados rapidamente, posteriormente ocorrerá a mudança gradual para a fermentação da fração insolúvel, mas potencialmente degradável, que necessitam ser hidratadas e colonizadas pelos microrganismos (POWELL et al., 2020). O volume final de gases produzido no ensaio de fermentação *in vitro* foi menor na dieta completa extrusada quando comparado a mistura moída da dieta completa pré-extrusão, possivelmente pelo menor volume produzido de gases após 24 horas de incubação. A redução relativa do volume final de gases causada pela extrusão foi de aproximadamente 20%. Além disso, essa diferença não foi compensada até o final da incubação, o que sugere que a taxa de fermentação foi constante. O processo de extrusão afeta a estrutura da parede celular e as características físico-químicas dos alimentos (HUANG e MA, 2016). Uma das mudanças é o aumento do conteúdo de fibra insolúvel que pode ser creditada

a dois fenômenos diferentes: a formação de amido resistente e a reação de Maillard (ESPOSITO et al., 2005; ROBIN et al., 2012). A reação de Maillard é caracterizada pela formação de complexo de polissacarídeos proteicos que são insolúveis (GUERRERO et al., 2012). O mais próximo observado *in vivo* foi descrito por Drogoul et al. (2000a), onde os autores sugerem que a peletização diminuiu a taxa de degradação da fibra, uma vez que o feno peletizado permaneceu no intestino grosso por mais tempo que o feno não peletizado, mas sem alterar a digestibilidade dos nutrientes.

Por fim, é importante ressaltar que nenhum animal apresentou desconforto abdominal durante os ensaios, entretanto, avaliações da dieta completa extrusada por um período maior de tempo é necessária para validar a segurança da dieta no manejo alimentar dos equinos.

5 CONCLUSÃO

A dieta completa extrusada é uma alternativa na alimentação de equinos em manutenção por curtos períodos de tempo, uma vez que não causou prejuízos a microbiota fecal. Entretanto, estudos a longo prazo devem ser realizados para determinar se há impactos sobre a saúde gastrointestinal e comportamento ingestivo. Outras fontes de fibra devem ser exploradas na confecção de dietas completas, além do manejo alimentar, como aumentar a frequência das refeições.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. I. V. D.; FERREIRA, W. M.; ALMEIDA, F. Q. D.; GONÇALVES, L. C.; REZENDE, A. S. C. Composição química e predição do valor nutritivo de dietas para equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 6, p. 1268-1278, 1999a.

ALMEIDA, M. I. V.; FERREIRA, W. M.; ALMEIDA, F. Q.; SAINT JUST, C. A.; GONÇALVES, L. C.; REZENDE, A. S. C. Valor nutritivo do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum), do feno de alfafa (*Medicago sativa*, L.) e do feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) para equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 4, p. 743-752, 1999b.

ANDREW, J. E.; KLINE, K. H.; SMITH, J. L. Effects of feed form on growth and blood glucose in weanling horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 8, p. 349-355, 2006.

ARGO, C. M.; COX, J. E.; LOCKYER, C.; FULLER, Z. Adaptive changes in the appetite, growth and feeding behaviour of pony mares offered ad libitum access to a complete diet in either a pelleted or chaff-based form. **Animal Science**, v. 74, n. 3, p. 517-528, 2002.

ARGO, C. MCG. Nutritional management of the older horse. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 32, n. 2, p. 343-354, 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995, 1025p.

BARUC, C.J.; DAWSON, K.A.; BAKER, J.P. The characterization of nitrogen metabolism of equine caecal bacteria. Equine Nutrition and Physiology Symposium, 8. **Proceedings... ENPS**: Kentucky, p. 151-156, 1983.

BOLIN, D. W.; KING, R. P.; KLOSTERMAN, E. W. A simplified method for the determination of chromic oxide (Cr₂O₃) when used as an index substance. **Science (Washington)**, v. 116, p. 634-635, 1952.

- BOTT, R.; GREENE, ELIZABETH A.; KOCH, K.; MARTINSON, K. L.; SICILIANO, P. D.; WILLIAMS, C.; TROTTIER, N. L.; BURK, A.; SWINKER, A. Production and environmental implications of equine grazing. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 12, p. 1031-1043, 2013.
- CLARKE, K. R.; OWENS, N. J. P. A simple and versatile micro-computer program for the determination of 'most probable number'. **Journal of Microbiological Methods**, v. 1, n. 3, p. 133-137, 1983.
- COENEN, M.; VERVUERT, I. A minimum of roughage and a maximum of starch-necessary benchmarks for equine diets. **Pferdeheilkunde**, v. 26, n. 2, p. 147-151, 2010.
- COSTA, K. A. D. P.; OLIVEIRA, I. P. D.; FAQUIN, V.; NEVES, B. P. D.; RODRIGUES, C.; SAMPAIO, F. D. M. T. Intervalo de corte na produção de massa seca e composição químico-bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. MG-5. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1197-1202, 2007.
- CYMBALUK, Nadia F. Water balance of horses fed various diets. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, 1989.
- DESROUSSEAUX, G.; SANTOS, A.S.; PELLIKAAN, W.F.; VAN DER POEL, A.F.B.; CONE, J.W.; GUEDES, C.M.V.; FERREIRA, L.M.M.; RODRIGUES, M.A.M. Effect of collection time on the fermentative activity of microbes in equine faeces. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, p. 183– 189, 2012.
- DROGOUL, C.; PONCET, C.; TISSERAND, J. L. Feeding ground and pelleted hay rather than chopped hay to ponies: 1. Consequences for in vivo digestibility and rate of passage of digesta. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, n. 1-2, p. 117-130, 2000a.
- DROGOUL, Carole; TISSERAND, Jean-Louis; PONCET, Claude. Feeding ground and pelleted hay rather than chopped hay to ponies: 2. Consequences on fibre degradation in the cecum and the colon. **Animal feed science and technology**, v. 87, n. 1-2, p. 131-145, 2000b.
- EARLE, P.I. Compression of Complete Diets for Horses. **Journal of Animal Science**, v.9, p.255- 260, 1950.
- ELGHANDOUR, M. M.; CHAGOYÁN, J. C. V.; SALEM, A. Z.; KHOLIF, A. E.; CASTAÑEDA, J. S. M.; CAMACHO, L. M.; BUENDÍA, G. In vitro fermentative capacity of equine fecal inocula of 9 fibrous forages in the presence of different doses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 5, p. 619-625, 2014.
- ELIA, J. B.; ERB, H. N.; HOUP, K. A. Motivation for hay: effects of a pelleted diet on behavior and physiology of horses. **Physiology & behavior**, v. 101, n. 5, p. 623-627, 2010.
- ESPOSITO, F.; ARLOTTI, G.; BONIFATI, A. M.; NAPOLITANO, A.; VITALE, D.; FOGLIANO, V. Antioxidant activity and dietary Fibre in durum wheat bran by-products. **Food Research International**, v. 38, p. 1167–1173, 2005.
- EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; VALLE, C. B. D.; DIFANTE, G. D. S.; BARBOSA, R. A.; CACERE, E. R. Valor nutritivo da forragem e produção animal em pastagens de *Brachiaria brizantha*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 98-106, 2009.
- FAICHNEY, G. J. The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants. In: McDONALD, I.W., WARNER, A. I. C. (Ed.) **Digestion and metabolism in ruminant**. The University of New England Publishing Unit: Armidale NSW, p.277-291, 1975.

- FELTRE, K.; CARVALHO BALIEIRO, J. C.; FUKUMASU, H.; OLIVEIRA GOBESSO, A. A. Digestive effects and intestinal health of ponies fed a complete single diet, thermally processed and containing long fiber. **Livestock Science**, v. 223, p. 151-156, 2019.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001
- FRANZAN, B. C.; FRANCO, T. W.; STEFANI, G.; PEREIRA, M. M.; ALMEIDA, F. Q. D.; SILVA, V. P. Equine fecal inoculum optimization in in vitro fermentation assays of dehydrated roughage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 47:e20180006, 2018.
- GRIMM, P.; PHILIPPEAU, C.; JULLIAND, V. Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. **Animal**, v. 11, n. 7, p. 1136-1145, 2017.
- GUERRERO, P.; BEATTY, E.; KERRY, J.P.; CABA, K. DE LA. Extrusion of soy protein with gelatin and sugars at low moisture content. **Journal of Food Engineering**, v.110, p. 53-59, 2012.
- HAENLEIN, G. F. W.; HOLDREN, R. D.; YOON, Y. M. Comparative response of horses and sheep to different physical forms of alfalfa hay. **Journal of Animal Science**, v. 25, n. 3, p. 740-743, 1966.
- HALLIWELL, G.; BRYANT, M. P. The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. **Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 441-448, 1963.
- HANSEN, T. L.; CHIZEK, E. L.; ZUGAY, O. K.; MILLER, JESSICA, M.; BOBEL, J. M.; CHOINARD, J. W.; ADKIN, A. M.; SKURUPEY, L. A.; WARREN, L. K. Digestibility and Retention Time of Coastal Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) Hay by Horses. **Animals**, v. 9, n. 12, p. 1148, 2019.
- HENDERSON, J. V.; WARAN, N. K. Reducing equine stereotypies using an Equiball™. **Anim. welf**, v. 10, p. 73-80, 2001.
- HILL, J. Impacts of nutritional technology on feeds offered to horses: A review of effects of processing on voluntary intake, digesta characteristics and feed utilization. **Animal Feed Science and Technology**, v. 138, n. 2, p. 92-117, 2007.
- HINTZ, H. F.; LOY, R. G. Effects of pelleting on the nutritive value of horse rations. **Journal of Animal Science**, v. 25, n. 4, p. 1059-1062, 1966.
- HINTZ, H. F.; SCOTT, J. K.; HERNANDEZ, T.; SHEWOKIS, L. Extruded feeds for horses. In: **Proceedings-Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers**. 1985.
- HINTZ, Harold F. Equine nutrition update. **AAEP Proceedings** 46: 62, v. 79, 2000.
- HUANG, Y. L.; MA, Y. S. The effect of extrusion processing on the physiochemical properties of extruded orange pomace. **Food chemistry**, v. 192, p. 363-369, 2016.
- JULLIAND, V.; DE FOMBELLE, A.; VARLOUD, M. Starch digestion in horses: the impact of feed processing. **Livestock science**, v. 100, n. 1, p. 44-52, 2006.
- JULLIAND, V.; DE VAUX, A.; MILLET, L.; FONTY, G. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3738-3741, 1999.
- KIENZLE, E.; FEHRLE, S.; OPITZ, B. Interactions between the apparent energy and nutrient digestibilities of a concentrate mixture and roughages in horses. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1778S-1780S, 2002.

- KIMURA, F. T.; MILLER, V. L. Chromic oxide measurement, improved determination of chromic oxide in cow feed and feces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 216-216, 1957.
- LEEDLE, J.A.Z.; HESPELL, R.B. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, n.4, p.709- 719, 1980.
- MARTINS, J. A. **Suplementação Dietética de Equinos com Eletrólitos**. UFRRJ, 37p. 2012. Seropédica, RJ. (Dissertação – Mestrado em zootecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.
- MAURÍCIO, R. M.; MOULD, F.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNAA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 321-330, 1999.
- MIRAGLIA, N.; BERGERO, D.; POLIDORI, M.; PEIRETTI, P. G.; LADETTO, G. The effects of a new fibre-rich concentrate on the digestibility of horse rations. **Livestock Science**, v. 100, n. 1, p. 10-13, 2006.
- NAGATA, Y. Development of complete pelletized rations for racing horses at different stages of growth. **Experimental Reports of Equine Health Laboratory**, v. 1970, n. 7, p. 33-42, 1970.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of horses**. 6.ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 341p. 2007.
- OTT, E.A.; KIVIPELTO, J.; McQUAGGE, J. Feeding of complete, extruded feed to mares. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.19, n.7, p.459-462, 1999.
- PARKINS, J. J.; SNOW, D. H.; ADAMS, S. The apparent digestibility of ‘complete diet’ cubes given to thoroughbred horses and the use of chromic oxide as an inert faecal marker. **British Veterinary Journal**, v. 138, n. 4, p. 350-355, 1982.
- PARSONS, A. M.; NIELSEN, B. D.; SCHOTT, H. C.; GEOR, R.; YOKOYAMA, M.; HARRIS, P. Effects of fiber type, particle size, and soak time on water hydration and estimated potential water releasing capacities of roughages fed to horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 5, n. 31, p. 261, 2011.
- PIMENTEL, R. R. M.; ALMEIDA, F. Q. D.; VIEIRA, A. A.; OLIVEIRA, A. P. P. D.; GODOI, F. N. D.; FRANÇA, A. B. Consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes e balanço hídrico em equinos alimentados com feno de coast-cross em diferentes formas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1272-1278, 2009.
- POWELL, C. D.; DHANOA, M. S.; GARBER, A.; MURREY, J.-A. M. D., LÓPEZ, S., ELLIS, J. L., FRANCE, J. Models Based on the Mitscherlich Equation for Describing Typical and Atypical Gas Production Profiles Obtained from In Vitro Digestibility Studies Using Equine Faecal Inoculum. **Animals**, v. 10, p. 308, 2020.
- RALSTON, S. L. Clinical nutrition of adult horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 6, n. 2, p. 339-354, 1990.
- RALSTON, S. L. Controls of feeding in horses. **Journal of animal science**, v. 59, n. 5, p. 1354-1361, 1984.
- RALSTON, S. L.; VAN DEN BROEK, G.; BAILE, C. A. Feed intake patterns and associated blood glucose, free fatty acid and insulin changes in ponies. **Journal of animal science**, v. 49, n. 3, p. 838-845, 1979.

- ROBIN, F., SCHUCHMANN, H. P., & PALZER, S. Dietary fiber in extruded cereals: Limitations and opportunities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 28, p. 23–32, 2012.
- ROSENFELD, I.; AUSTBØ, D. Digestion of cereals in the equine gastrointestinal tract measured by the mobile bag technique on caecally cannulated horses. **Animal feed science and technology**, v. 150, n. 3-4, p. 249-258, 2009.
- SALIBA, E. O. S.; FARIA, E. P.; RODRIGUEZ, N. M.; MOREIRA, G. R.; SAMPAIO, I. B. M.; SALIBA, J. S.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, I.; BORGES, A. L. C. C. Use of infrared spectroscopy to estimate fecal output with marker Lipe®. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 4, p. 1-10, 2015.
- SANTOS, T. M. D.; ALMEIDA, F. Q. D.; GODOI, F. N. D.; SILVA, V. P.; FRANÇA, A. B.; SANTIAGO, J. M.; SANTOS, C. S. D. Capacidade tamponante, pH e consistência das fezes em equinos submetidos à sobrecarga dietética com amido. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1782-1788, 2009.
- SARRAFCHI, A.; BLOKHUIS, H. J. Equine stereotypic behaviors: causation, occurrence, and prevention. **Journal of Veterinary behavior**, v. 8, n. 5, p. 386-394, 2013.
- SCHNEIDER, B. H.; FLATT, W. P. **The evaluation of feeds through digestibility experiments**. Athens: The University of Georgia, 1975. 423 p.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária, 3º edição, 235p, 2006.
- SILVA, V. P.; ALMEIDA, F. Q. D.; PIMENTEL, R. R. M.; GODOI, F. N. D.; SANTOS, T. M. D.; PIRES, M. S. Passage kinetics of digesta in horses fed with coastcross hay ground to different degrees. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 5, p. 506-514, 2014.
- THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, n.2, p.104-111, 1963.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. In: Standardization of analytical methodology for feeds. Pigden, W. J.; Balch, C. C.; Graham, M., eds. IDRC, Ottawa, Canada. p.49-60. 1980.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- VAN WEYENBERG, S.; SALES, J.; JANSSENS, G. P. J. Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: A review. **Livestock science**, v. 99, n. 1, p. 3-12, 2006.
- WARREN, L. K.; LAWRENCE, L. M.; BREWSTER-BARNES, T. A. M. M. Y.; POWELL, D. M. The effect of dietary fibre on hydration status after dehydration with frusemide. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. S30, p. 508-513, 1999.
- WILLIAMSON, A.; ROGERS, C. W.; FIRTH, E. C. A survey of feeding, management and faecal pH of Thoroughbred racehorses in the North Island of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 55, n. 6, p. 337-341, 2007.

CAPÍTULO II

DIETA COMPLETA EXTRUSADA PARA EQUINOS: IMPACTOS SOBRE O MICROBIOMA FECAL

RESUMO

As dietas completas são alimentos processados comumente usados na alimentação de equinos, formuladas para atender às as exigências nutricionais diárias sem suplementação. Elas podem ser usadas na criação de equinos, desde que a saúde gastrointestinal não seja afetada. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da adaptação gradual de equinos a uma dieta completa extrusada (CED) em sua diversidade bacteriana fecal. Seis equinos adultos castrados da raça Mangalarga Marchador com peso médio de 380 kg foram removidos de uma pastagem nativa e alimentados com feno de Coastcross (*Cynodon* spp. Cv. Coastcross) por uma semana. Na segunda semana, os equinos foram divididos em dois grupos (n=3 cada): um alimentado exclusivamente com dieta de feno de Coastcross (CHD) por 21 dias e outro alimentado com aumentos semanais dos níveis de CED (30, 60 e 100%) em substituição ao CHD, totalizando 21 dias. Amostras fecais foram coletadas semanalmente para análises de microbioma e fermentação *in vitro*. A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada e sequenciada na plataforma Illumina MiSeq. O feno de Coastcross e a dieta completa extrusada foram utilizados como substrato no ensaio de fermentação *in vitro*. As sequências foram analisadas usando o software Mothur e a análise estatística realizada pelo pacote estatístico Past3. Os resultados foram submetidos à ANOVA ($\alpha = 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Após 28 dias de consumo de CHD, a abundância relativa do filo Actinobacteria foi maior quando comparado a 7 dias de consumo ($p=0,014$). O consumo da CED afetou significativamente os filos Verrucomicrobia ($p=0,030$), Synergistetes ($p=0,005$), Tenericutes ($p<0,001$) e Lentisphaerae ($p=0,004$). A riqueza e diversidade de espécies bacterianas fecais do equinos alimentados com CED foi mantida até a semana 3 e diminui na semana 4. Além disso, os equinos alimentados com CED mostraram uma maior abundância da ordem Synergistales do que os equinos alimentados com CHD ($p=0,016$). O microbioma fecal de equinos está associado à sua dieta, e a inclusão de 30% de CED afeta a abundância de grupos bacterianos capazes de alterar a atividade fermentativa *in vitro*. A estabilidade da diversidade está associada à presença de volumoso na dieta.

Palavras-chaves: concentrado, equino, fermentação, fibra, microbiota

ABSTRACT

Complete diets are processed foods commonly used in horse feeding, formulated to meet their daily nutritional requirements without supplementation. They can be used in horse breeding, as long as gastrointestinal health is not affected. This study aimed to evaluate the effect of gradual adaptation of horses to a complete extruded diet (CED) on their faecal bacterial diversity. Six Mangalarga Marchador geldings weighing 380 kg were removed from a native pasture and fed Coastcross hay (*Cynodon* spp. Cv. Coastcross) for one week. In the second week, the horses were divided into two groups (n=3 each): one fed exclusively with Coastcross hay diet (CHD) for 21 days and the other fed with weekly increases of CED levels (30, 60, and 100%) to replace CHD, totaling 21 days. Faecal samples were collected weekly for microbiome and *in vitro* fermentation analyses. The V4 region from the 16S rRNA gene was amplified and sequenced on the MiSeq platform. The Coastcross hay and the complete extruded diet were used as a substrate in the *in vitro* fermentation assay. Sequences were analysed using the Mothur software and the statistical analysis performed by the Past3 statistical package. The results were submitted to ANOVA ($\alpha = 0.05$) and the means compared by the Tukey test ($\alpha = 0.05$). After 21 days of CHD intake, the relative abundance of phylum Actinobacteria increased ($p=0.014$). Complete extruded diet intake significantly affected the phyla Verrucomicrobia ($p=0.030$), Synergistetes ($p=0.005$), Tenericutes ($p<0.001$), and Lentisphaerae ($p=0.004$). Diversity of faecal bacterial species was maintained up to week 3. After 21 days, horses fed with CED showed a greater abundance of order Synergistales than CHD-fed horses ($p=0.016$). The fecal microbiome of horses is associated with their diet, and inclusion of 30% CED affects its microbial abundance and the detection of bacterial groups able to alter *in vitro* fermentative activity. Also, diversity stability appears to be associated with the presence of roughage in the diet.

Keywords: concentrate meal, equine, fermentation, fibre, microbiota

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da microbiota gastrointestinal de equinos mantidos a pasto é um processo naturalmente dinâmico, pois se adapta continuamente em resposta à disponibilidade e qualidade da forragem que varia de acordo com fatores climáticos e ambientais (ARCHER et al., 2017; SALEM et al., 2018). Além disso, é bem conhecido que o regime alimentar e o manejo ao longo da vida, raça e origem geográfica podem influenciar a microbiota intestinal dos equinos (COSTA et al., 2012; O'DONNELL et al., 2013; FERNANDES et al., 2014). No entanto, a prática de confinar os equinos em centros de treinamento, que geralmente ficam próximos às áreas urbanas, reduz a disponibilidade de áreas de pastagem. Isso também limita o armazenamento de alimentos volumosos, uma vez que grandes áreas são necessárias para seu armazenamento adequado (CLARKE et al., 1990). Portanto, há uma necessidade de desenvolver alimentos destinados a atender às exigências nutricionais diárias dos equinos, incluindo o conteúdo de fibra, mas que também sejam produtos fáceis de manusear e armazenar.

O baixo consumo de fibras reduz o tempo de mastigação dos equinos e induz problemas de saúde (COENEN e VERVUET, 2010). Além disso, a adição de grãos que fornecem amido em excesso à dieta dos equinos altera a composição e a estabilidade da microbiota intestinal (HANSEN et al., 2015). Atualmente, concentrados com alto teor de fibra têm sido formulados para manter a comunidade bacteriana do intestino grosso equino (MIRAGLIA et al., 2006). Nesse contexto, a dieta extrusada completa pode ser utilizada como alternativa na alimentação de equinos.

A dieta extrusada completa é definida pela reunião de todos os nutrientes exigidos por uma categoria animal em um único produto, exceto água. Para tanto, a mistura passa por uma extrusora para a produção de rações que se destinam a ser oferecidas como uma refeição completa aos animais, sem adição de grãos, suplementos e pasto ou feno. A extrusão dos alimentos permite a inclusão de fontes de fibras nos *kibbles* (HILL, 2007), garantindo assim o consumo mínimo de fibras para o bom funcionamento gastrointestinal. É um excelente processo termoplástico para aumentar a digestibilidade pré-cecal do amido do cereal, dependendo de sua origem botânica (POTTER et al., 1992; VERVUERT et al., 2004; 2008; JULLIAND et al., 2006), o que evita a fermentação indesejável no intestino grosso devido à sobrecarga de amido (JULLIAND et al., 2006).

Como dietas completas para a alimentação de equinos são adotadas há muito tempo (EARLE, 1950), há algumas evidências de que sua utilização pode fornecer bons resultados em situações específicas. Um estudo realizado com potros desmamados constatou que a dieta completa leva a um maior ganho de peso em comparação com uma dieta com os mesmos ingredientes fornecidos separadamente (ANDREW et al., 2006). Além disso, a dieta é benéfica para equinos idosos e animais com problemas dentários porque seu tamanho de partícula reduzido facilita a mastigação, deglutição, digestão e reduz o risco de cólicas por compactação (ARGO, 2016). A dieta completa tem sido usada em eventos clínicos relacionados a doenças gastrointestinais, como diarreia crônica, enterolitíase e ressecção cirúrgica extensa do intestino grosso (RALSTON, 1990). No entanto, o consumo dessas dietas tem sido associado a comportamentos estereotipados e consequências fisiológicas negativas devido à redução da taxa de mastigação e do tempo de alimentação (ELIA et al., 2010). Além disso, apesar do crescente número de estudos sobre o microbioma equino, o efeito de dietas completas extrusadas sobre a manutenção do microbioma permanece pouco pesquisado.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a microbiota fecal de equinos adultos em manutenção alimentados com dieta completa extrusada, assumindo que a adaptação gradual dos animais à dieta extrusada completa não afeta a composição da comunidade e diversidade bacteriana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

O ensaio foi executado no Setor de Garanhões da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, e as amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia, no Laboratório de Pesquisas em Saúde Equina (EQUILAB) e no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, ambos do Instituto de Veterinária na UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Este trabalho foi conduzido de acordo com as normas éticas e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob número de protocolo 3083.029756/2017-10.

2.2 Animais

Seis equinos machos adultos castrados da raça Mangalarga Marchador foram usados no experimento. A idade dos equinos era de $4 \pm 0,8$ anos e seu peso vivo (PV) era de 380 ± 25 kg. Os equinos foram retirados de pastagens nativas de *Urochloa decumbens* e *Paspalum notatum* e, uma vez transferidos para as instalações experimentais da UFRRJ, foram submetidos ao controle do parasita com ivermectina (EQVALAN, Boehringer Ingelheim, Alemanha) e cipermetrina (CIPERALLVET, Eurofarma, Brasil). Avaliações clínicas e hematológicas foram realizadas antes do início do período experimental para confirmar o estado de saúde dos animais. Os equinos foram mantidos em baias individuais com livre acesso a água e sal mineral. Nenhum antimicrobiano foi dado aos animais durante o período experimental.

2.3 Período Experimental

O período experimental durou 28 dias (quatro semanas). Durante a primeira semana, todos os equinos foram alimentados com dieta de feno de Coastcross (CHD; *Cynodon* spp. Cv Coastcross) *ad libitum*. Durante a segunda semana, os equinos foram divididos aleatoriamente em dois grupos. O grupo CHD ($n = 3$) foi alimentado exclusivamente com dieta de feno de Coastcross por 21 dias, enquanto o grupo CED ($n = 3$) foi alimentado com níveis crescentes da dieta completa extrusada (CED; FORAGGE HORSE, Nutratta, Brasil) para substituir o CHD. A proporção de CHD: CED na dieta dos animais foi ajustada semanalmente da seguinte forma: 70:30 (semana 2), 40:60 (semana 3) e 0:100% (semana 4) (Figura 1). A CED foi dividida igualmente e oferecida em três refeições diárias às 08:00, 13:00 e 18:00 h, enquanto o CHD foi disponibilizado *ad libitum* no comedouro de feno tipo rede.

Três ensaios foram realizados para atender aos seguintes objetivos:

_ *Ensaio I*: avaliar as alterações do microbioma fecal em equinos alimentados exclusivamente com volumoso em dois momentos de adaptação ao consumo de CHD. Para tanto, foram coletadas amostras fecais de animais alimentados exclusivamente com CHD aos 7 (S1) e 28 (S4) dias após o início do consumo de CHD.

_ *Ensaio II*: avaliar as alterações do microbioma fecal de equinos alimentados com CED em quatro momentos de adaptação ao consumo de CED. Amostras fecais dos animais alimentados com CED ($n = 3$) foram coletadas semanalmente, no 7º dia, seguindo as relações CHD:CED: semana 1, 100:0; semana 2, 70:30; semana 3, 40:60; semana 4, 0:100%.

_ *Ensaio III*: avaliar as alterações no microbioma fecal de equinos dos grupos CHD ($n = 3$) e CED ($n = 3$) após 28 dias de consumo alimentar (semana 4).

Período Experimental

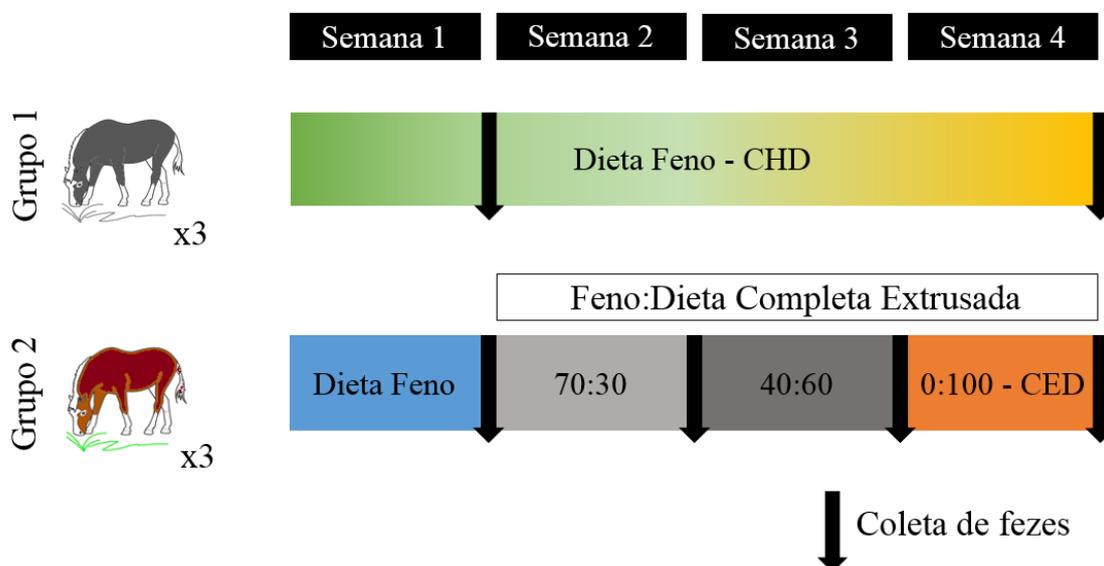


Figura 1. Cronograma da coleta de amostras fecais para o ensaio de fermentação *in vitro* e análise de microbioma

Amostras fecais foram coletadas manualmente do reto usando uma luva descartável. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos lacrados e transportadas para o laboratório em caixa térmica a 39 °C. As amostras foram divididas para serem utilizadas como inóculo fecal para o ensaio de fermentação *in vitro* ou para serem congeladas e armazenadas a -20 °C até a extração do DNA.

Tabela 1. Composição química do feno de Coastcross e da dieta completa extrusada, na base da matéria seca

Item	Alimento	
	Feno de Coastcross	Dieta completa extrusada
Matéria seca, g/Kg	900	888
Composição química, g/Kg MS		
Matéria mineral	58	46
Extrato etéreo	23	33
Protéina bruta	157	114
Fibra em detergente neutro	823	446
Fibra em detergente ácido	392	255
Celulose	319	200
Lignina ¹	73	55
Carboidratos não fibrosos ²	0	362
Conteúdo energético		
Energia bruta, kcal/Kg MS	4421	4572
Energia digestível, kcal/Kg MS ³	1740	2710

¹ Lignina determinada por oxidação de permanganato

² CNF = 100 - (%PB + %FDN + %EE + %MM)

³ Energia digestível estimada, Pagan (1998) = 2118 + 12.18 × (% PB) - 9.37 × (% FDA) - 3.83 × (% hemicelulose) + 47.18 × (% EE) + 20.35 × (% CNF) - 26.3 × (% MM)

2.4 Análises Bromatológicas

Amotras do feno de Coastcross e da dieta completa extrusada foram analisadas quanto à matéria seca (MS), proteína bruta (PB), cinzas (AOAC, 1995), extrato etéreo (EE) e energia bruta (SILVA e QUEIROZ, 2006). Também quanto a lignina por oxidação com permanganato (VAN SOEST e ROBERTSON, 1980), bem como o conteúdo de fibra em detergente neutro (FDN) e detergente ácido (FDA) (VAN SOEST et al., 1991) (Tabela 1). O consumo médio de MS foi de 25 g MS kg⁻¹ de PV para as respectivas dietas testadas (Tabela 2) e, portanto, a quantidade supriu as exigências nutricionais de equinos em manutenção (NRC, 2007).

2.5 Ensaio de Fermentação *in vitro*

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso com medidas repetidas. Foi utilizada a técnica semiautomática de produção de gases. Amostras de feno de Coastcross (volumoso) e dieta extrusada completa (concentrado) foram moídas a 1 mm para serem utilizadas como substrato. Os frascos de fermentação contendo a solução nutritiva (THEODOROU et al., 1994) e 1 g dos substratos foram preparadas 12 horas antes da inoculação fecal (FRANZAN et al., 2018). Alíquotas de 100 g de fezes frescas por animal foram pesadas e diluídas em solução nutritiva na proporção 1:1 (peso:peso). A mistura de fezes e solução nutritiva foi mantida por 1 h em banho-maria (39 °C) com agitação constante e pulverização de CO₂. Após 1 h, o inóculo fecal foi filtrado e usado para inocular os frascos de fermentação. Três frascos foram incubados para cada combinação de doador de inóculo e substrato, e mantidos em banho-maria a 39 °C por 48 horas.

A produção de gás foi medida utilizando um transdutor de pressão (LOGGER AG100, Universal Datalogger) em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 e 48 h, perfazendo um total de 26 leituras. O volume de gás (mL g MS⁻¹) foi obtido utilizando a equação específica para condições experimentais no EQUILAB-UFRRJ (2°45'S, 43°41'O Gr e 33 m de altitude): $\hat{y} = -0,07 + 3,79x + 0,77x^2$, em que cada psi corresponde a 3,80 mL (MARTINS, 2012). Após 48 h de incubação, o pH foi medido e os resíduos de cada frasco foram analisados quanto à degradação da MS e da MO (FRANZAN et al., 2018).

Tabela 2. Consumo estimado de nutrientes durante o período experimental: dieta exclusiva de feno de Coastcross (CHD) e inclusões crescentes da dieta completa extrusada (CED)

Item, g/dia	100 % CHD	CED			
		0%	30%	60%	100%
Matéria mineral	580	580	544	508	460
Extrato etéreo	230	230	260	290	330
Proteína bruta	1570	1570	1441	1312	1140
Fibra em detergente neutro	8230	8230	7099	5968	4460
Fibra em detergente ácido	3920	3920	3509	3098	2550
Celulose	3190	3190	2833	2476	2000
Carboidratos não fibrosos ¹	0	0	1086	2172	3620

¹ NFC = 100 - (%CP + %NDF + %EE + % ash)

2.6 Extração de DNA, Preparação de Biblioteca e Sequenciamento do Gene 16S rRNA

O DNA total foi extraído de 0,2 g de fezes congeladas usando o kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini (QIAGEN Ltd, Reino Unido) seguindo as instruções do fabricante. A região variável V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada com os primers 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) (APPRILL et al., 2015; PARADA et al., 2016) e amplicons sequenciados na plataforma MiSeq 250

emparelhada Illumina, EUA). A preparação da biblioteca e o sequenciamento do amplicon foram realizados pelo Argonne National Lab (www.anl.gov).

2.7 Análises de Bioinformática

Os dados de sequenciamento desmultiplexados foram processados usando o software Mothur v.1.41.3 (SCHLOSS et al., 2009). As sequências forward e reverse foram emparelhadas e aquelas com menos de 245 ou mais de 300 pares de bases e sequências contendo quaisquer ambiguidades ou mais de oito homopolímeros foram removidas do conjunto de dados. Em seguida, as sequências foram alinhadas usando um banco de dados Silva modificado (QUAST et al., 2013) e o alinhamento resultante foi submetido a `screen.seqs` e `filter.seqs` para remover sequências mal alinhadas e colunas não informativas do alinhamento. Em seguida, as sequências foram pré-agrupadas usando o comando `pre.cluster` com o parâmetro `difs = 2`. As quimeras foram detectadas e eliminadas usando os comandos `chimera.vsearch` e `remove.seqs`, respectivamente. O comando `classify.seqs` foi usado com o banco de dados Ribosomal Database Project versão 16 (COLE et al., 2009) e um limite de bootstrap de 80. Sequências identificadas como cloroplastos, mitocôndrias, Eukarya, Archaea, ou não atribuídas a nenhum reino foram removidas. O número de leituras por amostra foi normalizado para a amostra com o menor número de sequências. Além disso, as sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTU) usando o comando `cluster.split`, com uma dissimilaridade de 3%. As OTU raras foram removidas usando o comando `split.abund`. Finalmente, a distribuição de OTU, os índices de alfa diversidade de Chao1 (CHAO, 1984), Shannon (SHANNON, 1948) e Simpson (SIMPSON, 1949), bem como as curvas de rarefação foram calculados. A composição bacteriana foi avaliada por meio de um resumo taxonômico de cada amostra. A distribuição OTU foi usada como entrada para uma ordenação de escala multidimensional não métrica (NMDS) com o índice de similaridade de Bray-Curtis.

2.8 Análises Estatísticas

Os resultados dos ensaios de fermentação *in vitro*, como volume final de gases, pH e degradação de nutrientes, bem como os resultados obtidos com o sequenciamento do gene 16S rDNA, frequências relativas de filos e ordens bacterianas (base logarítmica) e os índices de diversidade fecal foram testados para homocedasticidade de variâncias e normalidade. Quando as premissas foram atendidas, foram submetidas à ANOVA ($\alpha = 0,05$) e comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

As diferenças na composição estrutural entre dietas e momentos de adaptação foram avaliadas utilizando um teste PERMANOVA. Todos os procedimentos foram realizados usando o pacote estatístico Past3 (HAMMER et al., 2001). O efeito da dieta e dos momentos de adaptação sobre uma determinada OTU bacteriana foi avaliado pelo Indicator Species Analysis (DUFRÊNE e LEGENDRE, 1997), realizado no software Mothur v.1.39.5.

2.9 Número de Acesso das Sequências de Nucleotídeos

Os dados gerados no sequenciamento foram depositados no NCBI Sequence Read Archive (SRA) e estão disponíveis sob o número de acesso de bioprojeto PRJNA640129.

3 RESULTADOS

3.1 Métricas do Sequenciamento

Dezoito amostras fecais geraram 491.997 sequências. Após o alinhamento e aplicação dos filtros de qualidade, restaram 383.315 sequências não quiméricas de alta qualidade, das quais 382.011 foram classificadas como domínio *Bacteria* (77,65% do número original de sequências). Após a normalização dos dados, 306.450 sequências (17.025 por amostra) foram

agrupadas em 3.533 OTU (limiar de dissimilaridade de 3%) e usadas para os cálculos subsequentes. O número de sequências subamostradas foi considerado adequado para representar a diversidade bacteriana presente nas amostras fecais, uma vez que aumentar este valor teria um impacto mínimo no número de OTU (Figura 2). Aproximadamente 88% das sequências foram identificadas a nível de filo e foram distribuídas em 16 filos bacterianos. Além disso, 56% das sequências foram identificadas a nível de classe, 52% a nível de ordem, 38% a nível de família e apenas 19% foram identificadas a nível de gênero.

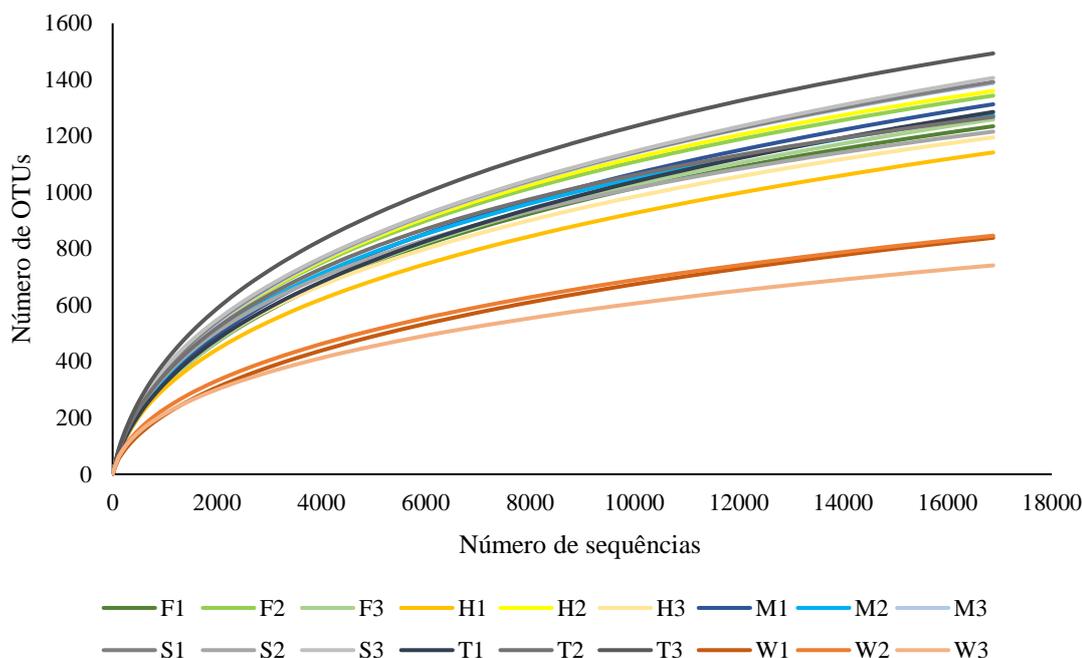


Figura 2. Curvas de rarefação do números de OTUs observadas em fezes de equinos alimentados com feno de de feno de Coastercross (CHD) ou inclusões crescentes de dieta extrusada completa (CED). Tons verdes (F) representam equinos alimentados CHD na semana 1; tons amarelos (H): equinos alimentados com CHD na semana 4; tons azuis (M): equinos alimentados com CHD na semana 1; tons de cinza (S): equinos alimentados com 30% de CED na semana 2; tons pretos (T): equinos alimentados com 60% CED na semana 3; tons laranjas (W): equinos alimentados com 100% CED na semana 4.

3.2 Diversidade Bacteriana

Os resultados relativos à alfa diversidade para os três ensaios são mostrados na Tabela 3. Como todos os equinos foram alimentados exclusivamente com CHD durante a primeira semana (semana 1), nenhuma diferença nos índices de alfa diversidade foi observada entre os animais. Da mesma forma, a análise das amostras do Ensaio I, em que os equinos foram alimentados exclusivamente com a dieta CHD por 21 dias, não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) nos índices de alfa diversidade das fezes coletadas nas semanas 1 e 4.

No Ensaio II, não foram observadas diferenças significativas no número de OTU e nos índices de diversidade quando os equinos foram alimentados com 30% (semana 2) e 60% (semana 3) de CED para substituir CHD ($p > 0,05$). Porém, quando os animais receberam 100% de CED (semana 4), observou-se um menor número de OTU e, conseqüentemente, menores índices de Chao1 e Shannon e um índice de Simpson maior do que nas outras semanas. Por fim, no Ensaio III, os equinos alimentados com CHD apresentaram maior número de OTU ($p < 0,01$) e, conseqüentemente, maiores índices de Chao1 ($p < 0,01$) e Shannon ($p < 0,01$) e menor índice de Simpson em relação aos alimentados com CED ($p = 0,02$).

Tabela 3. Comparação dos índices de diversidade da comunidade bacteriana fecal de equinos alimentados com feno de Coastcross (CHD) ou inclusões crescentes da dieta completa extrusada (CED) nos diferentes momentos de adaptação

Índices	Período experimental										
	Ensaio I - 100% CHD			Ensaio II – Inclusões da dieta completa extrusada ¹					Ensaio III - Semana 4 ²		
	Semana 1	Semana 4	<i>p</i>	0%	30%	60%	100%	<i>p</i>	CHD 100%	CED 100%	<i>p</i>
Número de OTU	1280	1233	0,55	1325 ^a	1338 ^a	1349 ^a	810 ^b	<0,001	1233 ^a	810 ^b	<0,01
Chao1	1804,5	1740,3	0,55	1846,8 ^a	1902,2 ^a	1837,8 ^a	1183,9 ^b	<0,001	1740,3 ^a	1183,9 ^b	<0,01
Shannon	5,43	5,51	0,66	5,56 ^a	5,75 ^a	5,66 ^a	4,54 ^b	<0,001	5,51 ^a	4,54 ^b	<0,01
Simpson	0,014	0,013	0,80	0,012 ^b	0,008 ^b	0,010 ^b	0,035 ^a	<0,001	0,013 ^b	0,035 ^a	0,02

¹ Médias com letras diferentes dentro do ensaio II diferem significativamente pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

² Médias com letras diferentes dentro do ensaio III diferem significativamente pelo teste de Fisher ($\alpha < 0,05$).

3.3 Composição Taxonômica das Comunidades Bacterianas

Os filos Bacteroidetes e Firmicutes representaram aproximadamente 75% da comunidade bacteriana em todas as amostras (Figura 3). Os seguintes filos representaram menos de 1% da abundância relativa: Elusimicrobia, Synergistetes, Actinobacteria, Candidatus Saccharibacteria, SR1, Lentisphaerae, Tenericutes, Planctomycetes, Chloroflexi, Acidobacteria e Fusobacteria. No entanto, juntos, esses filos representam aproximadamente 2% da comunidade bacteriana (Figura 4).

Os membros das seguintes 40 ordens bacterianas foram identificados: Gp1, Gp6, Actinomycetales, Bifidobacteriales, Coriobacteriales, Solirubrobacterales, Bacteroidales, Cytophagales, Flavobacteriales, Sphingobacteriales, Anaerolineales, Elusimicrobiales, Candidatus_Endomicrobium, Fibrobacterales, Bacillales, Lactobacillales, Clostridiales, Erysipelotrichales, Selenomonadales, Fusobacteriales, Victivallales, Oligosphaerales, Planctomycetales, Rhizobiales, Rhodospirillales, Sphingomonadales, Burkholderiales, Bdellovibrionales, Desulfovibrionales, Myxococcales, Campylobacteriales, Aeromonadales, Enterobacteriales, Pasteurellales, Pseudomonadales, Spirochaetales, Synergistales, Anaeroplasmatales, Puniceicoccales e Verrucomicrobiales.

Nenhuma diferença significativa foi observada na composição e abundância relativa dos filos bacterianos entre os dois grupos experimentais na semana 1 (ver dados de W1 na Figura 3). Entre os 16 filos bacterianos identificados, o filo Fusobacteria não foi detectado nas amostras fecais coletadas na semana 1. A composição da comunidade bacteriana permaneceu a mesma ao longo do Ensaio I (Figura 3). No entanto, a abundância relativa do filo Actinobacteria foi significativamente maior na semana 4 quando comparado à semana 1 ($p=0,014$). Consequentemente, a abundância da ordem Coriobacteriales do filo Actinobacteria foi maior nas amostras coletadas na semana 4 do que na semana 1 ($p=0,011$) (Figura 4).

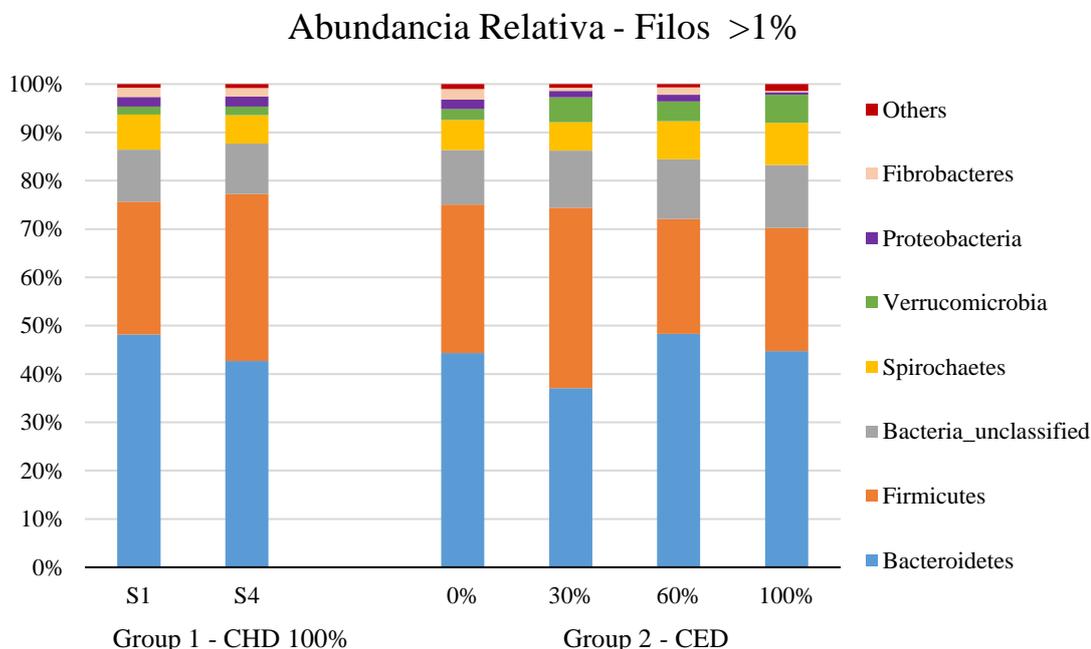


Figura 3. Filos bacterianos com abundância relativa superior a 1% observados nas fezes de equinos alimentados com dieta de feno de Coastcross (CHD) ou inclusões crescentes de dieta extrusada completa (CED).

A análise de abundância relativa realizada nos dados do Ensaio II mostrou diferenças significativas em relação aos filos Verrucomicrobia ($p=0,030$), Synergistetes ($p=0,005$), Tenericutes ($p<0,001$) e Lentisphaerae ($p=0,004$). O filo Verrucomicrobia aumentou

progressivamente com a inclusão do CED, de modo que, a abundância relativa de Verrucomicrobia na semana 4 foi significativamente diferente do que na semana 1, mas não diferiu entre as semanas 2 e 3 (Figura 4). Os equinos alimentados com 100% CED durante a semana 4 mostraram um aumento significativo do filo Synergistetes (Figura 4) e da ordem Synergistales ($p=0,005$). Além disso, o filo Tenericutes não foi observado na semana 4. A inclusão de 30% de CED levou a um aumento na abundância do filo Lentisphaerae, que permaneceu inalterada após 60% de CED ter sido oferecido aos animais. No entanto, a menor abundância deste filo foi observada na semana 4 (Figura 4).

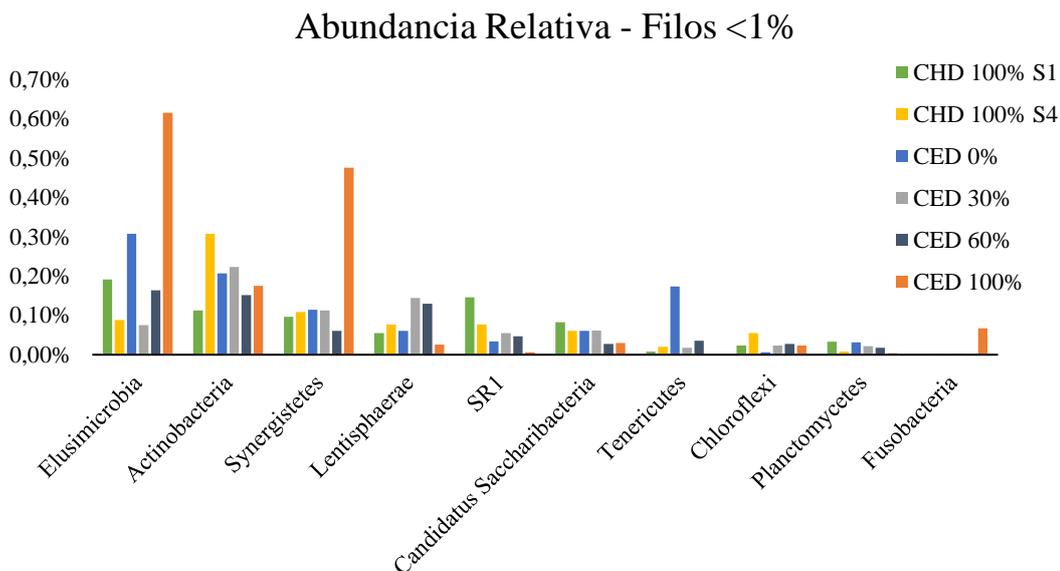


Figura 4. Filos bacterianos com abundância relativa menor que 1% observado em fezes de equinos alimentados com feno de Coastcross (CHD) ou inclusões crescentes de dieta extrusada completa (CED).

Finalmente, a nível de order, observou-se diferença significativa em Bacillales ($p<0,05$), Aeromonadales ($p<0,05$) e Oligosphaerales ($p<0,05$). A abundância relativa de Bacillales aumentou quando 30% de CED foi oferecido; entretanto, sua abundância diminuiu quando os animais foram alimentados com 60% de CED (semana 3). De fato, quando os equinos foram alimentados com 60% de CED (semana 3), observou-se um aumento significativo na abundância relativa da ordem Aeromonadales; no entanto, nenhuma diferença significativa foi detectada na semana 4, quando os animais receberam 100% de CED. A abundância da ordem Oligosphaerales foi significativamente maior na semana 2 e diminuiu gradualmente nas semanas 3 e 4. Além disso, Anaeroplasmatales e Pasteurellales foram observados nas semanas 1, 2 e 3, mas não na semana 4. Curiosamente, a ordem Rhodospirillales foi detectada apenas nas fezes dos equinos alimentados com CED.

No Ensaio III, não foi observada diferença significativa na abundância relativa dos filios mais abundantes Bacteroidetes e Firmicutes entre as dietas ($P>0,05$; Figura 4). No entanto, a abundância da ordem Synergistales foi maior em animais alimentados exclusivamente com CED do que naqueles alimentados com CHD ($p=0,016$). Membros de Anaeroplasmatales, Bdellovibrionales e Sphingobacteriales foram detectados apenas nas fezes de equinos alimentados com CHD.

3.4 Análise multivariada da distribuição de OTUs

A análise da distribuição de OTUs indicou que a dieta teve um efeito significativo na estrutura da comunidade bacteriana (PERMANOVA; $p=0,002$). A escala multidimensional não

métrica revelou as relações entre a composição bacteriana, dietas e semanas de tratamento (Figura 5).

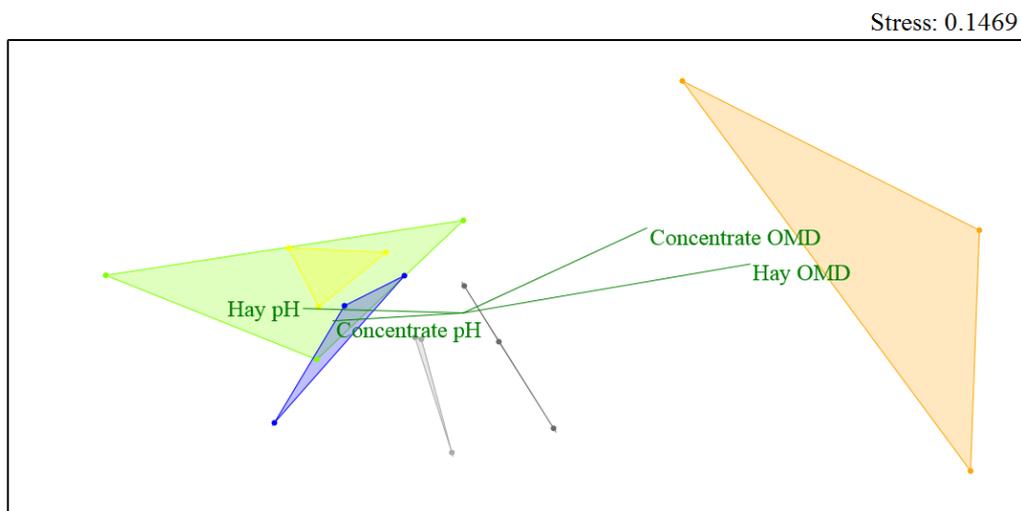


Figura 5. Escala multidimensional não métrica (NMDS) da distribuição de OTUs pelo índice de similaridade Bray-Curtis com parâmetros de fermentação *in vitro*, pH e degradação de matéria orgânica, plotados como vetores. Escala de estresse expresso variando de 0 a 1. Verde: equinos alimentados com dieta de feno de Coastcross (CHD) na semana 1; Amarelo: equinos alimentados com CHD na semana 4; Azul: equinos alimentados com CHD na semana 1; Cinza: equinos alimentados com 30% de dieta extrusada completa (CED) na semana 2; Cinza escuro: equinos alimentados com 60% CED na semana 3; Laranja: equinos alimentados com 100% CED na semana 4.

As comunidades bacterianas observadas nas fezes coletadas de todos os animais na semana 1 foram semelhantes às observadas nas fezes dos equinos alimentados com algum nível de CHD. Além disso, as amostras fecais coletadas na semana 4 dos equinos do grupo CHD revelaram uma comunidade bacteriana diferente da detectada nas fezes obtidas nas semanas 2, 3 e 4 dos equinos do grupo CED. Portanto, na semana 4, ambas as dietas levaram à comunidades bacterianas significativamente diferentes.

3.5 Análise de Espécies Indicadoras (ISA)

Todas as OTUs foram testadas como indicadores nas comparações entre dietas e momentos de adaptação (semanas). As OTUs impactadas pelos tratamentos dietéticos foram consideradas significativas ($p < 0,05$) e apresentaram valor indicador acima de 60 no intervalo de 0 a 100 (Figura 6). Houve uma diferença significativa em sete OTUs entre as dietas CHD e CED na semana 1: duas do filo Bacteroidetes, duas da ordem Bacteroidales, uma do gênero *Anaerovorax* e uma do gênero *Roseburia*. Ambos os gêneros pertencem ao filo Firmicutes e um à classe Subdivisão 5 do filo Verrucomicrobia (Figura 6A).

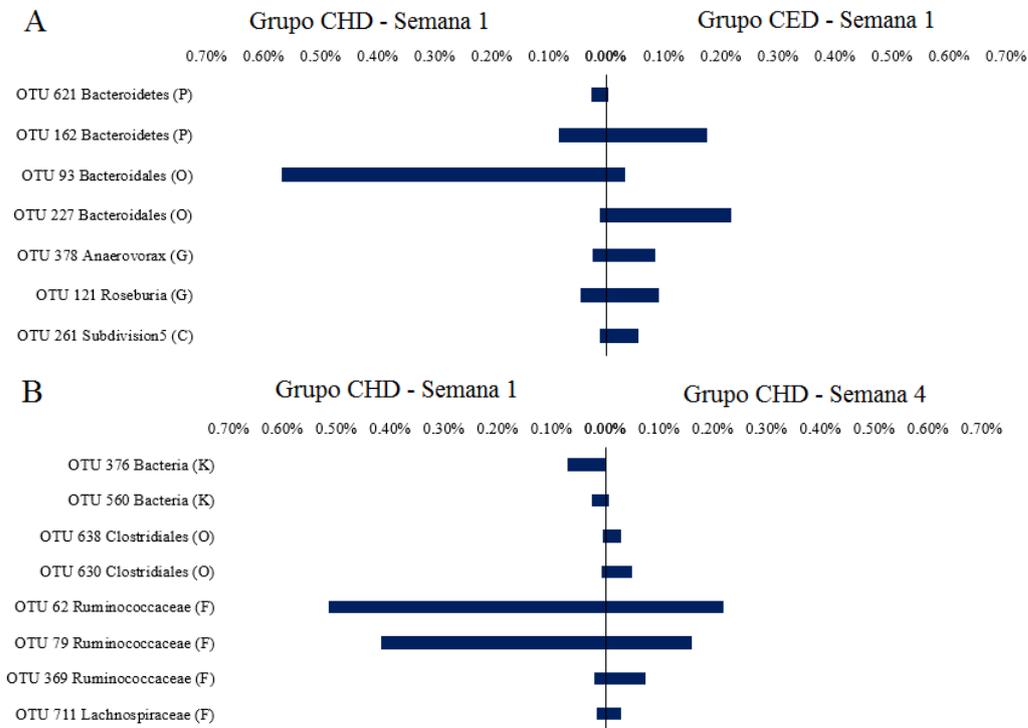
O ensaio I revelou diferenças significativas em oito OTUs. A abundância de duas OTUs classificadas no nível do Reino e de duas OTUs da família Ruminococcaceae diminuiu após 28 dias de consumo de CHD. Por outro lado, a abundância de duas OTUs da ordem Crotridiales, uma da família Ruminococcaceae e uma da família Lachnospiraceae aumentou após 28 dias de consumo de CHD (Figura 6B).

O ensaio II mostrou diferenças significativas em 8, 11 e 16 OTUs entre as semanas, mostrado a seguir: 1 e 2 (Figura 6C), 2 e 3 (Figura 6D) e 3 e 4 (Figura 6E), respectivamente.

A comparação entre as semanas 1 e 2 revelou a redução da abundância de uma OTU classificada no nível do Reino e de um do filo Firmicutes. Três OTUs classificadas em nível de Reino, bem como uma OTU do filo Firmicutes, uma da família Lachnospiraceae e uma do

gênero *Phascolarctobacterium* aumentaram entre semanas 1 e 2. Mais comparações entre semanas revelaram diferenças significativas entre as semanas 2 e 3. De fato, foi observado uma redução na abundância relativa de uma OTU classificada em nível de Reino, bem como de duas OTUs da família Ruminococcaceae, uma do gênero *Lactobacillus* e duas do gênero *Phascolarctobacterium*. No entanto, três OTUs do filo Bacteroidetes, uma da ordem Bacteroidales e uma do filo Proteobacteria apresentaram valores de abundância aumentados entre as semanas 2 e 3.

Finalmente, a comparação entre as semanas 3 e 4 revelou que uma OTU da família Ruminococcaceae e uma da família Synergistaceae aumentou, enquanto três OTUs classificadas no nível do Reino, bem como três OTUs do filo Bacteroidetes, três da ordem Bacteroidales, um do gênero *Paraprevotella*, um da classe Clostridia, um da família Ruminococcaceae, um do gênero *Treponema* e um do filo Proteobacteria diminuíram entre as semanas 3 e 4.



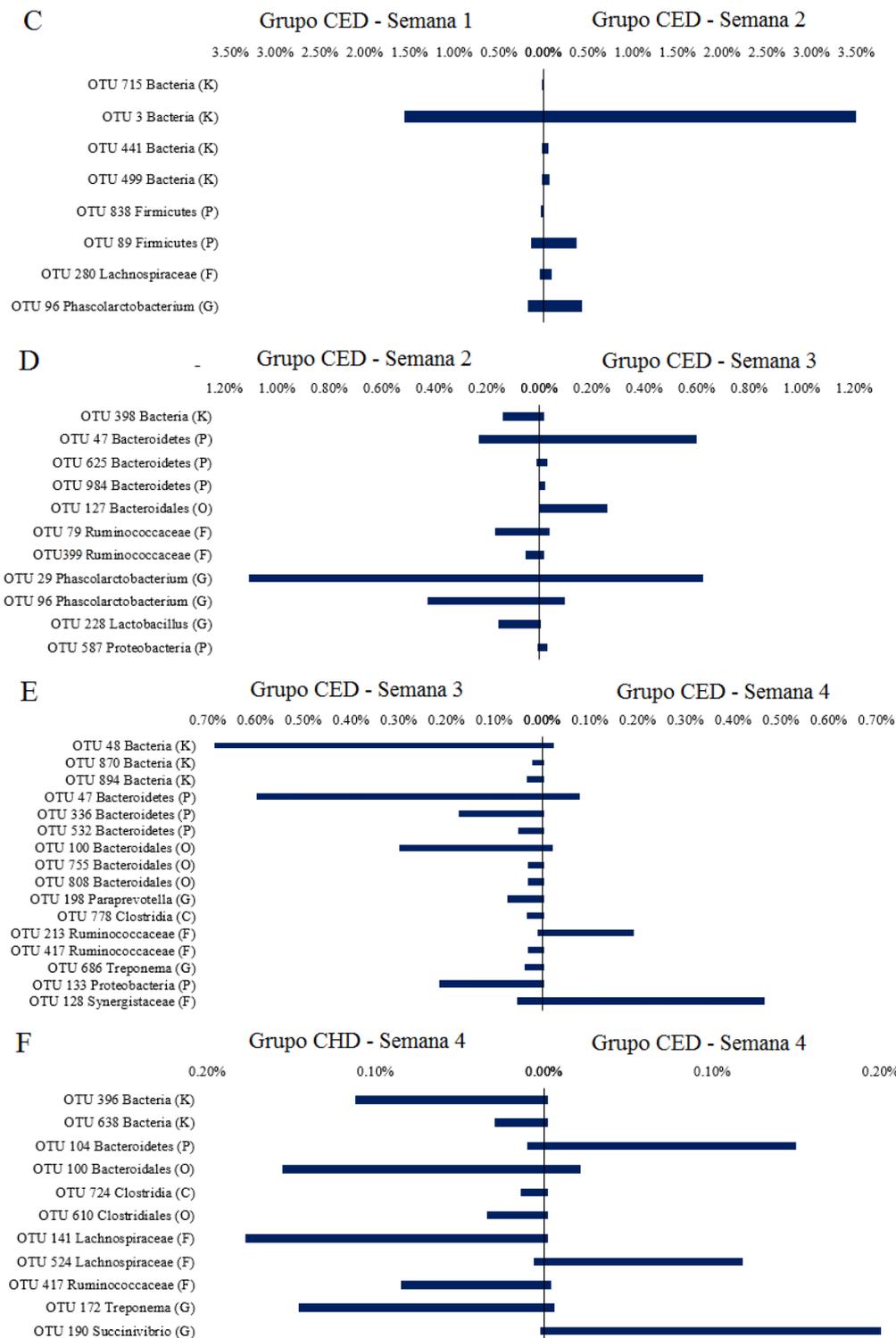


Figura 6. Comparação da abundância relativa de todas as OTUs entre os dois grupos de equinos alimentados com dieta de feno de Coastcross (CHD) na semana 1 (A); equinos alimentados com CHD entre semana 1 e 4 (B); equinos alimentados com dieta extrusada completa (CED) entre as semanas 1 e 2 (C); equinos alimentados com CED entre as semanas 2 e 3 (D); equinos alimentados com CED entre as semanas 3 e 4 (E) e entre equinos alimentados com CHD e alimentados com CED na semana 4 (F). Apenas OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor do indicador maior que 60 foram representadas. A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G - Gênero.

No Ensaio III, observou-se diferenças significativas em 11 OTUs. A abundância de duas OTUs classificadas em nível de Reino, bem como de uma OTU da ordem Bacteroidales, uma da classe Clostridia, uma da ordem Clostridiales, uma da família Lachnospiraceae, uma da família Ruminococcaceae e uma do gênero *Treponema* apresentou valores mais elevados nas fezes coletadas de equinos alimentados exclusivamente com CHD por 28 dias do que em equinos alimentados com CED. Por outro lado, três OTUs identificadas nas fezes de equinos alimentados exclusivamente com concentrado mostraram valores de abundância relativa aumentados, uma OTU do filo Bacteroidetes, uma da família Lachnospiraceae e uma do gênero *Succinivibrio* (Figura 6F).

3.6 Ensaio de Fermentação *in vitro*

Como todos os animais foram alimentados com CHD durante a primeira semana, não foram observadas diferenças nas variáveis de fermentação avaliadas: produção de gás final, degradação da MS, degradação da MO e pH (Tabela 4).

No Ensaio I, o inóculo fecal coletado dos equinos alimentados com CHD mostrou capacidade de fermentação superior após quatro semanas, quando volumoso foi usado como substrato ($p < 0,05$), conforme verificado pelo aumento no volume final de gases, degradação de MS e MO, e pH (Tabela 4). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas variáveis de fermentação *in vitro* obtidas em amostras coletadas no início (semana 1) e no final (semana 4) do período experimental, quando o concentrado foi utilizado como substrato ($p > 0,05$).

O ensaio II, que incluiu a CED na dieta, revelou um aumento significativo na produção de gases ($p = 0,04$), e na degradação da MS ($p < 0,001$) e da MO ($p < 0,001$), quando volumoso foi usado como substrato. Além disso, o pH final observado no resíduo líquido obtido dos frascos contendo feno como substrato foi menor nas semanas 2 e 4 do que nas demais semanas ($p < 0,001$). Quando o concentrado foi utilizado como substrato para o processo de fermentação *in vitro*, não foi observada diferença significativa no volume final do gases. Entretanto, os valores finais de pH diminuíram significativamente ($p = 0,02$), enquanto a degradação da MS ($p < 0,05$) e MO ($p = 0,01$) aumentou nas semanas 2 e 4 em comparação com as outras semanas.

No Ensaio III, o consumo de ambas as dietas experimentais após 28 dias revelou que as fezes obtidas de equinos alimentados com CED resultaram em maior degradação da MO, quando o CED foi utilizado como substrato ($p = 0,02$).

Tabela 4. Valores médios dos parâmetros de fermentação *in vitro* dos substratos feno de Coastcross e concentrado incubados com fezes de equinos alimentados com feno de Coastcross (CHD) ou níveis crescentes de dieta completa extrusada (CED) em diferentes momentos de adaptação

Substrato	Período Experimental										
	Ensaio I – 100% CHD ¹			Ensaio II – Inclusões crescentes da CED ²					Ensaio III – Semana 4 ¹		
	Semana 1	Semana 4	<i>p</i>	0%	30%	60%	100%	<i>p</i>	CHD 100%	CED 100%	<i>p</i>
Feno de Coastcross											
Volume total de gases ³	54,5 ^b	83,1 ^a	0,01	63,7 ^b	76,8 ^b	66,2 ^b	88,4 ^a	0,04	83,1	88,4	0,52
Degradação da matéria seca ⁴	226 ^b	363 ^a	0,01	252 ^c	366 ^b	345 ^b	402 ^a	<0,001	363	402	0,30
Degradação da matéria orgânica ⁴	217 ^b	373 ^a	0,02	247 ^c	371 ^b	347 ^b	429 ^a	<0,001	372	429	0,21
pH final do resíduo	6,58 ^a	6,35 ^b	0,01	6,55 ^a	6,33 ^b	6,57 ^a	6,37 ^b	<0,001	6,35	6,37	0,65
Concentrado											
Volume total de gases ³	140,9	166,0	0,15	142,9	144,2	120,8	164,2	0,14	166,0	164,2	0,89
Degradação da matéria seca ⁴	432	470	0,28	435 ^b	500 ^a	389 ^b	521 ^a	0,05	470	521	0,09
Degradação da matéria orgânica ⁴	444	489	0,26	446 ^{bc}	517 ^{ab}	369 ^c	574 ^a	0,01	489 ^b	574 ^a	0,02
pH final do resíduo	6,42	6,24	0,08	6,45 ^a	6,12 ^c	6,36 ^{ab}	6,25 ^{bc}	0,02	6,24	6,25	0,73

¹Médias com letras diferentes dentro do ensaio I ou ensaio III diferem significativamente pelo teste de Fisher (P <0,05).

²Médias com letras diferentes dentro do ensaio II diferem significativamente pelo teste de Tukey (P <0,05).

³mL/g MS

⁴mg/g

4 DISCUSSÃO

O fornecimento de alimentos processados como complemento da dieta alimentar é uma prática comum na criação de equinos, principalmente no caso de animais com necessidades nutricionais elevadas. Entre os métodos de processamento comumente usados estão aqueles que combinam tratamentos de temperatura, umidade e pressão. Como as dietas completas são rotineiramente peletizadas ou extrusadas, suas propriedades físicas e químicas são alteradas no processo para melhorar a digestibilidade dos alimentos (NRC, 2007) de forma a garantir o consumo uniforme de nutrientes pelos animais (JULLIAND et al., 2006; HILL, 2007). No entanto, além das limitações que envolvem a fabricação e manuseio do concentrado, existem preocupações em relação ao uso de dietas completas para o bem-estar e comportamento dos equinos (ANDREW, 2006; HILL, 2007; ELIA, 2010). Como vários fatores ambientais podem modificar o microbioma intestinal dos animais, decidiu-se por usar animais da mesma raça, idade e condições do sistema de criação (manejo, instalações, pasto), para determinar se os efeitos observados no microbioma dos equinos poderiam realmente estar associados aos tratamentos dietéticos impostos.

No início do estudo, todos os equinos foram submetidos ao mesmo manejo e esquemas de alimentação, primeiro na pastagem nativa e depois com o aumento do consumo de feno de Coastcross. Como formulamos a hipótese de que todos os animais teriam uma estrutura de comunidade bacteriana fecal semelhante no ponto de partida experimental, as amostras fecais obtidas na semana 1 dos animais de cada grupo foram reunidas e testadas. Assim, nenhuma diferença significativa foi observada nos índices de diversidade e na estrutura da comunidade bacteriana fecal entre todos os animais na semana 1. Entretanto, mesmo controlando o manejo e a dieta, a homogeneidade bacteriana relativa entre os animais não foi totalmente alcançada. De fato, o procedimento ISA revelou diferença significativa na abundância relativa de sete OTUs identificados em três filos: Bacteroidetes, Firmicutes e Verrucomicrobia. Diferenças na composição do microbioma fecal entre cavalos sob o mesmo manejo e dieta também foram observadas em outros estudos (JULLIAND e GRIMM, 2016). Na verdade, foi demonstrado que o efeito individual é responsável por até 50% da variação detectada na composição do microbioma fecal na espécie equina (ANTWIS et al., 2018). Apesar das diferenças individuais, descobrimos que a variação individual não foi capaz de aumentar a distância da comunidade bacteriana fecal entre todas as amostras coletadas. Além disso, os inóculos fecais apresentaram o mesmo potencial fermentativo, independentemente se feno ou concentrado foram usados como substratos.

Em concordância com outros estudos (COSTA e WEESE, 2018), os filos Bacteroidetes e Firmicutes dominaram a comunidade bacteriana em todas as amostras fecais analisadas, representando aproximadamente 75% da comunidade bacteriana. Também foi observado que a abundância relativa dos filos Spirochaetes, Verrucomicrobia, Proteobacteria e Fibrobacteres era superior a 1%. Devido ao seu impacto metabólico, o filo Firmicutes é considerado o principal filo do intestino grosso de equinos saudáveis (COSTA e WEESE, 2018). É também o mais abundante (ALMEIDA et al., 2016; ARCHER et al., 2017). Dessa forma, a classe Clostridia do filo Firmicutes foi a mais abundante no presente estudo. Desta classe, as famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae desempenham um papel importante na degradação da fibra e foram identificadas como parte do microbioma central do intestino grosso equino (HASTIE et al., 2008; O'DONELL et al., 2013; DOUGAL et al., 2014). A abundância reduzida de membros dessas famílias foi encontrada em equinos com Síndrome Metabólica Equina (ELZINGA et al., 2016). Além disso, membros das famílias Streptococcaceae e Lactobacillaceae são frequentemente referidos como potenciais marcadores de doenças acidificantes (JULLIAND et al., 2018). Embora não degradem carboidratos estruturais diretamente, eles podem usar oligossacarídeos liberados por microrganismos fibrolíticos obrigatórios e,

consequentemente, aumentar a produção de ácido láctico e CO₂, acidificando assim a digesta do intestino grosso (DALY et al., 2012).

No Ensaio I, o consumo de feno de Coastcross por 21 dias aumentou a abundância do filo Actinobacteria, o que pode ser explicado pelo aumento da abundância da ordem Coriobacteriales. A capacidade fermentativa do inóculo fecal melhorou quando comparado com o inóculo dos equinos alimentados com CHD por 7 dias. De fato, a produção de gases aumentou como resultado da degradação da MS e da MO do substrato do feno e, consequentemente, diminuiu o pH final. No entanto, esse efeito não foi observado quando o concentrado extrusado completo foi usado como substrato.

O filo Actinobacteria ocorre naturalmente em todo o trato gastrointestinal equino (DOUGAL et al., 2013; DONG et al., 2016), e é composto por bactérias Gram-positivas fenotipicamente diversas, algumas das quais desempenham um papel benéfico para o hospedeiro, como *Bifidobacterium*, que é conhecido por modular o sistema imunológico e prevenir distúrbios gastrointestinais (ENDO et al., 2007; GOODFELLOW, 2015). O gênero *Bifidobacterium* não é observado com frequência no microbioma dos equinos aqui estudados. Além disso, os representantes mais abundantes do filo Actinobacteria eram da família Coriobacteriaceae da ordem Coriobacteriales, que inclui bactérias anaeróbias obrigatórias que catalisam a oxidação dos ácidos biliares e afetam o metabolismo dos lipídios do fígado (CLAVEL et al., 2013). O filo Actinobacteria foi observado em maior abundância nas fezes de equinos obesos quando comparados a animais com peso corporal regular (MORRISON et al., 2018). Um estudo longitudinal que submeteu equinos a um programa de ganho de peso revelou que a abundância relativa desse filo era maior no final do programa (LANGNER et al., 2020). Da mesma forma, em um programa de emagrecimento, equinos que apresentaram maior perda de peso tiveram menor abundância de Actinobacterias do que aqueles com perda de peso reduzida (MORRISON et al., 2020). Além disso, em um estudo metabolômico em equinos, o filo foi associado a uma comunidade bacteriana fecal que induziu alta produção de acetato e, consequentemente, levou à geração de metabólitos sanguíneos relacionados ao metabolismo lipídico (PLANCADE et al., 2019).

A manutenção da homeostase intestinal é essencial para a nutrição e saúde dos equinos e está intimamente ligada à disponibilidade de substratos para a microbiota do hospedeiro (DALY et al., 2012). A introdução de grãos de cereais na dieta ocorre quando a exigência de energia do equino aumenta, uma vez que o consumo de forragem nem sempre atende totalmente a essas necessidades. Entretanto, uma mudança abrupta para uma dieta concentrada pode alterar o ecossistema microbiano intestinal, levando a um aumento nas concentrações de bactérias anaeróbias totais, como *Streptococcus* e *Lactobacillus*, e redução das bactérias fibrolíticas devido ao aumento da produção de lactato e à queda da pH do ceco e do cólon (DE FOMBELLE et al., 2001; VAN DEN BERG et al., 2013). Levando esta informação em consideração, foi oferecida aos equinos aqui estudados uma substituição gradual da dieta de feno pela dieta completa, onde o consumo de 100% de CED foi alcançado na semana 4, Ensaio II.

Considerando que o feno fornecido aos equinos foi produzido a partir de um capim de metabolismo C4 (*Cynodon* spp. Cv Coastcross), que não contém frutose ou uma quantidade significativa de amido como reserva energética, acreditamos que a única fonte de carboidratos não fibrosos (CNF) na dieta foi fornecido pela CED, que continha 362 g CNF / Kg MS. Assim, a inclusão progressiva de CED ao longo das semanas experimentais aumentou o consumo de CNF para 0,91, 1,81 e 3,02 g / Kg de PV / refeição referente ao fornecimento de 30, 60 e 100% de CED, respectivamente. Por meio da análise ISA comparativa entre as semanas 1 e 2 (Ensaio II), observamos que a OTU 3 (Bactéria não classificada) foi responsiva à adição de carboidratos não fibrosos à dieta dos equinos alimentados com CED, pois sua abundância relativa aumentou de 1,5 para 3,5 %. Assim, a importância de OTU 3 na estrutura da comunidade microbiana aumentou à medida que o conteúdo de CNF aumentou na dieta.

Outros fatores podem influenciar as características físicas e químicas da digesta que chega à câmara de fermentação do equino e, conseqüentemente, a disponibilidade de substratos e o ambiente para o crescimento e manutenção de microrganismos (DROGOUL et al., 2001). Por exemplo, a composição da dieta e o tamanho das partículas do alimento oferecido aos equinos podem influenciar a cinética de passagem e a qualidade físico-química dos carboidratos presentes na digesta (DROGOUL et al., 2000). De fato, o tempo médio de retenção pré-cecal aumentou quando uma dieta mista peletizada foi oferecida aos equinos em comparação com os alimentos *in natura* (CABRERA e TISSERAND, 1995). Além disso, o processo de fabricação para produzir pellets ou *kibbles* extrudados precisa moer os alimentos em partículas muito pequenas, o que remove a integridade estrutural dos alimentos (HILL, 2007). Isso afeta a taxa de passagem pelo trato gastrointestinal de equinos (JULLIAND et al., 2006).

À medida que a inclusão de CNF aumentou e outras mudanças na ingestão de nutrientes foram realizadas ao longo do esquema de adaptação da dieta, é possível que diferentes ecossistemas tenham sido gerados para a população microbiana e que, por sua vez, levaram às várias mudanças na estrutura da comunidade bacteriana observada. Por exemplo, volumoso oferecido como feno de Coastcross parece ser necessário para a manutenção de condições adequadas à sobrevivência de membros das ordens Anaeroplasmatales (Tenericutes) e Pasteurellales (Proteobacteria). Na verdade, eles foram detectados apenas nas fezes coletadas de equinos alimentados com alguma quantidade de feno, mesmo tão pouco quanto 1 g de feno / Kg PV / dia (oferecido na semana 3, Ensaio II). Além disso, quando foi incluído o consumo mínimo de volumoso recomendado de 1,3 g MS / Kg PV / dia (COENEN e VERVUERT, 2010), membros dessas ordens foram observados nas semanas 1, 2 e 3 (Ensaio II).

A abundância relativa do filo Verrucomicrobia e da ordem Aeromonadales (Proteobacteria) também aumentou significativamente com a ingestão progressiva da dieta completa extrusada. Além disso, a ordem Rhodospirillales (Proteobacteria) foi detectada apenas quando o concentrado foi incluído na dieta dos cavalos (semanas 2, 3 e 4).

O papel metabólico do filo Verrucomicrobia no microbioma intestinal de equinos foi sugerido para responder a fatores como escore de condição corporal, antibióticos, doença e resposta imune (STEELMAN et al., 2012; COSTA et al., 2015ab; ELZINGA et al., 2016; LINDENBERG et al., 2019). Em contraste com os resultados observados no presente estudo, uma maior abundância do filo Verrucomicrobia foi relatada em equinos alimentados com forragem quando comparado com aqueles alimentados com dietas ricas em amido ou silagem (O'DONNELL et al., 2013; WARZECHA et al., 2017). Além disso, o aumento da abundância deste filo foi associado ao status de obesidade em equinos e como uma possível resposta adaptativa da microbiota à condição de saúde e nutrição do hospedeiro (ELZINGA et al., 2016).

Além disso, o filo Lentisphaerae aumentou até a semana 3, quando os equinos foram alimentados com 60% de CED, e diminuiu na semana 4, quando o fornecimento de feno de Coastcross foi totalmente removido (Ensaio II). Assim, embora esse filo tenha respondido aos aumentos de CNF na dieta, ele precisa que o quadro nutricional gerado pela presença de feno para que se mantenha em abundância relativamente alta. Por outro lado, o filo Synergistetes aumentou na semana 4 (Ensaio II). Em conjunto, esses dados confirmam que os membros do microbioma intestinal equino respondem de forma diferente à dieta do hospedeiro.

Observou-se que alimentar os animais com feno de Coastcross manteve a estabilidade de todos os índices de diversidade nas semanas 1, 2 e 3. De fato, o gráfico de rarefação de OTUs mostra que a inclusão de 21 g / Kg MS / dia de CNF não diminuiu a riqueza de espécies; entretanto, a ausência de feno de Coastcross diminuiu significativamente a riqueza. Após a retirada do feno da dieta (semana 4), os índices de riqueza de Chao1 e de diversidade de Shannon diminuíram, influenciando o índice de dominância de Simpson devido à menor uniformidade da distribuição das OTUs.

É possível que o pH ácido do estômago associado ao ataque enzimático no intestino delgado reduza as bactérias que vivem naturalmente nos alimentos consumidos pelos equinos (MOORE-COLYER et al., 2020). No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre a sobrevivência de bactérias que vivem naturalmente em alimentos, bem como sobre sua relevância na manutenção da população bacteriana intestinal e diversidade bacteriana em equinos adultos. Embora o conteúdo bacteriano do concentrado não tenha sido investigado aqui, a alta temperatura usada durante o processo de extrusão provavelmente reduziu a população de microrganismos no alimento que, se presente, poderia contribuir para manter a diversidade da microbiota fecal dos equinos alimentados com concentrado. Portanto, é necessário separar os efeitos da alta inclusão de amido, aqui estimada pelo teor de CNF na dieta, e a ausência de volumoso na estabilidade do microbioma fecal equino. Estudos futuros devem avaliar o microbioma de equinos alimentados com 3 g de CNF / Kg de PV / refeição associada à ingestão de volumoso que não inclui amido ou CNF adicional.

Plancade et al. (2019) relataram que o índice de Simpson de cavalos de enduro participantes de corridas de 160 km foi maior do que o observado em cavalos participantes de corridas mais curtas. O estudo sugeriu que dietas formuladas para alto consumo de energia associada à restrição de forragem reduzem a abundância de bactérias fibrolíticas importantes. Desse modo, observou-se que quando o feno de Coastcross foi usado como substrato, o inóculo fecal obtido de equinos alimentados com concentrado induziu um aumento progressivo de sua capacidade fermentativa. Consequentemente, foi detectado um declínio do pH do líquido residual devido aos ácidos produzidos durante a fermentação. Entretanto, esse efeito no pH foi observado apenas nas semanas 2 e 4, quando os equinos foram alimentados com 30% e 100% da dieta completa extrusada, respectivamente. Em contraste, o inóculo fecal de equinos alimentados com o concentrado não aumentou a produção de gás, quando o concentrado foi usado como substrato.

Os carboidratos hidrolisáveis da dieta, especialmente o amido, são digeridos em D-glicose pela α -amilase e maltase pancreática no intestino delgado dos equinos (HOFFMAN et al., 2001). A D-glicose resultante é então transportada através da membrana da borda em escova dos enterócitos intestinais pelo co-transportador Na^+ / glicose, SGLT1. Posteriormente, deixa a célula através da membrana basolateral através do transportador monossacarídeo independente de Na^+ , GLUT2 (SHIRAZI-BEECHEY, 2008; DYER et al., 2009). O consumo de amido acima de 2 g / kg de PV / refeição pode exceder a capacidade digestiva da α -amilase pancreática no intestino delgado dos equinos. Como resultado, mais amido não digerido chega no intestino grosso, onde é fermentado rapidamente, aumentando a produção de substâncias acidificantes com a consequente redução do pH (JULLIAND et al., 2006). Por sua vez, o ambiente ácido estimula a proliferação de bactérias produtoras de ácido láctico e o declínio adicional do pH, afetando assim a microbiota e a saúde do hospedeiro (AL JASSSIM et al., 2005; JULLIAND et al., 2006).

Um estudo anterior mostrou que a redução do consumo de volumoso, associada ao concentrado, reduz a capacidade tampão do fluido fecal (ZEYNER et al., 2004). Valores baixos de pH do líquido residual foram detectados na semana 2, mas não na semana 3, embora uma maior atividade fermentativa *in vitro* tenha sido observada na semana 3. Os gêneros bacterianos que acidificam a digesta pertencem à ordem dos Lactobacillales. Uma vez que a abundância relativa de Lactobacillales não foi afetada entre as semanas 2 e 3, avaliamos a abundância relativa de famílias específicas desta ordem para compreender as diferenças observadas na capacidade de tamponamento fecal durante a adaptação dos animais a CED. Assim, foi observado que aproximadamente 80% das sequências obtidas para a ordem Lactobacillales pertenciam a três famílias produtoras de ácido láctico: Lactobacillaceae, Streptococcaceae e Leuconostocaceae. Streptococcaceae e Leuconostocaceae mostraram o mesmo padrão de mudança de sua abundância relativa ao longo do esquema de adaptação alimentar adotado nesse

estudo (Ensaio II). A família Streptococcaceae, responsável por 0,11% da comunidade bacteriana na semana 1, aumentou para 0,91% na semana 2 e diminuiu para 0,52% e 0,31% nas semanas 3 e 4, respectivamente. A família Leuconostocaceae apresentou valores de 0,01% na semana 1, aumentados para 1,72% na semana 2 e reduzidos em 1,05 e 0,78% nas semanas 3 e 4, respectivamente. Lactobacillaceae revelou um padrão de mudança distinto, onde sua abundância relativa aumentou de 0,48% na semana 1 para 1,12% na semana 2, diminuiu para 0,09% na semana 3 e finalmente aumentou para 0,57% na semana 4, acompanhando assim o padrão de mudança observado para os valores de pH. Os valores de pH na semana 4 foram semelhantes aos observados em equinos alimentados apenas com feno de Coastcross (Ensaio III).

De acordo com as informações acima, acredita-se que, entre as semanas 2 e 3, a microbiota dos equinos pode ter se adaptado à redução da entrada de glicose para o intestino grosso em resposta ao aumento da expressão de SGLT1 e ao ambiente resultante de baixa capacidade de tamponamento. Como o tempo necessário para adaptação à dieta afeta o pH residual, independente da quantidade de CNF, os animais devem iniciar a adaptação às dietas concentradas com a inclusão de menos de 30% de concentrado em suas dietas.

Conforme descrito, vários grupos de bactérias responderam de forma diferente a aumentos na proporção de dieta completa na alimentação dos equinos. Por exemplo, a abundância relativa da OTU 3 Bacteria não classificada, o filo Verrucomicrobia e a ordem Aeromonadales aumentaram nas fezes dos equinos ao longo do período de adaptação à dieta completa extrusada, enquanto a ordem Rhodospirillales foi observada apenas nas semanas em que os animais foram alimentados com alguma quantidade de CED (semanas 2 a 4). As ordens Bacillales e Oligosphaerales foram observadas em alta abundância apenas na semana 2, enquanto nas semanas 3 e 4, suas abundâncias relativas foram semelhantes às encontradas em animais consumindo exclusivamente feno (Ensaio III), sugerindo que alguns grupos bacterianos responderam à capacidade fisiológica do hospedeiro em digerir os CNF. Esta observação coincide com o período de adaptação necessário para regular o SGLT1 e aumentar a absorção de glicose no intestino delgado após a mudança dietética (SHIRAZI-BEECHER, 2008; DYER et al., 2009).

Após 21 dias de consumo de CED ou CHD (Ensaio III), as ordens Bdellovibrionales (Proteobacteria) e Sphingobacteriales (Bacteroidetes) foram observadas apenas em fezes obtidas de equinos alimentados com CHD. Embora não tenha sido observada diferença estatística em relação ao filo Fibrobacteres, equinos alimentados com CED apresentaram menor abundância desse filo do que equinos alimentados com CHD, provavelmente porque a maioria dos Fibrobacteres são intolerantes a ácido (MIYAZAKI et al., 1992). Na verdade, além da redução do pH na digesta que ocorre em resposta ao alto consumo de CNF, a competição entre microrganismos adaptados ao substrato disponível em comparação com aqueles que são fibrolíticos obrigatórios afeta a estrutura da comunidade bacteriana intestinal dos equinos (DALY et al., 2012).

Atualmente, o manejo nutricional de muitos sistemas de criação de equinos consiste em duas grandes refeições concentradas diárias (CLARKE, 1990). Esta estratégia de manejo pode ter efeitos deletérios na saúde gastrointestinal e no bem-estar geral dos animais (CLARKE, 1990; JULLIAND et al., 2006). Portanto, qualquer produto com o objetivo de inovar no setor equestre de alimentação deve priorizar a saúde das comunidades microbianas e incluir este parâmetro no conceito de saúde e bem-estar do cavalo.

A exclusão do feno de Coastcross na semana 4 no Ensaio II aumentou a abundância do filo Fusobacteria nos equinos alimentados com CED. Foi relatado que este filo ocorre em baixa abundância em amostras coletadas do cólon dorsal de equinos (ERICSON et al., 2016) e fezes (RODRIGUEZ et al., 2015). Entretanto, aumentos na abundância relativa deste filo foram associados à ocorrência de colite (COSTA et al., 2012) e diarreia (RODRIGUEZ et al., 2015).

Nenhum dos equinos apresentou distúrbios gastrointestinais ao longo do período experimental; entretanto, não é possível afirmar que a alimentação prolongada de equinos com CED pode manter a estrutura de sua comunidade microbiana intestinal e, conseqüentemente, a saúde gastrointestinal.

Curiosamente, o inóculo fecal obtido de equinos alimentados com dietas CED e CHD mostrou o mesmo potencial fermentativo para degradar o substrato feno. Entretanto, o inóculo fecal de equinos alimentados com CED aumentou a degradação da MO quando o concentrado foi usado como substrato. A fase lag é o tempo necessário para que os microrganismos intestinais reconheçam o substrato, e a sua duração pode variar de acordo com a qualidade do inóculo fecal. Conforme observado por Murray et al. (2006), substratos com alto teor de amido têm uma fase lag longa quando incubados com fezes de equinos alimentados com uma dieta de baixo teor de amido, enquanto fases lag mais curtas ocorreram quando o inóculo veio de equinos alimentados com dietas de alto teor de amido. A capacidade do inóculo fecal obtido dos equinos alimentados com CED para fermentar o feno foi mantida em comparação com a capacidade fermentativa do inóculo proveniente de equinos alimentados com CHD. Curiosamente, o inóculo obtido dos animais alimentados exclusivamente com CED não perdeu sua capacidade de fermentar fibras. Embora a importância do consumo de fibra seja bem conhecida (NRC, 2007), até o momento, não há recomendação sobre o consumo de fibra para equinos. No entanto, Hintz (2000) sugeriu que um mínimo de 24% de FDN ou 14% de FDA na dieta total é adequado para manter a saúde gastrointestinal e Drogoul et al. (2001) sugeriram uma inclusão mínima de 50% de FDN para proteger contra distúrbios intestinais em cavalos alimentados com dietas de grãos de cereais. O consumo exclusivo de CED descrito aqui (Ensaio III) atendeu à recomendação de Hintz (2000), pois continha 45% de FDN e 25% de FDA.

Richardson e Murray (2016) mostraram que a adição de alimentos fibrosos de alta qualidade, como polpa de beterraba e casca de soja, à composição de alimentos completos extrusados reduz o amido e aumenta a disponibilidade de energia. Embora o presente estudo tenha sido realizado com três equinos com exigência de manutenção da mesma raça que foram expostos ao mesmo manejo e condições ambientais, o período experimental analisou apenas um curto período (21 dias) de consumo de CED pelos animais. Portanto, para avaliar melhor a nutrição e a segurança do uso de CED como estratégia alimentar, seria interessante investigar o efeito dessa dieta a longo prazo. Também seria interessante avaliar diferentes desafios ambientais para confirmar o padrão de mudança do microbioma fecal, incluindo o uso de outras categorias de equinos, como potros desmamados, equinos idosos com problemas dentários, equinos sob manejo de alimentação pós-operatório e aqueles submetidos a regimes de exercícios. Além disso, pesquisas futuras devem investigar o impacto dessa dieta em comunidades desconhecidas de microbiomas equinos, como fungos, arqueias e protozoários.

5 CONCLUSÃO

Equinos em manutenção, da mesma raça, expostos ao mesmo manejo e condições ambientais, pertencentes ao mesmo sistema de criação e sob o mesmo regime alimentar, apresentam estruturas semelhantes de comunidade bacteriana fecal.

Embora o consumo de feno de Coastcross tenha mantido a composição da comunidade bacteriana fecal dos equinos, o período de adaptação à dieta volumosa é tão importante quanto a adaptação à dieta concentrada, uma vez que a atividade de degradação *in vitro* do volumoso aumenta quando os microrganismos fecais são adaptados para a mesma dieta. Mais estudos são necessários para estabelecer o papel do filo Actinobacteria em equinos alimentados exclusivamente com dietas volumosas.

O monitoramento semanal da adaptação ao consumo de CED mostrou que o microbioma fecal está associado à dieta do hospedeiro. A inclusão de 30% de CED afetou a

abundância e a detecção de alguns grupos bacterianos que influenciam a atividade fermentativa *in vitro*. Os dados apresentados indicam que a inclusão de CED deve começar com menos de 30% para permitir que o equino se adapte ao novo alimento, de modo a reduzir seu impacto no microbioma intestinal do animal. A diversidade microbiana fecal está associada à presença de volumoso e não ao aumento de CNF na dieta, uma vez que um aumento de 0,91 a 1,81 g de CNF / Kg de PV / refeição não alterou a diversidade bacteriana.

Diferentes padrões de mudança de abundância relativa foram observados para membros específicos da comunidade bacteriana, sugerindo que a resposta digestiva do hospedeiro à dieta contribui para mudanças na composição da microbiota gastrointestinal. Além disso, a atividade desses microrganismos depende do período de adaptação ao substrato que atinge o intestino grosso. Assim, as mudanças na dieta devem ocorrer por um período mais longo.

Embora o estudo tenha controlado a dieta e o manejo dos animais para garantir a segurança do CED, recomenda-se que avaliações do efeito da CED a longo prazo sejam realizadas no microbioma intestinal dos equinos após o período de adaptação a dieta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL JASSIM, R. A.; SCOTT, P. T.; TREBBIN, A. L.; TROTT, D.; POLLITT, C. C. The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. 1, p. 75-81, 2005.

ALMEIDA, M. L. M.; FERINGER JÚNIOR, W. H.; CARVALHO, J. R. G.; RODRIGUES, I. M.; JORDÃO, L. R.; FONSECA, M. G.; REZENDE, A. S. C.; QUEIROZ NETO, A.; WEESE, J. S.; COSTA, M. C. LEMOS, E. G. M.; FERRAZ, G. C. Intense exercise and aerobic conditioning associated with chromium or L-carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0167108, 2016.

ANTWIS, R. E.; LEA, J. M.; UNWIN, B.; SHULTZ, S. Gut microbiome composition is associated with spatial structuring and social interactions in semi-feral Welsh Mountain ponies. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 207, 2018.

APPRILL, A.; MCNALLY, S.; PARSONS, R.; WEBER, L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 75, n. 2, p. 129-137, 2015.

ARCHER, D.; BARTON, M.; MAIR, T. Temporal Stability of Faecal Microbiota in Horses Kept at Pasture. **Equine Veterinary Education**, v. 29, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995, 1025p.

CABRERA, L.; TISSERAND, J. L. Effet du rythme de distribution et de la forme de presentation d'un regime paille-concentre (a 2 niveaux d'apport azote) sur l'aminoacidemie chez le poney. In: **Annales de Zootechnie**. 1995. p. 105-114.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of statistics**, p. 265-270, 1984.

CLARKE, L. L.; ROBERTS, M. C.; ARGENZIO, R. A. Feeding and digestive problems in horses: physiologic responses to a concentrated meal. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 6, n. 2, p. 433-450, 1990.

CLAVEL, T.; CHARRIER, C.; WENNING, M.; HALLER, D. *Parvibacter caecicola* gen. nov., sp. nov., a bacterium of the family Coriobacteriaceae isolated from the caecum of a

mouse. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2642-2648, 2013.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_1, p. D141-D145, 2008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn879>

COSTA, M. C.; ARROYO, L. G.; ALLEN-VERCOE, E.; STÄMPFLI, H. R.; KIM, P. T., STURGEON, A., & WEESE, J. S. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41484, 2012.

COSTA, M. C.; WEESE, J. S. Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 34, n. 1, p. 1-12, 2018.

DALY, K.; PROUDMAN, C. J.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J.; DYER, J.; SHIRAZI-BEECHEY, S. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 7, p. 989-995, 2012.

DESROUSSEAUX, G.; SANTOS, A. S.; PELLIKAAN, W. F.; VAN DER POEL, A. F. B.; CONE, J. W.; GUEDES, C. M. V.; FERREIRA, L. M. M.; RODRIGUES, M. A. M. Effect of collection time on the fermentative activity of microbes in equine faeces. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, n. 3-4, p. 183-189, 2012.

DOUGAL, K.; FUENTE, G.; HARRIS, P. A.; GIRDWOOD, S. E.; PINLOCHE, E.; GEOR, R. J.; NIELSEN, B. D.; SCHOTT II, H. C.; ELZINGA, S. NEWBOLD, J. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e87424, 2014.

DOUGAL, K.; HARRIS, P. A.; GIRDWOOD, S. E.; CREEVEY, C. J.; CURTIS, G. C.; BARFOOT, C. F.; ARGO, C. M.; NEWBOLD, C. J. Changes in the total fecal bacterial population in individual horses maintained on a restricted diet over 6 weeks. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1502, 2017.

DROGOUL, C.; DE FOMBELLE, A.; JULLIAND, V. Feeding and microbial disorders in horses: 2: Effect of three hay: grain ratios on digesta passage rate and digestibility in ponies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 10, p. 487-491, 2001.

DROGOUL, C.; PONCET, C.; TISSERAND, J. L. Feeding ground and pelleted hay rather than chopped hay to ponies: 1. Consequences for in vivo digestibility and rate of passage of digesta. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, n. 1-2, p. 117-130, 2000.

DUFRÊNE, M.; LEGENDRE, P. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. **Ecological monographs**, v. 67, n. 3, p. 345-366, 1997.

DYER, J.; AL-RAMMAHI, M.; WATERFALL, L.; SALMON, K. S. H.; GEOR, R. J.; BOURÉ, L.; EDWARDS, G. B.; PROUDMAN, C. J.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Adaptive response of equine intestinal Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) to an increase in dietary soluble carbohydrate. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 458, n. 2, p. 419-430, 2009.

- ENDO, A.; OKADA, S.; MORITA, H. Molecular profiling of *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium* species in feces of active racehorses. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 191-200, 2007.
- ERICSSON, A. C.; JOHNSON, P. J.; LOPES, M. A.; PERRY, S. C.; LANTER, H. R. A microbiological map of the healthy equine gastrointestinal tract. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0166523, 2016.
- FRANZAN, B. C.; FRANCO, T. W.; STEFANI, G.; PEREIRA, M. M.; ALMEIDA, F. Q. D.; SILVA, V. P. Equine fecal inoculum optimization in in vitro fermentation assays of dehydrated roughage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, 2018.
- GOODFELLOW, M. Actinobacteria phyl. nov. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-2, 2015.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.
- HANSEN, N. C. K.; AVERSHINA, E.; MYDLAND, L. T.; NÆSSET, J. A.; AUSTBØ, D.; MOEN, B.; MAGE, I.; RUDI, K. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, n. 1, p. 27216, 2015.
- HASTIE, P. M.; MITCHELL, K.; MURRAY, J.-A. M. D. Semi-quantitative analysis of *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* and *Streptococcus bovis* in the equine large intestine using real-time polymerase chain reaction. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2008.
- HILL, J. Impacts of nutritional technology on feeds offered to horses: A review of effects of processing on voluntary intake, digesta characteristics and feed utilisation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 138, n. 2, p. 92-117, 2007.
- HINTZ, H. F.; ARGENZIO, R. A.; SCHRYVER, H. F. Digestion coefficients, blood glucose levels and molar percentage of volatile acids in intestinal fluid of ponies fed varying forage-grain ratios. **Journal of Animal Science**, v. 33, n. 5, p. 992-995, 1971.
- JULLIAND, S.; MARTIN, A.; JULLIAND, V. Effect of dehydrated alfalfa on equine gastric and faecal microbial ecosystems. **Livestock Science**, v. 215, p. 16-20, 2018a.
- JULLIAND, S.; MARTIN, A.; JULLIAND, V. Effect of live yeast supplementation on gastric ecosystem in horses fed a high-starch diet. **Livestock Science**, v. 215, p. 25-29, 2018b.
- JULLIAND, V.; DE FOMBELLE, A.; VARLOUD, M. Starch digestion in horses: the impact of feed processing. **Livestock science**, v. 100, n. 1, p. 44-52, 2006.
- JULLIAND, V.; GRIMM, P. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 6, p. 2262-2274, 2016.
- MIYAZAKI, K.; HINO, T.; ITABASHI, H. Effects of extracellular pH on the intracellular pH and membrane potential of cellulolytic ruminal bacteria, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, and *Fibrobacter succinogenes*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 567-573, 1992.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - **Nutrient Requirements of Horses**. Washington: National Academy Press, 2007, 6Ed, 341p.

- O'DONNELL, M. M.; HARRIS, H. M. B.; JEFFERY, I. B.; CLAESSION, M. J.; YOUNGE, B.; O'TOOLE, P. W.; ROSS, R. P. The core faecal bacterial microbiome of Irish Thoroughbred racehorses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 492-501, 2013.
- PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J. A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403-1414, 2016.
- PLANCADE, S.; CLARK, A.; PHILIPPE, C.; HELBLING, J. C.; MOISAN, M. P.; ESQUERRÉ, D.; LE MOYEC, L.; ROBERT, C.; BARREY, E.; MACH, N. Unraveling the effects of the gut microbiota composition and function on horse endurance physiology. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.
- POTTER, G. D.; ARNOLD, F. F.; HOUSEHOLDER, D. D.; HANSEN, D. H.; BROWN, K. M. Digestion of starch in the small or large intestine of the equine. **Pferdeheilkunde**, v. 1, n. 4, p. 107-111, 1992.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012. doi: doi.org/10.1093/nar/gks1219
- RODRIGUEZ, C.; TAMINIAU, B.; BRÉVERS, B.; AVESANI, V.; VAN BROECK, J.; LEROUX, A.; GALLOT, M.; BRUWIER, A.; AMORY, H.; DELMÉE, M.; DAUBE, G. Faecal microbiota characterisation of horses using 16 rDNA barcoded pyrosequencing, and carriage rate of clostridium difficile at hospital admission. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 181, 2015.
- SALEM, S. E.; MADDOX, T. W.; BERG, A.; ANTCZAK, P.; KETLEY, J. M.; WILLIAMS, N. J.; ARCHER, D. C. Variation in faecal microbiota in a group of horses managed at pasture over a 12-month period. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8510, 2018.
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541 (2009). doi:10.1128/AEM.01541-09
- SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, n. 3, p. 379-423, 1948.
- SHEPHERD, M. L.; SWECKER JR, W. S.; JENSEN, R. V.; PONDER, M. A. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, n. 1, p. 62-68, 2012.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária, 3.ed., 2006, 235p.
- SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688, 1949.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. p. 49-60. In: **Standardization of analytical methodology for feeds: proceedings...** IDRC, Ottawa, ON, CA, 1980.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VERVUERT, I.; COENEN, M.; BOTHE, C. Effects of corn processing on the glycaemic and insulinaemic responses in horses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, n. 9-10, p. 348-355, 2004.

VERVUERT, I.; VOIGT, K.; HOLLANDS, T.; CUDDEFORD, D.; COENEN, M. Effects of processing barley on its digestion by horses. **Veterinary Record**, v. 162, n. 21, p. 684-688, 2008.

CAPÍTULO III

RESPOSTAS DO MICROBIOMA FECAL DE EQUINOS MANGALARGA MACHADOR A TROCAS ABRUPTAS DE DIETAS

RESUMO

A troca abrupta da dieta dos equinos está associadas a distúrbios gastrointestinais. Objetivou-se avaliar os efeitos da troca abrupta de dieta exclusiva de feno de Coastcross e dieta completa extrusada sobre o microbioma fecal de equinos. Oito equinos machos adultos da raça Mangalarga Marchador foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo A (n=4) alimentado com feno de Coastcross; grupo B (n=4) alimentado com dieta completa extrusada. Após 34 dias de alimentação, as dietas foram trocadas abruptamente entre os grupos de equinos. Amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal, às 0, 24 e 96 horas após a mudança de dieta. O pH e do microbioma fecal foram avaliados. Os resultados foram submetidos à ANOVA ($\alpha = 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os equinos alimentados com feno de Coastcross tiveram maior maior pH fecal e maiores índices de alfa diversidade quando comparado à dieta completa extrusada. A estrutura da comunidade bacteriana de ambos os grupos foram distintas. A troca do feno de Coastcross para dieta completa extrusada resultou na redução do índice de diversidade de Shannon e da abundância relativa do filus Firmicutes e Actinobacteria, e no aumento dos filus Bacteroidetes e Elusimicrobia 24 horas após a troca. Após 96 horas da troca da dieta, o pH fecal e a abundância dos filus Elusimicrobia e Proteobacteria diminuíram enquanto o filo Verrucomicrobia aumentou. Além disso, a estrutura da comunidade bacteriana fecal se diferenciou após 96 horas da troca. A mudança da dieta completa extrusada para o feno de Coastcross resultou na redução do pH fecal e da abundância relativa do filo Synergistetes 24 horas após a troca. Após 96 horas da troca da dieta houve aumento do índice de diversidade de Shannon e da abundância do filo Lentisphaerae. Não houve diferença significativa da estrutura da comunidade do grupo B nos três tempos avaliados. Além disso, houve um aumento da abundância de OTUs classificadas como pertencentes ao filo Bacteroidetes e ao gênero *Treponema* nas fezes de ambos os grupos 24 horas após a troca, seguido de redução após 96 horas. Após a troca do feno de Coastcross para a dieta completa extrusada ocorre redução da alfa diversidade, a qual é detectável nas fezes 24 horas após a troca. Quando ocorre a troca da dieta completa extrusada para o feno de Coastcross, é necessário tempo superior a 96 horas para recuperar a diversidade de espécies do microbioma fecal. Portanto, a composição da dieta influencia a resposta do microbioma fecal equino a uma mudança abrupta da dieta.

Palavras-chave: adaptação, cavalo, microbiota, mudança dietética

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of abrupt interchange of Coastcross hay diet and complete extruded diet on the fecal microbiome of horses. Eight adult male horses were randomly split into two groups: group A (n = 4), fed a Coastcross hay diet; group B (n = 4) fed a complete extruded diet. After 34 days of diet adaptation, the diets were abruptly interchanged between the groups. Fecal samples were collected directly from the rectum at 0, 24 and 96 hours after diet change. pH and microbiome analyses of the feces were performed. The results were submitted to ANOVA ($\alpha = 0.05$) and the means compared by the Tukey test ($\alpha = 0.05$). Horses fed Coastcross hay had a higher fecal pH and a higher alpha diversity index when compared to the complete extruded diet. The structure of the bacterial community in both groups was different. The exchange of Coastcross hay for a complete extruded diet resulted in a reduction in the Shannon diversity index and in the relative abundance of the phyla Firmicutes and Actinobacteria, and in an increase in the phyla Bacteroidetes and Elusimicrobia 24 hours after the change. After 96 hours of changing the diet, the fecal pH and the abundance of the phyla Elusimicrobia and Proteobacteria decreased while the phylum Verrucomicrobia increased. In addition, the structure of the fecal bacterial community differed after 96 hours of change. The change from the complete extruded diet to the Coastcross hay resulted in a reduction in faecal pH and relative abundance of the phylum Synergistetes 24 hours after changing. After 96 hours of changing the diet, there was an increase in the Shannon diversity index and in the abundance of the phylum Lentisphaerae. There was no significant difference in the group B community structure in the three periods evaluated. In addition, there was an increase in the abundance of OTUs classified as belonging to the phylum Bacteroidetes and to the genus *Treponema* in the feces of both groups 24 hours after the change, followed by a reduction after 96 hours. After changing the Coastcross hay to the complete extruded diet, there is a reduction in alpha diversity, which is detectable in the feces 24 hours after the change. When changing from the complete extruded diet to the Coastcross hay, it takes more than 96 hours to recover the diversity of species in the fecal microbiome. Therefore, the composition of the diet influences the response of the equine fecal microbiome to an abrupt change in diet.

Keywords: adaptation, dietary change, horse, microbiota

1 INTRODUÇÃO

O trato digestório dos equinos oferece ambiente propício para o desenvolvimento da microbiota anaeróbica e, por fim, os animais utilizam os metabólitos microbianos para suprir parte de suas exigências nutricionais. As modificações na dieta dos equinos influenciam o equilíbrio entre microrganismos especializados na fermentação de diferentes substratos dentro da comunidade microbiana, conseqüentemente, afetam os ecossistemas microbianos intestinais e seus metabólitos (DALY et al., 2012; DOUGAL et al., 2012).

Nos equinos adultos, as mudanças dietéticas ocorrem por inúmeros fatores, podendo estar associadas a sazonalidade da disponibilidade das forragens devido aos períodos de seca e/ou inverno e, conseqüentemente, a utilização de forrageiras conservadas na forma de feno ou silagem. Em outras situações, mudanças nas dietas por uso de alimentos concentrados, seja devido a limitação de área de pastagem, confinamento em estábulos, transporte ou categorias animais de maior exigência energética (CLARKE et al., 1990; NRC, 2007).

Mudanças dietéticas abruptas e fornecimento de dietas concentradas com alto teor de nutrientes rapidamente fermentescíveis são práticas comuns na criação intensiva de equinos (VAN DER BERG et al., 2013). O fornecimento de um novo lote de forragem e mudança no tipo de forragem; a inclusão, aumento ou mudança do tipo de alimento concentrado, além da redução do tempo de pastejo ou do consumo de alimento volumoso aumentam a probabilidade de ocorrência de cólica equina (CURTIS et al., 2019). A disbiose causada pela inclusão abrupta de altas proporções de cereais na dieta da espécie foi o evento estudado por GOODSON et al. (1988), enquanto outras mudanças dietéticas podem impactar o microbioma intestinal, como a troca abrupta de uma dieta concentrada por uma dieta volumosa e até mesmo entre dietas volumosas baseadas em alimentos diferentes (GRIMM et al., 2016; GARBER et al., 2020).

A comunidade bacteriana era sub representada pois apenas 5% das sequências bacterianas correspondiam a organismos conhecidos disponíveis em bancos de dados públicos (DALY et al., 2012). Além disso, a maioria dos estudos sobre a microbiota intestinal equina foram realizados utilizando técnicas dependente de cultura capazes de quantificar grupos funcionais como bactérias celulolíticas, utilizadoras e produtoras de lactato (DE FOMBELLE et al., 2001). Metodologias baseadas em biologia molecular como o sequenciamento de nova geração, possuem maior potencial de identificação de microrganismos de difícil cultivo, logo, houve avanços na compreensão da ecologia microbiana intestinal dos equinos (COSTA et al., 2012; COSTA e WEESE, 2018).

Objetivou-se avaliar os efeitos da troca abrupta entre dieta exclusiva de feno de capim Coastcross (*Cynodon* spp. cv Coastcross) e dieta completa extrusada sobre o microbioma fecal de equinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob número de protocolo 3083.029756/2017-10.

2.1 Animais

Foram utilizados 8 equinos machos castrados Mangalarga Machador, adultos em manutenção, com idade de 4 ± 1 anos, peso vivo de 370 ± 12 kg e sem administração de tratamentos antimicrobianos durante o período experimental. Antes do início da pesquisa, os equinos foram submetidos ao controle de parasitas com ivermectina (EQVALAN, Boehringer Ingelheim, Alemanha), e cipermetrina (CIPERALLVET, Eurofarma, Brasil). Exames clínicos

e hematológicos foram realizados com vista à higidez dos animais. Os equinos foram mantidos em baias individuais com livre acesso a água e ao sal mineral.

2.2 Delineamento Experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso com medidas repetidas no tempo, os tratamentos foram representados por duas dietas com quatro repetições e as medidas repetidas representadas pelos momentos da coleta de amostras fecais após 34 dias de adaptação às dietas (0, 24 e 96 horas após a mudança abrupta entre as dietas).

2.3 Condução do Experimento e Coleta de Amostras Fecais

Os equinos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo A (n=4), equinos alimentados exclusivamente com feno de Coastcross (*Cynodon* spp. cv Coastcross); grupo B (n=4), equinos alimentados com dieta completa extrusada (FORAGGE HORSE, Nutratta, Brasil). O feno de Coastcross foi disponibilizado em redes tipo porta feno e a dieta extrusada foi dividida em três refeições iguais e oferecidas às 08:00, 13:00 e 18:00 horas. O consumo médio diário de matéria seca foi de 25 g MS kg⁻¹ de peso vivo das respectivas dietas (Tabela 1), que supriram as exigências nutricionais da categoria adultos em manutenção (NRC, 2007). Após a adaptação de 34 dias às dietas, realizou-se a primeira coleta de amostras fecais (T0) (Figura 1). No mesmo dia, as dietas dos grupos foram trocadas. A segunda coleta de fezes foi realizada em 24 horas (T24) e a terceira 96 horas (T96) após a mudança abrupta.

Tabela 1. Composição química do feno de Coastcross e da dieta completa extrusada, na base da matéria seca

Item	Dietas	
	Feno de Coastcross	Dieta completa extrusada
Matéria seca, g/Kg	900	888
Composição química, g/Kg MS		
Matéria mineral	58	46
Extrato etéreo	23	33
Protéina bruta	157	114
Fibra em detergente neutro	823	446
Fibra em detergente ácido	392	255
Celulose	319	200
Lignina ¹	73	55
Carboidratos não fibrosos ²	0	362
Conteúdo energético		
Energia bruta, kcal/Kg MS	4421	4572
Energia digestível, kcal/Kg MS ³	1740	2710

¹ Lignina determinada por oxidação de permanganato

² CNF = 100 - (%PB + %FDN + %EE + %MM)

³ Energia digestível estimada, Pagan (1998) = 2118 + 12.18 × (% PB) – 9.37 × (% FDA) – 3.83 × (% hemicelulose) + 47.18 × (% EE) + 20.35 × (% CNF) – 26.3 × (% MM)

As amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal utilizando luvas de uso único, às 09:00 h. Imediatamente após a coleta, o pH fecal foi analisado e as amostras foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos devidamente identificados, minimizando a exposição ao O₂. No laboratório, 20 g de cada amostra foi congelada à -20 °C até a extração de DNA.

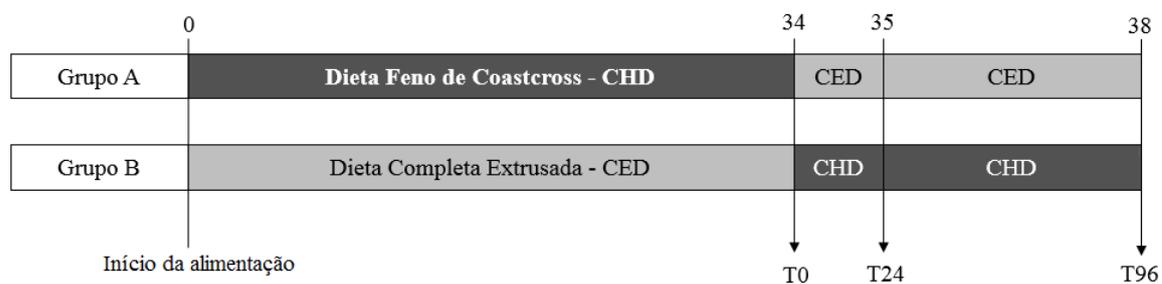


Figura 1. Esquema de coleta de amostras fecais para análise do microbioma. As setas indicam o momento de coleta de fezes em 0, 24 e 96 horas após a mudança abrupta de dieta (T0, T24 e T96, respectivamente).

2.4 Análise Bromatológica

O feno de Coastcross e a dieta completa extrusada foram analisados quanto: matéria seca, proteína bruta e cinzas (AOAC, 1995), extrato etéreo e energia bruta (SILVA e QUEIROZ, 2006). A fibra foi determinada em detergente neutro e detergente ácido (VAN SOEST et al., 1991) e lignina analisada por oxidação da lignina com permanganato (VAN SOEST e ROBERTSON, 1980).

2.5 Análise do pH Fecal

Ao final do ensaio de digestão, o pH do líquido fecal obtido a partir da compressão de 100 g de fezes coletadas diretamente do reto foi mensurado com um aparelho pHmetro de bancada previamente calibrado.

2.6 Extração do DNA Total, Preparo de Biblioteca e Sequenciamento do Gene 16S rRNA

O DNA total foi extraído a partir de 200 mg de fezes congeladas utilizando o kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini (QIAGEN Ltd, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. A região variável V4 do gene 16S rRNA que codifica 16S rRNA foi amplificado com os primers 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (GGACTACNVTGGTWTCTAAT) (APPRILL et al., 2015; PARADA et al., 2016). Os amplicons foram sequenciados na plataforma MiSeq sistema paired-end 2x250 (Illumina, EUA). O preparo de biblioteca e o sequenciamento dos amplicons foram realizados por Argonne National Lab (www.anl.gov).

2.7 Análise de Bioinformática

Os dados brutos do sequenciamento foram processados por meio do software Mothur 1.42.1 (SCHLOSS et al., 2009). Após a formação de contigs, foram removidas as sequências menores de 240 pares de bases (pb) ou superiores a 270 pb, que continham ambiguidade ou mais que 8 homopolímeros. O alinhamento das sequências foi realizado usando a base de dados de Silva como referência (QUAST et al., 2013), e as sequências mal alinhadas e colunas não informativas no alinhamento foram removidas para então, serem pré-agrupadas. As sequências quiméricas foram detectadas e removidas. As sequências resultantes foram classificadas de acordo com a versão 16 do Projeto de Banco de Dados Ribossomal (COLE et al., 2009) com limiar de confiança de 80. Sequências identificadas como sendo de cloroplastos, mitocôndrias, eucariotos ou Archaea e aquelas identificadas como reino desconhecido também foram removidas. Após a normalização das amostras para o mesmo número de sequências, essas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTU) com um limiar de dissimilaridade de 3%. As OTUs raras foram retiradas e foram calculadas as curvas de rarefação, distribuição das OTUs, índices de alfa diversidade Chao1 (CHAO, 1984), Shannon

(SHANNON, 1948) e Simpson (SIMPSON, 1949). A composição bacteriana foi avaliada utilizando um resumo taxonômico de cada amostra e a visualização foi feita através de um *heatmap* usando o módulo Marker Data Profiling da ferramenta online MicrobiomeAnalyst (www.microbiomeanalyst.ca) (DHARIWAL et al., 2017).

A distribuição das OTUs foi usada como entrada para uma ordenação de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) com o índice de similaridade de Bray-Curtis projetadas em espaço bidimensional.

2.8 Predição Metagenômica Funcional

A predição funcional para as sequências do gene 16S rRNA foi realizada por meio do pacote Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) (LANGILLE et al., 2013). A tabela de distribuição das OTUs foi reclassificada utilizando a versão 13.5 do banco de dados GreenGenes (DESANTIS et al., 2006). Após exclusão das OTUs desconhecidas do banco de dados de referência GreenGenes e normalização pelo número de cópias do gene 16S rRNA, os metagenomas funcionais para cada amostra foram preditos utilizando o catálogo da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) e agrupados para um nível especificado de KEGG.

2.9 Análises Estatísticas

As frequências relativas dos filos bacterianos e os índices de diversidade foram testados para homocedasticidade e normalidade. Dados de frequência relativa que não atenderam as premissas para realização do teste ANOVA, foram submetidos a transformação logarítmica. Atendendo as premissas de homocedasticidade e normalidade, os dados foram submetidos a ANOVA ($\alpha = 5\%$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

A estrutura da comunidade foi avaliada utilizando um teste de PERMANOVA.

As diferenças nas funções entre os grupos de amostras foram avaliadas pela análise de similaridade (ANOSIM) e visualizada através da ordenação de NMDS, ambas utilizando a métrica de dissimilaridade de Bray-Curtis.

Todos os procedimentos descritos acima foram realizados com o uso do pacote estatístico Past3 (HAMMER et al., 2001).

A abundância relativa das vias bioquímicas preditas pelo PICRUSt foi comparada por meio da LEfSe (*Linear discriminate analysis effect size*) disponível na plataforma de ferramentas online Galaxy - The Huttenhower Lab (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) (SEGATA et al., 2011).

O efeito da dieta inicial e do tempo após a mudança abrupta da dieta sobre alguma OTU bacteriana específica foi avaliado pela Análise de Espécies Indicadoras (DUFRÊNE e LEGENDRE, 1997) na versão v.1.39.5 do software Mothur. Todas OTUs foram testadas como indicadoras nas comparações entre os grupos A e B e entre os tempos dentro de cada grupo. Foram considerados como OTUs impactadas pela mudança abrupta de dieta aquelas significativas ($p < 0,05$) e que apresentaram valor de indicador maior que 60 no intervalo de 0 a 100.

2.10 Número de Acesso da Sequência de Nucleotídeos

Os dados gerados foram depositados no NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) e estão disponíveis sob o número de acesso de bioprojeto PRJNA640129.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação do pH Fecal

No momento da mudança abrupta da dieta, o pH fecal do Grupo A de 6,79 foi significativamente maior ($p=0,0070$) quando comparado ao Grupo B com valor de 6,34.

Não houve diferença significativa do pH fecal dos equinos do grupo A 0 e 24 horas após a troca de dieta do feno de Coastcross para dieta extrusada ($p=0,3186$) com valores 6,79 e 6,70, respectivamente. Entretanto, 96 horas após a mudança o pH diminuiu significativamente para 6,22 ($p=0,0005$).

Após a troca de dieta do grupo B da dieta extrusada para o feno de Coastcross, o pH fecal diminuiu significativamente ($p=0,0026$) de 6,34 para 6,08, 24 horas após a troca. Enquanto 96 horas após a troca, o pH fecal aumentou significativamente para 6,60 ($p=0,0000$).

Finalmente, não houve diferença significativa do pH fecal entre os dois grupos 96 horas após a mudança abrupta.

3.2 Métricas do Sequenciamento

As 24 amostras coletadas no presente estudo originaram 619.510 sequências. Após o alinhamento e aplicação de filtros de qualidade, duas amostras foram excluídas pelo baixo número de sequências, uma pertencente ao grupo A coletada 24 horas após a troca e uma pertencente ao grupo B coletada 96 horas após a troca das dietas. Dessa forma, as análises a jusante foram realizadas com 22 amostras.

Uma subamostragem foi realizada com base na amostra com o menor número de sequências, resultando em 361.086 sequências, 16.413 por amostra, que foram distribuídas em 3.416 OTUs. As curvas de rarefação das OTUs apresentaram tendência em atingir o platô com o número total de sequências analisadas (Figura 2), o que indica que o aumento desse valor teria impacto mínimo no número de OTUs. Cerca de 89% das sequências foram classificadas a nível de filo, 52% classificadas a nível de classe, 49% a nível de ordem, 36% a nível de família e 17% a nível de gênero.

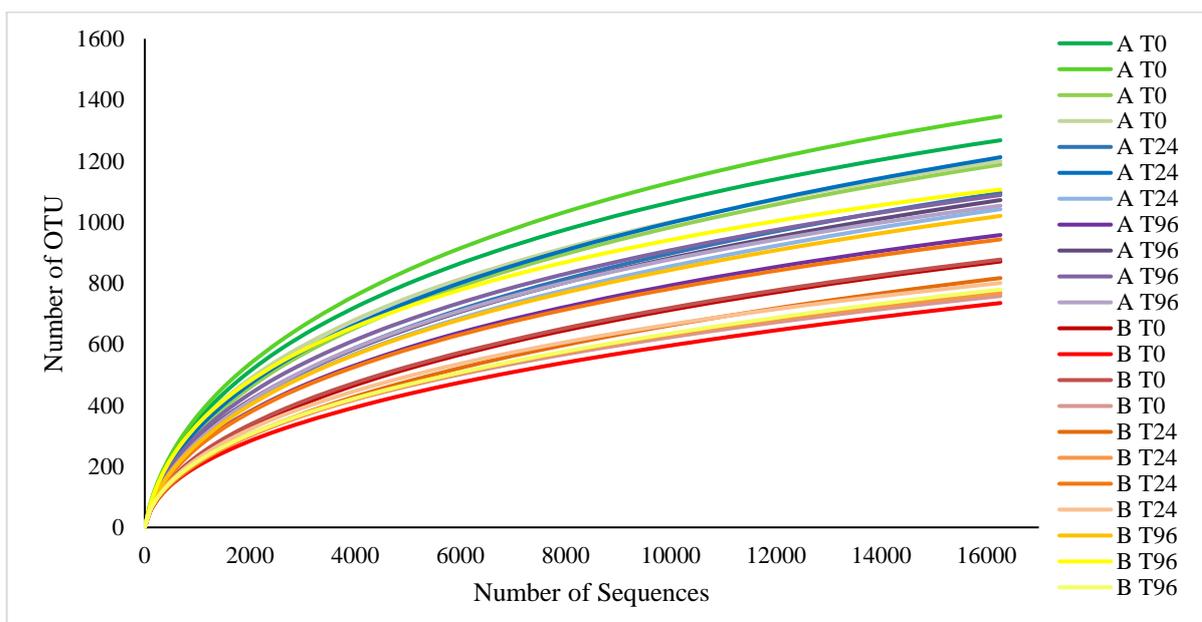


Figura 2. Curvas de rarefação do número de OTUs observadas em fezes de equinos submetidos a troca abrupta da dieta. Linhas em tons de verde, azul e roxo são dos animais do Grupo A após 0, 24 e 96 horas, respectivamente, da mudança abrupta da dieta feno de Coastcross para a dieta completa extrusada; Linhas em tons de vermelho, laranja e amarelo são dos animais do Grupo B após 0, 24 e 96 horas, respectivamente, da adaptação abrupta da dieta completa extrusada para a dieta feno de Coastcross.

3.3 Índices de Diversidade de Espécies

Após a adaptação as dietas, observou-se que os animais alimentados com o feno de Coastcross apresentaram número de OTUs significativamente maior quando comparado aos animais alimentados com a dieta completa extrusada ($p=0,0001$), bem como maiores índices estimadores de alfa diversidade, Chao1 ($p<0,0001$), Shannon ($p=0,0001$) e, conseqüentemente, menor índice de Simpson ($p=0,0038$) (Figura 3).

A troca de dieta do grupo A de feno de Coastcross para dieta completa extrusada diminuiu o número de OTUs observadas e o índice de Shannon avaliados após 24 horas da troca ($p=0,0057$ e $p=0,0189$, respectivamente) e não houve efeito significativo entre 24 e 96 horas após a troca para ambos os índices ($p>0,05$). Não foi observada diferença significativa no índice de Chao1 entre 0 e 24 horas após a troca ($p>0,05$), entretanto foi significativamente menor em 96 horas quando comparado com 24 horas ($p=0,0050$). Além disso, não foi observada diferença significativa no índice de Simpson entre todos os tempos avaliados ($p=0,0604$).

A troca de dieta do grupo B de dieta completa extrusada para feno de Coastcross não teve efeito significativo no número de OTUs e nos índices de Chao1 e Shannon entre T0 e T24 ($p>0,05$), no entanto, induziu aumentos significativos dessas variáveis no T96 ($p=0,0243$ para o número de OTUs; $p=0,0486$ para o índice de Chao1 e $p=0,0453$ para o índice de Shannon). Além disso, não foi observada diferença significativa no índice de Simpson entre os todos os tempos avaliados ($p>0,05$).

Não foi observada diferenças significativas nos índices de alfa diversidade avaliados entre os dois grupos 96 horas após a troca de dietas ($p<0,05$).

3.4 Análise Multivariada da Distribuição de OTUs

A análise da distribuição das OTUs indicou que a similaridade da estrutura da comunidade após a mudança abrupta de dieta é dependente do tipo de dieta inicial e do tempo após a mudança de dieta (PERMANOVA, $p=0,001$).

Houve diferenciação da comunidade bacteriana fecal proveniente dos animais dos grupos A e B (Figura 4). A troca de dieta de feno de Coastcross para dieta extrusada do grupo A não afetou a estrutura da comunidade bacteriana fecal observada 24 horas após a troca ($p=0,1157$), e comunidades observadas nos tempos 0 e 24 horas diferiram da comunidade observada 96 horas após a troca de dieta (0 vs 96 horas, $p= 0,0284$; 24 vs 96 horas, $p= 0,0247$). Entretanto, a troca de dieta completa extrusada para o feno de Coastcross do grupo B não teve efeito detectável nas comunidades bacterianas fecais observadas entre todos os tempos avaliados foram similares (0 vs 24 horas, $p= 0,4786$; 24 vs 96 horas, $p= 0,8299$; 0 vs 96 horas, $p= 0,3916$).

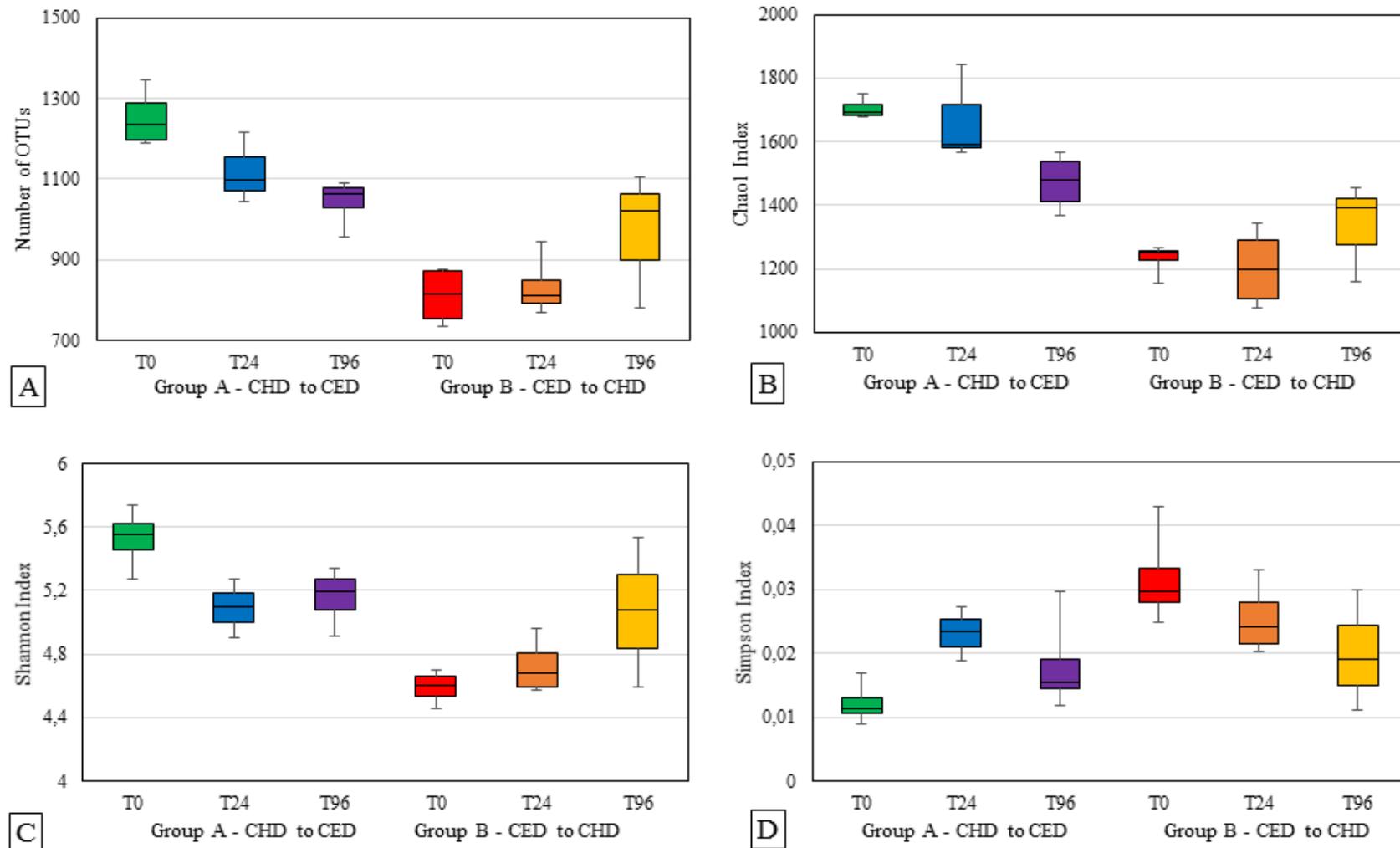


Figura 3. Número de OTUs observadas (A), índices de alfa diversidade de Chao1 (B), Shannon (C) e Simpson (D) da comunidade bacteriana de fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta do feno de Coastcross (CHD) para dieta completa extrusada (CED) e da dieta CED para CHD nos tempos 0 e 24 e 96 horas após a mudança abrupta da dieta (T0, T24 e T96, respectivamente).

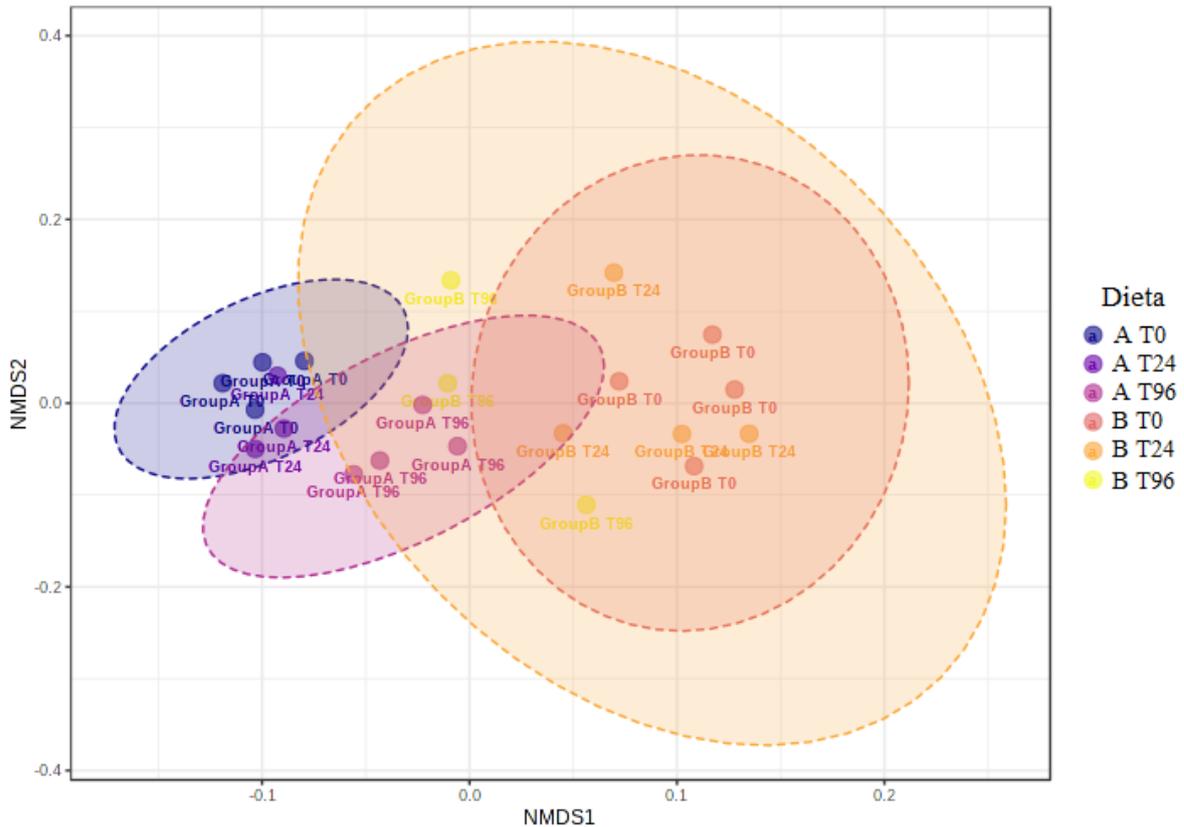


Figura 4. Ordenação multidimensional não-métrica (NMDS) usando o índice de similaridade de Bray-Curtis da distribuição de OTUs observadas nas fezes de equinos submetidos a uma mudança abrupta de dieta com valor de pH fecal plotado como vetor. A T0, amostras do Grupo A 0 horas após a mudança abrupta da dieta de feno de Coastcross (CHD) para dieta completa extrusada (CED); A T24, amostras do Grupo A 24 horas após a mudança abrupta de CHD para CED; A T96, amostras do Grupo A 96 horas após a mudança abrupta de CHD para CED; B T0, 0 horas após a mudança abrupta de CED para CHD; B T24, 24 horas após a mudança abrupta de CED para CHD; B T96, 96 horas após a mudança abrupta de CED para CHD.

3.5 Composição Taxonômica das Comunidades Bacterianas

Foram identificados 17 filos bacterianos nas amostras fecais: Bacteroidetes, Firmicutes, Spirochaetes, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Fibrobacteres, Elusimicrobia, Actinobacteria, Synergistetes, Lentisphaerae, Candidatus Saccharibacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, SR1, Tenericutes, Fusobacteria e Acidobacteria (Figura 5). Os filos Fusobacteria e Acidobacteria não foram detectados em 20% das amostras, portanto, foram retirados na pipeline padrão do *MicrobiomeAnalyst* para criação do *heatmap*.

Observou-se diferença significativa na abundância relativa dos filos Fibrobacteres ($p=0,0240$), Lentisphaerae ($p=0,0036$), Verrucomicrobia ($p=0,0102$) e Synergistetes entre as fezes de animais alimentados com feno de Coastcross e dieta completa extrusada antes da mudança abrupta de dieta. Os filos Fibrobacteres (2,07%) e Lentisphaerae (0,09%) foram mais abundantes nas amostras de fezes dos animais alimentados com feno de Coastcross, quando comparados àquelas dos animais alimentados com a dieta completa extrusada (0,18 e 0,03%, respectivamente). Enquanto os filos Verrucomicrobia (5,47%) e Synergistetes (0,42%) foram mais abundantes nas fezes dos equinos alimentados com a dieta completa extrusada, quando comparadas às dos equinos alimentados com feno de Coastcross (1,87% e 0,12%, respectivamente). Além disso, o filo Tenericutes foi observado exclusivamente nas amostras fecais dos equinos alimentados com o feno de Coastcross (0,03%).

Na troca do feno de Coastcross para dieta extrusada do grupo A, observou-se diferença significativa na abundância relativa dos filos Bacteroidetes ($p=0,0047$), Firmicutes ($p=0,0013$),

Verrucomicrobia ($p=0,0115$), Proteobacteria ($p=0,0313$), Elusimicrobia ($p=0,0056$) e Actinobacteria ($p=0,0135$) nas fezes dos animais. O filo Bacteroidetes aumentou significativamente após 24 horas (52,32%) quando comparado com o tempo 0 (41,14%) e não apresentou diferença significativa entre 24 e 96 horas após a troca de dieta (49,91%). O filo Elusimicrobia aumentou significativamente 24 horas após (0,55%) quando comparado com 0 horas (0,14%), mas reduziu 96 horas após a mudança (0,17%) igualando-se aos valores iniciais observados a 0 horas. Além disso, não foi observada diferença significativa na abundância relativa do filo Verrucomicrobia entre 0 (1,87%) e 24 horas após a troca (1,34%), entretanto aumentou significativamente após 96 horas da troca (3,87%). A abundância relativa dos filios Firmicutes e Actinobacteria de 34,30 e 0,33% observada no tempo 0, respectivamente, reduziram para 20,69 e 0,17%, respectivamente, 24 horas após a troca de dieta. Entretanto, não apresentou diferença significativa entre 24 e 96 horas, onde foi observada abundância de 24,00 e 0,13%, respectivamente. Enquanto a abundância relativa do filo Proteobacteria não apresentou diferença entre 0 (2,02%) e 24 horas (2,66%), entretanto, diminuiu significativamente 96 horas após a troca de dieta (1,26%).

Diferenças significativas foram observadas após a troca da dieta completa extrusada para o feno de Coastcross do grupo B, quanto aos filios Synergistetes ($p=0,0299$) e Lentisphaerae ($p=0,0396$). A abundância relativa do filo Synergistetes diminuiu significativamente 24 horas após a troca (0,07%) quando comparado com 0 horas (0,42%) e não apresentou diferença significativa entre 24 e 96 horas após a troca de dieta (0,16%). Enquanto a abundância do filo Lentisphaerae aumentou significativamente 96 horas após a troca (0,12%) quando comparado a 0 (0,03%) e 24 horas (0,05%).

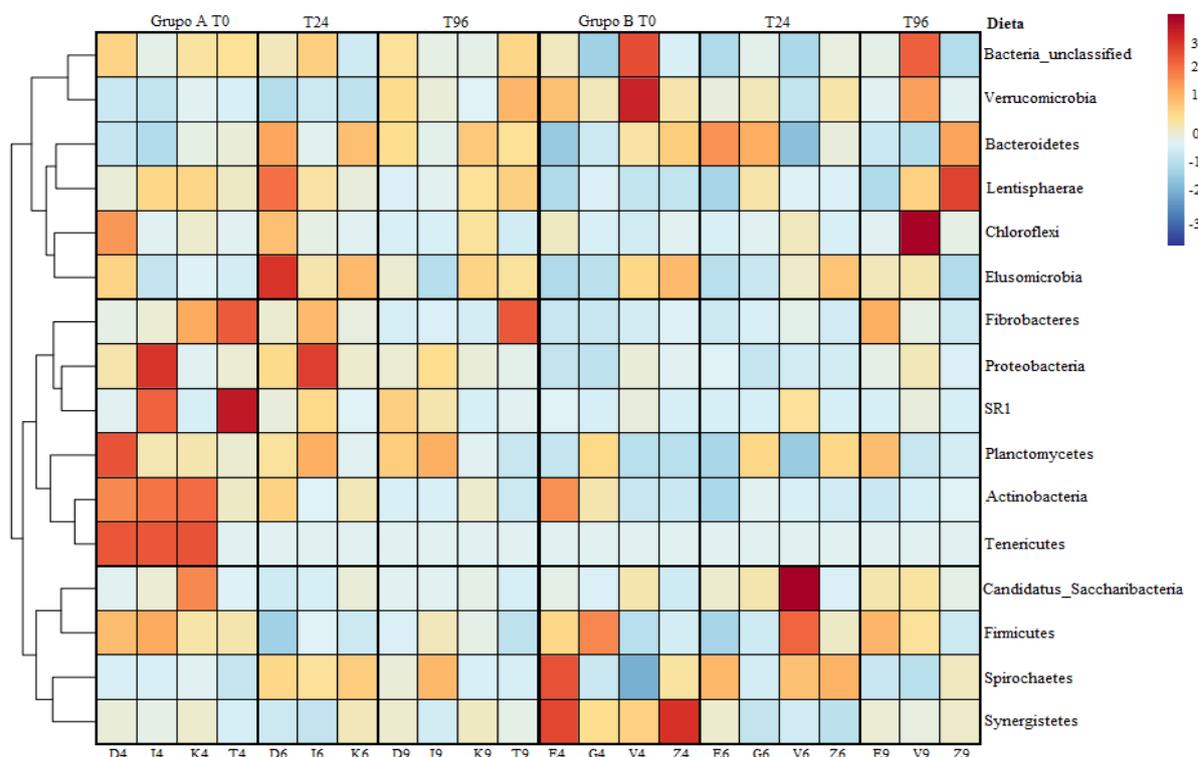


Figura 5. Heatmap ilustrando filios bacterianos caracterizados com sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA (região v4) de amostras fecais coletadas de equinos após a troca abrupta de dieta entre feno de Coastcross e dieta completa extrusada (Grupo A) e entre a dieta completa extrusada e o feno de Coastcross (Grupo B) nos tempos 0 e 24 e 96 horas após a mudança abrupta da dieta (T0, T24 e T96, respectivamente). Escala à direita indica abundância relativa normalizada.

3.6 Análise de Espécies Indicadoras (ISA)

Ao final do período de adaptação às dietas, observou-se diferença significativa em 169 OTUs entre os grupos A e B pertencentes à 28 táxons e representaram juntas 22,16% da comunidade do grupo A e 9,42% da comunidade do grupo B (Figura 6).

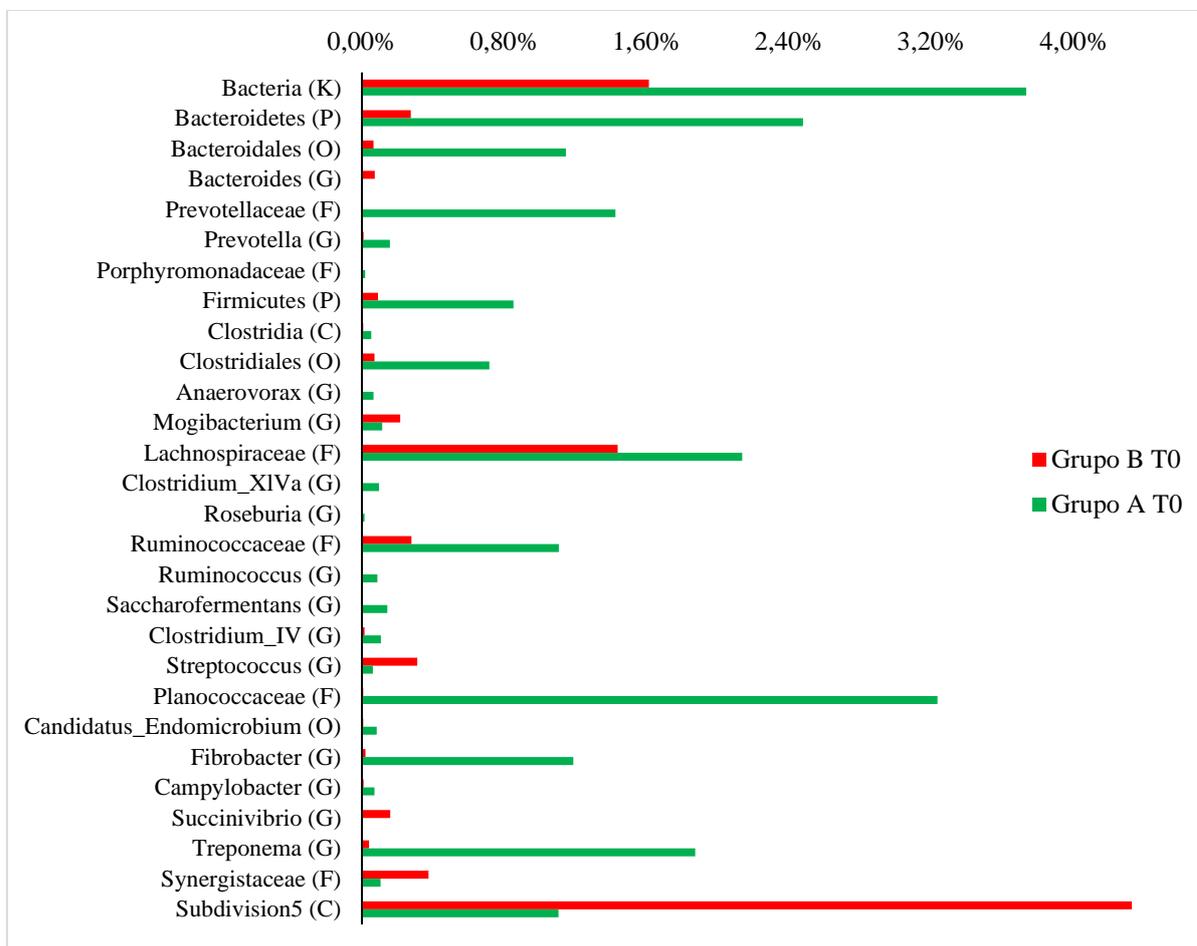


Figura 6. Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação entre as fezes de equinos após a adaptação (T0) às dietas feno de Coastcross (Grupo A) e dieta completa extrusada (Grupo B). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G - Gênero.

Diferenças significativas foram observadas na avaliação do grupo A em 19 OTUs entre 0 e 24 horas após a mudança pertencentes à 9 táxons, juntas representaram 11,36% da comunidade observada no tempo 0, enquanto na comunidade observada 24 horas após a troca representaram 17,90% da comunidade (Figura 7). Na comparação entre 24 e 96 horas, foi observada diferença significativa em 51 OTUs pertencentes à 17 táxons, juntas representaram 16,85% da comunidade observada 24 horas, enquanto em 96 horas após a troca de dieta representaram 13,62% da comunidade (Figura 8).

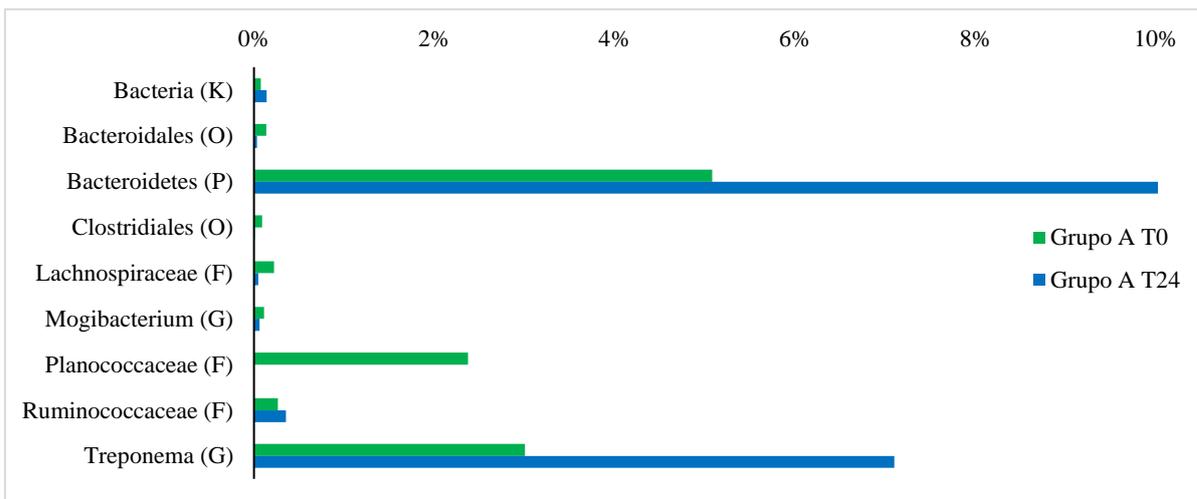


Figura 7. Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação das fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta entre feno de Coastcross para uma dieta completa extrusada nos tempos 0 e 24 horas após a mudança (T0 e T24, respectivamente). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G - Gênero.

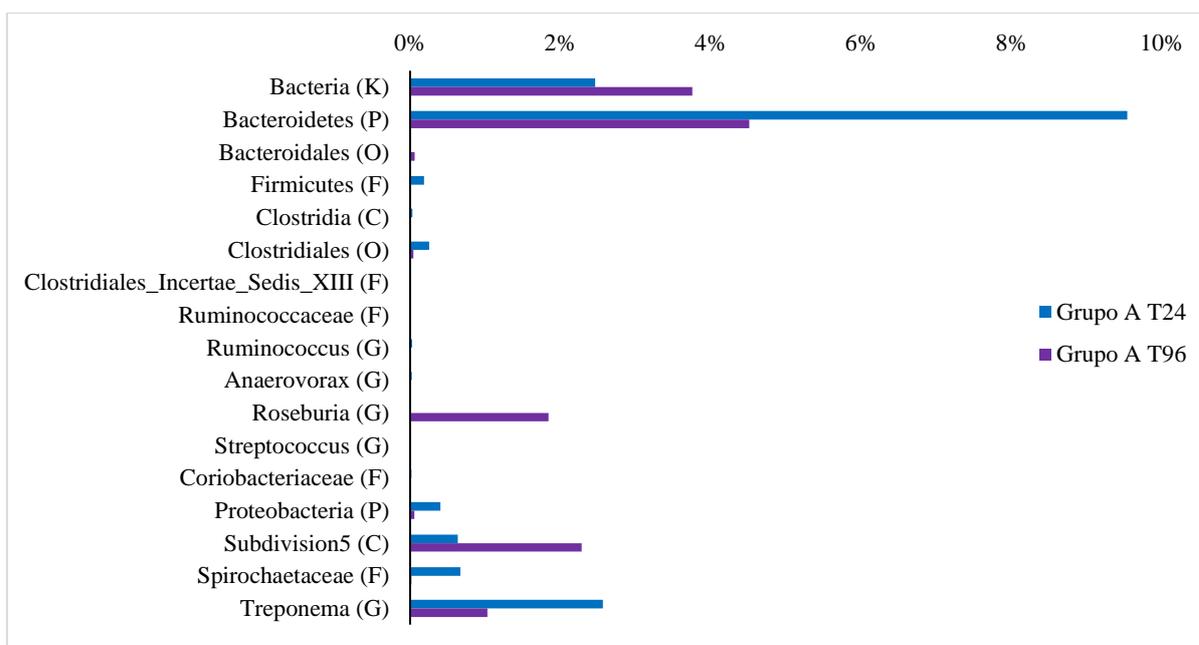


Figura 8. Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação das fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta entre feno de Coastcross para uma dieta completa extrusada nos tempos 24 e 96 horas após a mudança (T24 e T96, respectivamente). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G - Gênero.

Diferenças significativas foram observadas na avaliação do grupo B em 22 OTUs entre 0 e 24 horas após a troca de dieta pertencentes a 11 táxons, juntas representaram 1,45% da comunidade observada em 0 horas, enquanto 24 horas representaram 4,36% da comunidade (Figura 9). Na comparação entre 24 e 96 horas após a troca, foi observada diferença significativa em 39 OTUs pertencentes a 13 táxons, as quais representaram juntas 1,95% da comunidade observada 24 horas, enquanto 96 horas representaram 3,36% da comunidade (Figura 10).

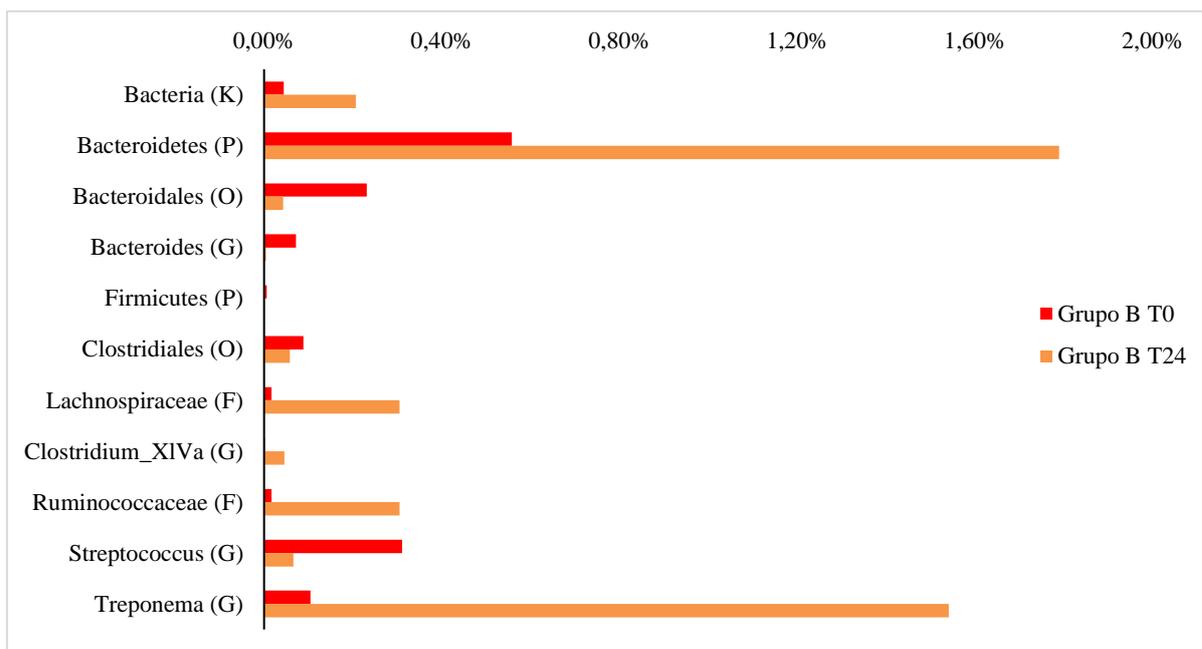


Figura 9. Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação das fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta entre uma dieta completa extrusada para feno de Coastcross nos tempos 0 e 24 horas após a mudança (T0 e T24, respectivamente). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G - Gênero.

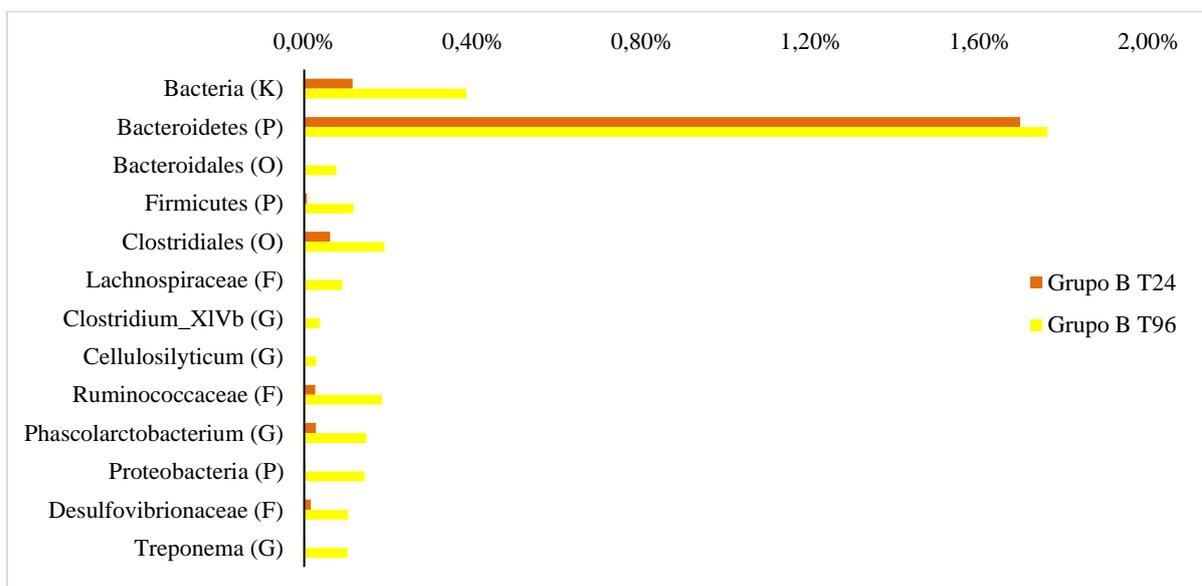


Figura 10. Abundância relativa das OTUs com diferença significativa ($p < 0,05$) e valor de indicador maior que 60 na comparação das fezes de equinos após uma mudança abrupta de dieta entre uma dieta completa extrusada para feno de Coastcross nos tempos 24 e 96 horas após a mudança (T24 e T96, respectivamente). A melhor classificação da OTU foi apresentada: K - Reino, P - Filo, C - Classe, O - Ordem, F - Família e G - Gênero.

3.7 Predição Metagenômica Funcional

Após a predição do perfil funcional das comunidades bacterianas observadas nas fezes de equinos, foram observadas sete vias da camada primária de KEGG. A maior abundância relativa observada foi das vias relacionadas ao Metabolismo de 45,80 a 49,63%, seguida pelas vias de processamento de informações genéticas com 19,97 a 20,56%, vias não classificadas com 13,48 a 13,84%, vias de processamento de informações ambientais 11,18 a 14,15%,

processos celulares com 3,33 a 4,97%, sistemas orgânicos 0,75 a 0,83% e, por fim, vias relacionadas a doenças humanas com 0,72 a 0,80% de abundância relativa.

Por meio da ANOSIM, foi observado diferença significativa entre os metagenomas preditos nas fezes dos equinos do grupo A após a mudança abrupta da dieta ($p=0,0279$), entretanto, não foi observada diferença significativa nos metagenomas preditos nas fezes dos equinos do grupo B após a mudança abrupta de dieta ($p=0,8951$). A ordenação multidimensional não-métrica (NMDS) dos metagenomas funcionais preditos podem ser observados na Figura 11.

Por meio da LEfSe foi observado diferença significativa ($p<0,05$) na abundância relativa de 42 vias dos metagenomas funcionais predito das fezes dos equinos do grupo A durante a mudança de dieta, enquanto nos metagenomas do grupo B foram observadas diferenças significativas na abundância relativa de apenas 5 vias (Figura 12).

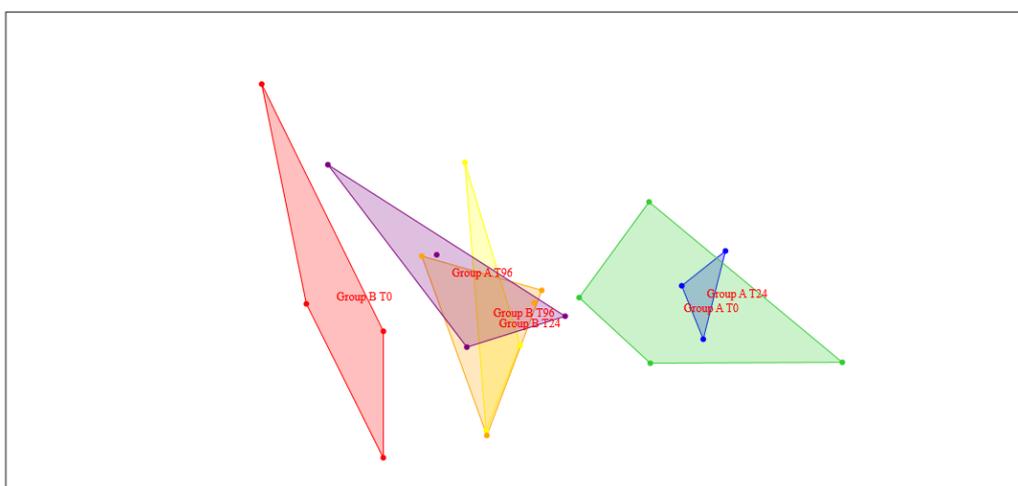


Figura 11. Ordenação multidimensional não-métrica (NMDS) usando o índice de similaridade de Bray-Curtis dos metagenomas funcionais preditos da comunidade bacteriana de fezes de equinos submetidos a uma mudança abrupta de dieta. Verde - amostras do Grupo A após a adaptação (T0) a dieta feno de Coastcross (CHD); Azul - amostras do Grupo A 24 horas após a mudança abrupta (T24) de CHD para a dieta completa extrusada (CED); Roxo - amostras do Grupo A 96 horas após a mudança abrupta (T96) de CHD para CED; Vermelho - amostras do Grupo B após a adaptação a CED (T0); Laranja - amostras do Grupo B 24 horas após a mudança abrupta de CED para CHD (T24); Amarelo - amostras do Grupo B 96 horas após a mudança abrupta de CED para CHD (T96).



Figura 12. Abundância relativa das funções previstas da comunidade bacteriana de fezes de equinos submetidos a uma mudança abrupta de dieta entre feno de Coastcross para dieta completa extrusada (A) e entre dieta completa extrusada para feno de Coastcross (B).

4 DISCUSSÃO

A dieta dos equinos é naturalmente composta por alto teor de fibra e baixo teor de nutrientes solúveis rapidamente fermentescíveis (JULLIAND e GRIMM, 2017). Desse modo, a espécie é dependente da relação simbiótica com a microbiota intestinal para o aproveitamento da energia oriunda dos polissacarídeos da parede celular vegetal (FLINT, 2004). Como a fermentação ocorre predominantemente nos segmentos do intestino grosso na espécie equina, a microbiota intestinal evoluiu utilizando como substrato os resíduos da digestão enzimática e da absorção no intestino delgado (JULLIAND e GRIMM, 2017; COSTA e WEESE, 2018). A estabilidade da microbiota intestinal saudável é desejável, entretanto, o conceito é subjetivo, uma vez que nem todas as alterações dietéticas são indícios de distúrbios gastrointestinais (DE FOMBELLE et al., 2001). A mudança da microbiota de equinos mantidos a pasto acompanha composição botânica da pastagem, bem como a composição química do alimento forrageiro consumido. Conseqüentemente, a alteração da microbiota está intimamente associada às mudanças gradativas das estações e condições climáticas locais (SALEM et al., 2018). Portanto, mesmo em condições favoráveis de manutenção da microbiota saudável por meio do consumo exclusivo de alimento volumoso, espera-se que ocorram adaptações naturais e progressivas em função da dieta consumida.

Para alcançar o objetivo proposto no presente estudo, os animais passaram por um período de adaptação as dietas de 34 dias, além disso, foram utilizados alimentos pertencentes ao mesmo lote para garantir a uniformidade da composição da dieta durante todo o período experimental. Desse modo, as alterações observadas foram creditadas exclusivamente à mudança abrupta da dieta, uma vez que foi demonstrado que existe estabilidade temporal da microbiota fecal em equinos mantidos sob a mesma dieta por um período de 72 horas (BLACKMORE et al., 2013).

A mudança abrupta de dietas aumenta os riscos de cólica por obstrução ou distensão. Estudos indicam risco máximo durante os primeiros sete dias após a inclusão de carboidratos solúveis com redução dos riscos após 14 dias (HILLYER et al., 2002). Portanto, os animais foram acompanhados durante todo esse período após a mudança de dieta e não apresentaram desconforto abdominal.

Após a adaptação dos equinos às dietas experimentais, os grupos A e B apresentavam comunidades bacterianas fecais distintas como demonstrado na ordenação da distribuição das OTUs e pelos índices de diversidade. Porém, foi observado que os filos com diferenças significativas possuíam baixa abundância: Verrucomicrobia (1,87% no grupo A e 5,47% no grupo B), Fibrobacteres (2,07% no Grupo A e 0,18% no grupo B), Synergistetes (0,12% no grupo A e 0,42% no grupo B), Lentisphaerae (0,90% no grupo A e 0,30% no grupo B) e Tenericutes (0,90 no grupo A e não foi observado no grupo B). O tipo de dieta oferecida aos equinos tem efeito sobre a microbiota colônica, isto porque, animais mantidos em pastagens de *Lolium perene* apresentaram maior abundância de membros de *Fibrobacter* e Ruminococcaceae, conhecidas como bactérias fibrolíticas (HASTIE et al., 2008), enquanto os animais alimentados com dieta concentrada, apresentaram maior abundância de Bacteroidetes, Lachnospiraceae e do grupo produtor de ácido láctico *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (DALY et al., 2012). Tanto as famílias Ruminococcaceae e Lachnospiraceae quanto os gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* são pertencentes ao filo Firmicutes, entretanto, não foi observado diferença significativa entre as dietas oferecidas no presente estudo. Após a ISA foi identificada diferença significativa em 169 OTUs, das quais 149 eram mais abundantes no Grupo A em comparação ao Grupo B. Entre os táxons influenciados pelo feno de Coastercross estavam OTUs classificadas como pertencentes às famílias Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Planococcaceae, Porphyromonadaceae e Prevotellaceae, bem como aos gêneros *Fibrobacter*, *Treponema*, *Clostridium* cluster IV, *Ruminococcus*, *Campylobacter*,

Clostridium cluster XIVa, *Saccharofermentans*, *Prevotella*, *Anaerovorax* e *Roseburia*. Enquanto OTUs classificadas como pertencentes a classe Subdivision5 do filo Verrucomicrobia, a família Synergistaceae e aos gêneros *Streptococcus*, *Mogibacterium* e *Succinivibrio* foram associadas à dieta completa extrusada. O aumento da concentração do gênero *Streptococcus* é conhecido de estudos que investigaram o efeito de dietas concentradas sobre a microbiota intestinal de equinos (DE FOMBELLE et al., 2001; JULLIAND et al., 2001). O gênero *Succinivibrio* foi observado em maior abundância em equinos suplementados com amido em comparação com equinos alimentados apenas com feno misto de capim Timóteo e outras gramíneas (DOUGAL et al., 2014), e por fim, o gênero *Mogibacterium* foi associado a microbiomas fecais de equinos obesos (BIDDLE et al., 2018). Dessa forma, é possível que grupos de níveis taxonômicos mais baixos também sejam responsáveis pelo distanciamento entre as comunidades observadas dos grupos A e B, mas não foram identificados a nível de filo, uma vez que os filos dominantes permaneceram conservados.

A diferença da abundância dos grupos bacterianos supracitados pode ser reflexo do aumento da competitividade dos membros adaptáveis a mudança do substrato em comparação com aqueles que são fibrolíticos obrigatórios, como o filo Fibrobacteres (DALY et al., 2012). Por exemplo, membros de gênero *Fibrobacter* degradam especificamente carboidratos tais como: glicose, celobiose e celulose (SPAIN et al., 2005). Os membros do filo Lentisphaerae são essencialmente sacarolíticos e capazes de utilizarem apenas mono- e dissacarídeos, polióis ou ácidos de açúcar (HEDLUND et al., 2015). Enquanto as bactérias do filo Synergistetes degradam aminoácidos (WHITMAN et al., 2015) e membros do filo Verrucomicrobia podem ser metanotróficos (DUNFIELD et al., 2007).

Demonstrou-se que equinos alimentados com dieta exclusiva de feno de capim Timóteo, com consumo de 0,15g de amido / kg de peso vivo / refeição, possuíam maior diversidade de espécies na comunidade bacteriana cecal, sugerindo maior resiliência dos ecossistemas microbianos presentes no intestino grosso. Enquanto, aqueles alimentados com dietas concentradas com consumo de 1,68 g de amido/ kg de peso vivo / refeição, apresentaram redução da diversidade de espécies e, portanto, estariam mais susceptíveis aos efeitos deletérios que as mudanças abruptas de dieta e do manejo alimentar podem causar (HANSEN et al., 2015). De fato, o pH fecal do Grupo A reduziu após 96 horas da mudança de dieta, enquanto do Grupo B, a redução foi observada 24 horas após a mudança. Entretanto, apesar de causar menor diversidade do microbioma intestinal, a inclusão de amido na dieta diminuiu a porcentagem de membros comuns do microbioma fecal entre indivíduos. Desse modo, observou-se que 15,90% das sequências foram comuns entre equinos alimentados com feno e, quando houve suplementação com concentrado, os membros comuns reduziram para 5,42% (DOUGAL et al., 2014). De forma semelhante, as comunidades bacterianas dos equinos alimentados com a dieta completa extrusada ocuparam maior área na ordenação da distribuição de OTUs quando comparado aos equinos alimentados com feno, o que indica menor similaridade da comunidade entre os indivíduos.

O consumo de alimentos/dietas concentradas pode causar rápidas mudanças no fluxo dos líquidos compartimentais, alterações nos padrões de motilidade gastrointestinal, ajustes homeostáticos por mecanismos neuroendócrinos (CLARKE et al., 1990). Desse modo, é evidente que ocorram mudanças na microbiota intestinal, o que foi demonstrado em alguns estudos, principalmente, após a introdução abrupta de amido e/ou carboidratos prontamente fermentescíveis na dieta de equinos (GOODSON et al., 1988; DE FOMBELLE et al., 2001; JULLIAND et al., 2006; DOUGAL et al., 2012). Após 24 horas da mudança abrupta de feno de Coastcross para a dieta completa extrusada, observou-se redução do número de OTUs e do índice de Shannon com tendência de aumento do índice de Simpson.

Além disso, a mudança abrupta influenciou diferentemente a abundância relativa de seis filos bacterianos: Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Elusimicrobia,

Actinobacteria. Observou-se aumento na abundância dos filos Bacteroidetes e Elusimicrobia 24 horas após a troca de dieta, enquanto a abundância dos filos Firmicutes e Actinobacteria diminuiu. O filo Bacteroidetes não se alterou 96 horas após a troca e a abundância do filo Elusimicrobia reduziu no mesmo tempo, o que sugere efeito transitório da mudança sobre o filo Elusimicrobia que não foi observado no filo Bacteroidetes. Além disso, houve aumento da abundância do filo Verrucomicrobia enquanto o filo Proteobacteria reduziu 96 horas após a troca.

Os táxons identificados na ISA acompanharam alguns resultados observados a nível de filo. As principais mudanças na comunidade bacteriana fecal na comparação entre 0 e 24 horas após a troca foram: o aumento na abundância relativa de OTUs classificadas como Bacteroidetes que passaram de 5,08 para 10,14%; OTUs classificadas como *Treponema* (Spirochaetes) que passaram de 3,01 para 7,10% e, os quais foram responsáveis pelo aumento do índice de Simpson, e por fim, a redução da abundância de OTUs classificadas como Planococcaceae de 2,37% para 0,01%. Entretanto, as mudanças observadas não alteraram de forma significativa a estrutura da comunidade bacteriana fecal. Na comparação entre 24 e 96 horas após a troca, a abundância relativa de OTUs classificadas como Bacteroidetes e *Treponema* diminuiu para valores de 4,51 e 1,03%, respectivamente. Além disso, foi observada redução da abundância relativa de OTUs classificadas como pertencentes aos filos Proteobacteria e Firmicutes, enquanto OTUs não classificadas a nível de filo e outras classificadas como pertencentes a classe Subdivision5 (Verrucomicrobia) e ao gênero *Roseburia* aumentaram. As mudanças observadas entre 24 e 96 horas após a troca foram suficientes para distanciar as duas comunidades bacterianas fecais. As diferenças da abundância relativa das OTUs supracitadas observadas entre as comparações 0 e 24 horas e 24 e 96 horas, sugerem que o microbioma intestinal ainda está em adaptação metabólica ao novo substrato. Isto porque, o gênero *Roseburia* produz H₂, CO₂ e butirato a partir da fermentação de glicose e acetato, mas também é capaz de utilizar carboidratos como D-glicose, celobiose, D-maltose, D-rafinose, sacarose e D-xilose como fontes de carbono e energia, incluindo o amido (STANTON et al., 2015). Como descrito anteriormente, o filo Verrucomicrobia contém membros metanotróficos, além disso, se beneficia em ambientes de pH abaixo da neutralidade, ambas as condições podem ser encontradas em um ambiente com alta disponibilidade de nutrientes (ELGHANDOUR et al., 2016).

Apesar de abundância relativa do filo Fibrobacteres ter sido diferente nas fezes provenientes dos grupos A e B após a adaptação às dietas, não foi observada diferença dentro dos grupos A e B entre os tempos avaliados após a mudança de dietas. A inclusão abrupta de carboidratos rapidamente fermentescíveis na dieta de equinos ocasiona rápida queda de pH da digesta do intestino grosso (DE FOMBELLE et al., 2001; JULLIAND et al., 2001) e as bactérias Fibrobacteres são conhecidas como ácido intolerantes (DOUGAL et al., 2012). Desta forma, esperava-se observar diferenças após as mudanças abruptas entre as dietas, uma vez que o teor de carboidratos não fibrosos mudou de 0 para 362 g / kg de MS. É provável que a maior abundância de Fibrobacteres no Grupo A durante o período de adaptação esteja relacionada diretamente ao conteúdo de polissacarídeos estruturais presentes na dieta exclusiva de feno de Coastcross e, que seja necessário tempo para o estabelecimento da população no intestino grosso, pois não foi observado aumento da abundância desse filo nas fezes provenientes do Grupo B. A abundância relativa de Fibrobacteres foi observada entre 1 a 7% em equinos alimentados com diferentes dietas (JULLIAND e GRIMM, 2016). Em animais a pasto, o filo muda de forma bifásica ao longo das estações do ano (SALEM et al., 2018). Desse modo, é importante entender a relação da abundância do filo com o teor de FDN dietético, assim como com o teor de CNF, especialmente, o amido. Além disso, ressalta-se que existem outros microrganismos responsáveis pela degradação da fibra dietética no intestino grosso dos equinos, como bactérias do gênero *Ruminococcus* e fungos (JULLIAND et al., 1999; HASTIE

et al., 2008; MURA et al., 2019), os quais também devem ser considerados para implementação de uma nova dieta.

Após a mudança abrupta da dieta completa extrusada para o feno de Coastcross (Grupo B), não foi observada diferença nos índices de diversidade entre 0 e 24 horas após a troca, o que confirma que uma comunidade menos diversa não responde rapidamente a mudança abrupta de dietas (HANSEN et al., 2015). Após 96 horas, observou-se aumento da diversidade de espécies identificado pelo aumento dos índices de diversidade avaliados. Entretanto, apesar do aumento da diversidade, é possível observar o aumento da dispersão dos índices avaliados, o que sugere que existe efeito individual na recuperação da diversidade de espécies bacterianas em uma situação de mudança abrupta de dieta entre uma dieta completa e um alimento volumoso. O efeito individual de recuperação ao status saudável da comunidade bacteriana diante de um desafio ambiental foi demonstrado em uma fermentação *in vitro* utilizando amido e lactato como substratos incubados com fezes de três equinos (BIDDLE et al., 2013).

Além disso, foi observada diferença em apenas dois filões de baixa abundância, Synergistetes e Lentisphaerae. Através da ISA, foi observado na comparação entre 0 e 24 horas após a troca, aumento da abundância relativa de OTUs classificadas como pertencentes às famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae que pode ser reflexo do aumento do conteúdo de fibra da dieta, uma vez que o consumo diário de FDN aumentou de 4,46 para 8,23 Kg. Entretanto, as diferenças não foram suficientes para mudar a estrutura da comunidade bacteriana fecal do Grupo B após a mudança abrupta de dieta, como observado na análise multivariada da distribuição das OTUs.

Assim como foi observado na mudança de dieta do Grupo A, os filões dominantes na comunidade têm sua abundância relativa conservada. Além disso, foi observado aumento da abundância relativa de OTUs classificadas como Bacteroidetes e *Treponema*. O filo Bacteroidetes e o gênero *Treponema* (filo Spirochaetes) ocorrem naturalmente no microbioma intestinal equino (JULLIAND e GRIMM, 2016) e possuem relações metabólicas com os equinos, além de ter papel importante na saúde. A maior abundância do filo Bacteroidetes foi associada a animais com colite (COSTA et al., 2012). Enquanto o gênero *Treponema* interage de forma dinâmica com os membros de *Fibrobacter succinogenes*, *Lachnospiraceae*, *Streptococcus*, *Anaerostipes* e *Anaerovibrio* no metabolismo do ceco de equinos alimentados com dietas a base de feno e suplementados com cevada (KRISTOFFERSEN et al., 2016).

A utilização das fezes como indicador da composição e atividade da microbiota intestinal tem a vantagem de garantir repetibilidade de amostragem em um mesmo indivíduo sem a necessidade de manter o animal fistulado (JULLIAND e GRIMM, 2016). O efeito da inclusão abrupta de cevada na dieta de equinos alimentados apenas com volumoso pode ser observado na microbiota intestinal cinco horas após o consumo (DE FOMBELLE et al., 2001). Entretanto, quando técnicas dependentes de cultura foram utilizadas para estimar as concentrações de bactérias fibrolíticas nas fezes, não foi observada diferença entre equinos alimentados com dieta volumosa comparada com uma dieta concentrada (DE FOMBELLE et al., 2003; MURRAY et al., 2014). Assim, o sequenciamento de nova geração auxiliou na constatação das mudanças na microbiota fecal. Após 96 horas da mudança de dieta, a comunidade bacteriana fecal do Grupo A não foi similar a comunidade do grupo B após 34 dias de adaptação à dieta completa extrusada, assim como a comunidade bacteriana fecal do Grupo B não foi similar a comunidade do Grupo A após 34 dias de adaptação ao consumo de feno de Coastcross. Desse modo, não foi possível determinar o momento no qual a microbiota fecal dos dois grupos se adaptou ao consumo da nova dieta devido ao limite do intervalo escolhido para amostragem de 96 horas após a mudança. Optou-se por avaliar a comunidade bacteriana fecal 24 e 96 horas após a mudança abrupta da dieta, pois estudos anteriores relataram que a composição da microbiota fecal muda em resposta a novas dietas em 4 a 6 dias (VAN DER BERG et al., 2013; FERNANDES et al., 2014). Na mudança de pastagem para uma dieta

concentrada, as concentrações das populações fecais de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. aumentaram após 6 dias (VAN DER BERG et al., 2013). Utilizando uma abordagem de sequenciamento de nova geração, foi observado que a comunidade bacteriana fecal de animais alimentados com uma dieta concentrada a base de silagem e grãos de cereais demorou quatro dias para se igualar as comunidades dos animais mantidos em pastagem compostas por 80-95% azevém perene (*Lolium perenne*) e 5-20% de trevo branco (*Trifolium repens*) após mudança abrupta de uma dieta.

Os efeitos dietéticos que incluem o efeito dos alimentos, composição bromatológica da dieta, o manejo alimentar adotado, bem como o processamento o qual os alimentos foram submetidos, são fatores que devem ser considerados na modulação do microbioma intestinal equino. Isso porque, a origem botânica dos alimentos assim como o tipo de processamento dos quais os alimentos foram submetidos têm influência direta na digestibilidade dos seus componentes (JULLIAND et al., 2006), conseqüentemente, ao substrato que os microrganismos terão acesso (PHILIPPEAU et al., 2015). Na fermentação *in vitro* de milho, aveia e trigo, os microrganismos fecais de equinos utilizados como inóculos, foram modulados de forma diferente de acordo com a inclusão de *Lactobacillus* probióticos (HARLOW et al., 2017). A suplementação com um alimento volumoso para equinos mantidos a pasto nos períodos de baixa oferta de forragem nas pastagens alterou a estrutura da comunidade bacteriana fecal dos animais (SALEM et al., 2018). Apesar da dieta completa extrusada ser composta por diferentes alimentados a fim de atender as exigências nutricionais da categoria animal para que se destina, os ingredientes passam pelo processo de moagem e, em seguida, são submetidos a altas temperaturas, umidade e pressão formando um único produto (HILL, 2007; NRC, 2007). Desse modo, como foram avaliadas duas dietas exclusivas, é possível que a adição de outros alimentos possa causar efeitos associativos.

Períodos de jejum prolongados afetam o pH intestinal dos equinos, conseqüentemente, afetam a atividade metabólica da microbiota em todo o trato gastrointestinal (CLARKE et al., 1990). Além disso, foi observado que equinos alimentados com feno apresentaram maior estabilidade nas mudanças pós-prandiais da microbiota cecal (KRISTOFFERSEN et al., 2016). No presente estudo, as dietas foram fornecidas em esquemas de alimentação diferente, enquanto o feno de Coastcross foi disponibilizado *ad libitum*, a dieta completa extrusada foi fornecida fracionada em três refeições ao dia. Dessa forma, o manejo alimentar deve ser considerado durante as mudanças de dieta. Por exemplo, dietas a base de feno e suplementadas com amido ou óleo não afetaram a estrutura da comunidade bacteriana fecal de equinos quando foram oferecidas em um mesmo esquema de alimentação (DOUGAL et al., 2014).

As tecnologias de sequenciamento de nova geração melhoraram a compreensão da composição microbiana de amostras biológicas complexas, como de microbiomas intestinais, por acessar os genes de microrganismos ainda não cultivados ou de difícil cultivo (COSTA e WEESE, 2018; KAUTER et al., 2019). Apesar do grande número de informações geradas pelo sequenciamento, muitos microrganismos ainda são poucos conhecidos, assim como seu papel na saúde e na doença dos equinos. Bactérias não classificadas a nível de filo foram mais abundantes em equinos alimentados com feno de Coastcross (Grupo A) quando comparados aos equinos alimentados com a dieta completa extrusada (Grupo B). Além disso, foi observado por meio da ISA que algumas OTUs não classificadas foram responsivas às mudanças abruptas de dietas em todas as comparações realizadas. Isso sugere que existem condições ainda pouco exploradas, como é o caso do microbioma de equinos mantidos a pasto composto por gramíneas tropicais C4. Dessa forma, é importante ressaltar que o desenvolvimento de meios de cultura capazes recuperar novos microrganismos, bem como o isolamento e caracterização, ainda é procedimento essencial para o entender o seu papel ecológico no microbioma.

Os dados resultantes de abundância de genes podem oferecer informações funcionais importantes sem a necessidade de realização de avaliações metagenômicas por *shotgun*

(CHONG et al., 2020). Como microbioma intestinal possui um grande potencial metabólico, foi realizada a predição funcional com o PICRUST para auxiliar a visualização do efeito da dieta inicial e do tempo após a mudança durante um evento de mudança abrupta de dieta. Equinos alimentados com dieta volumosa possuem comunidade bacteriana mais diversa, sugerindo maior resiliência nos ecossistemas microbianos do intestino grosso (HANSEN et al., 2015). De fato, essa resposta a diferentes substratos foi observada na análise do metagenoma funcional dos equinos do grupo A enquanto não foi observada no grupo B. Pela NMDS foi possível visualizar a sobreposição do metagenoma funcional do grupo A no tempo 0 e 24 horas após a troca e a sobreposição entre os metagenomas funcionais do grupo A após 96 horas com os do grupo B após 24 e 96 horas. Ressalta-se que a adaptação funcional pode demorar mais tempo do que foi avaliado no presente estudo (SALEM et al., 2018), assim, estudos metagenômicos poderiam auxiliar na estratégia de mudança de dietas de forma segura.

5 CONCLUSÃO

A composição da dieta influencia na resposta do microbioma fecal equino às mudanças abruptas de dieta. A disbiose do intestino grosso equino ocorre de forma rápida e é detectável nas fezes 24 horas após a mudança da dieta exclusiva de feno de Coastcross para dieta completa extrusada. Entretanto, é necessário tempo superior a 96 horas para a recuperar a riqueza de espécies do microbioma fecal quando ocorre mudança da dieta completa extrusada para uma dieta exclusiva com feno de Coastcross, o que destaca a importância da desadaptação ao consumo do alimento concentrado para garantir a saúde e bem-estar dos equinos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPRILL, A.; MCNALLY, S.; PARSONS, R.; WEBER, L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 75, n. 2, p. 129-137, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995, 1025p.
- BIDDLE, A. S.; BLACK, S. J.; BLANCHARD, J. L. An in vitro model of the horse gut microbiome enables identification of lactate-utilizing bacteria that differentially respond to starch induction. **PlosOne**, v. 8, n. 10, p. e77599, 2013.
- BIDDLE, A. S.; TOMB, J. F.; FAN, Z. Microbiome and blood analyte differences point to community and metabolic signatures in lean and obese horses. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 225, 2018.
- BLACKMORE, T. M.; DUGDALE, A.; ARGO, C. McG.; CURTIS, G.; PINLOCHE, E.; HARRIS, P. A.; WORGAN, H. J.; GIRDWOOD, S. E.; DOUGAL, K.; NEWBOLD, C. J.; MCEWAN, N. R. Strong stability and host specific bacterial community in faeces of ponies. **PlosOne**, v. 8, n. 9, p. e75079, 2013.
- CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, p. 265-270, 1984.
- CHONG, J.; LIU, P.; ZHOU, G.; XIA, J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. **Nature Protocols**, v. 15, n. 3, p. 799-821, 2020.

- CLARKE, L. L.; ROBERTS, M. C.; ARGENZIO, R. A. Feeding and digestive problems in horses: physiologic responses to a concentrated meal. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 6, n. 2, p. 433-450, 1990.
- COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl_1, p. D141-D145, 2009. doi.org/10.1093/nar/gkn879
- COSTA, M. C.; ARROYO, L. G.; ALLEN-VERCOE, E.; STÄMPFLI, H. R.; KIM, P. T.; STURGEON, A.; WEESE, J. S. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. **PlosOne**, v. 7, n. 7, p. e41484, 2012.
- COSTA, M. C.; WEESE, J. S. Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 34, n. 1, p. 1-12, 2018.
- CURTIS, L.; BURFORD, J.H. ; ENGLAND, G.C.W ; FREEMAN, S.L. Risk factors for acute abdominal pain (colic) in the adult horse: A scoping review of risk factors, and a systematic review of the effect of management-related changes. **PlosOne**, v. 14, n.7: e0219307.11, 2019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219307
- DALY, K.; PROUDMAN, C. J.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J.; DYER, J.; SHIRAZI-BEECHEY, S. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 7, p. 989-995, 2012.
- DALY, K.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 38, n. 2-3, p. 141-151, 2001.
- DE FOMBELLE, A.; JULLIAND, V.; DROGOUL, C.; JACOTOT, E. Feeding and microbial disorders in horses: 1-Effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 9, p. 439-445, 2001.
- DE FOMBELLE, A.; VARLOUD, M.; GOACHET, A. G.; JACOTOT, E.; PHILIPPEAU, C.; DROGOUL, C.; JULLIAND, V. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. **Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 293-304, 2003.
- DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; RUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSON, G. L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.
- DHARIWAL, A.; CHONG, J.; HABIB, S.; KING, I. L.; AGELLON, L. B.; XIA, J. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W180-W188, 2017.
- DOUGAL, K.; DE LA FUENTE, G.; HARRIS, P.; GIRFWOOD, S. E.; PINLOCHE, E.; GEOR, R. J.; NIELSEN, B. D.; SCHOTT II, H. C.; ELZINGA, S.; NEWBOLD, J. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. **PlosOne**, v. 9, n. 2, p. e87424, 2014.

- DUFRENE, M.; LEGENDRE, P. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. **Ecological Monographs**, v. 67, n. 3, p. 345-366, 1997.
- DUNFIELD, P.F.; YURYEV, A.; SENIN, P.; SMIRNOVA, A.V.; STOTT, M.B.; HOU, S.; LY, B.; SAW, J.H.; ZHOU, Z.; REN, Y.; WANG, J.; MOUNTAIN, B.W.; CROWE, M.A.; WEATHERBY, T.M.; BODELIER, P.L.; LIESACK, W.; FENG, L.; WANG, L.; ALAM, M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 879-882, 2007.
- ELGHANDOUR, M. M. Y.; MELLADO, M.; KHOLIF, A. E.; SALEM, A. Z. M.; BARBABOSA, A.; BALLINAS, S.; ESQUIVEL, A.; ODONGO, N. E. Fecal gas production of ten common horse feeds supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 47, p. 1-8, 2016.
- FERNANDES, K. A.; KITTELMANN, S.; ROGERS, C. W.; GEE, E. K.; BOLWELL, C. F.; BERMINGHAM, E. N.; THOMAS, D. G. Faecal microbiota of forage-fed horses in New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. **PlosOne**, v. 9, n. 11, p. e112846, 2014.
- FERREIRA, L. M. M.; GARCIA, U.; RODRIGUES, M. A. M.; CELAYA, R.; DIAS-DASILVA, A.; OSORO, K. Estimation of feed intake and apparent digestibility of equines and cattle grazing on heathland vegetation communities using the n-alkane markers. **Livestock Science**, v. 110, n. 1-2, p. 46-56, 2007.
- FLINT, H. J. Polysaccharide breakdown by anaerobic microorganisms inhabiting the mammalian gut. **Advances in Applied Microbiology**, v. 56, p. 89-120, 2004.
- GARBER, A., HASTIE, P., MCGUINNESS, D., MALARANGE, P., & MURRAY, J. A. Abrupt dietary changes between grass and hay alter faecal microbiota of ponies. **PlosOne**, v. 15, n. 8, p. E0237869, 2020.
- GONÇALVES, S.; JULLIAND, V.; LEBLOND, A. Risk factors associated with colic in horses. **Veterinary Research**, v. 33, n. 6, p. 641-652, 2002.
- GOODSON, J.; TYZNIK, W. J.; CLINE, J. H.; DEHORITY, B. A. Effects of an abrupt diet change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1946-1950, 1988.
- GRIMM, P.; JULLIAND, V.; PHILIPPEAU, C.; SADET-BOURGETEAU, S. Effect of yeast supplementation on hindgut microbiota and digestibility of horses subjected to an abrupt change of hays. **Livestock Science**, v. 186, p. 34-40, 2016.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.
- HANSEN, N. C. K.; AVERSHINA, E.; MYDLAND1, L. T.; NÆSSET, J. A.; AUSTBØ, D.; MOEN, B.; MAGE, I.; RUDI, K. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, n. 1, p. 27216, 2015.
- HARLOW, B. E.; LAWRENCE, L. M.; HARRIS, P. A.; AIKEN, G. E.; FLYTHE, M. D. Exogenous lactobacilli mitigate microbial changes associated with grain fermentation (corn, oats, and wheat) by equine fecal microflora ex vivo. **PlosOne**, v. 12, n. 3, p. e0174059, 2017.
- HASTIE, P. M.; MITCHELL, K.; MURRAY, J. A. MD. Semi-quantitative analysis of *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* and *Streptococcus bovis* in the equine

large intestine using real-time polymerase chain reaction. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2008.

HEDLUND, B. P.; CHO, J. C.; DERRIEN, M.; COSTA, K. C. Lentisphaerae. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-2, 2015.

HILL, J. Impacts of nutritional technology on feeds offered to horses: A review of effects of processing on voluntary intake, digesta characteristics and feed utilization. **Animal Feed Science and Technology**, v. 138, n. 2, p. 92-117, 2007.

HILLYER, M. H.; TAYLOR, F. G. R.; PROUDMAN, C. J.; EDWARDS, G. B.; SMITH, J. E.; FRENCH, N. P. Case control study to identify risk factors for simple colonic obstruction and distension colic in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 5, p. 455-463, 2002.

JULLIAND, V.; DE FOMBELLE, A.; DROGOUL, C.; JACOTOT, E. Feeding and microbial disorders in horses: Part 3—Effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 11, p. 543-546, 2001.

JULLIAND, V.; DE FOMBELLE, A.; VARLOUD, M. Starch digestion in horses: the impact of feed processing. **Livestock Science**, v. 100, n. 1, p. 44-52, 2006.

JULLIAND, V.; DE VAUX, A.; MILLET, L.; FONTY, G. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3738-3741, 1999.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. Horse Species Symposium: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 6, p. 2262-2274, 2016.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. The impact of diet on the hindgut microbiome. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 23-28, 2017.

KAUTER, A.; EPPING, L.; SEMMLER, T.; ANTAO, E. M.; KANNAPIN, D.; STOECKLE, S. D.; GEHLEN, H.; LÜBKE-BECKER, A.; GÜNTHER, S.; WIELER, L. H.; WALTHER, B. The gut microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives. **Animal Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 14, 2019.

KRISTOFFERSEN, C.; JENSEN, R. B.; AVERSHINA, E.; AUSTBØ, D.; TAUSON, A. H.; RUDI, K. Diet-dependent modular dynamic interactions of the equine cecal microbiota. **Microbes and Environments**, p. ME16061, 2016.

LANGILLE, M. G. I.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J. A.; CLEMENTE, J. C.; BURKEPILE, D. E.; THURBER, R. L. V.; KNIGHT, R.; BEIKO, R. G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814-821, 2013.

MURA, E.; EDWARDS, J.; KITTELMANN, S.; KAERGER, K.; VOIGT, K.; MRAZEK, J. MONIELLO, G.; FLIEGEROVA, K. Anaerobic fungal communities differ along the horse digestive tract. **Fungal Biology**, v. 123, n. 3, p. 240-246, 2019.

MURRAY, J. A. M.; LONGLAND, A.; MOORE-COLYER, M.; DUNNETT, C. The effect of feeding a low- or high-starch diet on equine faecal parameters. **Livestock Science**, v. 159, p. 67-70, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - **Nutrient Requirements of Horses**. Washington: National Academy Press, 2007, 6Ed, 341p.

- PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J. A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403-1414, 2016.
- PHILIPPEAU, C.; SADET-BOURGETEAU, S.; VARLOUD, M.; JULLIAND, V. Impact of barley form on equine total tract fibre digestibility and colonic microbiota. **Animal**, v. 9, n. 12, p. 1943-1948, 2015.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012. doi.org/10.1093/nar/gks1219
- SALEM, S. E.; MADDOX, T. W.; BERG, A.; ANTCZAK, P.; KETLEY, J. M.; WILLIAMS, N. J.; ARCHER, D. C. Variation in faecal microbiota in a group of horses managed at pasture over a 12-month period. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied Environmental Microbiology**, 75, 7537–7541 (2009). doi:10.1128/AEM.01541-09
- SEGATA, N.; IZARD, J.; WALDRON, L.; GEVERS, D.; MIROPOLSKY, L.; GARRETT, W. S.; HUTTENHOWER, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, p. 1-18, 2011.
- SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, n. 3, p. 379-423, 1948.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária, 3.ed., 2006, 235p.
- SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688, 1949. doi.org/10.1038/163688a0
- SPAIN, A. M.; FORSBERG, C. W.; KRUMHOLZ, L. R. Fibrobacter. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-10, 2015.
- STANTON, T. B.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Roseburia. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-7, 2015.
- VAN DEN BERG M.; HOSKIN, S. O.; ROGERS, CHRIS W.; GRINBERG, A. Fecal pH and microbial populations in thoroughbred horses during transition from pasture to concentrate feeding. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p. 215-222, 2013.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. p. 49-60. In: Standardization of Analytical Methodology for Feeds: **Proceedings... IDRC**, Ottawa, ON, CA, 1980.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- WHITMAN, William Barnaby et al. (Ed.). **Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria**. Hoboken, NJ: Wiley, 2015.

CAPÍTULO IV

DESMAME DE POTROS SUPLEMENTADOS COM PREBIÓTICO, PROBIÓTICO E SIMBIÓTICOS: EFEITOS NO MICROBIOMA FECAL

RESUMO

O desmame pode ser considerado o evento mais estressante da vida dos equinos. Objetivou-se avaliar mudanças do microbioma fecal de potros suplementados com prebiótico, probiótico e simbiótico no período de desmame. Oito potros lactentes com 159 dias de idade foram utilizados. Os potros e suas mães foram divididos em dois grupos mantidos separados e alimentados em sistema *creep-feeding* com concentrado farelado a 1,2% do peso vivo e feno Coastcross *ad libitum*. Após o período de adaptação de 15 dias, um grupo foi suplementado com o prebiótico inulina de chicória (dose de 0,07 g / kg de PV / potro / dia) por seis dias antes do desmame e mais sete dias após o desmame, misturando diretamente no concentrado. Os potros foram desmamados abruptamente. Sete dias após o desmame, o grupo controle recebeu suplementação com probiótico *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 (0,19 g / kg de PV/ potro / dia, $1,0 \times 10^{10}$ UFC / g) e o grupo suplementado passou a consumir simbiótico (*S. cerevisiae* SC 47 + inulina de chicória) por mais 14 dias. Amostras fecais foram coletadas para análise de pH e microbioma por meio do sequenciamento de amplicon do gene 16S rRNA. Os aditivos e o período em relação ao desmame não influenciaram os índices de alfa diversidade de espécies. Contudo, as amostras formaram dois clusters principais definidos pelo desmame. A suplementação com prebiótico estimulou o aumento da classe Bacilli nas fezes dos potros lactentes. O pH fecal dos potros suplementados com inulina foi superior ao grupo controle. A suplementação com probiótico e simbiótico aumentou as classes Erysipelotrichia e Saccharimonadia, respectivamente, após três dias de consumo, entretanto, o efeito não foi observado após 14 dias. Houve diferença dos microbiomas fecais entre os sexos dos potros. Portanto, a suplementação com prebiótico inulina possui potencial de diminuir o impacto do desmame sobre o microbioma fecal de potros. A suplementação com probiótico *S. cerevisiae* Sc 47 e simbiótico inulina + *S. cerevisiae* Sc 47 tem efeitos diferentes no microbioma fecal de potros desmamados. O sexo dos potros deve ser considerado em estudos do microbioma fecal.

Palavras-chave: inulina, microbiota, *Saccharomyces cerevisiae*, simbiótico

ABSTRACT

Weaning can be considered the most stressful event in horses' life. The aim of this study was to evaluate changes in the fecal microbiome of supplemented foals with prebiotic, probiotic and symbiotic along the weaning period. Eight suckling foals aged 159 days were used. The foals and their mares were split into two groups kept separate and supplemented in a creep-feeding system facility with concentrate at 1.2% of body weight (BW) and Coastcross hay *ad libitum*. After adaptation period of the 15-days, one group was supplemented with the chicory inulin as prebiotic (0.07 g / kg BW / foal / day) for six days before weaning, and seven more days after weaning by mixing directly in the concentrate. Following, foals were weaned abruptly. Seven days after weaning, the control group started supplementing with probiotic *Saccharomyces Cerevisiae* Sc 47 (0.19 g / kg BW / foal / day, 1.0×10^{10} CFU / g) and the supplemented group started with symbiotic administration (*S. Cerevisiae* SC 47 + chicory inulin) for 14 days longer. Fecal samples were collected for pH and microbiome analysis by using the 16S rRNA gene amplicon sequencing. The additive administration and the period in relation to weaning did not influence the alpha diversity indexes. However, the samples were clustered into two main groups defined by weaning. The prebiotic supplementation increased Bacilli class in the feces of suckling foals. The fecal pH of foals supplemented with inulin was higher than the control group. Along three days, probiotic and symbiotic supplementation increased the classes Erysipelotrichia and Saccharimonadia, respectively, however, the effect was not observed after 14 days. There was a fecal microbiome difference due to foal's sex. The inulin prebiotic supplementation has the potential to decrease the impact of weaning on fecal microbiome of foals, whereas probiotic *S. cerevisiae* Sc 47 supplementation followed by symbiotic inulin + *S. cerevisiae* Sc 47 administration has different effects on the fecal microbiome of weaned foals. The sex should be considered for coming studies of the foal's fecal microbiome.

Keywords: inulin, microbiota, *Saccharomyces cerevisiae*, simbiotic

1 INTRODUÇÃO

O desmame de equinos ocorre geralmente entre o quarto e o sexto mês de vida e é descrito como um dos eventos mais estressantes da vida da espécie, por envolver respostas afetivas, fisiológicas, nutricionais e cognitivo-comportamentais na tentativa de recuperar a homeostase corporal (WARAN et al., 2008; ERBER et al., 2012). A mudança alimentar que ocorre no desmame pode alterar o equilíbrio do microbioma intestinal afetando a saúde dos equinos (MACH et al., 2017). Após o desmame, as exigências nutricionais do potro serão supridas exclusivamente por alimentos sólidos. Desse modo, a introdução gradual de alimentos de formas físicas distintas da líquida podem auxiliar na estabilização do microbioma com efeitos positivos sobre a degradação da fibra (COVERDALE, 2016; FAUBLADIER et al., 2017). Contudo, informações científicas que confirmem os impactos da suplementação com aditivos associada à alimentação sólida sobre os parâmetros zootécnicos, tais como: digestibilidade, crescimento, lactação ou desempenho são limitadas (COVERDALE, 2016). Apesar da existência de resultados conflitantes na literatura, o uso de aditivos zootécnicos equilibradores da microbiota podem ser uma alternativa no auxílio da homeostase da população microbiana (JOHN et al., 2015; SCHOSTER et al., 2016; COVERDALE, 2016).

Os prebióticos são ingredientes de fermentação seletiva, com potencial de modificar a microbiota gastrointestinal e proporcionar efeitos sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro (COVERDALE, 2016), enquanto os probióticos são microrganismos vivos administrados em doses específicas que conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os benefícios atribuídos ao uso de probióticos incluem: a ativação e modulação do sistema imunológico, aumento da função de barreira protetora da mucosa intestinal, exclusão competitiva de patógenos e, conseqüente, redução do risco de infecção devido à produção de substâncias antimicrobianas, incluindo ácidos láctico e acético (SCHOSTER et al., 2014). Em potros, o uso de probióticos foi estudado principalmente com o intuito de prevenir e tratar diarreia (JOHN et al., 2015; SCHOSTER et al., 2015; 2016). Os gêneros mais estudados incluem *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Saccharomyces* (SCHOSTER et al., 2014).

Apesar do aumento do número de pesquisas sobre a influência da dieta sobre o microbioma do trato gastrointestinal de equinos, há pouco conhecimento sobre a modificação do microbioma de potros no desmame. Desse modo, objetivou-se descrever mudanças do microbioma fecal de potros suplementados com prebiótico, probiótico e simbiótico no período de desmame.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de Equideocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado em Seropédica, Rio de Janeiro. A manipulação das amostras fecais e extração de DNA foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Instituto de Veterinária. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da UFRRJ sob número de protocolo 23083.001560/2018-41.

2.1 Animais

Foram utilizados oito potros saudáveis da raça Mangalarga Machador, com idade 159 ± 9 dias e peso vivo médio de 151 ± 21 kg. Antes do início do experimento, os potros foram submetidos ao controle de parasitas com ivermectina (EQVALAN, Boehringer Ingelheim, Alemanha). Exames clínicos e hematológicos foram realizados com vista à higidez. Nenhum antimicrobiano foi administrado durante do período experimental.

2.2 Condução do Experimento

Os potros foram separados por pares de peso em dois grupos de quatro animais. Cada grupo foi mantido em um piquete separado juntamente com suas mães com livre acesso à água, onde foram alimentados com feno Coastcross *ad libitum* e concentrado farelado a 1,2% do peso vivo, quantidade ajustada para atender as exigências nutricionais de potros em crescimento (NRC, 2007). O concentrado farelado foi fornecido aos potros individualmente em sistema de *creep-feeding* duas vezes ao dia. Os potros passaram por um período de adaptação ao sistema de alimentação de 15 dias.

O experimento foi dividido em dois períodos:

Período I: Avaliou-se o efeito da suplementação com prebiótico inulina de chicória (Orafti®SIPX, BENEIO Orafti, Bélgica) sobre o microbioma fecal de potros lactentes e recém desmamados. Um grupo controle recebeu como placebo a mesma quantidade de peso da suplementação prebiótica em concentrado farelado. O segundo grupo foi suplementado com o prebiótico por seis dias antes do desmame, e mais sete dias pós desmame, totalizando 13 dias de suplementação. Os potros foram submetidos a um método de desmame abrupto. No dia do desmame, os potros foram retirados de suas mães, separados em duplas e mantidos em baias de alvenaria para o fornecimento do concentrado matinal.

Período II: Avaliaram-se os efeitos da suplementação com prebiótico e simbiótico sobre o microbioma fecal de potros desmamados. O grupo controle do período I passou a ser suplementado com prebiótico *Saccharomyces cerevisiae* (ACTISAF Sc47 HR Plus, Lesaffre, França) sete dias após o desmame e o grupo suplementado do período I passou a consumir simbiótico (*S. cerevisiae* Sc 47 + inulina de chicória). O período II teve duração de 14 dias.

O prebiótico inulina foi administrado na dose de 0,07 g / kg de PV / potro / dia (DIAS et al., 2017). O prebiótico (garantia de concentração mínima de $1,0 \times 10^{10}$ UFC / g) foi administrado na dose 0,19 g / kg de PV / potro / dia (JULLIAND et al., 2018). Os aditivos foram fornecidos junto com o concentrado farelado na primeira refeição do dia. Os animais foram pesados semanalmente e as doses ajustadas de acordo com o peso corporal.

As amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal utilizando luvas de uso único, entre às 09:00 e 11:00 horas. Imediatamente após a coleta, o pH fecal foi mensurado e as amostras foram acondicionadas separadamente em tubos plásticos devidamente identificados, minizando a exposição ao O₂. No laboratório, 20 g de cada amostra foi congelada à -20 °C até a extração de DNA. Ao longo dos dois períodos foram realizadas 6 coletas de cada animal (Figura 1).

2.4 Análises de Bioinformática

Os dados brutos do sequenciamento dos amplicons das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA foram processados por meio do software R versão 3.6 (R Development Core Team – 2016). As sequências foram processadas seguindo a pipeline DADA2 (CALAHAM et al., 2017). Após a formação de contigs, as sequências quiméricas foram excluídas. Sequências menores de 400 e maiores de 430 pb e aquelas não pertencentes ao domínio Bacteria foram removidas do banco de dados. Posteriormente, foram classificadas utilizando o banco de dados SILVA SSU r123 e agrupadas em *amplicon sequence variant* (AVS) (Projeto Silva: <https://www.arb-silva.de/projects/ssu-ref-nr/>). Finalmente, o banco de dados foi submetido a uma rarefação com base na amostra com menor número de sequência

As sequências resultantes foram utilizadas para cálculo dos índices de alfa diversidade e análises exploratórias multivariadas.

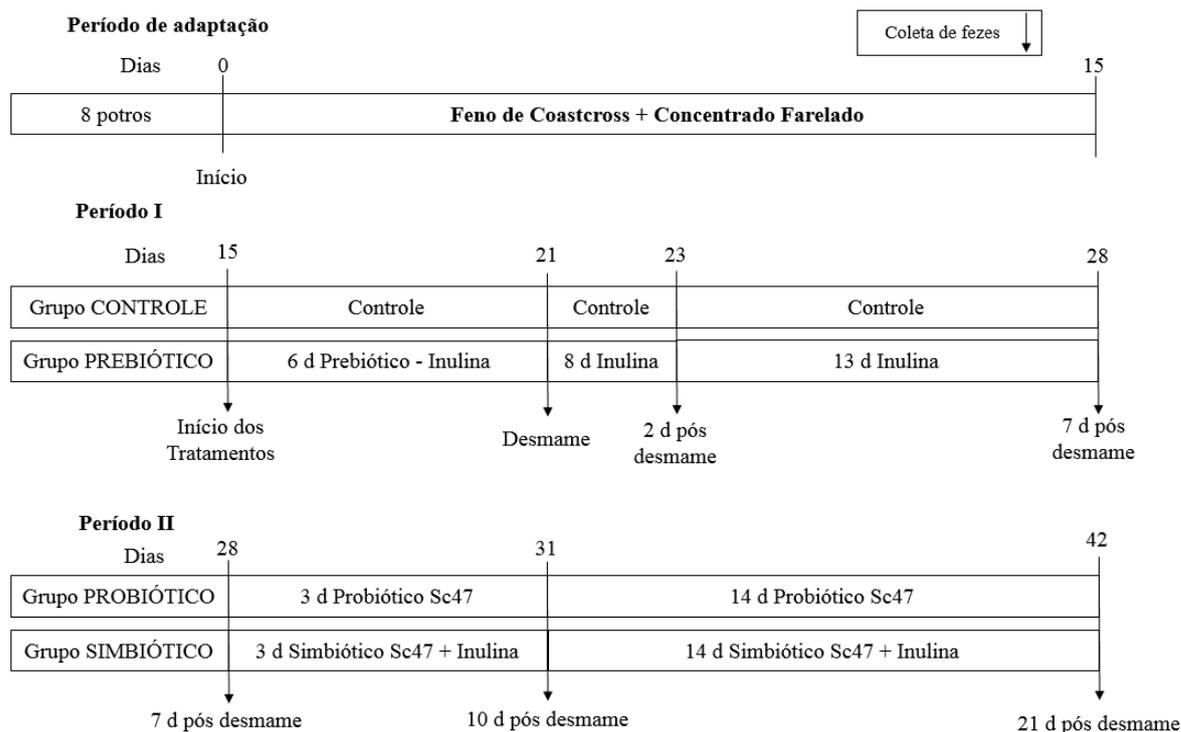


Figura 1. Esquema do período experimental e coleta de fezes dos potros para análise de microbioma.

2.3 Extração do DNA total, preparo de biblioteca e sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA total foi extraído a partir de 200 mg de fezes congeladas utilizando o kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini (QIAGEN Ltd, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. A região variável V3-V4 do gene 16S rRNA foi amplificado com os primers Bakt_341F: CCTACGGGNGGCWGCAG; Bakt_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC e os amplicons sequenciados com uma plataforma MiSeq sistema 300 pb paired-end (Illumina, EUA). O preparo de biblioteca e o sequenciamento dos amplicons foram realizados por Macrogen (<http://www.macrogen.com>, Seul, Coréia do Sul).

2.5 Análises Estatísticas

Os resultados dos índices de diversidade foram submetidos aos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis de soma e classificação de Wilcoxon (Mann-Whitney) ($\alpha = 0,05$).

As amostras foram agrupadas de acordo com o grau de similaridade pelo índice de correlação de Spearman utilizando a abundância relativa das 13 principais classes e o grupo Others, que representa a soma de todas as classes menos abundantes.

A abundância diferencial da ASV entre grupos específicos de amostras foi testada usando a análise permutacional ANOVA (PERMANOVA) e foram consideradas ASVs com variações significativas quando o $p < 0,01$ e apenas essas foram apresentadas graficamente.

2.5 Número de acesso das sequências de nucleotídeos

Os dados gerados foram depositados no NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) e estão disponíveis sob o número de acesso do bioprojeto PRJNA695245.

3 RESULTADOS

3.1 Métricas do Sequenciamento

As 48 amostras coletadas originaram 3.137.701 pares de sequências. Após o alinhamento e aplicação de filtros de qualidade, restaram 1.344.396 sequências únicas não quiméricas com fragmentos variando entre 400 a 433 pb (42,85% do valor inicial). Após a atribuição da taxonomia, as sequências foram distribuídas em 9.812 ASV nas 48 amostras e as sequências não pertencentes ao domínio *Bacteria* foram excluídas, resultando em 1.232.673 sequências (25.681 sequências médias/amostra). A rarefação foi realizada utilizando apenas as sequências pertencentes ao domínio *Bacteria* com base na amostra com menor número de sequências, resultando em 930.432 ASVs, 19.384 por amostra.

3.2 Composição Taxonômica e Diversidade das Comunidades Bacterianas

Ao final do processo de rarefação observou-se que as ASVs pertenciam à 19 filos, 31 classes, 45 ordens, 73 famílias e 172 gêneros distintos. Além disso, vários outros ASVs não foram classificados. Os filos observados foram Actinobacteria, Bacteroidetes, Chamydiae, Choroflexi, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Epsilonbacteraeota, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Kiritimatiellaeota, Lentisphaerae, Patescibacteria, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes e Verrucomicrobia (Tabela 1).

As classes mais abundantes foram Clostridia, Bacteroidia, Kiritimatiellae, Verrucomicrobiae, Bacilli, Saccharimonadia, Spirochaetia, Erysipelotrichia e Synergistia (Tabela 2).

Tabela 1. Abundância relativa dos 13 principais filos bacterianos observados nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico *Saccharomyces Cerevisiae* Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) reagrupadas com base no período em relação ao desmame

Período Tratamento	Pré	Desmame		2d pós desmame		7d pós desmame		10d pós desmame		21d pós desmame	
	Início	Controle	6d FOS	Controle	8d FOS	Controle	13d FOS	3d Sc47	3d FOS + Sc47	14d Sc47	14d FOS + Sc47
Firmicutes	46,04	44,15	44,92	32,28	45,17	45,73	45,97	43,14	37,89	43,67	47,59
Bacteroidetes	33,07	29,31	37,53	40,69	30,27	26,60	29,73	34,31	20,43	30,18	23,28
Kiritimatiellaeota	9,42	10,06	8,86	11,81	11,14	18,50	18,37	14,75	29,84	14,26	16,12
Verrucomicrobia	3,91	11,61	3,35	7,72	7,16	2,68	0,99	1,65	2,71	6,87	7,44
Patescibacteria	0,78	0,57	1,44	0,73	1,38	1,21	0,98	1,83	4,88	1,06	1,04
Spirochaetes	2,99	1,13	0,95	2,98	1,21	1,24	1,12	0,84	1,53	0,76	1,11
Synergistetes	0,59	0,55	0,61	0,74	0,98	1,62	0,67	1,10	0,28	0,51	0,53
Fibrobacteres	0,50	0,52	0,60	0,29	0,84	0,55	0,23	0,41	0,12	0,36	0,36
Proteobacteria	0,77	0,39	0,12	0,58	0,22	0,12	0,17	0,07	0,06	0,13	0,50
Tenericutes	0,16	0,18	0,34	0,07	0,11	0,10	0,21	0,10	0,51	0,26	0,37
Cyanobacteria	0,19	0,12	0,14	0,36	0,09	0,21	0,16	0,14	0,17	0,09	0,45
Actinobacteria	0,26	0,13	0,07	0,31	0,01	0,15	0,39	0,19	0,25	0,07	0,04
Planctomyceters	0,17	0,22	0,07	0,06	0,06	0,17	0,11	0,14	0,14	0,16	0,10
Others	1,15	1,07	1,01	1,38	1,34	1,15	0,92	1,32	1,18	1,63	1,06

Tabela 2. Abundância relativa das 9 principais classes bacterianas observadas nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico *Saccharomyces Cerevisiae* Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) reagrupadas com base no período em relação ao desmame

Período Tratamento	Pré Início	Desmame		2d pós desmame		7d pós desmame		10d pós desmame		21d pós desmame	
		Controle	6d FOS	Controle	8d FOS	Controle	13d FOS	3d Sc47	3d FOS + Sc47	14d Sc47	14d FOS + Sc47
Clostridia	42,30	42,30	35,50	29,80	28,20	44,50	41,70	36,00	36,70	42,90	46,70
Bacteroidia	33,10	29,40	37,60	40,70	30,10	26,70	29,90	34,20	20,30	30,20	23,40
Kiritimatiellae	9,40	10,10	8,80	11,80	11,20	18,30	18,30	14,60	29,90	14,20	16,10
Verrucomicrobiae	3,90	11,60	3,30	7,80	7,10	2,80	1,00	1,60	2,80	6,90	7,50
Bacilli	1,10	0,30	7,70	0,70	16,10	0,10	0,20	0,40	0,10	0,20	0,00
Saccharimonadia	0,70	0,50	1,40	0,70	1,40	1,20	1,00	1,80	4,90	1,10	1,00
Spirochaetia	2,80	1,10	1,00	2,50	1,20	1,20	1,10	0,90	1,60	0,80	1,10
Erysipelotrichia	0,60	0,20	0,40	0,70	0,20	0,40	1,50	6,60	0,40	0,30	0,30
Synergistia	0,60	0,60	0,60	0,70	1,00	1,60	0,70	1,10	0,30	0,50	0,50
Others	5,60	3,80	3,90	4,70	3,30	3,20	4,70	2,80	3,10	3,00	3,30

De acordo com o grau de similaridade calculado pela matriz de distância (Figura 2), as amostras reagrupadas pelo período em relação ao desmame e tempo de suplementação com o prebiótico, probiótico e simbiótico formaram dois clusters principais. O primeiro cluster foi formado pelas amostras coletadas dos dois grupos de potros no início do experimento, no dia do desmame e dois dias após os desmame. Dentro do primeiro cluster, as amostras coletadas do grupo controle foram mais similares às coletadas no início do experimento, enquanto as amostras do grupo suplementado prebiótico foram similares pela abundância expressiva da classe Bacilli. Dentro do segundo cluster, não foi observado um padrão quanto ao período em relação ao desmame e o tempo de suplementação, contudo, observou-se aumento da abundância relativa da classe Kiritimatiellae e redução da abundância relativa da classe Verrucomicrobiae. Além disso, observou-se aumento da abundância relativa das classes Erysipelotrichia e Saccharimonadia nas fezes dos potros suplementados com probiótico e simbiótico, respectivamente, após 3 dias de suplementação.

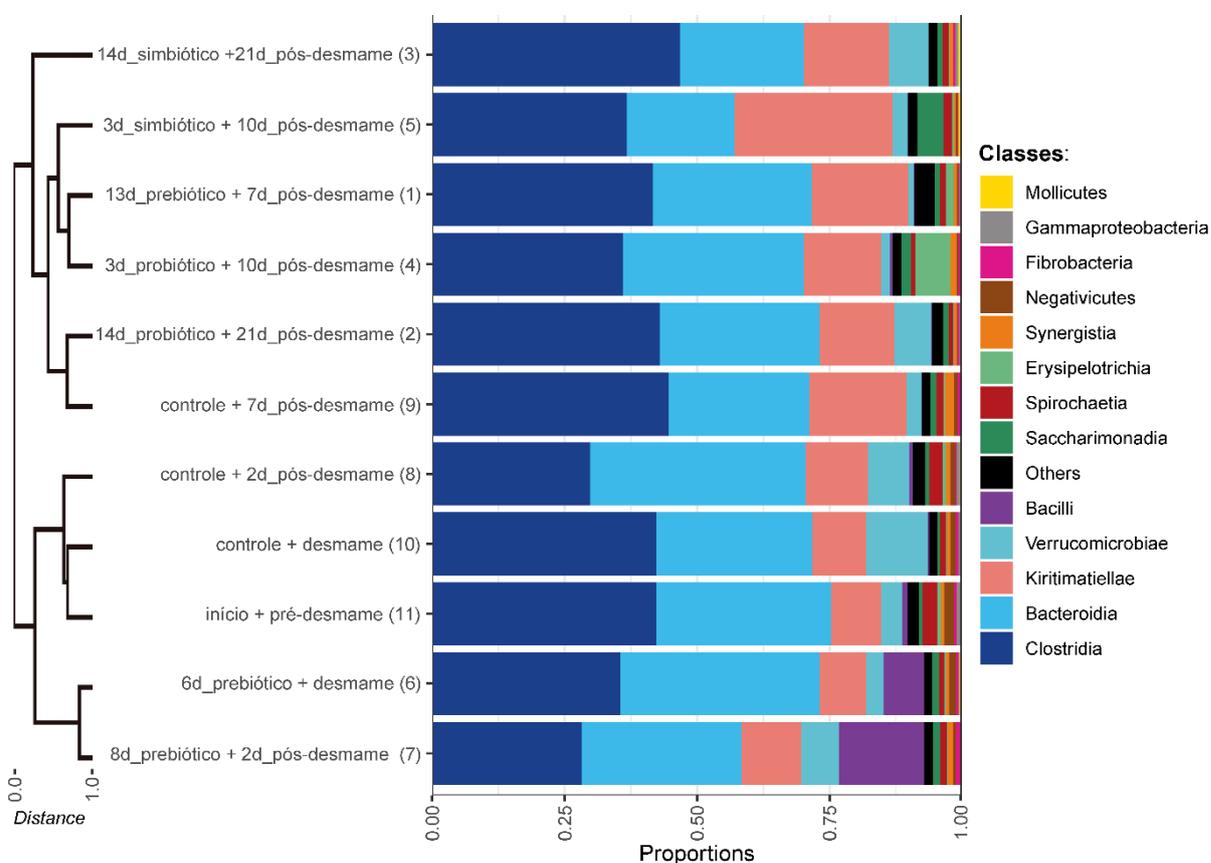


Figura 2. Histograma geral da abundância relativa das 13 principais classes bacterianas observadas nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico *Saccharomyces Cerevisiae* Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) coletadas em diferentes períodos em relação ao desmame agrupadas de acordo com o grau de similaridade. O Dendrograma foi pelo método UPGMA com base na matriz de Bray-Curtis calculada com base nos dados de abundância.

Não houve diferença significativa entre os índices de Chao, Shannon e Simpson dos grupos ($p < 0,05$), seja por sexo, período do desmame (Figura 3), tempo de suplementação (Figura 4) ou a interação entre ambos.

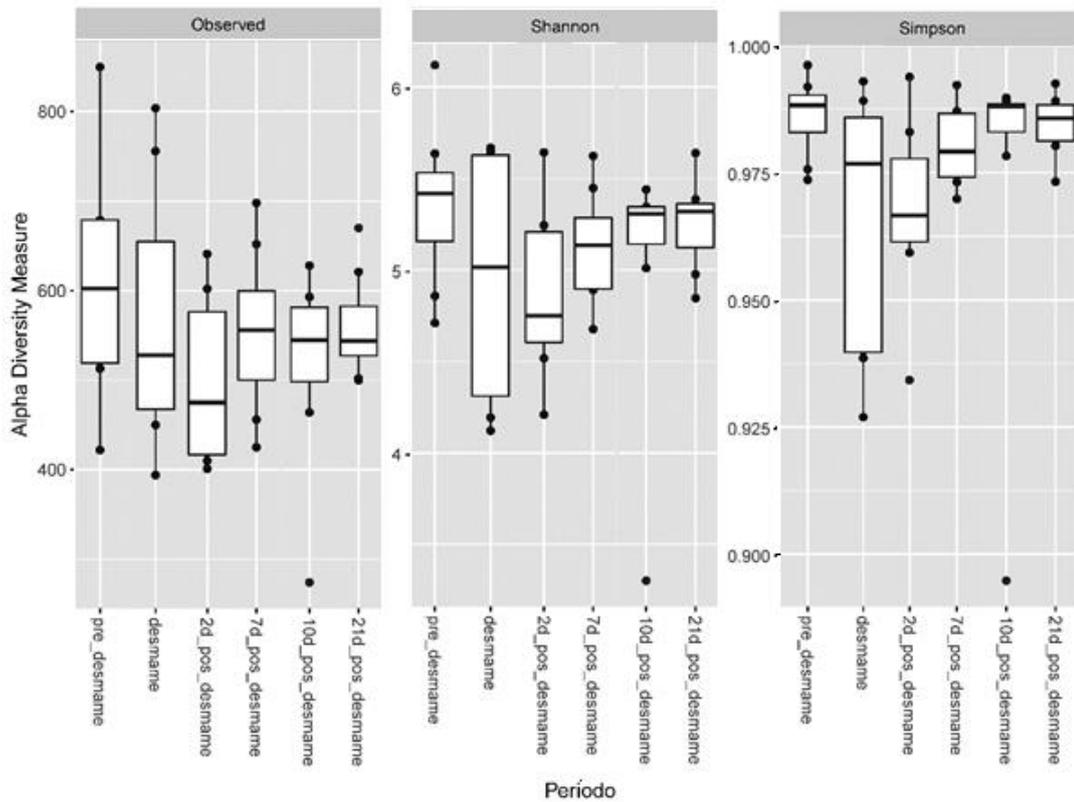


Figura 3. Dispersões dos índices de diversidade bacteriana observados nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico *Sacchoromyces Cerevisiae* Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) agrupadas de acordo com o período em relação ao desmame.

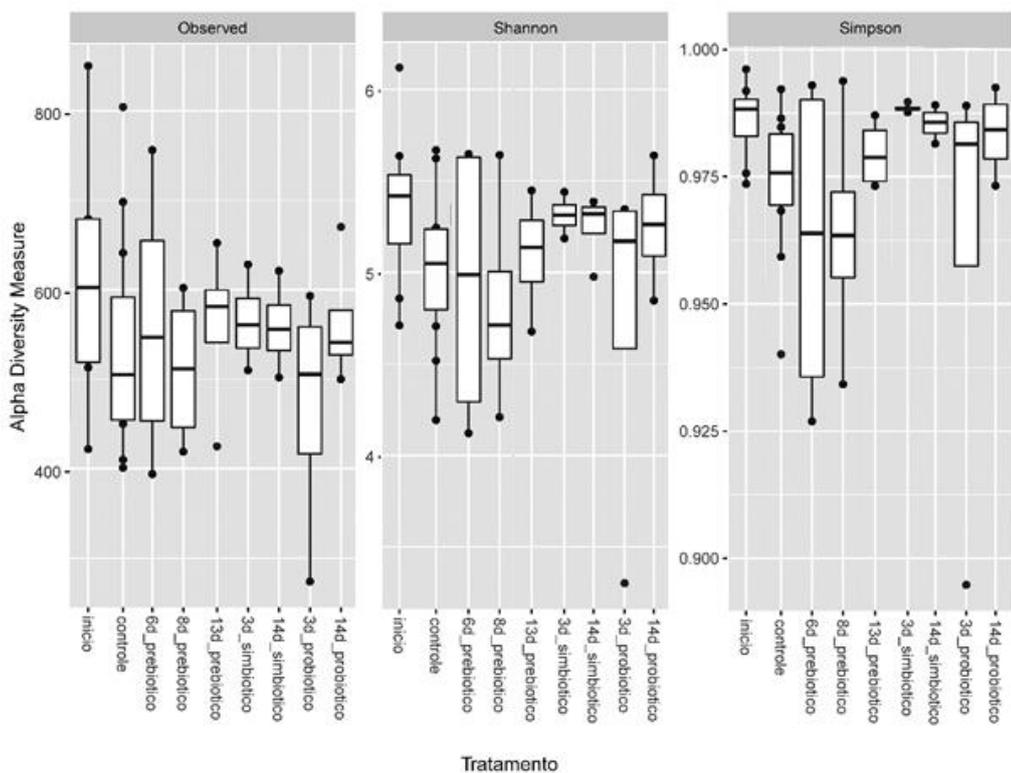


Figura 4. Dispersões dos índices de diversidade bacteriana observados nas fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS), probiótico *Sacchoromyces Cerevisiae* Sc47 (Sc47) e simbiótico (FOS + Sc47) agrupadas de acordo com o tempo de suplementação.

3.3 Análise Multivariada dos Microbiomas Bacterianos das Fezes de Potros

O Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) não destacou separação em função do tempo de suplementação com prebiótico, probiótico ou simbiótico ou do período em relação ao desmame. Houve maior tendência de diferenciação entre microbiomas bacterianos das comunidades de potros machos e fêmeas quando considerada apenas a matriz de presença e ausência (Figura 5). O microbioma bacteriano fecal de potras apresentaram abundância diferencial significativa de AVS classificadas como Verrucomicrobiales, Bacteroidales, Clostridiales e Lactobacillales. Enquanto o microbioma bacteriano fecal de potros apresentaram abundância diferencial de AVS classificadas como Clostridiales e Bacteroidales (Figura 6).

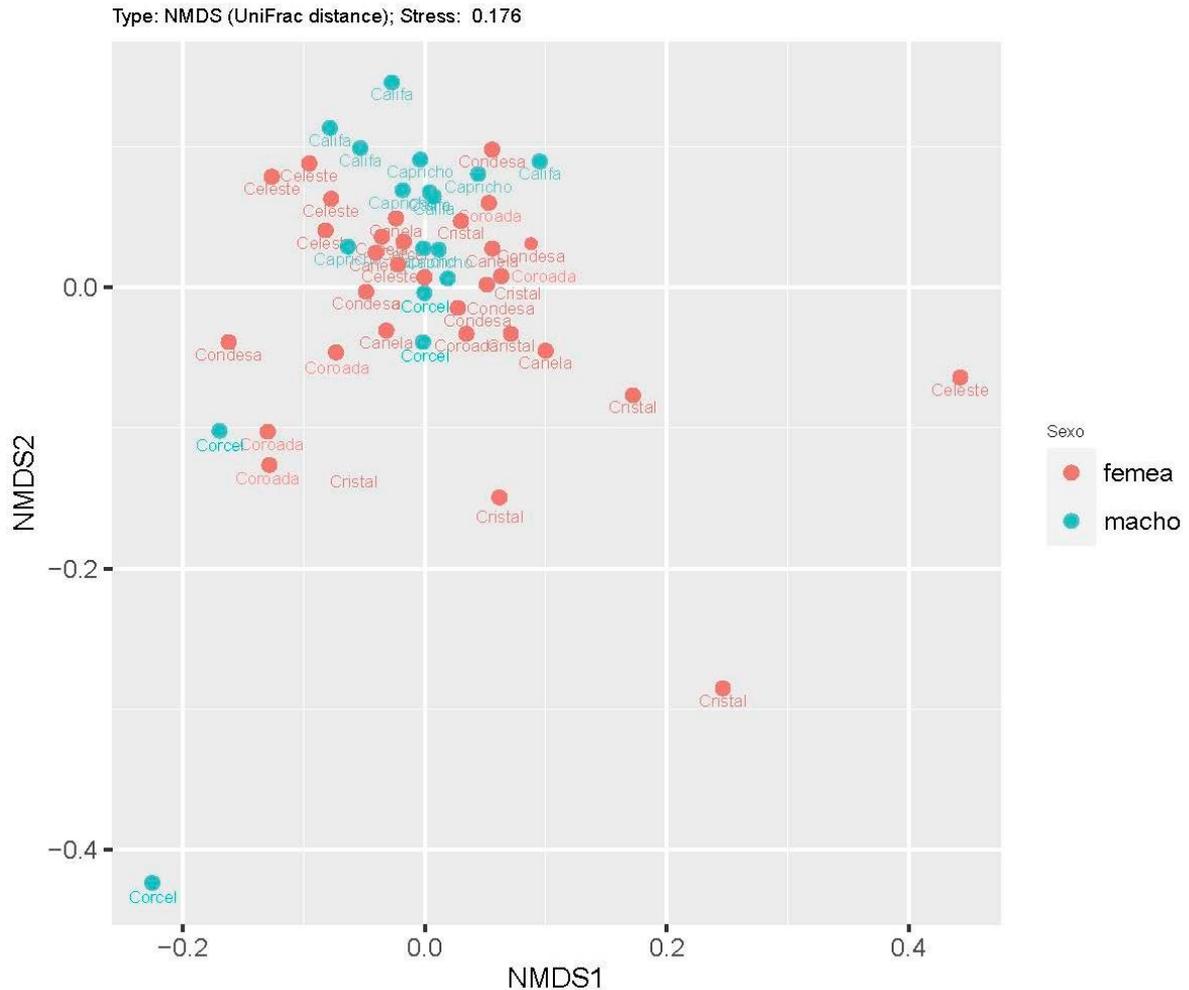


Figura 5. Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) de microbiomas bacterianos das fezes de potros do sexo masculino e feminino quando considerada a matriz de presença e ausência de ASVs.

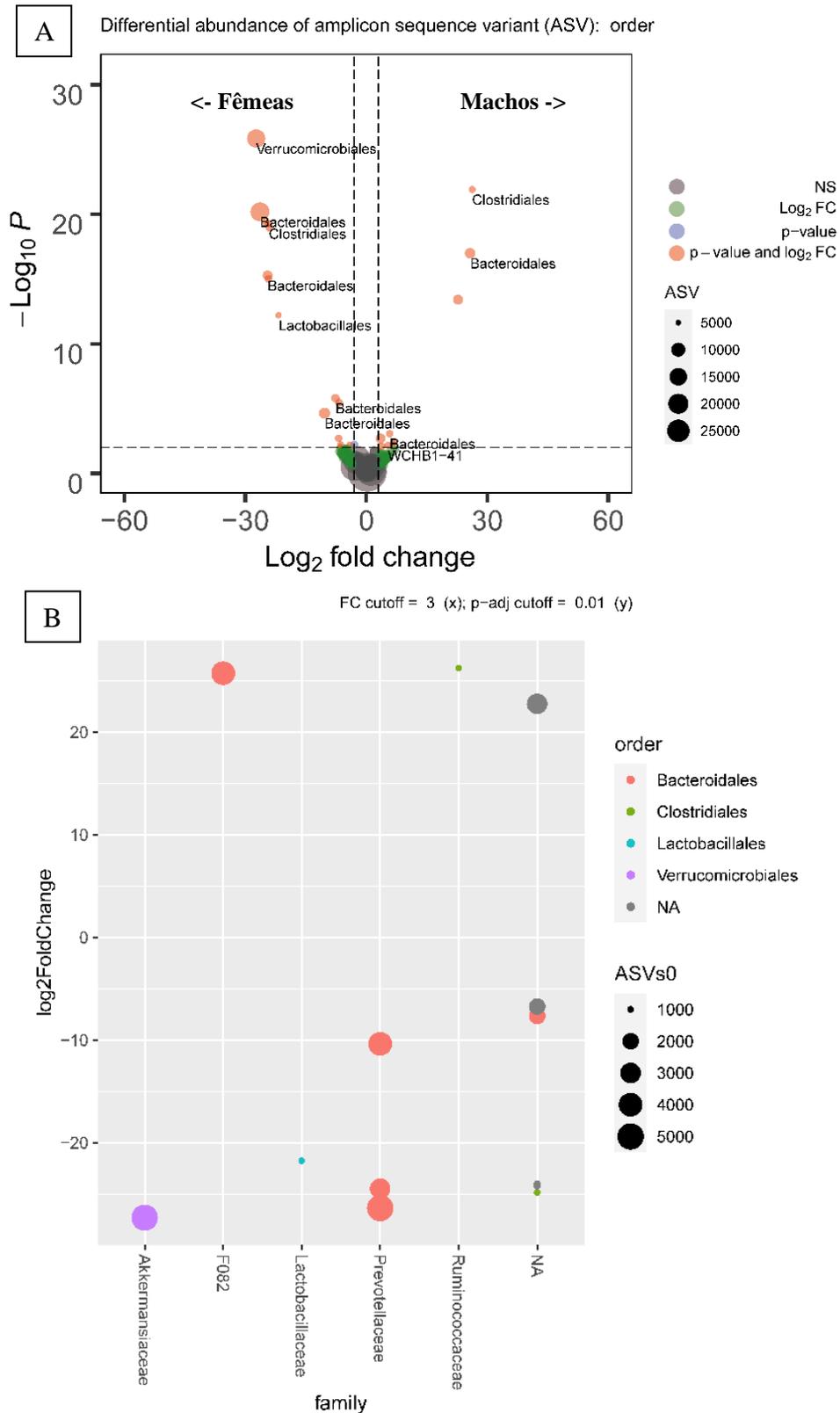


Figura 6. Abundância diferencial de ASVs do microbioma bacteriano fecal entre potros machos e fêmeas testados utilizando a análise permutacional ANOVA (PERMANOVA). Apenas ASVs com variações significativas ($p < 0,01$) foram demonstradas (A). Famílias que predominam dentro de cada ordem (B).

3.4 Análise de pH Fecal e Correlação com Tóxons Bacterianos

Não houve efeito de interação entre a suplementação aditivos e o tempo de suplementação. Houve efeito simples da suplementação ($p=0,0304$), onde o grupo suplementado com prebiótico e posteriormente com simbiótico, nos períodos experimentais I e II, respectivamente, apresentou pH fecal superior comparado ao grupo controle que posteriormente foi suplementado apenas com probiótico (Figura 7). Além disso, houve efeito do período em relação ao desmame ($p=0,0080$), onde o pH fecal das amostras coletadas 10 dias após o desmame foi inferior ao observado nas amostras coletadas 2 dias após o desmame.

O pH fecal dos potros foi utilizado na análise de correlação com os principais tóxons bacterianos a nível de família (Figura 8). O pH foi correlacionado positivamente com as famílias Lactobacillaceae ($p<0,001$), Fibrobacteraceae ($p<0,01$), Streptococcaceae ($p<0,001$) e Campylobacteraceae ($p<0,05$), e negativamente com as famílias Clostridiaceae ($p<0,05$) e Defluviitaleaceae ($p<0,01$).

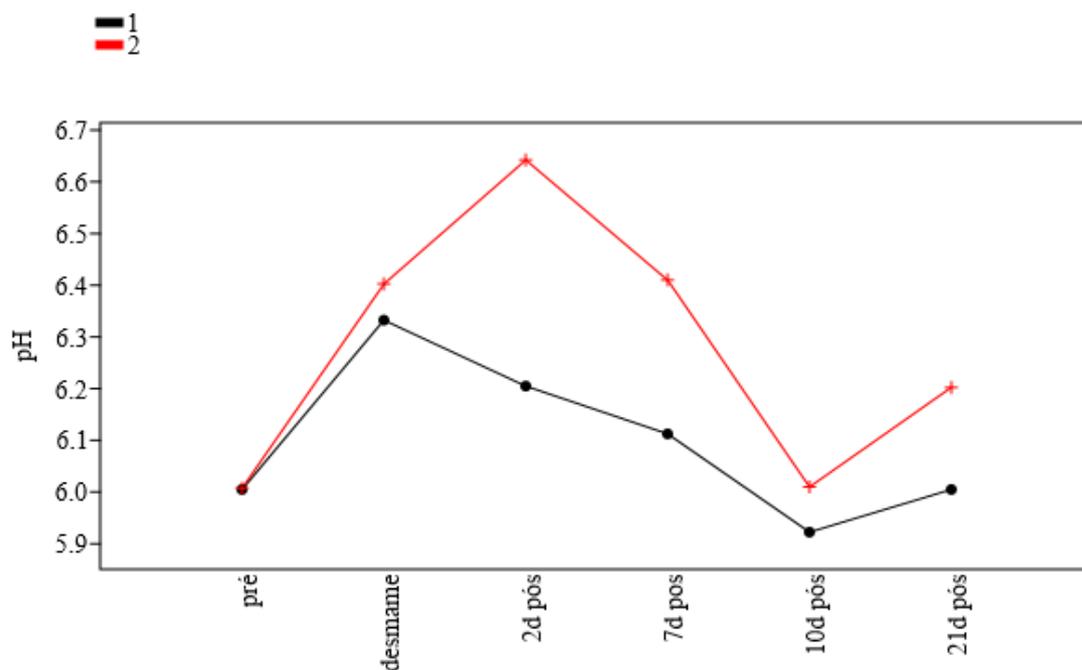


Figura 7. pH das fezes de potros do grupo controle e suplementos com probiótico probiótico *Saccharomyces Cerevisiae* Sc47 (Sc47) a partir do dia 7 após o desmame (linha preta) comparado as fezes de potros suplementados com prebiótico inulina (FOS) até o dia 7 após o desmame e simbiótico (FOS + Sc47) do dia 7 ao 21 pós desmame (linha vermelha)

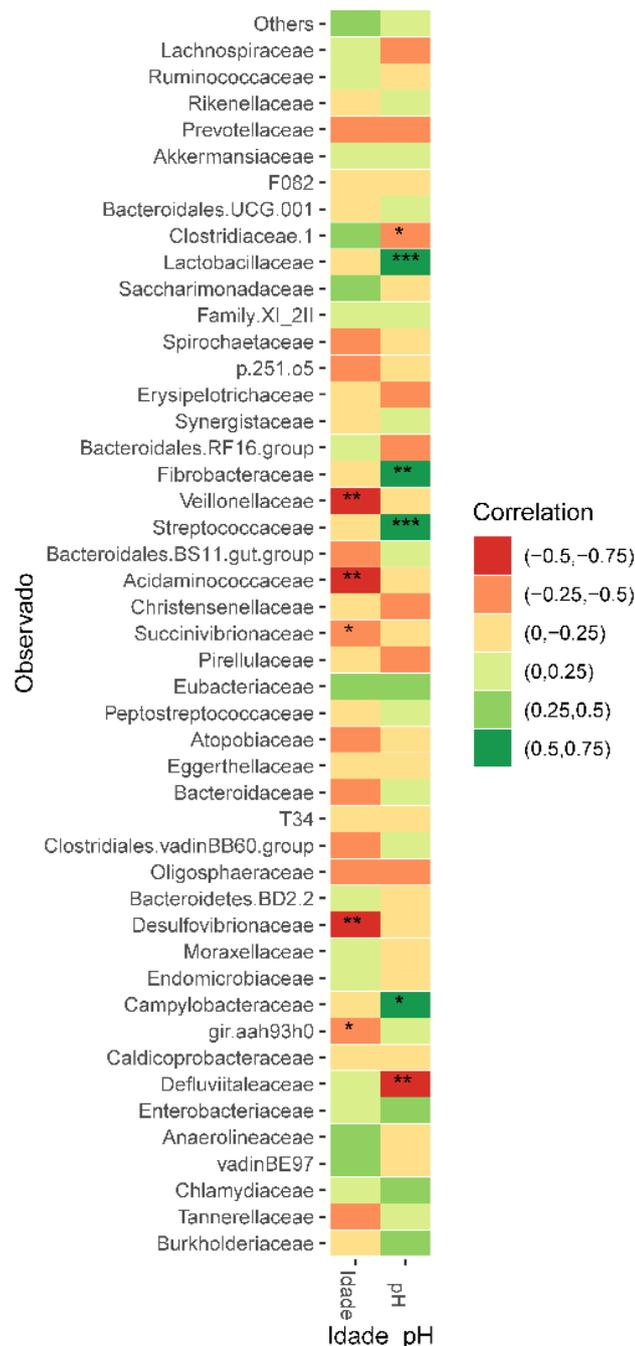


Figura 8. Correlações dos 50 principais táxons bacterianos atribuídos a famílias com a idade e pH fecal de potros. Foi utilizado o coeficiente de correlações de Spearman, onde os valores de p foram calculados usando o algoritmo AS 89 e o p-value exato computado por Spearman's ρ , caso contrário, através da aproximação t assintótica. Códigos de significância (p): '****' 0,001, '**' 0,01, e '*' 0,05.

4 DISCUSSÃO

A microbiota intestinal possui papel fundamental na utilização de fibras como fonte de energia (COSTA e WEESE, 2018). Apesar dos equinos serem herbívoros, poucos estudos foram realizados para esclarecer a colonização do trato gastrointestinal de potros e os fatores que influenciam a colonização e, posteriormente, na estabilidade e funcionalidade do microbioma (BORDIN et al., 2013; COSTA et al., 2016; LINDENBERG et al., 2019).

Inicialmente, acreditava-se que a estabilização da microbiota intestinal de potros ocorresse entre 30 e 60 dias e que o desmame não alterava a comunidade bacteriana (EARING et al., 2012; FAUBLADIER et al., 2014). Entretanto, mesmo com o aumento linear do tempo de pastejo com a idade e a redução da atividade da sucção (CROWELL-DAVIS et al., 1985), estudos baseados em sequenciamento de nova geração revelaram informações divergentes sobre o efeito do desmame na microbiota intestinal de potros (COSTA et al., 2016; MACH et al., 2017; LINDENBERG et al., 2019). As alterações observadas por Mach et al. (2017) foram atribuídas ao estresse provocado pelo desmame e não à cessação do consumo de leite materno. Não há informações do efeito da idade de desmame sobre o microbioma fecal de potros, mas sugere-se que, quanto mais tardio o desmame, menor será a contribuição do leite na dieta do potro (DOREAU et al., 1990; SHARE et al., 2015). Mesmo que as mudanças sobre o microbioma intestinal no desmame sejam sutis comparadas a todas aquelas ocorridas desde o nascimento, elas devem ser consideradas, pois podem diminuir a dominância de bactérias benéficas, expondo os animais a bactérias comensais oportunistas e diminuir a atividade fermentativa (MACH et al., 2017). Observou-se que a suplementação com o prebiótico inulina teve efeito diferente nos potros entre os períodos pré e pós desmame. Em animais lactentes, a suplementação estimulou o aumento da classe Bacilli nas fezes, que se manteve até 2 dias após o desmame. Entretanto, o aumento não foi observado nas fezes do grupo suplementado 7 dias após o desmame. Portanto, sugere-se que o leite possui papel fundamental na modulação do microbioma, mesmo se consumido em pouca quantidade. Além disso, a associação com a inulina prolongou a permanência de populações benéficas durante a fase mais aguda do estresse. Desse modo, a suplementação com inulina associada ao alimento para os potros lactentes torna-se uma estratégia preventiva contra a disbiose que pode ser causada pelo estresse.

A inulina de chicória é fonte de FOS, polissacarídeos compostos por unidades de frutose ligadas entre si através de ligações $\beta(2,1)$, que são hidrolisadas apenas por enzimas de microrganismos específicos. De fato, os prebióticos comumente avaliados são aqueles que estimulam o componente de bactérias do ácido láctico da microbiota, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (COVERDALE et al., 2016). Além disso, estudos anteriores demonstraram que a suplementação com FOS resultaram em superior produção de ácidos graxos de cadeia curta com concomitante aumento do pH fecal (BERG et al., 2005). O que resulta no aumento da tolerância a mudanças abruptas de dieta (RESPONDEK et al., 2008). Avaliando níveis taxonômicos mais baixos, observou-se que o aumento da classe Bacilli foi devido ao aumento do gênero *Lactobacillus*, gênero conhecido pelo efeito na acidificação da digesta em equinos (JULLIAND et al., 2018), entretanto, o pH fecal dos potros suplementados com inulina foi superior ao dos potros não suplementados no período I.

Segundo Mach et al. (2017) três dias após o desmame ocorreu enriquecimento das vias de digestão e absorção de carboidratos. Desse modo, observou-se redução da abundância da classe Verrucomicrobiae e aumento da classe Kiritimatiellae após o desmame. O filo Verrucomicrobia é comum no trato gastrointestinal equino (COSTA e WEESE, 2018) e foi descrito como dominante nas fezes de potros (COSTA et al., 2016). O gênero *Akkermansia* foi o mais abundante dentro do filo Verrucomicrobia. Este gênero está associado a degradação de mucina e na produção de vitaminas do complexo B envolvidas diretamente no metabolismo energético (BELZER e DE VOS, 2012; KIRMIZ et al., 2020). O filo Kiritimatiellaeota possui membros de metabolismo estritamente anaeróbico e fermentativo que utilizam preferencialmente os açúcares como substratos, mas também utilizam polissacarídeos sulfatados, incluindo a glicoproteína mucina (SPRING et al., 2016; EDWARDS et al., 2020). É razoável supor que há competição entre esses filós pelo mesmo tipo de substrato e, que o desmame, é o ponto crítico de amadurecimento da microbiota intestinal.

Os tratamentos aplicados antes e após o desmame não influenciaram a diversidade de espécies e a estrutura da comunidade, assim não apresentaram padrão de agrupamentos entre

os grupos de amostras testados. Segundo Costa et al. (2016), potros jovens com idade entre 121 a 180 dias não apresentavam uma espécie indicadora da idade no microbioma fecal, um componente do microbioma comum entre os animais de abundância relativa representativa. Assim, a variabilidade entre os indivíduos pode camuflar o efeito dos aditivos. Sete dias pós-desmame, uma comunidade intestinal relativamente estável foi estabelecida (MACH et al., 2017). De fato, não foi observado alteração significativa do microbioma fecal dos potros para semelhante momento. Entretanto, observou-se aumento da classe Erysipelotrichia e Saccharimonadia após três dias de suplementação com o probiótico e simbiótico, respectivamente. A classe Erysipelotrichia pertencente ao filo Firmicutes que são anaeróbios facultativos, de baixo potencial fermentativo (KANNO et al., 2015). A classe Saccharimonadia é pertencente ao filo Patescibacteria (reclassificação da divisão TM7), possui várias enzimas para a degradação de carboidratos complexos como alfa-amilase, glucoamilase, trealase, beta-glucosidase e endoglucanase, e aproveita os carboidratos simples por meio da fermentação (LE MOS et al., 2019; FIZTGERALD et al., 2020). Apesar de haver um grupo de controle paralelo mantido nas mesmas condições que permitiu a detecção do efeito da suplementação do prebiótico no período I, não houve semelhante controle no período II, portanto, os potros passaram a ser controle deles mesmos. Desse modo, outros fatores além do tratamento aplicado, poderiam ter afetado o microbioma fecal dos potros (JULLIAND e GRIMM, 2016). Ainda assim, a redução do pH fecal foi consistente nos dois grupos após a inclusão do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* Sc47. Além disso, os efeitos da suplementação do simbiótico e probiótico observados no microbioma fecal foram transitórios, pois o aumento das classes Erysipelotrichia e Saccharimonadia não foi observado após 14 dias de suplementação.

A maioria dos estudos com uso de aditivos zootécnicos para potros foram direcionados a prevenção/ controle da diarreia nos primeiros dias de vida e, diferentes cepas probióticas foram utilizadas sem êxito, tais como: *Lactobacillus pentosus* WE7 (WEESE e ROUSSEAU, 2005), *Bacillus cereus* var *toyoi* (JOHN et al., 2015), multicepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterias* (SCHOSTER et al., 2016) ou de *L. rhamnosus* e *Enterococcus faecium* (STRÖBEL et al., 2018). As doses utilizadas de prebióticos e probióticos, além das cepas utilizadas nos estudos, muitas vezes são baseadas nas utilizadas em outras espécies monogástricas (JOHN et al., 2015) e podem não ser apropriadas para os equinos. A cepa e dose de probiótico baseou-se em Julliard et al. (2018), que relataram ação benéfica no ecossistema microbiano gástrico de equinos desafiados com dietas ricas em amido.

A preparação simbiótica bem-sucedida depende da seleção de cepa capaz de colonizar com sucesso o trato gastrointestinal equino com o prebiótico adequado para complementar as necessidades da cepa probiótica, desta forma, a associação entre os aditivos requer considerações cuidadosas (WEESE, 2002). Poucos estudos investigaram o uso de uma preparação simbiótica destinada ao consumo equino e os resultados são variáveis (COVERDALE et al., 2013; GORDON et al., 2013; GRIMM et al., 2020). A preparação de *Bacillus* DFM (garantia de 1×10^9 UFC) e produtos de fermentação de *S. cerevisiae* não melhoraram a digestibilidade aparente da dieta (GORDON et al., 2013), enquanto a preparação de multicepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium* (garantia de $2,3 \times 10^6$ UFC) e produtos de fermentação de *S. cerevisiae* tendeu a aumentar a digestibilidade da MS da dieta (COVERDALE et al., 2013). No microbioma, uma preparação de *Saccharomyces cerevisiae* e microalgas *Aurantiochytrium limacinum* aumentou a abundância relativa da Família XIII Clostridiales no ceco e nas fezes, e a abundância de Veillonellaceae, família de bactérias utilizadoras de lactato, no cólon e nas fezes de equinos alimentados com uma dieta de feno e cevada (GRIMM et al., 2020). Desse modo, é o primeiro relato de utilização de uma preparação simbiótica para suplementação de potros, por isso, mais estudos são necessários para identificar a potencial ação benéfica na saúde e desempenho dos potros.

A transição dietética gradual do leite para a alimentação sólida antes do desmame pode modular as alterações do microbioma intestinal (FAUBLADIER et al., 2013; MACH et al., 2017). Dessa forma, além dos aditivos zootécnicos, o uso do manejo alimentar por meio do sistema de *creep-feeding* pode ter auxiliado na homeostase do microbioma intestinal durante o período de desmame. O manejo permitiu o controle da introdução do alimento sólido concentrado na dieta dos potros e a utilização dos aditivos sem a manipulação excessiva dos animais. Os potros consomem forragem a partir do segundo dia de vida (FAUBLADIER et al., 2013). Entretanto, o fornecimento de alimentos volumoso e concentrado suplementares à pastagem ocorreu apenas no início do período experimental, quando os potros possuíam em média 159 dias de vida, 21 dias antes do desmame. Em outros estudos, a suplementação ocorreu a partir de 105 dias de vida (FAUBLADIER et al., 2013; 2014; 2017). O tempo de introdução de alimentos sólidos antes do desmame pode ter efeito sobre o microbioma intestinal de potros, porém, novos estudos são necessários para confirmação desta hipótese.

No desmame, os potros são frequentemente expostos a uma série de agentes estressores além da mudança dietética, como a separação de suas mães, rearranjo da hierarquia do grupo social, novo ambiente, que em conjunto podem modificar a composição da microbiota (WARAN et al., 2008; MACH et al., 2017). Acredita-se que o manejo adequado dos animais minimizou os efeitos estressores, uma vez que os potros permaneceram no seu grupo social no mesmo piquete ao qual já estavam acostumados. Assim, as estratégias de manejo adotadas podem ter tornado as mudanças no microbioma menos evidentes. Portanto, sugere-se de forma prática a necessidade de rigor no manejo de desmame, a fim de reduzir os desafios que podem desencadear alterações severas sobre o microbioma.

Apesar de não ser o objetivo principal do estudo, foram observadas diferenças no microbioma fecal de potros machos e fêmeas, onde o microbioma das fêmeas apresentou maior abundância de AVS classificadas como Verrucomicrobiales, Bacteroidales, Clostridiales e Lactobacillales e o de machos de AVS classificadas como Clostridiales e Bacteroidales. O primeiro estudo que investigou diferenças da população microbioma fecal entre machos e fêmeas utilizou método de cultura e não observou diferenças entre os sexos (MSHELIA et al., 2018). Entretanto, recentemente, um estudo utilizando sequenciamento de amplicons de 16S rRNA demonstrou que a comunidade microbiana dominante era relacionada ao sexo do equino. O microbioma de fêmeas tinha maior diversidade de Shannon, enquanto o microbioma de machos continha maiores quantidades de microrganismos relacionados a doenças (HU et al., 2020). Aparentemente, as diferenças entre machos e fêmeas são estabelecidas desde o início da vida dos equinos, o que reforça a hipótese de que o sexo deve ser considerado como uma variável biológica em estudos futuros do microbioma.

5 CONCLUSÃO

A suplementação com prebiótico inulina de chicória possui potencial de diminuir o impacto do desmame no microbioma fecal dos potros, por estimular populações benéficas nos potros lactentes. Entretanto, não demonstrou efeito no período pós desmame.

A suplementação com probiótico *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 e simbiótico inulina + *S. cerevisiae* Sc47 afetam de maneira diferente o microbioma fecal de potros desmamados. No entanto, mais estudos são necessários para separar o efeito da suplementação probiótica sobre o pH fecal dos potros.

Os microbiomas fecais de potros machos e fêmeas são distintos, portanto, o sexo deve ser considerado em estudos futuros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELZER, C.; DE VOS, W. M. Microbes inside—from diversity to function: the case of Akkermansia. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1449-1458, 2012.
- BORDIN, A. I.; SUCHODOLSKI, JAN S.; MARKEL, MELISSA E.; WEAVER, KAYTEE B.; STEINER, J. M.; DOWD, S. E.; PILLAI, S.; COHEN, N. D. Effects of administration of live or inactivated virulent *Rhodococcus equi* and age on the fecal microbiome of neonatal foals. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66640, 2013.
- COSTA, M. C.; STÄMPFLI, H. R.; ALLEN-VERCOE, E.; WEESE, J. S. Development of the faecal microbiota in foals. **Equine veterinary journal**, v. 48, n. 6, p. 681-688, 2016.
- COSTA, M. C.; WEESE, J. S. Understanding the intestinal microbiome in health and disease. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 34, n. 1, p. 1-12, 2018.
- COVERDALE, J. A. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: Can the microbiome of the horse be altered to improve digestion?. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 6, p. 2275-2281, 2016.
- COVERDALE, J. A.; LAMPRECHT, E. D.; KROPP, P.; YOON, I.; LUCIA, J. L.; WINSKO, K. N.; HANSON, A. E.; WARZECHA, C. M. Influence of prebiotic and probiotic supplementation on apparent digestibility in mature geldings at maintenance. **J. Anim. Sci.**, v. 91, n. E-Suppl. 2, p. 565, 2013.
- CROWELL-DAVIS, S. L.; HOUP, K. A.; CARNEVALE, J. Feeding and drinking behavior of mares and foals with free access to pasture and water. **Journal of animal science**, v. 60, n. 4, p. 883-889, 1985.
- DIAS, A. C. C.; CABRAL, G. C.; SILVA, C. F.; FERREIRA, M. C. N.; FRANCO, T. W.; MOURA, R. A.; SILVA, V. P.; ALMEIRDA, F. Q. Development of Mangalarga Marchador suckling foals supplemented with fructooligosaccharides. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 9, p. 747-754, 2017.
- DOREAU, M.; BOULOT, S.; BARLET, J. P.; PATUREAU-MIRAND, P. Yield and composition of milk from lactating mares: effect of lactation stage and individual differences. **Journal of Dairy Research**, v. 57, n. 4, p. 449-454, 1990.
- EARING, J. E.; DURIG, A. C.; GELLIN, G. L.; LAWRENCE, L. M.; FLYTHE, M. D. Bacterial colonization of the equine gut; comparison of mare and foal pairs by PCR-DGGE. 2012.
- EDWARDS, J. E.; SHETTY, S. A.; VAN DER BERG, P.; BURDEN, F.; VAN DOORN, D. A.; PELLIKAAN, W. F.; DIJKSTRA, J.; SMIDT, H. Multi-kingdom characterization of the core equine fecal microbiota based on multiple equine (sub) species. **Animal Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2020.
- ERBER, R.; WULF, M.; ROSE-MEIERHÖFER, S.; BECKER-BIRCK, M.; MÖSTL, E.; AURICH, J.; HOFFMANN, G.; AURICH, C. Behavioral and physiological responses of young horses to different weaning protocols: a pilot study. **Stress**, v. 15, n. 2, p. 184-194, 2012.
- FAUBLADIER, C.; JULLIAND, V.; BEUNEICHE, L.; PHILIPPEAU, C. Comparative fibre-degrading capacity in foals at immediate and late post-weaning periods. **Animal: an International Journal of Animal Bioscience**, v. 11, n. 9, p. 1497, 2017.

- FAUBLADIER, C.; SADET-BOURGETEAU, S.; PHILIPPEAU, C.; JACOTOT, E.; JULLIAND, V. Molecular monitoring of the bacterial community structure in foal feces pre- and post-weaning. **Anaerobe**, v. 25, p. 61-66, 2014.
- FITZGERALD, D. M.; SPENCE, R. J.; STEWART, Z. K.; PRENTIS, P. J.; SILENCE, M. N.; DE LAAT, M. A. The effect of diet change and insulin dysregulation on the faecal microbiome of ponies. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 7, 2020.
- GORDON, M. E.; EDWARDS, M. S.; SWEENEY, C. R.; JERINA, M. L. Effects of added chelated trace minerals, organic selenium, yeast culture, direct-fed microbials, and *Yucca schidigera* extract in horses. Part I: Blood nutrient concentration and digestibility. **Journal of animal science**, v. 91, n. 8, p. 3899-3908, 2013.
- GRIMM, P.; COMBES, S.; PASCAL, G.; CAUQUIL, L.; JULLIAND, V. Dietary composition and yeast/microalgae combination supplementation modulate the microbial ecosystem in the caecum, colon and faeces of horses. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 4, p. 372-382, 2020.
- HU, D.; CHAO, Y.; LI, Y.; PENG, X.; WANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, D.; LI, K. Effect of gender bias on equine fecal microbiota. **Journal of Equine Veterinary Science**, p. 103355, 2020.
- JACQUAY, E.; ZEGLIN, L.; LILLICH, J.; JONES, E.; KOUBA, J. 63 Characterization of Foal Fecal Microbiome from Birth to Weaning and the Relationship to Mare Milk and Mare Feces. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. suppl_2, p. 33-33, 2018.
- JOHN, J.; ROEDIGER, K.; SCHROEDL, W.; ALDAHER, N.; VERVUERT, I. Development of intestinal microflora and occurrence of diarrhoea in sucking foals: effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* supplementation. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 34, 2015.
- JULLIAND, S.; MARTIN, A.; JULLIAND, V. Effect of live yeast supplementation on gastric ecosystem in horses fed a high-starch diet. **Livestock Science**, v. 215, p. 25-29, 2018.
- JULLIAND, V.; GRIMM, P. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **Journal of animal science**, v. 94, n. 6, p. 2262-2274, 2016.
- KANNO, M.; KATAYAMA, T.; MORITA, N.; TAMAKI, H.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y. *Catenisphaera adipataaccumulans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Erysipelotrichaceae isolated from an anaerobic digester. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. 3, p. 805-810, 2015.
- KIRMIZ, N.; GALINDO, K.; CROSS, K. L.; LUNA, E.; RHOADES, N.; PODAR, M.; FLORES, G. E. Comparative genomics guides elucidation of vitamin B12 biosynthesis in novel human-associated Akkermansia strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 3, 2020.
- LEMONS, L. N.; MEDEIROS, J. D.; DINI-ANDREOTE, F.; FERNANDES, G. R.; VARANI, A. M.; OLIVEIRA, G.; PYLRO, V. S. Genomic signatures and co-occurrence patterns of the ultra-small *Saccharimonadia* (phylum CPR/Patescibacteria) suggest a symbiotic lifestyle. **Molecular ecology**, v. 28, n. 18, p. 4259-4271, 2019.
- LINDENBERG, F.; KRYCH, L.; W. KOT, W.; FIELDEN, J.; H. FRØKIÆR, H.; VAN GALEN, V.; NIELSEN, D. S.; HANSEN, A. K. Development of the equine gut microbiota. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

- MACH, N.; FOURY, A.; KITTELMANN, S.; REIGNER, F.; MOROLDO, M.; BALLESTER, M.; ESQUERRÉ, D.; RIVIÈRE, J.; SALLÉ, G.; GÉRARD, P.; MOISAN, M. P.; LANSADE, L. The effects of weaning methods on gut microbiota composition and horse physiology. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 535, 2017.
- MSHELIA, E. S.; ADAMU, L.; WAKIL, Y.; TURAKI, U. A.; GULANI, I. A.; MUSA, J. The association between gut microbiome, sex, age and body condition scores of horses in Maiduguri and its environs. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 81-86, 2018.
- RESPONDEK, F.; GOACHET, A. G.; JULLIAND, V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change in diet. **Journal of animal science**, v. 86, n. 2, p. 316-323, 2008.
- SCHOSTER, A. Probiotic use in equine gastrointestinal disease. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 34, n. 1, p. 13-24, 2018.
- SCHOSTER, A.; GUARDABASSI, L.; STAEMPFLI, H. R.; ABRAHAMS, M.; JALALI, M.; WEESE, J. S. The longitudinal effect of a multi-strain probiotic on the intestinal bacterial microbiota of neonatal foals. **Equine veterinary journal**, v. 48, n. 6, p. 689-696, 2016.
- SCHOSTER, A.; WEESE, J. S.; GUARDABASSI, L. Probiotic use in horses—what is the evidence for their clinical efficacy?. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 28, n. 6, p. 1640-1652, 2014.
- SHARE, E. R.; BARNHART, K.; REDDISH, J. M.; COLE, K. 67 Influence of maternal dietary yeast supplementation on the diversity of hindgut microbial populations of Quarter Horse mares and their offspring. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 5, n. 35, p. 412, 2015.
- SPRING, S.; BUNK, B., SPRÖER, C.; SCHUMANN, P.; ROHDE, M.; TINDALL, B. J.; KLENK, H. P. Characterization of the first cultured representative of Verrucomicrobia subdivision 5 indicates the proposal of a novel phylum. **The ISME journal**, v. 10, n. 12, p. 2801-2816, 2016.
- WARAN, N. K.; CLARKE, N.; FARNWORTH, M. The effects of weaning on the domestic horse (*Equus caballus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 110, n. 1-2, p. 42-57, 2008.
- WEESE, J. S. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Journal of equine veterinary science**, v. 22, n. 8, p. 357-360, 2002.
- WEESE, J. S.; ROUSSEAU, J. Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 12, p. 2031-2034, 2005.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Compreender os fatores que afetam a estrutura da microbiota intestinal equina é crucial para o desenvolvimento de estratégias em vários âmbitos da produção. O microbioma fecal equino é dinâmico e foi influenciado pela composição da dieta, suplementação com aditivos, além dos desafios provocados com a troca abrupta da dieta e pelo desmame.

Os dados apresentados têm potencial para ajudar a estabelecer o manejo correto de adaptação e desadaptação a dietas a fim de evitar disbiose intestinal. Além disso, o uso do sequenciamento de nova geração para análise de microbioma pode auxiliar nas pesquisas de exigência de fibras para equinos, uma vez que a estabilidade da diversidade microbiana fecal parece estar associada à presença de volumoso e não ao aumento de carboidratos não fibrosos na dieta.

O microbioma fecal de potros machos e fêmeas são distintos, portanto, o sexo deve ser considerado em estudos futuros. Entretanto, equinos em manutenção, da mesma raça e sexo, expostos ao mesmo manejo e condições ambientais, pertencentes ao mesmo sistema de criação e sob o mesmo regime alimentar, apresentam estruturas semelhantes de comunidade bacteriana fecal.

Os aditivos zootécnicos testados apresentaram potencial de influenciar positivamente o microbioma fecal de potros, desse modo, possuem potencial de utilização na alimentação de equinos. Entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer categorias alvo, tempo de suplementação, doses, cepas e preparações simbióticas, assim como avaliar os efeitos a longo prazo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL JASSIM, R. A. M.; ANDREWS, F. M. The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 25, n. 2, p. 199-215, 2009.
- AL JASSIM, R. A.; SCOTT, P. T.; TREBBIN, A. L.; TROTT, D.; POLLITT, C. C. The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. 1, p. 75-81, 2005.
- ALEXANDER, F.; DAVIES, M. E.; MUIR, A. R. Bacteriophage-like particles in the large intestine of the horse. **Research in veterinary science**, v. 11, p. 592-593, 1970.
- ALMEIDA, M. L. M.; FERINGER JÚNIOR, W. H.; CARVALHO, J. R. G.; RODRIGUES, I. M.; JORDÃO, L. R.; FONSECA, M. G.; REZENDE, A. S. C.; QUEIROZ NETO, A.; WEESE, J. S.; COSTA, M. C. LEMOS, E. G. M.; FERRAZ, G. C. Intense exercise and aerobic conditioning associated with chromium or L-carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0167108, 2016.
- ANDREW, J. E.; KLINE, K. H.; SMITH, J. L. Effects of feed form on growth and blood glucose in weanling horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 8, p. 349-355, 2006.
- ANTWIS, R. E.; LEA, J. M.; UNWIN, B.; SHULTZ, S. Gut microbiome composition is associated with spatial structuring and social interactions in semi-feral Welsh Mountain ponies. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2018.
- ARGO, C. McG.; COX, J. E.; LOCKYER, C.; FULLER, Z. Adaptive changes in the appetite, growth and feeding behaviour of pony mares offered ad libitum access to a complete diet in either a pelleted or chaff-based form. **Animal Science**, v. 74, n. 3, p. 517-528, 2002.
- BARUC, C. J. **The characterization and nitrogen metabolism of equine cecal bacteria**. 1983. Tese de Doutorado. University of Kentucky.
- BATISTA, A. C.; VASCONCELOS, C. T.; FISCHMAN, O.; SILVA, J. O. Flora micótica intestinal de equinos e asininos, no Recife. **Boletim do Instituto de Micologia da Universidade de Recife**, v. 326, p. 1-16, 1961.
- BERG, E. L.; FU, C. J.; PORTER, J. H.; KERLEY, M. S. Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentrations. **Journal of animal science**, v. 83, n. 7, p. 1549-1553, 2005.
- BIDDLE, A. S.; BLACK, S. J.; BLANCHARD, J. L. An in vitro model of the horse gut microbiome enables identification of lactate-utilizing bacteria that differentially respond to starch induction. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77599, 2013.
- BLACKMORE, T. M.; DUGDALE, A.; ARGO, C. M.; CURTIS, G.; PINLOCHE, E.; HARRIS, P. A.; WORGAN, H. J.; GIRDWOOD, S. E.; DOUGAL, K.; NEWBOLD, C. J.; MCEWAN, N. R. Strong stability and host specific bacterial community in faeces of ponies. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75079, 2013.
- BONHOMME, A. Attachment of horse cecal bacteria to forage cell walls. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 48, n. 2, p. 313-322, 1986.
- BORDIN, A. I.; SUCHODOLSKI, JAN S.; MARKEL, MELISSA E.; WEAVER, KAYTEE B.; STEINER, J. M.; DOWD, S. E.; PILLAI, S.; COHEN, N. D. Effects of administration of

live or inactivated virulent *Rhodococcus equi* and age on the fecal microbiome of neonatal foals. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66640, 2013.

CANN, A. J.; FANDRICH, S. E.; HEAPHY, S. Analysis of the virus population present in equine faeces indicates the presence of hundreds of uncharacterized virus genomes. **Virus genes**, v. 30, n. 2, p. 151-156, 2005.

COSTA, M. C.; STÄMPFLI, H. R.; ARROYO, L. G.; ALLEN-VERCOE, E.; GOMES, R. G., & WEESE, J. S. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 19, 2015b.

COSTA, M. C.; ARROYO, L. G.; ALLEN-VERCOE, E.; STÄMPFLI, H. R.; KIM, P. T.; STURGEON, A.; WEESE, J. S. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41484, 2012.

COSTA, M. C.; SILVA, G.; RAMOS, R. V.; STAEMPFLI, H. R.; ARROYO, L. G.; KIM, P.; WEESE, J. S. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 74-80, 2015a.

COSTA, M. C.; STÄMPFLI, H. R.; ALLEN-VERCOE, E.; WEESE, J. S. Development of the faecal microbiota in foals. **Equine veterinary journal**, v. 48, n. 6, p. 681-688, 2016.

COSTA, M. C.; WEESE, J. S. The equine intestinal microbiome. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 121-128, 2012.

COSTA, M. C.; WEESE, J. S. Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, 2018.

COVERDALE, J. A. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: Can the microbiome of the horse be altered to improve digestion?. **Journal of animal science**, v. 94, n. 6, p. 2275-2281, 2016.

CURTIS, L.; BURFORD, J. H.; ENGLAND, G. C.; FREEMAN, S. L. Risk factors for acute abdominal pain (colic) in the adult horse: A scoping review of risk factors, and a systematic review of the effect of management-related changes. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0219307, 2019.

DALY, K.; PROUDMAN, C. J.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J.; DYER, J.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 7, p. 989-995, 2012.

DALY, K.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Design and evaluation of group-specific oligonucleotide probes for quantitative analysis of intestinal ecosystems: their application to assessment of equine colonic microflora. **FEMS Microbiology ecology**, v. 44, n. 2, p. 243-252, 2003.

DALY, K.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. **FEMS microbiology ecology**, v. 38, n. 2-3, p. 141-151, 2001.

DE FOMBELLE, A.; JULLIAND, V.; DROGOUL, C.; JACOTOT, E. Feeding and microbial disorders in horses: 1-Effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 9, p. 439-445, 2001.

DE FOMBELLE, A.; VARLOUD, M.; GOACHET, A. G.; JACOTOT, E.; PHILIPPEAU, C.; DROGOUL, C.; JULLIAND, V. Characterization of the microbial and biochemical profile of

the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. **Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 293-304, 2003.

DOUGAL, K., DE LA FUENTE, G., HARRIS, P. A., GIRDWOOD, S. E., PINLOCHE, E., GEOR, R. J.; NIELSEN, B. D.; SCHOTT II, H. C.; ELZINGA, S.; NEWBOLD, C. J. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e87424, 2014.

DOUGAL, K.; DE LA FUENTE, G.; HARRIS, P. A.; GIRDWOOD, S. E.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C. J. Identification of a core bacterial community within the large intestine of the horse. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77660, 2013.

DOUGAL, K.; HARRIS, P. A.; EDWARDS, A.; PACHEBAT, J. A.; BLACKMORE, T. M.; WORGAN, H. J.; NEWBOLD, C. J. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. **FEMS microbiology ecology**, v. 82, n. 3, p. 642-652, 2012.

DOUGAL, K.; HARRIS, P. A.; GIRDWOOD, S. E.; CREEVEY, C. J.; CURTIS, G. C.; BARFOOT, C. F.; ARGO, C. M.; NEWBOLD, C. J. Changes in the Total Fecal Bacterial Population in Individual Horses Maintained on a Restricted Diet Over 6 Weeks. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1502, 2017.

EARING, J. E.; DURIG, A. C.; GELLIN, G. L.; LAWRENCE, L. M.; FLYTHE, M. D. Bacterial colonization of the equine gut; comparison of mare and foal pairs by PCR-DGGE. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. 02, p. 79, 2012.

EARLE, I. P. Compression of complete diets for horses. **Journal of animal science**, v. 9, n. 3, p. 255-260, 1950.

EDWARDS, J. E.; SHETTY, S. A.; VAN DEN BERG, P.; BURDEN, F.; VAN DOORN, D. A.; PELLIKAAN, W. F.; DIJKSTRA, J.; SMIDT, H. Multi-kingdom characterization of the core equine fecal microbiota based on multiple equine (sub) species. **Animal Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2020.

ELIA, J. B.; ERB, H. N.; HOUP, K. A. Motivation for hay: effects of a pelleted diet on behavior and physiology of horses. **Physiology & behavior**, v. 101, n. 5, p. 623-627, 2010.

ELZINGA, S. E.; WEESE, J. S.; ADAMS, A. A. Comparison of the fecal microbiota in horses with equine metabolic syndrome and metabolically normal controls fed a similar all-forage diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 44, p. 9-16, 2016.

ENDO, A.; FUTAGAWA-ENDO, Y.; DICKS, L. M. T. Lactobacillus and Bifidobacterium diversity in horse feces, revealed by PCR-DGGE. **Current microbiology**, v. 59, n. 6, p. 651-655, 2009.

ENDO, A.; OKADA, S.; MORITA, H. Molecular profiling of Lactobacillus, Streptococcus, and Bifidobacterium species in feces of active racehorses. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 53, n. 3, p. 191-200, 2007.

ENDO, A.; ROOS, S.; SATOH, E.; MORITA, H.; OKADA, S. Lactobacillus equigenosus sp. nov., a coccoid species isolated from faeces of thoroughbred racehorses. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 4, p. 914-918, 2008.

ERBER, Regina et al. Behavioral and physiological responses of young horses to different weaning protocols: a pilot study. **Stress**, v. 15, n. 2, p. 184-194, 2012.

- FAO/WHO. Working group for drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002. Available at: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acessado em 5 de Dezembro de 2020.
- FAUBLADIER, C.; JULLIAND, V.; BEUNEICHE, L.; PHILIPPEAU, C. Comparative fibre-degrading capacity in foals at immediate and late post-weaning periods. **animal**, v. 11, n. 9, p. 1497-1504, 2017.
- FAUBLADIER, C.; JULLIAND, V.; DANIEL, J.; PHILIPPEAU, C. Bacterial carbohydrate-degrading capacity in foal faeces: changes from birth to pre-weaning and the impact of maternal supplementation with fermented feed products. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 6, p. 1040-1052, 2013.
- FAUBLADIER, C.; SADET-BOURGETEAU, S.; PHILIPPEAU, C.; JACOTOT, E.; JULLIAND, V. Molecular monitoring of the bacterial community structure in foal feces pre- and post-weaning. **Anaerobe**, v. 25, p. 61-66, 2014.
- FERNANDES, K. A.; KITTELMANN, S.; ROGERS, C. W.; GEE, E. K.; BOLWELL, C. F.; BERMINGHAM, E. N.; THOMAS, D. G. Faecal microbiota of forage-fed horses in New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112846, 2014.
- FLIEGEROVA, K.; MURA, E.; MRÁZEK, J.; MONIELLO, G. A comparison of microbial profiles of different regions of the equine hindgut. **Livestock Science**, v. 190, p. 16-19, 2016.
- FLINT, H. J.; BAYER, E. A. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 280-288, 2008.
- FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, n. 1, p. 67-75, 2002.
- GAILLARD-MARTINIE, B.; BRETON, A.; DUSSER, M.; JULLIAND, V. *Piromyces citronii* sp. nov., a strictly anaerobic fungus from the equine caecum: a morphological, metabolic, and ultrastructural study. **FEMS microbiology letters**, v. 130, n. 2-3, p. 321-326, 1995.
- GARBER, A., HASTIE, P., MCGUINNESS, D., MALARANGE, P., & MURRAY, J. A. Abrupt dietary changes between grass and hay alter faecal microbiota of ponies. **PlosOne**, v. 15, n. 8, p. E0237869, 2020.
- GARNER, H. E.; MOORE, J. N.; JOHNSON, J. H.; CLARK, L.; AMEND, J. F.; TRITSCHLER, L. G.; SALEM, C. A. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 10, n. 4, p. 249-252, 1978.
- GEYER, H.; DREPPER, K. Mikrobielle Einwirkungen auf die Verdauung beim Pferd. **Biologie und Biochemie der Verdauung**. BLV Verlagsgesellschaft, München, Germany, 1973.
- GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition research reviews**, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.
- GOACHET, A. G.; VARLOUD, M.; PHILIPPEAU, C.; JULLIAND, V. Long-term effects of endurance training on total tract apparent digestibility, total mean retention time and faecal microbial ecosystem in competing Arabian horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 387-392, 2010.

- GOLOMIDOVA, A.; KULIKOV, E.; ISAEVA, A.; MANYKIN, A.; LETAROV, A. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions. **Applied and environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 5975-5981, 2007.
- GOODSON, J.; TYZNIK, W. J.; CLINE, J. H.; DEHORITY, B. A. Effects of an abrupt diet change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1946-1950, 1988.
- GRIMM, P.; DE BARROS, J. P. P.; JULLIAND, V. Impact of diet on bacterial lipopolysaccharides in equine feces and blood. **Livestock Science**, v. 215, p. 2-6, 2018.
- GRIMM, P.; JULLIAND, V.; PHILIPPEAU, C.; SADET-BOURGETEAU, S. Effect of yeast supplementation on hindgut microbiota and digestibility of horses subjected to an abrupt change of hays. **Livestock Science**, v. 186, p. 34-40, 2016.
- GRØNVOLD, A. M. R.; L'ABÉE-LUND, T. M.; STRAND, E.; SØRUM, H.; YANNARELL, A. C.; MACKIE, R. I. Fecal microbiota of horses in the clinical setting: potential effects of penicillin and general anesthesia. **Veterinary microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 366-372, 2010.
- HAENLEIN, G. F. W.; HOLDREN, R. D.; YOON, Y. M. Comparative response of horses and sheep to different physical forms of alfalfa hay. **Journal of Animal Science**, v. 25, n. 3, p. 740-743, 1966.
- HANSEN, N. C. K.; AVERSHINA, E.; MYDLAND, L. T.; NÆSSET, J. A.; AUSTBØ, D.; MOEN, B.; MAGE, I.; RUDI, K. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, n. 1, p. 27216, 2015.
- HARHANGI, H. R.; FREELove, A. C.; UBHAYASEKERA, W.; VAN DINTHER, M., STEENBAKKERS, P. J.; AKHMANOVA, A.; VAN DER DRIFT, C.; JETTEN, M. S.; MOWBRAY, S. L.; GILBERT, H. J. Cel6A, a major exoglucanase from the cellulosome of the anaerobic fungi *Piromyces* sp. E2 and *Piromyces equi*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1628, n. 1, p. 30-39, 2003.
- HARLOW, B. E.; KAGAN, I. A.; LAWRENCE, L. M.; FLYTHE, M. D. Effects of inulin chain length on fermentation by equine fecal bacteria and *Streptococcus bovis*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 48, p. 113-120. e1, 2017b.
- HARLOW, B. E.; LAWRENCE, L. M.; FLYTHE, M. D. Diarrhea-associated pathogens, lactobacilli and cellulolytic bacteria in equine feces: Responses to antibiotic challenge. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 1-2, p. 225-232, 2013.
- HARLOW, B. E.; LAWRENCE, L. M.; HARRIS, P. A.; AIKEN, G. E.; FLYTHE, M. D. Exogenous lactobacilli mitigate microbial changes associated with grain fermentation (corn, oats, and wheat) by equine fecal microflora ex vivo. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0174059, 2017a.
- HARLOW, B. E.; LAWRENCE, L. M.; HAYES, S. H.; CRUM, A.; FLYTHE, M. D. Effect of dietary starch source and concentration on equine fecal microbiota. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0154037, 2016.
- HASTIE, P. M.; MITCHELL, K.; MURRAY, J.A. M. D. Semi-quantitative analysis of *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* and *Streptococcus bovis* in the equine large intestine using real-time polymerase chain reaction. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 561-568, 2008.

- HAYES, S.; WERNER, H.; LAWRENCE, L. In vitro assessment of fiber digestion capacity in foals. **Proceedings of the 18th Equine Nutrition and Physiology Symposium, East Lansing, MI, USA**, p. 273-274, 2003.
- HINTZ, H. F.; LOY, R. G. Effects of pelleting on the nutritive value of horse rations. **Journal of Animal Science**, v. 25, n. 4, p. 1059-1062, 1966.
- HYSLOP, J. J. Voluntary feed intake, apparent digestibility and nutritive values in ponies given ad libitum access to complete pelleted diets containing different levels of unmolassed sugar beet pulp. **British Society of Animal Science (BSAS Ed.)**, p. 32, 2002.
- JANSEN, W. L.; CONE, J. W.; GEELLEN, S. N. J.; VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. S.; VAN GELDER, A. H.; ELFERINK, S. O.; BEYNEN, A. C. High fat intake by ponies reduces both apparent digestibility of dietary cellulose and cellulose fermentation by faeces and isolated caecal and colonic contents. **Animal feed science and technology**, v. 133, n. 3-4, p. 298-308, 2007.
- JENKINS, T. C.; PALMQUIST, D. L. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 5, p. 978-986, 1984.
- JOHN, J.; ROEDIGER, K.; SCHROEDL, W.; ALDAHER, N.; VERVUERT, I. Development of intestinal microflora and occurrence of diarrhoea in sucking foals: effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* supplementation. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 34, 2015.
- JOUANY, J. P.; MEDINA, B.; BERTIN, G.; JULLIAND, V. 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. **Journal of animal science**, v. 87, n. 9, p. 2844-2852, 2009.
- JULLIAND, V.; DE FOMBELLE, A.; DROGOUL, C.; JACOTOT, E. Feeding and microbial disorders in horses: Part 3—Effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 11, p. 543-546, 2001.
- JULLIAND, V.; DE VAUX, A.; MILLET, L.; FONTY, G. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3738-3741, 1999.
- JULLIAND, V.; DEVAUX, A.; VILLARO, L.; RICHARD, Y. Preliminary studies on the bacterial flora of faeces taken from foals, from birth to twelve weeks. Effect of the oral administration of a commercial colostrum replacer. **Pferdeheilkunde**, v. 12, n. 3, p. 209-212, 1996.
- JULLIAND, V.; GOACHET, A. G. Fecal microflora as a marker of cecal or colonic microflora in horses. In: **Proceedings of the 19th Equine Science Symposium**. p. 140-1. 2005.
- JULLIAND, V.; GRIMM, P. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **Journal of animal science**, v. 94, n. 6, p. 2262-2274, 2016.
- JULLIAND, V.; GRIMM, P. The impact of diet on the hindgut microbiome. **Journal of equine veterinary science**, v. 52, p. 23-28, 2017.
- JULLIAND, V.; RIONDET, C.; DE VAUX, A.; ALCARAZ, G.; FONTY, G. Comparison of metabolic activities between *Piromyces citronii*, an equine fungal species, and *Piromyces communis*, a ruminal species. **Animal feed science and technology**, v. 70, n. 1-2, p. 161-168, 1998.

- KABE, A. M. G.; DE SOUZA, A. D.; SOUSA, R. L. M.; BUENO, I. C. S.; MOTA, T. P.; CRANDELL, K.; INGRID VERVUERT, I.; CORREA, G. F.; BRANDI, R. A. Soybean hulls in equine feed concentrates: Apparent nutrient digestibility, physicochemical and microbial characteristics of equine feces. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 36, p. 77-82, 2016.
- KERN, D. L.; SLYTER, L. L.; LEFFEL, E. C.; WEAVER, J. M.; OLTJEN, R. R. Ponies vs. Steers: Microbial and Chemical Characteristics of Intestinal Ingesta 1. **Journal of Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 559-564, 1974.
- KERN, D. L.; SLYTER, L. L.; WEAVER, J. M.; LEFFEL, E. C.; SAMUELSONS, G. Pony cecum vs. steer rumen: the effect of oats and hay on the microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 2, p. 463-469, 1973.
- KOLLARCZIK, B.; ENDERS, C.; FRIEDRICH, M.; GEDEK, B. Auswirkungen der Rationszusammensetzung auf das Keimspektrum im Jejunum von Pferden. In: **Europäische Konferenz über die Ernährung des pferdes. Physiologie und Pathologie des Verdauungskanals–Konsequenzen für die Ernährung, Hannover, Germany**. 1992.
- KULIKOV, E. E.; ISAEVA, A. S.; ROTKINA, A. S.; MANYKIN, A. A.; LETAROV, A. V. Diversity and dynamics of bacteriophages in horse feces. **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 236-242, 2007.
- LWIN, K.-O.; MATSUI, H. Comparative analysis of the methanogen diversity in horse and pony by using mcrA gene and archaeal 16S rRNA gene clone libraries. **Archaea**, v. 2014, 2014.
- MACH, N.; FOURY, A.; KITTELMANN, S.; REIGNER, F.; MOROLDO, M.; BALLESTER, M.; ESQUERRÉ, D.; RIVIÈRE, J.; SALLÉ, G.; GÉRARD, P.; MOISAN, M.; LANSADE, L. The effects of weaning methods on gut microbiota composition and horse physiology. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 535, 2017.
- MACKIE, R. I.; WILKINS, C. A. Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2155-2160, 1988.
- MACZULAK, A. E.; DAWSON, K. A.; BAKER, J. P. Nitrogen utilization in bacterial isolates from the equine cecum. **Applied and environmental microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1439-1443, 1985.
- MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. 2016. Disponível: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view>
- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**. v3, p.31, 2015.
- MEDINA, B.; GIRARD, I. D.; JACOTOT, E.; JULLIAND, V. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 10, p. 2600-2609, 2002.
- METCALF, J. L.; SONG, S. J.; MORTON, J. T.; WEISS, S.; SEGUIN-ORLANDO, A.; JOLY, F.; FEH, C.; TABERLET, P.; COISSAC, E.; AMIR, A.; WILLERSLEV, E.; KNIGHT, R.; MCKENZIE, V. ORLANDO, L. Evaluating the impact of domestication and captivity on the horse gut microbiome. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

- MILINOVICH, G. J., TROTT, D. J., BURRELL, P. C., VAN EPS, A. W., THOEFNER, M. B., BLACKALL, L. L.; AL JASSIM, R. A. M.; MORTON, J. M.; POLLITT, C. C. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 5, p. 885-898, 2006.
- MILINOVICH, G. J.; BURRELL, P. C.; POLLITT, C. C.; BOUVET, A.; TROTT, D. J. *Streptococcus henryi* sp. nov. and *Streptococcus caballi* sp. nov., isolated from the hindgut of horses with oligofructose-induced laminitis. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 1, p. 262-266, 2008.
- MILINOVICH, G. J.; TROTT, D. J.; BURRELL, P. C.; CROSER, E. L.; AL JASSIM, R. A.; MORTON, J. M.; POLLITT, C. C. Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 8, p. 2090-2100, 2007.
- MIRAGLIA, N.; BERGERO, D.; POLIDORI, M.; PEIRETTI, P. G.; LADETTO, G. The effects of a new fibre-rich concentrate on the digestibility of horse rations. **Livestock Science**, v. 100, n. 1, p. 10-13, 2006.
- MOORE, B. E.; DEHORITY, B. A. Effects of diet and hindgut defaunation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon of the horse. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 12, p. 3350-3358, 1993.
- MOREAU, M. M., EADES, S. C., REINEMEYER, C. R., FUGARO, M. N., & ONISHI, J. C. 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**, v. 168, n. 2-4, p. 436-441, 2014.
- MORITA, H.; SHIRATORI, C.; MURAKAMI, M.; TAKAMI, H.; KATO, Y.; ENDO, A.; NAKAJIMA, F.; TAKAGI, M.; AKITA, H.; OKADA, S.; MASAOKA, T. *Lactobacillus hayakitensis* sp. nov., isolated from intestines of healthy thoroughbreds. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2836-2839, 2007.
- MOROTOMI, M., YUKI, N., KADO, Y., KUSHIRO, A., SHIMAZAKI, T., WATANABE, K., & YUYAMA, T. *Lactobacillus equi* sp. nov., a predominant intestinal *Lactobacillus* species of the horse isolated from faeces of healthy horses. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 1, p. 211-214, 2002.
- MORRISON, P. K.; NEWBOLD, C. J.; JONES, E. WORGAN, H. J.; GROVE-WHITE, D. H.; DUGDALE, A. H.; BARFOOT, C. HARRIS, P. A.; ARGO, C. MCG. Effect of age and the individual on the gastrointestinal bacteriome of ponies fed a high-starch diet. **PloS one**, v. 15, n. 5, p. e0232689, 2020.
- MORRISON, P. K.; NEWBOLD, C. J.; JONES, E.; WORGAN, H. J.; GROVE-WHITE, D. H.; DUGDALE, A. H.; BARFOOT, C.; HARRIS, P. A.; ARGO, C. MCG. The equine gastrointestinal microbiome: impacts of age and obesity. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 3017, 2018.
- MORVAN, B.; RIEU-LESME, F.; FONTY, G.; GOUET, P. In vitro interactions between Rumen H₂-Producing Cellulolytic Microorganisms and H₂-Utilizing Acetogenic and Sulfate-Reducing Bacteria. **Anaerobe**, v. 2, n. 3, p. 175-180, 1996.
- MUHONEN, S.; CONNYSSON, M.; LINDBERG, J. E.; JULLIAND, V.; BERTILSSON, J.; JANSSON, A. Effects of crude protein intake from grass silage-only diets on the equine colon

- ecosystem after an abrupt feed change. **Journal of animal science**, v. 86, n. 12, p. 3465-3472, 2008.
- MUHONEN, S.; JULLIAND, V.; LINDBERG, J. E.; BERTILSSON, J.; JANSSON, A. Effects on the equine colon ecosystem of grass silage and haylage diets after an abrupt change from hay 1. **Journal of animal science**, v. 87, n. 7, p. 2291-2298, 2009.
- NADEAU, J. A.; ANDREWS, F. M.; MATHEW, A. G.; ARGENZIO, R. A.; BLACKFORD, J. T., SOHTELL, M.; SAXTON, A. M. Evaluation of diet as a cause of gastric ulcers in horses. **American journal of veterinary research**, v. 61, n. 7, p. 784-790, 2000.
- NAGATA, Y. Development of complete pelletized rations for racing horses at different stages of growth. **Experimental Reports of Equine Health Laboratory**, v. 1970, n. 7, p. 33-42, 1970a.
- NAGATA, Y.; MURAKAMI, M.; SAKURAI, N. Effect of Complete Pelletized Rations on the Growth of Race Horses. **Experimental Reports of Equine Health Laboratory**, v. 1970, n. 7, p. 43-57, 1970.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - **Nutrient Requirements of Horses**. Washington: National Academy Press, 2007, 6Ed, 341p.
- O'DONNELL, M. M., HARRIS, H. M. B., JEFFERY, I. B., CLAESSION, M. J., YOUNGE, B., O'TOOLE, P. W., & ROSS, R. P. The core faecal bacterial microbiome of Irish T thoroughbred racehorses. **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 6, p. 492-501, 2013.
- ORPIN, C. G. Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. **Microbiology**, v. 123, n. 2, p. 287-296, 1981.
- OTT, E. A.; KIVIPELTO, J.; MCQUAGGE, J. Feeding of complete, extruded feed to mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, n. 7, p. 459-462, 1999.
- PARKINS, J. J.; SNOW, D. H.; ADAMS, S. The apparent digestibility of 'complete diet' cubes given to thoroughbred horses and the use of chromic oxide as an inert faecal marker. **British Veterinary Journal**, v. 138, n. 4, p. 350-355, 1982.
- PELLEGRINI, L.; MILIANI, A.; BERGERO, D. Frutto-oligosaccaridi sulla microflora intestinale del cavallo sportivo: nota pratica. **Rivista Di Zootecnia E Veterinaria**, v. 27, n. 2, p. 49-51, 1999.
- PHILIPPEAU, C.; SADET-BOURGETEAU, S.; VARLOUD, M.; JULLIAND, V. Impact of barley form on equine total tract fibre digestibility and colonic microbiota. **animal**, v. 9, n. 12, p. 1943-1948, 2015.
- PROUDMAN, C. J.; HUNTER, J. O.; DARBY, A. C.; ESCALONA, E. E.; BATTY, C.; TURNER, C. Characterisation of the faecal metabolome and microbiome of Thoroughbred racehorses. **Equine veterinary journal**, v. 47, n. 5, p. 580-586, 2015.
- RALSTON, S. L. Controls of feeding in horses. **Journal of animal science**, v. 59, n. 5, p. 1354-1361, 1984.
- RALSTON, S. L.; VAN DEN BROEK, G.; BAILE, C. A. Feed intake patterns and associated blood glucose, free fatty acid and insulin changes in ponies. **Journal of animal science**, v. 49, n. 3, p. 838-845, 1979.
- RALSTON, Sarah L. Clinical nutrition of adult horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 6, n. 2, p. 339-354, 1990.

- RESPONDEK, F.; GOACHET, A. G.; JULLIAND, V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change in diet. **Journal of animal science**, v. 86, n. 2, p. 316-323, 2008.
- RIOND, J.-L.; LEONI, S.; WANNER, M. Etude comparative de trois modes de rationnement pour les chevaux du train de l'armée suisse Untersuchungen dreier Fütterungsmethoden bei den Pferden des Trains der Schweizer Armee. **Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde**, v. 142, n. 10, p. 570-580, 2000.
- SADET-BOURGETEAU, S.; JULLIAND, V. La diversité de l'écosystème microbien du tractus digestif équin. **INRA Prod. Anim**, v. 25, n. 5, p. 407-418, 2012.
- SADET-BOURGETEAU, S.; JULLIAND, V.; ELLIS, A. D.; LONGLAND, A. C.; COENEN, M.; MIRAGLIA, N. Equine microbial gastro-intestinal health. **The Impact of Nutrition on the Health and Welfare of Horses, EAAP Publications**, v. 128, p. 161-82, 2010.
- SADET-BOURGETEAU, S.; PHILIPPEAU, C.; DEQUIEDT, S.; JULLIAND, V. Comparison of the bacterial community structure within the equine hindgut and faeces using Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA). **animal**, v. 8, n. 12, p. 1928-1934, 2014.
- SALEM, S. E.; MADDOX, T. W.; BERG, A.; ANTCZAK, P.; KETLEY, J. M.; WILLIAMS, N. J.; ARCHER, D. C. Variation in faecal microbiota in a group of horses managed at pasture over a 12-month period. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 8510, 2018.
- SANTOS, A. S.; RODRIGUES, M. A. M.; BESSA, R. J. B.; FERREIRA, L. M.; MARTIN-ROSSET, W. Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. **Animal**, v. 5, n. 1, p. 48-56, 2011.
- SCHOSTER, A. Probiotic use in equine gastrointestinal disease. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 34, n. 1, p. 13-24, 2018.
- SCHOSTER, A.; WEESE, J. S.; GUARDABASSI, L. Probiotic use in horses—what is the evidence for their clinical efficacy?. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 28, n. 6, p. 1640-1652, 2014.
- SHARE, E. R.; BARNHART, K.; REDDISH, J. M.; COLE, K. 67 Influence of maternal dietary yeast supplementation on the diversity of hindgut microbial populations of Quarter Horse mares and their offspring. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 5, n. 35, p. 412, 2015.
- SHEPHERD, M. L.; SWECKER JR, W. S.; JENSEN, R. V.; PONDER, M. A. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. **FEMS microbiology letters**, v. 326, n. 1, p. 62-68, 2012.
- SMYTH, G. B.; YOUNG, DIANE W.; HAMMOND, LINDA S. Effects of diet and feeding on postprandial serum gastrin and insulin concentrations in adult horses. **Equine veterinary journal**, v. 21, n. S7, p. 56-59, 1989.
- STEELMAN, S. M.; CHOWDHARY, B. P.; DOWD, S., SUCHODOLSKI, J.; JANEČKA, J. E. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 231, 2012.
- STRASINGER, L. A.; FOWLER, A. L.; HAYES, S.; GELLIN, G. L.; FLYTHE, M. D.; LAWRENCE, L. M. The relationship of coprophagy to fecal microbial species richness in neonatal foals. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 5, p. 345, 2013.
- TANABE, S.; SUZUKI, T.; WASANO, Y.; NAKAJIMA, F.; KAWASAKI, H.; TSUDA, T.; MAGAMINE, N.; TSURUMACHI, T.; SUGAYA, K.; AKITA, H.; TAKAGI, M.; TAKAGI,

- K.; INOUE, Y.; ASAI, Y.; MORITA, H. Anti-inflammatory and Intestinal Barrier-protective Activities of Commensal Lactobacilli and Bifidobacteria in Thoroughbreds: Role of Probiotics in Diarrhea Prevention in Neonatal Thoroughbreds. **Journal of equine science**, v. 25, n. 2, p. 37-43, 2014.
- URBANIAK, C.; ANGELINI, M.; GLOOR, G. B.; REID, G. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 1, 2016.
- VAN WEYENBERG, S.; SALES, J.; JANSSENS, G. P. J. Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: A review. **Livestock science**, v. 99, n. 1, p. 3-12, 2006.
- VARLOUD, M.; DE FOMBELLE, A.; GOACHET, A. G.; DROGOUL, C.; JULLIAND, V. Partial and total apparent digestibility of dietary carbohydrates in horses as affected by the diet. **Animal Science**, v. 79, n. 1, p. 61-72, 2004.
- VARLOUD, M.; ROUSSEL, A.; BOISOT, P.; JULLIAND, V. A technique for the collection and the study of biochemical and microbial characteristics of postprandial gastric contents from conscious horses. **Animal feed science and technology**, v. 133, n. 3-4, p. 259-274, 2007.
- VENABLE, E. B., FENTON, K. A., BRANER, V. M., REDDINGTON, C. E., HALPIN, M. J., HEITZ, S. A., FRANCIS, J. M.; GULSON, N. A.; GOYER, C. L.; BLAND, S. D.; CROSS, T. W. L.; HOLSCHEER, H. D.; SWANSON, K. S. Effects of feeding management on the equine cecal microbiota. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 49, p. 113-121, 2017.
- WARAN, N. K.; CLARKE, N.; FARNWORTH, M. The effects of weaning on the domestic horse (*Equus caballus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 110, n. 1-2, p. 42-57, 2008.
- WEESE, J. S., HOLCOMBE, S. J., EMBERTSON, R. M., KURTZ, K. A., ROESSNER, H. A., JALALI, M., & WISMER, S. E. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post partum colic. **Equine veterinary journal**, v. 47, n. 6, p. 641-649, 2015.
- WEESE, J. S., HOLCOMBE, S. J., EMBERTSON, R. M., KURTZ, K. A., ROESSNER, H. A., JALALI, M., & WISMER, S. E. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post partum colic. **Equine veterinary journal**, v. 47, n. 6, p. 641-649, 2015.
- WEESE, J. S.; ROUSSEAU, J. Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 12, p. 2031-2034, 2005.
- WILLING, B.; VÖRÖS, A.; ROOS, S.; JONES, C.; JANSSON, A.; LINDBERG, J. E. Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. **Equine veterinary journal**, v. 41, n. 9, p. 908-914, 2009.
- WOLTER, R.; NOUWAKPO, F.; DURIX, A. Étude comparative de la digestion d'un aliment complet chez le poney et le lapin. **Reproduction Nutrition Développement**, v. 20, n. 5B, p. 1723-1730, 1980.
- YUKI, N.; SHIMAZAKI, T.; KUSHIRO, A.; WATANABE, K.; UCHIDA, K.; YUYAMA, T.; MOROTOMI, M. Colonization of the stratified squamous epithelium of the nonsecreting area of horse stomach by lactobacilli. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 11, p. 5030-5034, 2000.

ANEXOS

A – Números e links de acesso para sequências de nucleotídeos

Número de bioprojeto PRJNA640129 para sequências referentes ao Capítulo II e III, e bioprojeto PRJNA695245 no site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>

B – Protocolo da Comissão de Ética no Uso Animal referente aos Capítulos I, II e III.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFRRJ/IZ

DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto intitulado "Avaliação de dieta total extrusada em equinos.", processo nº 23083.029756/2017-10, coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Queiroz de Almeida está de acordo com as normas do uso de animais em atividades de ensino e pesquisa do CONCEA e foi aprovado pela CEUA/UFRRJ/IZ.

Seropédica, 12 de dezembro de 2017

Rodrigo Vasconcelos de Oliveira
Prof. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira
Coordenador da CEUA-IZ

Prof. Rodrigo V. de Oliveira
DPA/IZ/UFRRJ
SIAPE: 2142739



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
COMISSÃO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFRRJ/IZ

DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto intitulado “Utilização de creep-feeding e de aditivos dietéticos em potros da raça Mangalarga Marchador.”, processo nº 23083.001560/2018-41, sob responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Queiroz de Almeida está de acordo com as normas do uso de animais em atividades de ensino e pesquisa do CONCEA e foi aprovado na XXV Reunião da CEUA/UFRRJ/IZ em 06/06/2018.

Seropédica, 11 de junho de 2018

A handwritten signature in black ink, reading 'Rodrigo Vasconcelos de Oliveira', is written over a horizontal line.

Prof. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

Coordenador da CEUA-IZ

Prof. Rodrigo V. de Oliveira
DPA/IZ/UFRRJ
SIAPE: 2142739