

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIA DE ASSIS ARANTES

**Microbiota fecal, intestinal e translocação bacteriana em equinos com  
síndrome cólica cirúrgica**

---

Pirassununga

2023

JULIA DE ASSIS ARANTES

**Microbiota fecal, intestinal e translocação bacteriana em equinos com  
síndrome cólica cirúrgica**

*Versão corrigida*

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Gebara Sampaio Dória

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Carvalho da Costa

---

Pirassununga

2023

**Título: Microbiota fecal, intestinal e translocação bacteriana em equinos com síndrome cólica cirúrgica**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para o cumprimento de uma etapa do programa de doutorado em Biociência Animal.

Aprovado em: 22/11/2023.

**Banca Examinadora**

- Prof. Dra. Renata Gebara Sampaio Dória

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

- Prof. Dr. Rafael Resende Faleiros

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Julgamento: Aprovada

- Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Julgamento: Aprovada

- Prof. Dra. Carla Bargi Belli

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

- Prof. Dr. Vinicius Silveira Raposo

Instituição: Instituto Federal Minas Gerais

Julgamento: Aprovada

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação,  
FZEA/USP, com os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

A662m Arantes, Julia de Assis  
Microbiota fecal, intestinal e translocação  
bacteriana em equinos com síndrome cólica cirúrgica /  
Julia de Assis Arantes ; orientadora Renata Gebara  
Sampaio Dória ; coorientador Márcio Carvalho Costa. -  
- Pirassununga, 2023.  
121 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em  
Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e  
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Cirurgia de equinos. 2. Microbioma. 3.  
Translocação bacteriana. 4. Abdome agudo. 5.  
Cavalos. I. Dória, Renata Gebara Sampaio, orient.  
II. Costa, Márcio Carvalho, coorient. III. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL, INTESTINAL E PERITONEAL DE EQUINOS COM SÍNDROME CÔLICA CIRÚRGICA", protocolada sob o CEUA nº 5405101019 (ID 001417), sob a responsabilidade de **Renata Gebara Sampaio Dória e equipe; Julia de Assis Arantes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 28/01/2020.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE FECAL, INTESTINAL AND PERITONEAL MICROBIOTA OF EQUINE SURGICAL COLIC SYNDROME", utilizing 54 Equines (males and females), protocol number CEUA 5405101019 (ID 001417), under the responsibility of **Renata Gebara Sampaio Dória and team; Julia de Assis Arantes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 01/28/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [02/2020](#) a [03/2022](#)

Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem: [Hospital Veterinário UDCH](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [3 a 12 anos](#)

N: [30](#)

Linhagem: [SRD](#)

Peso: [300 a 600 kg](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [3 a 12 anos](#)

N: [24](#)

Linhagem: [SRD](#)

Peso: [300 a 600 kg](#)

Local do experimento: Hospital Veterinário (UDCH) - Clínica médica - Centro cirúrgico - Laboratório de análises clínicas UDCH - Laboratório de microbiologia FZEA/USP Hospital Veterinário de Batatais (apenas para colheita de amostra) - Clínica médica - Centro cirúrgico Hospital Veterinário da Universidade Brasil Campus Descalvado (apenas para colheita de amostra) - Clínica médica - Centro cirúrgico

Pirassununga, 19 de maio de 2021

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Profa. Renata, por sempre me apoiar nas minhas escolhas e me orientar dentro e fora da academia. Com você, pude aprender muito sobre cavalos, cirurgia e pesquisa. E até hoje, aprendo muito! Foram tantos anos trabalhando juntas, que mesmo que essa etapa esteja se encerrando, você sempre será a minha mentora no coração. Obrigada por tanto!

Em segundo lugar, gostaria de agradecer ao Prof. Márcio. Que me abriu portas para uma das experiências mais especiais da minha vida. Viver no Canadá! Assim como a Renata, você também foi uma pessoa que me deu muita confiança e liberdade para trabalhar. Com você pude aprender muito sobre microbiota, metodologia científica e pesquisa de uma forma geral. Você me apresentou a diversos profissionais e equipes e com isso também pude enriquecer muito o meu conhecimento e fazer diversas conexões, obrigada!

Em terceiro lugar, gostaria de agradecer a todos os pós-graduandos que me acompanharam nessa trajetória, mas em especial Pedro e Marília. Em maior ou menor convivência, desde 2010 estamos juntos nessa trajetória. Na esfera de pós-graduandos LACCRE, vocês foram os que mais me acompanharam nas experiências boas, aprendizados e dificuldades que tivemos ao longo desses anos. E foi ótimo poder dividir isso com vocês.

A todos os alunos de iniciação científica que colaboraram de alguma forma nesse projeto, mas em especial, à minha pupila Letícia, que foi uma grande companheira nos períodos pandêmicos, desde a microbiologia à cirurgia. E aos residentes que passaram pelo hospital durante o período desse trabalho.

Ao professor Valadão, por abraçar a nossa causa do projeto temático e ajudar essa ideia a sair do papel, tornando-a viável e possível. Agradeço também a toda equipe de UNESP de Jaboticabal envolvida nesse projeto, em especial, Camila e Caio Bustamante.

Gostaria de agradecer também à Dani Passarelli, por estar sempre disposta a rodar as amostras e fazer tudo o possível para que a gente conseguisse fazer o projeto, mesmo na pandemia. Assim como Prof. Adriano e os anestesistas que fizeram parte disso.

Agradeço ao Prof. Ricardo Moro, por ter cedido as dependências do seu laboratório para eu realizar todas as culturas e guardar as amostras. Bem como, à Silvia, pelo suporte dado no laboratório. Agradeço também à minha vizinha Andreia e ao Carlos do Qualileite, pelos conselhos microbiológicos ao longo desse processo.

Agradeço de coração à CAPES, por ter me financiado durante toda essa trajetória, dentro e fora do Brasil. Sem esse financiamento, não seria possível realizar tudo o que realizei e aprender tudo que aprendi. Ainda, ao financiamento do projeto temático pela FAPESP. Agradeço também à toda equipe de pós-graduação, em especial, Kefilin, Paula e Érica, por todo suporte, retirada de dúvidas e auxílio durante todos os anos de mestrado e doutorado.

Agradeço a todos os professores da Biociência Animal, que em maior ou menor grau, contribuíram para o meu crescimento profissional. Mas em especial Heidge, Juliano, Percin e Deise. Foi ótimo aprender com vocês durante os meus períodos de representação discente e organizações de simpósios. Aos professores de equinos que ficam no campus, Gobesso, Romero e Roberta, que no doutorado ou antes disso, com certeza contribuíram para o conhecimento que tenho hoje. Ao meu professor de inglês, Vinicius e a de francês, Val. Sem vocês minha experiência não teria sido tão rica no Canadá. E por fim, minha professora de francês do Canadá, Danael, uma perfeita inspiração na arte de ensinar.

A todos os funcionários da portaria, limpeza, segurança e trato da FZEA-USP. Vocês são fundamentais para todos os trabalhos que executamos na universidade.

A todos os cavalos desse período de doutorado. Sejam os que entraram para o projeto ou não... aprendi muito com eles! Eles fazem todo o cansaço e empenho valerem à pena!

Aos meus companheiros de trabalho da Horse Vet, por tantos aprendizados do último ano. E por todo apoio na minha reta final de doutorado.

À FZEA-USP, que foi meu local de estudo, trabalho, lazer, passeio e lugar favorito dos meus doguitos. Foram tantas experiências, que não cabem em palavras o quão especial esse lugar é para mim. E à Universidade de Montreal, que tão bem me acolheu no período de intercâmbio.

Às minhas amigas irmãs, da faculdade e da vida, pelas companhias à distância ou fisicamente, pelas palavras amigas e amizade de sempre. A todos os meus amigos do Canadá, mais conhecidos como “Les Immigrants” e todas as companheiras de laboratório. Em especial, gostaria de agradecer à Laura Franco, Jean, Vitória, Pedro e Dewison, foi incrível dividir a vida fora do Brasil com vocês, obrigada por todas as experiências incríveis e histórias vividas e todo o apoio no luto pelo meu pai. Vocês vão ter sempre um lugar no meu coração.

Ao meu companheiro Gustavo, por todo amor, carinho e companhia ao longo dos últimos anos. Por todo apoio aos meus desejos profissionais, pelos bons momentos bons vividos juntos e pelo cuidado comigo nos momentos desafiadores, pessoais e profissionais, que tive que enfrentar durante essa trajetória. O seu apoio e amor foram fundamentais para tornar tudo possível. Amo você e nossos cachorros. Obrigada também a toda sua família, por todo carinho de sempre.

Aos meus amados irmãos, Luiza, Martim e Pedro, e minha mãe, Claudia, por todo amor e união, mesmo que longe fisicamente. Ao meu querido pai, Francisco, e minha avó, Vera, que partiram durante essa trajetória, deixando um baía aperto no peito. O amor que sinto por todos vocês, é enorme! E muito do que sei e sou hoje, é reflexo de tudo que me ensinaram, me amaram e fizeram por mim. Agradeço também pelo nascimento do meu sobrinho Bento, que veio para trazer muita alegria para a nossa família.

O sentimento de gratidão é enorme! Nesse momento, não encerro apenas o meu doutorado, mas sim, uma trajetória de 14 anos de aluna USP, que foram vividos muito intensamente em cada etapa. Para todos que colaboraram de alguma forma para que esse projeto e doutorado fossem realizados, o meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) número do processo 2020/09633-0.

*“Faça do amor o seu guia permanente  
e tudo de bom há de vir às suas mãos”*

*Dinamor*

## RESUMO

ARANTES, J.A. **Microbiota fecal, intestinal e translocação bacteriana em equinos com síndrome cólica cirúrgica**. 2023. 121 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

A síndrome cólica é uma enfermidade importante em equinos, que pode apresentar alterações significativas na microbiota do trato gastrointestinal. A compreensão dessas alterações pode abrir caminho para novas abordagens preventivas e terapêuticas. Esse estudo avaliou a microbiota fecal e intestinal de equinos com síndrome cólica submetidos à celiotomia exploratória e verificou a ocorrência de translocação bacteriana para o líquido peritoneal. Para isso, 41 equinos com síndrome cólica de resolução cirúrgica foram selecionados e no momento pré-operatório, foram obtidas informações do paciente e colhidas amostras de sangue e fezes. No trans operatório foram colhidos sangue venoso, líquido peritoneal, conteúdo cecal e do segmento intestinal acometido. No pós-cirúrgico, 24h e 48h, após a recuperação anestésica, foram colhidos líquido peritoneal e fezes e, 72h após, apenas fezes. Como grupo controle para as amostras de fezes, essas amostras foram colhidas de 12 cavalos residentes da mesma propriedade dos animais com cólica. Além disso, foram colhidas fezes dos cavalos 6 meses após a cirurgia. Com sangue e líquido peritoneal, foram feitos hemograma, contagem de células no líquido peritoneal, proteína total, fosfatase alcalina, fósforo inorgânico, glicose e lactato em ambos os tipos de amostras. Com as fezes, conteúdos intestinais e líquido peritoneal foi realizado o sequenciamento genético (região V4 16S rRNA) para obtenção da microbiota e verificação da ocorrência da translocação bacteriana para o líquido peritoneal. No líquido peritoneal, também foi realizada a cultura e identificação dos isolados pela técnica de MALDI-TOF. Os cavalos foram comparados quanto ao diagnóstico, tipo de lesão, região da lesão, tempo de duração até a admissão no hospital e desfecho clínico. Foram encontradas alterações em microbiota fecal e intestinal na riqueza, diversidade e composição da microbiota, apresentando diferenças de acordo com tipo de lesão (estranhulativa e não estranhulativa), região da lesão (intestino grosso e delgado) e tempo de duração (<24h ou >24h), sugerindo que diversos fatores podem influenciar a disbiose nessa enfermidade. Além disso, as fezes apresentaram composição microbiana diferente de outros segmentos do intestino grosso, indicando que em casos de cólica, podem não ser representativas desse segmento intestinal. As fezes de cavalos com cólica foram diferentes de cavalos saudáveis, bem como, após 6 meses de cirurgia, haviam retornado



à composição similar a de seus companheiros saudáveis, indicando que mesmo com o distúrbio da cólica e a intervenção cirúrgica, eles são capazes de reestabelecer a microbiota após esse período. Além disso, foi observado que a técnica de sequenciamento genético é desafiadora para amostras de baixa biomassa, como o líquido peritoneal, mas foi possível identificar a translocação bacteriana, por meio de diferenças entre as amostras de líquido peritoneal do trans cirúrgico quando comparados aos cavalos saudáveis ou ao momento do pós-operatório, quando estavam sob efeito de antibióticos. Essas diferenças foram evidenciadas para riqueza, diversidade e composição da microbiota. Os cavalos com lesões de intestino grosso apresentaram maior riqueza e diversidade da comunidade bacteriana no líquido peritoneal, indicando maiores indícios de translocação bacteriana, bem como, animais com essas características microbiológicas, apresentaram maior chance de complicações incisionais.

**Palavras-chave:** cavalos, abdome agudo, sequenciamento genético, microbioma, disbiose

## ABSTRACT

ARANTES, J.A. **Fecal and intestinal microbiota, and bacterial translocation in horses with surgical colic syndrome.** 2023. 121 f. PhD (Thesis) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2023

Colic syndrome is an important disease in horses, which can present significant changes in the microbiota of the gastrointestinal tract. Understanding these changes may help to find new preventive and therapeutic approaches. The goal of this study was to evaluate the fecal and intestinal microbiota of horses with colic undergoing exploratory celiotomy and verify the occurrence of bacterial translocation into the peritoneal fluid. For this, 41 horses with colic that underwent to surgical management were selected, and in the preoperative moment, information was obtained from the patient, and blood and fecal samples were collected. During the surgery, venous blood, peritoneal fluid, cecal content, and the affected intestinal segment content were collected. In the post-surgical period, 24h and 48h, after anesthetic recovery, peritoneal fluid and feces were collected and, 72h later, only feces. As a control group for fecal samples, 12 animals living on the same property as the animals with colic, had fecal samples collected. In addition, fecal samples were collected from the colic horses 6 months after surgery. With the blood and peritoneal fluid samples, evaluations of blood count, cell count in the peritoneal fluid, and total protein, alkaline phosphatase, inorganic phosphorus, glucose, and lactate were carried out in both types of samples. Genetic sequencing (V4 16S rRNA region) was carried out with the feces, intestinal contents, and peritoneal fluid to obtain the intestinal and fecal microbiota and verify the occurrence of bacterial translocation into the peritoneal fluid. In peritoneal fluid samples, culture and identification of isolates were also performed using the MALDI-TOF technique. The horses were compared regarding diagnosis, type of injury, region of injury, time until hospital admission, and clinical outcome. Changes were found in fecal and intestinal microbiota in the richness, diversity, and composition of the microbiota, showing differences according to the type of injury (strangulation and non-strangulation), region of the injury (large and small intestine), and duration (<24h or >24h), suggesting that several factors can influence dysbiosis in this disease. Furthermore, fecal samples showed a different microbial composition from other segments of the large intestine, indicating that in cases of colic, fecal samples may not be representative of this intestinal segment. Fecal samples from horses with colic were different from healthy horses, and after 6 months of surgery, they had returned to a

composition like their healthy counterparts, indicating that even with the colic disorder and surgical intervention, they can reestablish the microbiota after this period. Furthermore, it was observed that the genetic sequencing technique is challenging for low biomass samples, such as peritoneal fluid. Still, it was possible to identify bacterial translocation, through differences between peritoneal fluid samples from horses with colic, when compared to healthy horses or during the postoperative period, when they were receiving antibiotics. These differences were evident in the richness, diversity, and composition of the microbiota. Horses with large intestine lesions showed greater richness and diversity of the bacterial community of peritoneal fluid, indicating strong evidence of bacterial translocation, as well as horses with these microbiological characteristics, presenting a greater chance of incisional complications.

**Keywords:** horses, acute abdomen, genetic sequencing, microbiome, dysbiosis

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

- Figura 1. Dados individuais de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória e identificados quanto ao diagnóstico, tipo de lesão, região da lesão, tempo de duração até a admissão no hospital e desfecho clínico..... 58
- Figura 2. Gráficos de violino representando mediana, intervalo interquartil e densidade do número de espécies observadas (OTUs) das amostras de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos à cirurgia de celiotomia exploratória.. ..... 60
- Figura 3. Diagramas de caixa representando valores de mediana, mínimo e máximo do índice de Chao de amostras de fezes pré-operatórias de cavalos com cólica que foram submetidos a cirurgia de laparotomia exploratória..... 61
- Figura 4. Valores médios de abundância relativa dos principais gêneros (>1%) contidos em amostras de conteúdo de intestino delgado (Small Intestine), ceco (Cecum), cólon maior (Large Colon) colhidas durante a cirurgia de celiotomia exploratória, e fezes pré-operatórias (Feces PreOp), colhidas no momento da admissão de cavalos com cólica que necessitaram de correção cirúrgica. .... 62
- Figura 5. Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível de gênero pela análise de Jaccard de amostras de conteúdo de intestino delgado (Small Intestine), ceco (Cecum), cólon maior (Large Colon), colhidas durante a cirurgia de celiotomia exploratória, e fezes pré-operatórias (Feces PreOp), colhidas no momento da admissão, de cavalos com cólica que necessitaram de correção cirúrgica. .... 63
- Figura 6 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível de gênero pela análise de Jaccard de amostras de fezes pré-operatórias subdivididas em: cólicas de intestino grosso de duração >24h (Long LI), cólicas de intestino grosso de duração < 24h (Short LI), cólicas de intestino delgado de duração >24h (Long SI), cólicas de intestino delgado de duração < 24h (Short SI), colhidas no momento da admissão hospitalar ..... 64
- Figura 7 – Valores médios de abundância relativa dos principais gêneros (>1%) contidos em amostras de fezes pré-operatórias (Feces PreOp), colhidas no momento da admissão hospitalar, um dia após a cirurgia de celiotomia exploratória (Day 1), dois dias depois (Day 2), três dias depois (Day 3) e seis meses depois (6 months), de cavalos com cólica que necessitaram de correção cirúrgica. E de fezes de cavalos controles (Control), animais saudáveis provenientes da mesma propriedade de parte dos cavalos com cólica. .... 65
- Figura 8 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível gênero pela análise de Jaccard de amostras de fezes pré-operatórias (Feces PreOp), colhidas no momento da admissão hospitalar, um dia após a cirurgia de celiotomia exploratória (Day 1), dois dias depois (Day 2), três dias depois (Day 3), de cavalos com cólica que necessitaram de correção cirúrgica. .... 65

- Figura 9 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível gênero pela análise de Jaccard de amostras de fezes pré-operatórias (Feces PreOp, N=27), colhidas no momento da admissão hospitalar, após 6 meses da celiotomia exploratória (Feces 6 months, N=12) e de fezes de cavalos controles (Feces Control, N=12), animais saudáveis provenientes da mesma propriedade dos cavalos com cólica. .... 65
- Figura 10 - Análise Discriminante Linear pelo Efeito de Tamanho (LefSe) demonstrando os gêneros bacterianos significativamente associados a cada grupo (escore LDA > 2), sendo em vermelho o grupo cólica, representado pelas amostras de fezes pré-operatórias (Feces PreOp), e em verde, amostras de fezes de cavalos saudáveis, provenientes da mesma propriedade de parte dos cavalos com cólica (Feces Control). .... 67
- Figura 11 - Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível de gênero pela análise de Jaccard de amostras líquidas de conteúdo cecal aspiradas no momento transcirúrgico de celiotomia exploratória de cavalos com síndrome cólica. Os pontos amarelos representam as amostras cecais de todas as cólicas estrangulativas (Strangulating) incluídas no estudo e os pontos verdes escuros, as não estrangulativas (NonStrangulating) ..... 69
- Figura 12 - Análise de coordenadas principais (PCoA) da estrutura da comunidade bacteriana utilizando o nível de gênero pela análise de Yue & Clayton de amostras de conteúdo de cólon maior colhidas no momento transcirúrgico de celiotomia exploratória de cavalos com síndrome cólica. Os pontos rosas representam as amostras de conteúdo de cólon maior de cavalos com torção de cólon maior (LCV) e os pontos pretos, as cólicas por obstrução intraluminal de intestino grosso (LIIO) ..... 70

### Capítulo 3

- Figura 1. Representação dos escores e classificação da escala de pontuação de avaliação macroscópica intestinal de equinos submetidos a celiotomia exploratória. .... 87
- Figura 2. Gráficos de violino representando mediana, intervalo interquartil e densidade do número de gêneros observadas (OTUs), índice de Chao ou índice de Simpson das amostras de líquido peritoneal de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos à cirurgia de celiotomia exploratória e cavalos saudáveis. .... 98
- Figura 3. Análise de coordenadas principais (PCoA) da estrutura das comunidades bacterianas utilizando o nível gênero pela análise de Yue and Clayton das amostras de líquido peritoneal de cavalos com síndrome cólica com lesões de intestino delgado (PF Small Intestinal Colic 1 e 2) e de intestino grosso (PF Large Intestinal Colic) que foram submetidos à cirurgia de celiotomia exploratória, bem como de cavalos saudáveis (PF Healthy Horses), e do grupo controle negativo composto apenas por reagentes do kit de extração de DNA (White – Qiagen Kit). .... 100
- Figura 4. Análise de coordenadas principais (PCoA) da estrutura das comunidades bacterianas utilizando o nível gênero pela análise de Yue and Clayton das amostras de líquido peritoneal de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos à cirurgia de

celiotomia exploratória, no dia 1 pós-operatório (PF Post Surgery Day 1), no dia 2 pós-operatório (PF Post Surgery Day 2), bem como de cavalos saudáveis (PF Healthy Horses..  
..... 101

Figura 5. Análise Discriminante Linear pelo Efeito de Tamanho (LefSe) demonstrando os gêneros bacterianos significativamente associados a cada grupo (escore LDA > 2), sendo em vermelho, as bactérias das amostras de líquido peritoneal de cavalos saudáveis juntamente às amostras do controle negativo (Controls), em verde, as bactérias das amostras de líquido peritoneal de cavalos com cólica cirúrgica de lesões de intestino grosso (PF Large Int) e, em azul, as bactérias das amostras de líquido peritoneal de cavalos com cólica cirúrgica de lesões de intestino delgado (PF Small Int)..... 103

Figura 6. Valores absolutos de coeficiente de correlação e respectivos p valores (identificados acima de cada coluna) para índices de alfa diversidade (N° de gêneros, Chao, Shannon e Simpson) que foram correlacionados com a região intestinal (intestino grosso ou delgado), deslocamento de cólon maior, obstrução de intestino delgado, proteína total e complicação incisional (presente ou ausente). ..... 105

Figura 7. Gráficos de violino representando mediana, intervalo interquartil e densidade dos valores de proteína total do líquido peritoneal (Total Protein PF) em mg/dL de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos à celiotomia exploratória. A) Dados de proteína total do líquido peritoneal comparando os grupos pela região intestinal acometida B) Dados de proteína total do líquido peritoneal comparando os grupos pelo tipo de cólica. Legenda: Líquido peritoneal (PF) de cavalos com lesão de intestino delgado (Small Intestine) e intestino grosso (Large Intestine. Líquido peritoneal (PF) de cavalos com lesão intraluminal obstrutiva simples (LIIO), deslocamento de cólon maior (LCD), torção de cólon maior (LCV), obstrução intraluminal de intestino delgado (SIIO), obstrução estrangulativa de intestino delgado (SISO). Letras maiúsculas dentro do mesmo gráfico denotam diferença entre as médias de cada grupo experimental ..... 107

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo 2

Tabela 1. Valores médios e desvio padrões de dos índices de alfa diversidade (Espécies Observadas, Chao, Inverso de Simpson e Shannon) das amostras de intestino delgado, ceco, cólon maior e fezes (pre-operatório, dia 1 pós-cirúrgico, dia 2 pós-cirúrgico, dia 3 p pós-cirúrgico e 6 meses pós cirúrgico), de cavalos com cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória e valores médios e desvio padrão, das amostras de fezes de cavalos controle saudáveis. .... 59

Tabela Suplementar 1. Dados individuais de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória e identificados quanto ao diagnóstico, tipo de lesão, região da lesão, tempo de duração até a admissão no hospital e desfecho clínico. .... 82

### Capítulo 3

Tabela 1. Representação dos escores e classificação da escala de pontuação de avaliação macroscópica intestinal de equinos submetidos a celiotomia exploratória. Coloração da serosa e mucosa: rósea (0), avermelhada/congesta (1), roxa (2) e negra (3); Manchas vaso-sanguíneas: ausente (0), petéquias (1), equimoses (2) e hematomas (3) (Figura 3); Distensão: ausente (0), pouca distensão (1), moderada distensão (2) e demasiada distensão (3); Espessura: fisiológica (0), pouco espessa (1), moderadamente espessa (2) e demasiadamente espessa (3). .... 88

Tabela 2. Dados individuais de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória e identificados quanto ao diagnóstico, tipo de lesão, região da lesão, tempo de duração até a admissão no hospital, desfecho clínico, risco de vida e escore de avaliação macroscópica intestinal. .... 95

Tabela 3. Valores médios e desvio padrões de dos índices de alfa diversidade (gêneros observados (OTUs), Chao, Simpson e Shannon) das amostras de intestino delgado, ceco, cólon maior e fezes (pre-operatório, dia 1 pós-cirúrgico, dia 2 pós-cirúrgico, dia 3 p pós-cirúrgico e 6 meses pós cirúrgico), de cavalos com cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória e valores médios e desvio padrão, das amostras de fezes de cavalos controle saudáveis. Letras maiúsculas na mesma coluna denotam diferença entre as médias de cada grupo experimental ou momento de colheita  $p < 0.05$ . .... 97

Tabela 4. Dados de avaliação macroscópica intestinal (distensão, coloração da mucosa e serosa, manchas vaso-sanguíneas, espessura e pontuação final), avaliação da ferida cirúrgica e tempo de duração da cólica de cavalos submetidos à celiotomia exploratória. Escores dos parâmetros da avaliação macroscópica intestinal: coloração da serosa e mucosa: rósea (0), avermelhada/congesta (1), roxa (2) e negra (3); manchas vaso-sanguíneas: ausente (0), petéquias (1), equimoses (2) e hematomas (3) (Figura 3); distensão: ausente (0), pouca distensão (1), moderada distensão (2) e demasiada distensão (3); espessura: fisiológica (0), pouco espessa (1), moderadamente espessa (2) e demasiadamente espessa (3). .... 104

Tabela Suplementar 1. Dados de valor mínimo, máximo, média, mediana, desvio padrão (DP) e erro padrão (EP) dos parâmetros avaliados ao realizar o hemograma, a bioquímica sérica, bioquímica do líquido peritoneal, razões entre líquido peritoneal/sangue e frequência cardíaca. .... 121



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	18
<b>2. Capítulo 1: Revisão Bibliográfica</b> .....	20
<b>2.1 Abdome agudo cirúrgico</b> .....	20
<b>2.2 Avaliações hematológicas e de líquido peritoneal como auxílio diagnóstico e prognóstico no abdome agudo cirúrgico</b> .....	22
2.2.1 <i>Hematologia</i> .....	22
2.2.2 <i>Líquido peritoneal</i> .....	25
<b>2.3 Alterações intestinais macroscópicas</b> .....	29
<b>2.4 Microbiotas intestinal e fecal</b> .....	31
<b>2.5 Translocação bacteriana</b> .....	35
<b>2.6 Interpretação dos resultados de sequenciamento genético</b> .....	38
2.6.1 <i>Abundância relativa</i> .....	38
2.6.2 <i>Alfa diversidade</i> .....	39
2.6.3 <i>Beta diversidade</i> .....	40
2.6.4 <i>Análise Linear Discriminante pelo Efeito de Tamanho (LEfSe)</i> .....	40
<b>2.7 Referências</b> .....	41
<b>3. Capítulo 2 – Artigo Científico I: Alterações na microbiota intestinal e fecal de equinos com cólica cirúrgica</b> .....	51
<b>3.1 Resumo</b> .....	51
<b>3.2 Introdução</b> .....	52
<b>3.3 Material e métodos</b> .....	53
3.3.1 <i>Seleção de Animais</i> .....	53
3.3.2 <i>Delineamento experimental e colheita de amostras</i> .....	53
3.3.3 <i>Extração, Amplificação da região V4 do gene 16S rRNA e sequenciamento</i> .....	55
3.3.4 <i>Análise de bioinformática e estatística</i> .....	56
<b>3.4 Resultados</b> .....	58
3.4.1 <i>Alfa diversidade</i> .....	59
3.4.2. <i>Abundância relativa, beta diversidade e análise de LEfSe</i> .....	62
<b>3.5 Discussão</b> .....	70
<b>3.6 Conclusão</b> .....	77
<b>3.7 Referências</b> .....	78
<b>3.8 Material Suplementar</b> .....	81

<b>Capítulo 3 – Artigo 2: Translocação bacteriana em casos de síndrome cólica cirúrgica: o que sabemos além da cultura?</b> .....	83
<b>3.1 Resumo</b> .....	83
<b>3.2 Introdução</b> .....	84
<b>3.3 Material e métodos</b> .....	85
3.3.1 <i>Seleção de Animais</i> .....	85
3.3.2 <i>Delineamento experimental</i> .....	85
3.3.3 <i>Classificação da afecção e análise macroscópica da alça intestinal</i> .....	87
3.3.4 <i>Colheita de amostras</i> .....	89
3.3.5 <i>Classificação do risco de vida</i> .....	90
3.3.6 <i>Avaliação incisional</i> .....	90
3.3.7 <i>Análises das amostras colhidas</i> .....	91
<b>3.4 Resultados</b> .....	95
3.4.1 <i>Sequenciamento genético das amostras de líquido peritoneal</i> .....	97
3.4.2 <i>Achados clínicos e comparações com sequenciamento genético</i> .....	104
<b>3.5 Discussão</b> .....	109
<b>3.6 Conclusão</b> .....	117
<b>3.7 Referências</b> .....	117
<b>3.8 Material suplementar</b> .....	121

## 1. Introdução

O abdome agudo é uma das causas mais comuns de mortalidade em equinos (TRAUB-DARGATZ et al., 2001; WORMSTRAND et al., 2014). A maioria dos episódios de cólica se resolve espontaneamente ou com tratamento clínico, porém, determinados casos necessitam de tratamento cirúrgico ou eutanásia (TINKER et al., 1997). Os avanços das técnicas cirúrgicas, manejo anestésico e cuidados pós-operatórios, entre outros fatores, fizeram com que as taxas de mortalidade reduzissem consideravelmente ao longo dos últimos 50 anos (FREEMAN, 2018; NIETO, 2006).

Nesse ínterim, diversas linhas de pesquisa dentro da gastroenterologia equina se desenvolveram e vem sendo aprimoradas, a fim de aperfeiçoar o conhecimento dessa afecção e melhorar as taxas de sobrevivência e qualidade de vida desses pacientes no presente e futuro (BLIKSLAGER, 2019a; FREEMAN; SCHAEFFER; BAKER, 2001; JACOBS; STEFANOVSKI; SOUTHWOOD, 2019; JENNINGS et al., 2014; STEWART et al., 2020). Considerando que a microbiota intestinal em desequilíbrio pode ser causa ou consequência de enfermidades do trato gastrointestinal, essa se tornou uma forte frente de investigações ao longo da última década (COSTA; WEESE, 2012, 2018a; JASSIM; ANDREWS, 2009; JULLIAND; GRIMM, 2017; LINDROTH et al., 2021; SCHOSTER et al., 2013).

O desequilíbrio da microbiota, bem como a própria lesão intestinal, nesses casos de síndrome cólica, também pode levar à ocorrência de translocação bacteriana para o líquido peritoneal e outros órgãos ou tecidos estéreis (HURCOMBE; MUDGE; DANIELS, 2012). Essa translocação pode trazer prejuízos na recuperação do animal, gerando por exemplo, problemas vasculares, nas lâminas do casco, na cavidade abdominal, entre outros (BIDDLE; BLACK; BLANCHARD, 2013; BLIKSLAGER et al., 2017; CAPEWELL; BOSTON, 2004; DÓRIA et al.,

2020; HANN et al., 2020; JACOBS; STEFANOVSKI; SOUTHWOOD, 2019; POUYADE et al., 2009; URAYAMA et al., 2018). Porém, o diagnóstico preciso tem se mostrado difícil nas últimas décadas, uma vez que técnicas baseadas em métodos de cultura podem ser ineficazes para esse tipo de detecção (HURCOMBE; MUDGE; DANIELS, 2012; RADCLIFFE et al, 2022).

As plataformas analíticas de DNA, RNA, proteínas e metabólitos, aliada aos avanços tecnológicos resultaram em uma transformação nesse campo de análise microbiológica, obtendo-se melhor compreensão sobre a mesma e conhecimento da sua interação com o hospedeiro (COSTA; WEESE, 2018b; MARCHESI; RAVEL, 2015a). Atualmente, já se tem descritas diversas informações sobre a microbiota intestinal e fecal de cavalos saudáveis, entretanto, para líquido peritoneal ou conteúdo de intestino e fezes, em cavalos acometidos por enfermidades do trato gastrointestinal, particularmente, o abdome agudo, esses estudos ainda são incipientes (ARROYO et al., 2020; MCKINNEY et al., 2020; SALEM et al., 2019; STEWART et al., 2020; WEESE et al., 2015; WIMMER-SCHERR et al., 2021).

Considerando que a microbiota intestinal pode ser profundamente alterada em certas afecções do trato gastrointestinal e que, nesses casos, a translocação bacteriana também pode ocorrer, a melhor compreensão dessas transformações pode possibilitar perspectivas para novas medidas preventivas e terapêuticas (COSTA; WEESE, 2012; GOULET, 2015; STEWART et al., 2020).

## **2. Capítulo 1: Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Abdome agudo cirúrgico**

Os distúrbios gastrointestinais dos equinos, manifestados por cólica, são considerados como a principal causa emergencial atendida por médicos veterinários a campo, apresentando altos índices de internação hospitalar (ARCHER, 2019; BOWDEN et al., 2020; SOUTHWOOD et al., 2009; TRAUB-DARGATZ; SALMAN; VOSS, 1991; VILJOEN et al., 2009). A sua prevalência dentre todas as enfermidades nos equinos varia de acordo com a localidade, atingindo até 4% ao ano, sendo que, dentre esses indivíduos, 1,4% a 17,5% são submetidos à cirurgia (CHRISTOPHERSEN et al., 2014; FREEMAN, 2018; GARDNER; DOCKERY; QUAM, 2019; VAN LOON et al., 2020).

Possui etiologia variada, envolvendo desde fatores anatômicos a fatores de manejo, relacionados à nutrição e confinamento, promovendo alterações na motilidade intestinal, na absorção/secreção pela mucosa gastrointestinal e na microbiota, o que resulta nesse distúrbio gastrointestinal conhecido como abdome agudo (BLIKSLAGER, 2019a). Diversos segmentos do trato gastrointestinal podem ser acometidos e, de acordo com o tipo de lesão e gravidade do caso, deve ser tratada de forma clínica ou cirúrgica, por meio da celiotomia exploratória (GARDNER; DOCKERY; QUAM, 2019).

Dentre as afecções que acometem os diferentes segmentos intestinais, da região de intestino delgado ou grosso, tem-se as obstruções estrangulativas, como as torções de jejuno ou cólon maior em diferentes graus, as hérnias inguinoescrotais, os lipomas pedunculados, intussuscepções, entre outros, e, as obstruções não estrangulativas, sendo as principais, compactações de íleo, ceco, cólon maior e cólon transverso; deslocamentos de cólon maior à direita e à esquerda; sablose; compactação por parasitas em intestino delgado, enterólitos em cólon transverso e fecalomas em

cólon menor (AITKEN et al., 2015; FIEGE et al., 2015; FREDERICO; JONES; BLIKSLAGER, 2006; PIERCE, 2009; WHEAT, 1975; WHYARD; BROUNTS, 2019).

A determinação à indicação cirúrgica se baseia na junção de achados clínicos e laboratoriais, que aliados à experiência do médico veterinário, fazem a união de resultados para uma tomada de decisão (THOEFNER et al., 2003). Dentre os principais, encontram-se exame clínico, avaliação do tipo e grau de dor, sondagem naso-gástrica, análises sanguíneas e de líquido peritoneal, palpação transretal e ultrassonografia abdominal (BUSONI et al., 2011; LASKOSKI et al., 2015; ORR et al., 2020; PYE et al., 2019; UNDERWOOD et al., 2010). Normalmente, são indicadas para a cirurgia, principalmente, as lesões estrangulativas e, em casos específicos, as não estrangulativas que, por algum motivo, não são passíveis de correção com tratamento clínico e/ou medicamentoso (BLIKSLAGER, 2019a; GARDNER; DOCKERY; QUAM, 2019).

O objetivo principal da celiotomia exploratória é corrigir a alteração do paciente, podendo ser utilizadas técnicas de reposicionamento, desobstrução, retirada de corpos estranhos ou ressecção e anastomose, conforme a necessidade de cada caso (BLIKSLAGER et al., 2017). O tipo de injúria, gravidade da lesão, intervalo de tempo entre o início dos sinais clínicos e a realização do procedimento cirúrgico, o “status” sistêmico do paciente, isto é, equilíbrio hemodinâmico, presença de endotoxemia e síndrome da resposta inflamatória sistêmica, dentre outros, são fatores diretamente relacionados com as taxas de sobrevivência pós-operatória (MAIR; SMITH; SHERLOCK, 2007).

Nas décadas de 70 a 90, a cirurgia de abdome agudo era considerada um procedimento de prognóstico ruim, visto que existiam baixas taxas de sobrevivência, que inicialmente não chegavam acima de 30% (PHILLIPS; WALMSLEY, 1993; TINKER et al., 1997; WHEAT, 1975). Atualmente, as taxas de sobrevida, a longo prazo, após celiotomia exploratória aumentaram para

50 a 90%, bem como, a qualidade de vida e o retorno às atividades atléticas (FREEMAN, 2018; VAN LOON et al., 2020; WORMSTRAND et al., 2014). Dessa forma, entende-se que a melhora das taxas ao longo das décadas se deu não só pelo desenvolvimento e aprimoramento das técnicas diagnósticas e terapêuticas, bem como pela conscientização dos proprietários, reconhecimento precoce dos candidatos à cirurgia e rápido encaminhamento do paciente para os centros especializados (NIETO, 2006).

## **2.2 Avaliações hematológicas e de líquido peritoneal como auxílio diagnóstico e prognóstico no abdome agudo cirúrgico**

A análise de parâmetros sanguíneos e de líquido peritoneal podem ser de grande valia tanto no período pré-operatório, para auxílio diagnóstico, bem como no pós-operatório, para avaliação da evolução do caso e determinação das escolhas terapêuticas; e, em ambos, para o prognóstico (DUKTI; WHITE, 2009; FAGLIARI; SILVA, 2002; PIHL et al., 2016; SALCICCIA et al., 2013; YAMOUT et al., 2011).

### *2.2.1 Hematologia*

A avaliação do volume globular (hematócrito) e proteínas totais está diretamente correlacionada com o equilíbrio hídrico do paciente, sendo que a elevação destes parâmetros representa um quadro de desidratação, comumente encontrado nos equinos com abdome agudo (BOSCAN; STEFFEY, 2007). A avaliação sequencial de hematócrito e proteína total de equinos com abdome agudo, nos períodos pré e pós-operatório, é uma ferramenta com função prognóstica, sendo que, quanto maior a elevação destes parâmetros, pior o prognóstico do paciente (GRULKE et al., 2001; KAUFMAN et al., 2020; WORMSTRAND et al., 2014).

A contagem total de leucócitos e a contagem diferencial são importantes ferramentas de auxílio diagnóstico no que tange o período de evolução do quadro de abdome agudo (WHITE, 1990). Na fase inicial da afecção, os leucócitos raramente apresentam alterações ou apresentam neutrofilia leve e linfopenia, consistentes com um leucograma de estresse (BLIKSLAGER et al., 2017; SOUTHWOOD, 2013). Com a evolução do quadro, pode ocorrer a marginalização e migração dos neutrófilos para o sítio acometido, o que será representado por leucopenia e neutropenia (PARRY, 1987). Essa leucopenia quando muito expressiva ( $<3.000$  células/ $\mu\text{L}$ ), associada à clínica de endotoxemia e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sugere a presença de sepse ou ruptura intestinal (BLIKSLAGER et al., 2017; SOUTHWOOD, 2013). Sequencialmente à leucopenia, pode ocorrer leucocitose neutrofílica, indicando inflamação intestinal tardia e degeneração tecidual ou endotoxemia (WHITE, 1990), sendo que a presença de neutrófilos tóxicos ou degenerados também indica a severidade da inflamação (SOUTHWOOD, 2013).

Adicionalmente, a avaliação do leucograma de equinos em período pós-operatório revela, normalmente, leucopenia e neutropenia, relacionadas com o insulto cirúrgico, a qual se normaliza ao longo de uma evolução positiva da recuperação do paciente. Quando esta leucopenia se torna persistente ou se converte em leucocitose, pode indicar complicações como enterite, colite, isquemia intestinal, peritonite, entre outras (BLIKSLAGER et al., 2017).

Associada às alterações leucocitárias, a contagem de plaquetas pode estar alterada em casos de inflamação intestinal grave e endotoxemia, sendo observada redução, devido à ativação sistêmica do sistema de coagulação, com elevação do consumo de plaquetas, com ou sem coagulação intravascular disseminada (SOUTHWOOD, 2013).



Além da avaliação dos componentes celulares do sangue, a avaliação de lactato, glicose, fosfatase alcalina e fósforo inorgânico apresentam valores de diagnóstico e prognóstico, especialmente quando realizadas de maneira sequencial e comparativa ao longo do tempo (PIHL et al., 2015; SOUTHWOOD, 2006; VALADÃO; ÁVILA JUNIOR; CAMPOS FILHO, 1996; WORMSTRAND et al., 2014).

O lactato sanguíneo tem sido usado como marcador indireto de isquemia em pacientes com abdome agudo, por ser o metabólito final da glicólise anaeróbica (BLIKSLAGER et al., 2017). Ele também se eleva em casos de hipoperfusão sistêmica, choque endotóxico e hipotensão. Sua avaliação sequencial tem sido recomendada, a fim de utilizar como parâmetro para indicação cirúrgica e, também, como indicador de prognóstico (NEIL, 2008; ORR et al., 2020). A cada 1mmol/L de elevação do lactato, a probabilidade de necessidade de cirurgia aumenta para 1,23 vezes (DELESALLE et al., 2007). O lactato sanguíneo, quando acima de 7mmol/L, apresenta forte correlação com o óbito de equinos com abdome agudo (HINCHCLIFF; RUSH; FARRIS, 2005; UNDERWOOD et al., 2010). Após 24 horas da cirurgia, o valor deve ser encontrado dentro dos parâmetros fisiológicos da espécie e a falta de normalidade é associada com a não sobrevivência (EDNER; ESSÉN-GUSTAVSSON; NYMAN, 2009; RADCLIFFE et al., 2012).

A elevação da glicemia é mediada pela adrenalina, em resposta à dor ou em falência circulatória (PARRY, 1987), sendo a hiperglicemia, em valores acima de 195 mg/dL, correlacionada com pior prognóstico, embora nem todos estudos apontem para esses resultados (HASSEL; HILL; RORABECK, 2009; MCCOY et al., 2011; PAIM et al., 2019; UNDERWOOD et al., 2010).

A fosfatase alcalina é uma enzima presente em todo organismo, mas se concentra no fígado, placenta, osteoblastos, leucócitos granulócitos e epitélios renal e intestinal (KANEKO;

HARVEY; BRUSS, 2008). A mucosa do intestino delgado possui essa enzima em demasia, enquanto a mucosa de intestino grosso, em menor quantidade (MOSS et al., 1977), dessa forma, é considerada uma variável importante para avaliação de comprometimento intestinal em casos de abdome agudo (FILIPPO et al., 2012; VALADÃO; ÁVILA JUNIOR; CAMPOS FILHO, 1996).

A mucosa intestinal também é rica em fósforo inorgânico, sendo que a hiperfosfatemia pode ocorrer quando há dano isquêmico na parede intestinal, que por meio do sistema porta-hepático e linfático, pode atingir a circulação (ARDEN; STICK, 1988). Por esse motivo, também é interessante de ser avaliado, como marcador, em casos de abdome agudo (FILIPPO et al., 2012; MOSS et al., 1977; VALADÃO; ÁVILA JUNIOR; CAMPOS FILHO, 1996).

### *2.2.2 Líquido peritoneal*

O líquido peritoneal é um ultrafiltrado do plasma, que permeia a superfície serosa de todos os órgãos da cavidade abdominal e, por esse motivo, é capaz de refletir as alterações que ocorrem nos órgãos e tecidos que ali permanecem, dentre eles, as alças intestinais (BROWNLOW; HUTCHINS; JOHNSTON, 1981; NIETO, 2018). Sua avaliação, em casos de abdome agudo, é muito mais representativa e fidedigna que a avaliação hematológica, a fim de demonstrar a gravidade das injúrias intestinais. A contagem de hemácias, leucócitos, concentração de fibrinogênio, lactato, glicose, fosfatase alcalina e fósforo inorgânico também podem ser avaliados no líquido peritoneal (WHITE, 1990), sendo os valores avaliados de maneira absoluta e em comparação com os valores obtidos das amostras sanguíneas (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

No líquido peritoneal deve existir baixa quantidade de leucócitos. Estudos iniciais relatavam valores entre 5 a 10.000 células/ $\mu$ L em cavalos saudáveis, mas sabe-se que raramente

esse valor ultrapassa 3.000 células/ $\mu\text{L}$  (BLIKSLAGER et al., 2017; FISCHER, 1997). A proporção neutrófilos/células mononucleares deve ser 2:1, com algumas células mesoteliais ocasionais (AUER et al., 2019; WHITE, 1990).

Quando a contagem de leucócitos peritoneais começa a se elevar, tem-se um indicativo de injúria intestinal, embora o aumento não seja sempre proporcional à gravidade do caso (BLIKSLAGER et al., 2017). Além disso, a proporção do tipo celular se altera, de forma que os neutrófilos passam a ocupar cerca de 90% da totalidade, além de poderem se apresentar degenerados e tóxicos (COWELL et al., 1987). Quando esta contagem se apresenta muito elevada (acima de 400.000 cel/ $\mu\text{L}$ ), sem o aumento do número de hemácias, há o indicativo de lesão não estrangulativa prolongada e/ou peritonite (WHITE, 1990).

Considerando o período pós celiotomia exploratória, é comum encontrar valores de leucócitos em torno de 150.000 cel/ $\mu\text{L}$  no primeiro dia pós-cirúrgico (BLIKSLAGER et al., 2017). Nos cavalos que não passaram por ressecção e anastomose, esse valor tende a se normalizar a partir do quarto dia pós cirúrgico e, nos animais em que o procedimento foi realizado, a contagem de leucócitos peritoneais pode ficar elevada por mais de 7 dias, com valores próximos de 40.000 cel/ $\mu\text{L}$ , sem que isso seja considerado uma complicação (HANSON et al., 1992; SANTSCHI et al., 1988).

As hemácias devem estar ausentes no líquido peritoneal. Quando presentes, costumam indicar a ocorrência de lesões estrangulativas e quando acima de 20.000 células/ $\mu\text{L}$ , essas injúrias costumam ser severas (HUNT; TENNANT; WHITLOCK, 1986). Deve-se sempre considerar a possibilidade de contaminação por sangue periférico ou punção do baço no momento da colheita, o que pode ser diferenciado na lâmina de citologia, pela presença apenas de hemácias livres e íntegras (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

A concentração da proteína reflete com maior precisão a resposta do peritônio à inflamação, isquemia ou distensão abdominal (WHITE, 1990). O valor fisiológico é de 0,8 a 1,8g/dL, e quando acima de 2g/dL já é indicativo de distúrbio mais expressivo (BROWNLOW; HUTCHINS; JOHNSTON, 1981 ; SOUTHWOOD, 2012). Vale ressaltar que, após celiotomia exploratória, valores elevados de proteína, entre 3,3 a 6,2mg/dL, são esperados (BLIKSLAGER et al., 2017).

O aumento do lactato em líquido peritoneal permite uma detecção mais precoce e fidedigna da injúria intestinal, quando comparada ao lactato sanguíneo, possuindo valor diagnóstico e prognóstico (LATSON et al., 2005; SOUTHWOOD, 2006). A cada 1mmol/L de elevação do lactato, a probabilidade de necessidade de cirurgia aumenta para 1,58 vezes (DELESALLE et al., 2007). As lesões estrangulativas apresentam concentrações de lactato significativamente maiores que as não estrangulativas (LATSON et al., 2005; YAMOUT et al., 2011). Concentrações acima de 4mmol/L ou concentrações que se elevam em colheitas seriadas, representam maior probabilidade de lesão intestinal estrangulativa (PELOSO; COHEN, 2012).

A concentração de glicose peritoneal em cavalos saudáveis costuma ser similar ou um pouco mais elevada que a sérica (VAN HOOGMOED et al., 1999). O aumento da glicólise anaeróbia por células metabolicamente ativas, como leucócitos ou organismos bacterianos, podem diminuir a concentração de glicose no líquido peritoneal. Quando o valor está abaixo de 40mg/dL ou a diferença entre a glicose sérica e a peritoneal foi maior que 50mg/dL, pode ser útil para prever a sepse ou peritonite séptica (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002). Entretanto, estudos mais recentes confrontam esses resultados, informando que não há uma boa acurácia entre o aumento da diferença entre as glicoses sanguínea e peritoneal (>50mg/dL) e a peritonite séptica (ALONSO et al., 2020).

A elevação das concentrações de fosfatase alcalina peritoneal pode ser correlacionada com o agravamento das lesões em intestino delgado e, nas lesões de intestino grosso, o aumento é progressivo, sendo dependente do tempo de instalação e da gravidade do caso (VALADÃO; ÁVILA JUNIOR; CAMPOS FILHO, 1996). Altas concentrações de fosfatase alcalina no líquido peritoneal são associadas com maior injúria intestinal, maior probabilidade de cirurgia e pior prognóstico (SAULEZ; CEBRA; DAILEY, 2004). Nos casos de celiotomia exploratória, a fosfatase alcalina peritoneal pode se apresentar elevada no período pós-operatório, pela destruição de leucócitos granulócitos peritoneais e tende a reduzir com a recuperação do paciente (FROSCHER; NAGODE, 1981).

O fósforo inorgânico também pode se apresentar elevado no fluido peritoneal em cavalos com injúrias intestinais, uma vez que será o primeiro local de contato, até ser transferido para circulação (ARDEN; STICK, 1988; VALADÃO; ÁVILA JUNIOR; CAMPOS FILHO, 1996). Essa variável também pode ser usada como um marcador para necessidade de ressecção de intestino isquêmico, uma vez que foram encontradas altas concentrações desse parâmetro em cavalos que necessitaram de ampla ressecção intestinal, quando comparados àqueles com cólicas clínicas ou que não precisaram de ressecção na cirurgia (ARDEN; STICK, 1988).

Adicionalmente, pode ser realizada avaliação da presença de bactérias no líquido peritoneal, que podem ser encontradas tanto na análise citológica da lâmina, livres ou fagocitadas, bem como na cultura do fluido (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002). A presença de bactérias no líquido peritoneal sugere ruptura intestinal ou translocação bacteriana, que pode ocorrer devido à desvitalização das alças intestinais (WHITE, 1990). A presença de bactérias fagocitadas no líquido peritoneal, aliada a outras características, classificam-no como exsudato séptico, o que não necessariamente deve ser correlacionado com pior prognóstico, uma vez que os animais podem

sobreviver com tratamento médico e/ou cirúrgico adequado (ALLEMAN, 2003; BLIKSLAGER et al., 2017).

### **2.3 Alterações intestinais macroscópicas**

A avaliação macroscópica do intestino durante o procedimento cirúrgico é de suma importância, tanto para a tomada de decisões ao longo da cirurgia, bem como para escolhas terapêuticas do período pós-operatório (BLIKSLAGER et al., 2017; WHITE, 1990).

A viabilidade intestinal é definida pela capacidade de recuperação completa da alça intestinal lesada, sem que haja risco de mais necrose da mesma e morte do animal, devido à endotoxemia e peritonite secundária (BLIKSLAGER et al., 2017). Quando há comprometimento da vascularização intestinal e de sua viabilidade, a ressecção se torna necessária e deve ser uma decisão tomada pelo cirurgião (AUER et al., 2019; HOPSTER et al., 2011). Vale ressaltar que, embora muitas vezes necessária, é uma intervenção que aumenta o risco cirúrgico e reduz a taxa de sobrevivência (CHRISTOPHERSEN et al., 2014; PHILLIPS; WALMSLEY, 1993; WORMSTRAND et al., 2014).

Outro fator que deve ser considerado no tocante à decisão de se realizar ressecção de segmento intestinal é o benefício que o procedimento pode trazer, ao evitar a translocação bacteriana ou seus subprodutos para o líquido peritoneal e circulação sanguínea, principalmente nas afecções de intestino grosso (HUGHES; SLONE, 1997).

Para avaliação da viabilidade intestinal no período transoperatório são descritas, desde o século passado, diversas técnicas que colaboram para a tomada de decisão de realizar ou não a ressecção do segmento acometido (WOLFMAN JR, 1989). Dentre elas, encontram-se determinação do pH intestinal e pressão de CO<sub>2</sub>, eletromiografia, utilização de microesferas radioativas, oximetria de superfície, ultrassonografia com doppler, testes com fluoresceína sódica,

microscopia de campo escuro, sangramento no local da enterotomia, exame histopatológico e avaliações clínicas, visuais e sensitivas (AUER et al., 2019; FREEMAN; SCHAEFFER; CLEARY, 2014; HOOGMOED et al., 2000; HURCOMBE et al., 2014; MURRAY; WILLIAMS, 1973; MYERS; CHERRY; GESSER, 1972; SNYDER et al., 1986; ZARINS et al., 1974).

Contudo, na prática hospitalar, a experiência do cirurgião ao observar os aspectos clínicos das alças intestinais como cor do intestino, presença ou ausência de pulsações arteriais mesentéricas, edema, fluxo sanguíneo e presença ou ausência de contrações peristálticas acabam sendo os métodos que mais influenciam a tomada de decisão no momento transoperatório (AUER et al., 2019; FREEMAN; SCHAEFFER; CLEARY, 2014; HOOGMOED et al., 2000; SOUTHWOOD, 2013; WOLFMAN JR, 1989).

A avaliação clínica, visual e tátil das alças intestinais tem a vantagem de não ser invasiva e possuir execução rápida, mas tem a desvantagem de ser imprecisa para graduar a extensão do comprometimento tecidual (AUER et al., 2019). Em um estudo realizado por Freeman e colaboradores (1988) demonstrou-se que hemorragia intramural e edema em intestino delgado foram fatores atribuídos a indicações desnecessárias de ressecção e anastomose em pôneis com obstrução intestinal. Sendo assim, atualmente, recomenda-se que a avaliação macroscópica transoperatória da alça intestinal acometida seja realizada após 15 minutos da correção da afecção, sendo observada tanto a serosa quanto a mucosa (por meio de enterotomia, quando possível), antes da tomada de decisão quanto à indicação de ressecção (AUER et al., 2019; FREEMAN; SCHAEFFER; CLEARY, 2014).

Freeman et al. (2001; 2014) criaram e aprimoraram uma escala para avaliação da viabilidade intestinal de intestino delgado e indicação de ressecção, com base em uma classificação visual das alças intestinais, por escores, apresentando resultados de 100% de sobrevivência de

curto prazo dos pacientes. Essa metodologia é importante por ser uma forma de determinação objetiva da viabilidade intestinal e que respalda a tomada de decisão do cirurgião no período trans cirúrgico (AUER et al., 2019). Entretanto, vale ressaltar que, embora diversos desses parâmetros utilizados para intestino delgado, sejam também usados na rotina cirúrgica para intestino grosso, ainda não é descrita na literatura uma escala própria para esse segmento (ORR et al., 2020).

Associada à decisão de se manter ou amputar um segmento intestinal, fatores como porção intestinal acometida, lesão estrangulativa versus não-estrangulativa, intensidade e tempo de evolução da injúria, contaminação transoperatória, entre outros, devem ser avaliados a fim conduzir tratamento pós-operatório e prever prognóstico, considerando a sobrevida e o retorno às atividades do paciente (AUER et al., 2019; BLIKSLAGER, 2019b).

Neste ínterim, acredita-se que as alterações macroscópicas intestinais observadas no período transoperatório possam ser correlacionadas com a translocação bacteriana para líquido peritoneal e com alterações da microbiota relacionadas com a afecção intestinal primária, assuntos que serão abordados na sequência.

## **2.4 Microbiotas intestinal e fecal**

Na última década tem sido dada mais atenção à comunidade de microorganismos presente no trato gastrointestinal dos equinos, qual a sua influência sobre as enfermidades desse sistema e como ela se comporta depois de a enfermidade instalada e na sua recuperação (BLIKSLAGER, 2019a; COSTA; WEESE, 2018b; STEWART et al., 2018; WEESE et al., 2015).

Sabe-se que o trato gastrointestinal do equino contém uma comunidade polimicrobiana complexa que consiste em protozoários, archaea, fungos, vírus e bactérias (PAGAN, 1998). A



comunidade bacteriana é uma das mais estudadas atualmente, visto que possui grande importância na manutenção da homeostase do ambiente gastrointestinal (JULLIAND; GRIMM, 2016).

Assim como em outras espécies, a determinação da microbiota intestinal equina teve início com métodos baseados em cultura (JULLIAND; FONTY, 1999). Entretanto, essa técnica possui várias limitações, pois a maioria das bactérias são difíceis de cultivar e/ ou podem ser sub ou superestimadas em sua abundância relativa, ou seja, nos fornece uma visão superficial dos micro-organismos existentes (COSTA; WEESE, 2018b; JULLIAND; GRIMM, 2016).

Por esse motivo, os métodos moleculares, independentes de cultura, como, por exemplo, a técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA, permitiram resultados mais precisos e fidedignos do microbioma intestinal (COSTA; WEESE, 2018b; DOUGAL et al., 2013; JULLIAND; GRIMM, 2016; SCHOSTER et al., 2013). O microbioma pode ser definido por todo o habitat, incluindo os microorganismos, seus genomas e as condições ambientais que os envolvem (MARCHESI; RAVEL, 2015). O microbioma possui relação sinérgica e adaptada ao sistema digestório de seu hospedeiro (PITTA; INDUGU; ENGILES, 2018).

Nos equinos, assim como em outras espécies, cada porção anatômica do trato gastrointestinal possui determinadas características de pH, digestão enzimática e tensão do oxigênio, além disso, cada parte é responsável por uma determinada função na digestão (PAGAN, 1998). Em função disso, sabe-se, atualmente, que a microbiota também é modificada de acordo com o segmento intestinal (COSTA; WEESE, 2012; DICKS et al., 2014; DOUGAL et al., 2013; ERICSSON et al., 2016; JULLIAND; GRIMM, 2016).

No intestino delgado, por exemplo, em que o trânsito é mais rápido, os micro-organismos se encontram em menor quantidade, com determinados gêneros bacterianos e, mais alocados na mucosa. Enquanto no intestino grosso, existe maior densidade de micro-organismos de outras

espécies, que também se encontram na mucosa, mas estão em sua maioria no lúmen intestinal (COSTA et al., 2015a; DOUGAL et al., 2013; ERICSSON et al., 2016).

Diversos estudos foram realizados no intuito de determinar o padrão da microbiota de equinos saudáveis (COSTA et al., 2015a; COSTA; WEESE, 2012; DONNELL et al., 2013; DOUGAL et al., 2013; JULLIAND; GRIMM, 2016, 2017). Entretanto, mesmo que alguns microorganismos estejam descritos em um senso comum pelos autores supracitados, ainda existem algumas divergências interindividuais entre os equinos que podem ser influenciadas por fatores como a dieta, jejum, manejo, clima, nível de atividade e utilização de antimicrobianos (COLLINET et al., 2021; COSTA et al., 2015b; COSTA; WEESE, 2018b; DOUGAL et al., 2013; GARBER; HASTIE; MURRAY, 2020; JULLIAND; GRIMM, 2017; PERRY et al., 2018; SCHOSTER et al., 2015).

A microbiota quando comparada entre cada um destes segmentos: estômago, duodeno, jejuno e íleo, podem apresentar variações entre os cavalos, sendo difícil criar um padrão microbiológico para cada segmento anatômico (SCHOSTER et al., 2013; ERICSSON et al., 2016; COSTA; WEESE, 2018b). Porém, isso não se aplica aos segmentos do intestino grosso, que apresentam maior semelhança de microbiota entre os indivíduos, mesmo que eles apresentem diferentes raças, idade e tipo de alimentação (COSTA; WEESE, 2018b; ERICSSON et al., 2016; REED et al., 2021; SCHOSTER et al., 2013).

Considerando que a microbiota intestinal possui sensibilidade a diversos fatores, após um episódio de síndrome cólica, podem existir alterações e desequilíbrios nesse sistema como um todo, gerando consequências negativas à saúde digestiva (COSTA; WEESE, 2018b; SALEM et al., 2019; STEWART et al., 2018). A disbiose, isto é, o desequilíbrio da microbiota intestinal, já se demonstrou prejudicial, por exemplo, nos casos de dietas com alto teor de amido (BUSTAMANTE

et al., 2022; DICKS et al., 2014; PAGAN, 1998). Nesse caso, o amido excedente, que não foi digerido no intestino delgado, mas fermentado por bactérias no intestino grosso, faz com que haja proliferação de bactérias anaeróbias, maior produção de ácido lático e, por consequência, a redução do pH (FRAPE, 2004). O pH reduzido pode afetar certas espécies bacterianas e prejudicar a absorção de nutrientes, além de danificar o epitélio intestinal e favorecer a disfunção da barreira intestinal, permitindo a translocação bacteriana ou de seus derivados para o líquido peritoneal, sangue e órgãos (GATT; REDDY; MACFIE, 2007).

Foram realizados alguns estudos utilizando a tecnologia molecular para avaliação da microbiota de cólicas clínicas e cirúrgicas por meio da colheita das fezes desses pacientes (STEWART et al., 2018, 2020; VENABLE; KERLEY; RAUB, 2013; WEESE et al., 2015). Entretanto, estudos com cólica cirúrgica e colheita de conteúdo de segmentos intestinais são incipientes (SALEM et al., 2019).

Já foram demonstradas alterações de redução de abundância relativa de determinados filos bacterianos em éguas que desenvolveram cólica pós-parto em relação àquelas que não desenvolveram (WEESE et al., 2015). Da mesma forma, cavalos que passaram por cirurgia de cólica apresentaram menor quantidade de espécies e diversidade bacterianas nas fezes da admissão, comparados àqueles que foram submetidos à cirurgia eletiva (STEWART et al., 2018).

Foi demonstrado por Salem e colaboradores (2019), em cavalos com distúrbios cirúrgicos que envolviam o cólon maior, houve redução da riqueza bacteriana nesse segmento e que as alfa e beta diversidades diferiram das fecais, o que difere dos resultados encontrados em animais saudáveis, em que normalmente elas são semelhantes (COSTA; WEESE, 2018b; ERICSSON et al., 2016; SCHOSTER et al., 2013). Isso sugere que as amostras fecais podem não

ser representativas para detecção de um problema no cólon maior. Entretanto, os resultados devem ser interpretados com cautela, devido ao baixo número experimental (SALEM et al., 2019).

Portanto, a compreensão do comportamento da microbiota intestinal será de grande valia, pois futuros resultados podem auxiliar no diagnóstico para detectar a cólica precocemente ou no manejo das complicações pós-operatórias, por meio do desenvolvimento de novas técnicas de manipulação da microbiota e a possível correção da disbiose, nos casos de abdome agudo e outras enfermidades que envolvem o trato gastrointestinal (MCKINNEY et al., 2021).

## **2.5 Translocação bacteriana**

A translocação bacteriana é descrita pela ocorrência de uma falha na função da barreira intestinal, permitindo com que bactérias viáveis ou seus derivados (lipopolissacarídeos e endotoxinas) atravessem a mucosa em direção aos tecidos estéreis como líquido peritoneal, linfonodos mesentéricos e outros órgãos internos (GATT; REDDY; MACFIE, 2007).

A barreira intestinal é definida por uma unidade morfofuncional responsável pela defesa da mucosa intestinal, que consiste em três principais pilares: a microbiota intestinal, as células epiteliais intestinais e a imunidade da mucosa, que possui uma rede complexa de citocinas, produtos metabólitos e moléculas regulatórias (MENG; KLINGENSMITH; COOPERSMITH, 2017).

Na espécie humana esses fatores são descritos com mais detalhes e sabe-se que a microbiota intestinal é a primeira linha de defesa para a barreira. Alterações qualitativas e quantitativas da microbiota podem prejudicar a relação entre espécies comensais e o hospedeiro, assim como modificar o equilíbrio entre comensais e patógenos, diminuir a proteção da barreira pelo aumento da permeabilidade intestinal e favorecer a proliferação de microorganismos patogênicos (MCDONALD et al., 2016; STÄRKEL et al., 2018).

O que se sabe é que além da questão da relação bactérias comensais versus patogênicas, os seus produtos e metabólitos também são muito importantes para homeostase do ambiente intestinal (IACOB; IACOB, 2019). Por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que são aqueles produzidos pela fermentação anaeróbica bacteriana, são fundamentais para a manter a energia dos enterócitos, garantir o pH adequado, favorecer a produção do muco e contribuir para a integridade das células intestinais (FENG et al., 2018; KELLY et al., 2015). Logo, esses fatores estando em desbalanço, há chance de comprometimento no processo de resistência e, conseqüentemente, possibilidade de invasão do epitélio intestinal por patógenos (IACOB; IACOB, 2019; STÄRKEL et al., 2018).

Além disso, na espécie humana, já é descrito que a colonização bacteriana comensal também é essencial, pois ela tem envolvimento no sistema imune intestinal, na angiogênese, na irrigação intestinal e na regulação da permeabilidade do epitélio (GOULET, 2015).

A segunda linha de defesa é o epitélio intestinal, que também possui seus próprios mecanismos de proteção, estruturais e funcionais, sendo eles a união das células intestinais por fortes junções comunicantes e uma camada de muco protetora (GOTO; IVANOV, 2013; STÄRKEL et al., 2018). Além disso, para manter a proteção constante, o epitélio está em constante perda e renovação celular, o que resulta na criação de um novo revestimento intestinal a cada cinco a sete dias (BLIKSLAGER; GONZALEZ, 2018). O epitélio quando lesado, permite a translocação de bactérias intestinais e de suas toxinas (IACOB; IACOB, 2019).

A terceira e última linha de defesa é o sistema imune intestinal que, quando funciona de forma eficiente, é capaz de fazer a diferenciação dos microorganismos, permitindo a aceitação imunológica dos comensais e a eliminação dos patogênicos, por meio de um sistema extremamente coordenado e complexo (IACOB; IACOB, 2019).

Em humanos, a translocação tem sido demonstrada após manipulação intestinal, obstrução intestinal e tem sido documentada sua ocorrência em 14% de pacientes que passaram por laparotomia (MACFIE et al., 2006).

Dessa forma, ao fazer a transposição dessas informações para a espécie equina, é possível hipotetizar que a síndrome cólica é uma enfermidade que deve cursar com a translocação bacteriana, não só pela injúria física intestinal (BLIKSLAGER et al., 2017), bem como pela alteração da microbiota. Em equinos, tem-se evidências clínicas de que, devido à distensão, obstrução ou estrangulamento podem haver translocações bacterianas (GATT; REDDY; MACFIE, 2007; HANN et al., 2020; MOORE; VANDENPLAS, 2014; WONG; MOORE; BROCKUS, 2012), o que, conseqüentemente, pode gerar flebite, laminite, peritonite, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, complicações incisionais, entre outros, que podem comprometer o período pós-operatório (BIDDLE; BLACK; BLANCHARD, 2013; BLIKSLAGER et al., 2017; CAPEWELL; BOSTON, 2004; DÓRIA et al., 2020; HANN et al., 2020; JACOBS; STEFANOVSKI; SOUTHWOOD, 2019; POUYADE et al., 2009; URAYAMA et al., 2018).

Em um estudo realizado com cavalos com lesões estrangulativas de intestino delgado foi evidenciada a translocação bacteriana para o sangue venoso portal, sangue venoso mesentérico e linfonodos mesentéricos em 13,8% dos pacientes, entretanto, não foi realizada a colheita de líquido peritoneal (HURCOMBE; MUDGE; DANIELS, 2012). Atualmente, estudos começaram a identificar microorganismos raros em líquido peritoneal de humanos, responsáveis por peritonite e isso só foi possível devido a utilização de técnicas modernas de identificação bacteriana (ADAPA et al., 2019, 2020).

Considerando a importância das translocações bacterianas para complicações pós-operatórias, entende-se que a utilização do sequenciamento genético em amostras de líquido

peritoneal em equinos pode trazer novas informações no quesito de quais gêneros translocam para o fluido, assim como ser possível a detecção de bactérias em cavalos, que usualmente apresentam cultura negativa (HURCOMBE; MUDGE; DANIELS, 2012).

## **2.6 Interpretação dos resultados de sequenciamento genético**

Os resultados de sequenciamento genético são apresentados em quatro categorias principais: abundância relativa, alfa diversidade, beta diversidade e análise linear discriminante pelo efeito de tamanho (LEfSe).

### *2.6.1 Abundância relativa*

A abundância relativa é a representação proporcional das diferentes bactérias, em qualquer nível taxonômico, presentes em uma amostra biológica (COSTA; WEESE, 2019). Esses resultados costumam ser apresentados no nível taxonômico de filo ou de gênero, em formato de gráficos ou tabelas, mas isso fica à escolha de quem apresenta os resultados (DI PIETRO et al., 2021; JULLIAND; GRIMM, 2017; STEWART et al., 2019). A medida informada, expressa a fração ou a porcentagem de uma determinada bactéria em relação à composição total da comunidade microbiana presente na amostra. Em outras palavras, a abundância relativa informa quão predominante um grupo microbiano específico é em relação aos outros (COSTA; WEESE, 2018).

É importante notar que a abundância relativa não fornece informações sobre a quantidade absoluta de microrganismos, apenas sobre suas proporções relativas na amostra (MARCHESI; RAVEL, 2015). Portanto, para obter informações sobre a quantidade absoluta, é necessário combinar outras técnicas, para se obter esse resultado, como, por exemplo, a PCR em tempo real (qPCR) (WANG et al., 2021).

### 2.6.2 Alfa diversidade

A alfa diversidade é uma medida que descreve a diversidade dos microrganismos dentro de uma única amostra ou ambiente (MARCHESI; RAVEL, 2015). Em outras palavras, ela mensura a quantidade de gêneros bacterianos presentes em uma única amostra, fornecendo informações sobre a complexidade da comunidade microbiana nesse local específico (MARCHESI; RAVEL, 2015).

A alfa diversidade é estimada por índices matemáticos que levam em consideração a riqueza (número de gêneros diferentes) e sua uniformidade (proporção /equidade), ou seja, quanto de cada uma existe dentro de uma comunidade. Quanto maior o número de gêneros de bactérias (riqueza) e quanto mais proporcionais elas forem entre si, maior será a diversidade (HUGHES et al., 2001). Geralmente, além do número de gêneros observados, podem ser utilizados, por exemplo, o índice de Chao, de Shannon e de Simpson.

O índice de Chao tem o objetivo de estimar a riqueza total de uma comunidade a partir de uma amostra, ou seja, é um método não paramétrico que calcula os gêneros esperados, baseado nos gêneros que foram observados (CHAO, 1984).

Os índices de diversidade, Shannon e Simpson, consideram as abundâncias relativas das espécies dentro de uma comunidade e, por isso, fornecem mais inferência sobre a composição da mesma. Dessa forma, além de considerarem a riqueza, também levam em consideração a uniformidade, ou seja, a proporção de cada bactéria dentro da comunidade (MARCHESI; RAVEL, 2015). A diferença entre eles é que o índice de Shannon coloca um peso maior na riqueza de espécies, enquanto o índice de Simpson considera mais a uniformidade das espécies em sua medição (KIM et al., 2017).



### 2.6.3 *Beta diversidade*

A beta diversidade é composta por índices que descrevem a diferença ou a variação na composição microbiana entre diferentes amostras ou regiões, sejam elas comparadas pelos gêneros contidos naquela comunidade (membros), bem pela proporção de cada um deles (estrutura). São eles os índices de Jaccard, para composição de membros, e Yue and Clayton, para estrutura da comunidade (GOODRICH et al., 2014). Por meio desses índices, é possível comparar a similaridade ou a dissimilaridade na composição ou estrutura da microbiota entre essas amostras ou grupos, e para determinar se as diferenças entre os grupos são estatisticamente significativas, pode ser utilizado o teste de AMOVA (Análise de Variância Molecular) (COSTA; WEESE, 2019).

Para fazer as observações com relação à beta diversidade, inicialmente, são construídos gráficos de análise coordenadas principais (PCoA) (GOODRICH et al., 2014). Nesse tipo de gráfico, quando temos padrões semelhantes de microbiota, os pontos tendem a se agrupar, quando são distintas, tendem a se afastar (COSTA et al., 2015b).

### 2.6.4 *Análise Linear Discriminante pelo Efeito de Tamanho (LEfSe)*

O teste LEfSe é uma ferramenta estatística utilizada para identificar gêneros bacterianos biomarcadores que são estatisticamente associadas a diferentes grupos ou condições (SEGATA et al., 2011). O objetivo do LEfSe é identificar quais membros da comunidade microbiana são mais distintos em um grupo em comparação com outro, destacando assim as associações significativas entre a microbiota e as variáveis de interesse, como os grupos de tratamento em um estudo (SEGATA et al., 2011).

O LEfSe não apenas identifica as diferenças, mas também classifica os microrganismos de acordo com sua importância estatística, destacando quais são os biomarcadores mais relevantes para cada grupo. Para isso, é realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do Wilcoxon e por fim,

a Análise de Discriminante Linear (LDA) (CHANG; HE; DANG, 2022). Um LDA maior do que 2 é considerado significativo, e isso pode nos dizer sobre a possibilidade dessa bactéria ser uma indicadora para determinada circunstância, afecção ou localização.

## 2.7 Referências

- ADAPA, S. et al. Peritonitis from Anaerobic Gram-positive Cocci Likely Due to Translocation of Bacteria from Gut in a Patient Undergoing Peritoneal Dialysis. **Cureus**, v. 11, n. 11, p. 10–14, 2019.
- ADAPA, S. et al. Peritonitis from facultative anaerobic gram-negative bacilli is likely due to translocation of bacteria from gut in a patient undergoing peritoneal dialysis. **Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 1, p. 16–18, 2020.
- AITKEN, M. R. et al. Outcome of Surgical and Medical Management of Cecal Impaction in 150 Horses (1991-2011). **Veterinary Surgery**, v. 44, n. 5, p. 540–546, 2015.
- ALLEMAN, A. R. Abdominal , thoracic , and pericardial effusions. **Veterinary Clinics of Small Animal**, v. 33, p. 89–118, 2003.
- ALONSO, J. DE M. et al. Accuracy of differences in blood and peritoneal glucose to differentiate between septic and non-septic peritonitis in horses. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 237–242, 2020.
- ARCHER, D. C. Colic surgery: Keeping it affordable for horse owners. **Veterinary Record**, v. 185, n. 16, p. 505–507, 2019.
- ARDEN, W. A.; STICK, J. A. Serum and peritoneal fluid phosphate concentrations as predictors of major intestinal injury associated with equine colic. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 8, p. 927–931, 1988.
- ARROYO, L. G. et al. Luminal and mucosal microbiota of the cecum and large colon of healthy and diarrheic horses. **Animals**, v. 10, n. 8, p. 1–12, 2020.
- AUER, J. A. et al. **Equine Surgery**. 5th Edition, 2019.
- 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. 1–13, 2013.
- BLIKSLAGER, A. Colic Prevention to Avoid Colic Surgery: A Surgeon’s Perspective. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 76, p. 1–5, 2019.
- BLIKSLAGER, A.; GONZALEZ, L. Equine Intestinal Mucosal Pathobiology. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 6, n. 8, p. 1–19, 2018.
- BLIKSLAGER, A. T. et al. **The equine acute abdomen**. 3rd edition, 2017.

- BOSCAN, P.; STEFFEY, E. P. Plasma colloid osmotic pressure and total protein in horses during colic surgery. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 34, n. 6, p. 408–415, 2007.
- BOWDEN, A. et al. Horse owners' knowledge, and opinions on recognising colic in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 52, n. 2, p. 262–267, 2020.
- BROWNLOW, M. A.; HUTCHINS, D. R.; JOHNSTON, K. G. Reference values for equine peritoneal fluid. **Equine Veterinary Journal**, v. 13, n. 2, p. 127–130, 1981.
- BUSONI, V. et al. Evaluation of a protocol for fast localised abdominal sonography of horses (FLASH) admitted for colic. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 77–82, 2011.
- BUSTAMANTE, C. C. et al. Effects of Starch Overload and Cecal Buffering on Fecal Microbiota of Horses. **Animals**, v. 12, n. 23, 1 dez. 2022.
- CAPEWELL, L.; BOSTON, R. Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p. 885–889, 2004.
- CHANG, F.; HE, S.; DANG, C. Assisted Selection of Biomarkers by Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) in Microbiome Data. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2022, n. 183, 2022.
- CHAO, A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**. vol. 11, n. 4, p. 265-270, 1984.
- CHRISTOPHERSEN, M. T. et al. Short-term survival and mortality rates in a retrospective study of colic in 1588 Danish horses. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 56, p. 20, 2014.
- COLLINET, A. et al. Multidimensional Approach for Investigating the Effects of an Antibiotic–Probiotic Combination on the Equine Hindgut Ecosystem and Microbial Fibrolysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1–14, 2021.
- COSTA, M. C. et al. 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. et al. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 19, p. 1–12, 2015b.
- 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. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 34, p. 1–12, 2018.
- COSTA, M.; WEESE, J. S. Methods and basic concepts for microbiota assessment. **Veterinary Journal**, v. 249, p. 10–15, 2019.
- COWELL, R. L. et al. Collection and evaluation of equine peritoneal and pleural effusions. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 3, n. 3, p. 543–561, 1987.
- DEHEER, H. L.; PARRY, B. W.; GRINDEM, C. B. **Peritoneal fluid**. Second Edition. Mosby, Inc., 2002.
- DELESALLE, C. et al. Determination of lactate concentrations in blood plasma and peritoneal fluid in horses with colic by an accusport analyzer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 2, p. 293–301, 2007.

- DI PIETRO, R. et al. Species-level gut microbiota analysis after antibiotic-induced dysbiosis in horses. **Animals**, v. 11, n. 10, p. 1–9, 2021.
- DICKS, L. M. T. et al. The equine gastro-intestinal tract : An overview of the microbiota , disease and treatment. **Livestock Science**, v. 160, p. 69–81, 2014.
- DONNELL, M. M. O. et al. The core faecal bacterial microbiome of Irish Thoroughbred racehorses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 492–501, 2013.
- DÓRIA, R. G. S. et al. Correlation Between Peritonitis and Incisional Infections in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 87, p. 1–8, 2020.
- DOUGAL, K. et al. Identification of a Core Bacterial Community within the Large Intestine of the Horse. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.
- DUKTI, S.; WHITE, N. A. Prognosticating Equine Colic. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 25, n. 2, p. 217–231, 2009.
- EDNER, A. H.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; NYMAN, G. C. Metabolism during anaesthesia and recovery in colic and healthy horses: A microdialysis study. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 1, p. 1–13, 2009.
- ERICSSON, A. C. et al. A Microbiological Map of the Healthy Equine Gastrointestinal Tract. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1–10, 2016.
- FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hípidos e de eqüinos acometidos por abdômem agudo , antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, p. 1–10, 2002.
- FENG, Y. et al. Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 190–205, 2018.
- FIEGE, J. K. et al. Current Treatment of Ascending Colon Volvulus in Horses: A Survey of ACVS Diplomates. **Veterinary Surgery**, v. 44, n. 3, p. 398–401, 2015.
- FILIPPO, P. A. DI et al. Indicadores bioquímicos séricos e do líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução intestinal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 504–511, 2012.
- FISCHER, A. T. Advances in diagnostic techniques for horses with colic. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 13, n. 2, p. 203–219, 1997.
- FRAPE, D. **Equine Nutrition and Feeding**. Third Edit ed., 2004.
- FREDERICO, L. M.; JONES, S. L.; BLIKSLAGER, A. T. Predisposing factors for small colon impaction in horses and outcome of medical and surgical treatment: 44 Cases (1999-2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 10, p. 1612–1616, 2006.
- FREEMAN, D. E. et al. Comparison of clinical judgment, Doppler ultrasound, and fluorescein fluorescence as methods for predicting intestinal viability in the pony. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 895–900, 1988.
- FREEMAN, D. E. Fifty years of colic surgery. **Equine Veterinary Journal**, v. 50, n. 4, p. 423–435, 2018.

- FREEMAN, D. E.; SCHAEFFER, D. J.; BAKER, G. J. A Clinical Grading System for Intraoperative Assessment of Small Intestinal Viability in the Horse. **AAEP Proceedings**, v. 47, p. 105–109, 2001.
- FREEMAN, D. E.; SCHAEFFER, D. J.; CLEARY, O. B. Long-term survival in horses with strangulating obstruction of the small intestine managed without resection. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, p. 711–717, 2014.
- FROSCHE, B. G.; NAGODE, L. A. Origin and importance of increased alkaline phosphatase activity in peritoneal fluids of horses with colic. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 5, p. 888–891, 1981.
- GARBER, A.; HASTIE, P.; MURRAY, J. A. Factors Influencing Equine Gut Microbiota: Current Knowledge. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 88, p. 102943, 2020.
- GARDNER, A.; DOCKERY, A.; QUAM, V. Exploratory Celiotomy in the Horse Secondary to Acute Colic: A Review of Indications and Success Rates. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 34, p. 1–9, 2019.
- GATT, M.; REDDY, B. S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, n. 25, p. 741–757, 2007.
- GOODRICH, J. K. et al. Conducting a microbiome study. **Cell**, v. 158, n.2, p.250-262, 2014.
- GOTO, Y.; IVANOV, I. I. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal – host immune crosstalk. **Immunology and Cell Biology**, v. 91, n. 3, p. 204–214, 2013.
- GOULET, O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. **Nutrition Reviews**, v. 73, p. 32–40, 2015.
- GRULKE, S. et al. Determination of a Gravity and Shock Score for Prognosis in Equine Surgical Colic. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 48, n. 8, p. 465–473, 2001.
- HANN, M. et al. Bacterial translocation in horses with colic and the potential association with surgical site infection: a pilot study. **Veterinary Record**, p. 1–7, 2020.
- HANSON, R. R. et al. Evaluation of peritoneal fluid following intestinal resection and anastomosis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 2, p. 216–221, 1992.
- HASSEL, D. M.; HILL, A. E.; RORABECK, R. A. Association between Hyperglycemia and Survival in 228 Horses with Acute Gastrointestinal Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 1261–1265, 2009.
- HINCHCLIFF, K. W.; RUSH, B. R.; FARRIS, J. W. Evaluation of plasma catecholamine and serum cortisol concentrations in horses with colic. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 2, p. 276–280, 2005.
- HOOGMOED, L. V. A. N. et al. Use of Pelvic Flexure Biopsies to Predict Survival After Large Colon Torsion in Horses. **Veterinary Surgery**, v. 29, p. 572–577, 2000.
- HOPSTER, K. et al. Influence of mechanical manipulations on the local inflammatory reaction in the equine colon. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 39, p. 1–7, 2011.

- HUGHES, F. E.; SLONE, D. E. Large Colon Resection. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 13, n. 2, p. 341–350, 1997.
- HUGHES, J. B. et al. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399-406, 2001.
- HUNT, E.; TENNANT, B. C.; WHITLOCK, R. H. Interpretation of peritoneal fluid erythrocyte counts in horses with abdominal disease. **Proceedings Equine Colic Research Symposium**, p. 168–174, 1986.
- HURCOMBE, S. D. et al. Dark-field microscopy in the assessment of large colon microperfusion and mucosal injury in naturally occurring surgical disease of the equine large colon. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, p. 674–680, 2014.
- HURCOMBE, S. D.; MUDGE, M. C.; DANIELS, J. B. Presumptive bacterial translocation in horses with strangulating small intestinal lesions requiring resection and anastomosis. v. 22, n. 6, p. 653–660, 2012.
- IACOB, S.; IACOB, D. G. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–17, 2019.
- JACOBS, C. C.; STEFANOVSKI, D.; SOUTHWOOD, L. L. Use of perioperative variables to determine the requirement for repeat celiotomy in horses with postoperative reflux after small intestinal surgery. **Veterinary Surgery**, p. 1–7, 2019.
- JASSIM, R. A. M. AL; ANDREWS, F. M. The Bacterial Community of the Horse Gastrointestinal Tract and Its Relation to Fermentative Acidosis, Laminitis, Colic, and Stomach Ulcers. **Vet Clin Equine**, v. 25, p. 199–215, 2009.
- JENNINGS, K. M. et al. Prospective survey of veterinary practitioners' primary assessment of equine colic: Clinical features, diagnoses, and treatment of 120 cases of large colon impaction. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. Suppl 1, p. 52-56, 2014.
- JULLIAND, V.; 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 1. **Journal of Animal Science**, v. 94, 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.
- KANEKO, J. J. ; HARVEY, J. W. ;; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 6th. ed., 2008.
- KAUFMAN, J. M. et al. Article Clinical findings, diagnoses, and outcomes of horses presented for colic to a referral hospital in Atlantic Canada (2000-2015). **Canadian Veterinary Journal**, v. 61, n. 3, p. 281–288, 2020.
- KELLY, C. J. et al. Tissue Barrier Function Short Article Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. **Cell Host and Microbe**, p. 1–10, 2015.

- KIM, B. R. et al. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089–2093, 2017.
- LASKOSKI, L. M. et al. Systemic leukopenia, evaluation of laminar leukocyte infiltration and laminar lesions in horses with naturally occurring colic syndrome. **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 15–21, 2015.
- LATSON, K. M. et al. Evaluation of peritoneal fluid lactate as a marker of intestinal ischaemia in equine colic. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 4, p. 342–346, 2005.
- LINDROTH, K. M. et al. Faecal bacterial composition in horses with and without free faecal liquid: a case control study. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021.
- MACFIE, J. et al. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. **British Journal of Surgery**, v. 93, n. 1, p. 87–93, 2006.
- MAIR, T. S.; SMITH, L. J.; SHERLOCK, C. E. Evidence-Based Gastrointestinal Surgery in Horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 23, n. 2, p. 267–292, 2007.
- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 31, p. 1–3, 2015.
- MCCOY, A. M. et al. Pulmonary Gas Exchange and Plasma Lactate in Horses with Gastrointestinal Disease Undergoing Emergency Exploratory Laparotomy: A Comparison with an Elective Surgery Horse Population. **Veterinary Surgery**, v. 40, n. 5, p. 601–609, 2011.
- MCDONALD, D. et al. Extreme Dysbiosis of the Microbiome in Critical Illness. **mSphere**, v. 1, n. 4, p. 1–6, 2016.
- MCKINNEY, C. A. et al. The fecal microbiota of healthy donor horses and geriatric recipients undergoing fecal microbial transplantation for the treatment of diarrhea. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. 1–16, 2020.
- MCKINNEY, C. A. et al. Assessment of clinical and microbiota responses to fecal microbial transplantation in adult horses with diarrhea. **PLoS ONE**, v. 16, n. 1 January, p. 1–21, 2021.
- MENG, M.; KLINGENSMITH, N. J.; COOPERSMITH, C. M. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure. **Current Opinion in Critical Care**. p. 143–148, 2017.
- MOORE, J. N.; VANDENPLAS, M. L. Is it the Systemic Inflammatory Response Syndrome or Endotoxemia in Horses with Colic? **Veterinary Clinics of NA: Equine Practice**, p. 1–15, 2014.
- MOSS, C. M. et al. The origin of the elevated peritoneal fluid alkaline phosphatase activity in small intestinal injury. **Journal of Surgical Research**, v. 23, n. 3, p. 172–176, 1977.
- MURRAY, W.; WILLIAMS, L. F. New Parameters of Viability in Ischemic Bowel Disease. **The American Journal of Surgery**, p. 136–141, 1973.
- MYERS, M.; CHERRY, G.; GESSER, J. Relationship between surface pH and pCO<sub>2</sub> and the vascularity and viability of intestine. **M. Surgery Gynecology and Obstetrics**, v. 134, p. 787, 1972.
- NEIL, K. How to use Lactate in Equine Practice. **Australian Equine Veterinarian**, v. 27, n. 4, p. 34–48, 2008.
- NIETO, J. Colic - Some bright views on the horizon. **Veterinary Journal**, v. 172, n. 1, p. 6–7, 2006.

- NIETO, J. Peritoneal Fluid. Em: PUSTERLA, N.; HIGGINS, J. (Eds.). **Interpretation of Equine Laboratory Diagnostics**. First Edit ed. p. 357–362, 2018.
- ORR, K. E. et al. Prognostic value of colonic and peripheral venous lactate measurements in horses with large colon volvulus. **Veterinary Surgery**, v. 49, n. 3, p. 472–479, 2020.
- PAGAN, J. D. **Advances in Equine Nutrition**. 1st ed ed. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, UK., 1998.
- PAIM, K. P. et al. Lactatemia e glicemia na síndrome cólica de equinos : revisão Lactatemia e glicemia na síndrome cólica de equinos : revisão Lactatemia y glicemia en el síndrome del cólico equino : revisión. **Pubvet**, v. 13, n. 8, p. 1–9, 2019.
- PARRY, B. W. Evaluation of Horses with Colic. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 3, n. 3, p. 529–542, 1987.
- PELOSO, J. G.; COHEN, N. D. Use of serial measurements of peritoneal fluid lactate concentration to identify strangulating intestinal lesions in referred horses with signs of colic. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 240, n. 10, p. 1208–1217, 2012.
- PERRY, E. et al. Journal of Equine Veterinary Science Effect of Road Transport on the Equine Cecal Microbiota. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 68, p. 12–20, 2018.
- PHILLIPS, T. J.; WALMSLEY, J. P. Retrospective analysis of the results of 151 exploratory laparotomies in horses with gastrointestinal disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 5, p. 427–431, 1993.
- PIERCE, R. L. Enteroliths and Other Foreign Bodies. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 25, n. 2, p. 329–340, 2009.
- PIHL, T. H. et al. Influence of Disease Process and Duration on Acute Phase Proteins in Serum and Peritoneal Fluid of Horses with Colic. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 651–658, 2015.
- PIHL, T. H. et al. Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic. **Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex.: 2001)**, v. 26, n. 5, p. 664–674, 2016.
- PITTA, D.; INDUGU, N.; ENGILES, J. B. Characterization of the fecal microbiota of healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 8, p. 811–819, 2018.
- POUYADE, G. R. et al. Evaluation of low-molecular-weight heparin for the prevention of equine laminitis after colic surgery. v. 19, n. 1, p. 113–119, 2009.
- PYE, J. et al. Preoperative factors associated with resection and anastomosis in horses presenting with strangulating lesions of the small intestine. **Veterinary Surgery**, v. 48, n. 5, p. 786–794, 2019.
- RADCLIFFE, R. M. et al. Evaluation of L-lactate and cardiac troponin I in horses undergoing emergency abdominal surgery. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 22, n. 3, p. 313–319, 2012.
- REED, K. J. et al. The pelvic flexure separates distinct microbial communities in the equine hindgut. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021.
- SALCICCIA, A. et al. Sensitivity and specificity of blood leukocyte counts as an indicator of mortality in horses after colic surgery. **Veterinary Record**, v. 173, n. 11, p. 267, 2013.



- SALEM, S. E. et al. Acute changes in the colonic microbiota are associated with large intestinal forms of surgical colic. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2019.
- SANTSCHI, E. M. et al. Peritoneal Fluid Analysis in Ponies after Abdominal Surgery. **Veterinary Surgery**, v. 17, n. 1, p. 6–9, 1988.
- SAULEZ, M. N.; CEBRA, C. K.; DAILEY, M. Comparative biochemical analyses of venous blood and peritoneal fluid from horses with colic using a portable analyser and an in-house analyser. **Veterinary Record**, v. 157, n. 8, p. 217–223, 2004.
- SCHOSTER, A. et al. Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism. **BMC Veterinary Research**, 2013.
- SCHOSTER, A. et al. Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 48, p. 595–602, 2015.
- SEGATA, N. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, 24 jun. 2011.
- SNYDER, J. R. et al. Surface oximetry of healthy and ischemic equine intestine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 12, p. 2530–2535, 1986.
- SOUTHWOOD, L. L. Acute Abdomen. **Clinical Techniques in Equine Practice**, p. 112–126, 2006.
- SOUTHWOOD, L. L. et al. Short-term outcome of equine emergency admissions at a university referral hospital. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 5, p. 459–464, 2009.
- SOUTHWOOD, L. L. **Practical Guide to Equine Colic**. 1st Edition, 2013.
- STÄRKEL, P. et al. Intestinal dysbiosis and permeability: the yin and yang in alcohol dependence and alcoholic liver. **Clinical Science**, v. 132, p. 199–212, 2018.
- STEWART, H. L. et al. Differences in the equine faecal microbiota between horses presenting to a tertiary referral hospital for colic compared with an elective surgical procedure. **Equine Veterinary Journal**, v. 0, p. 1–7, 2018.
- STEWART, H. L. et al. Differences in the equine faecal microbiota between horses presenting to a tertiary referral hospital for colic compared with an elective surgical procedure. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 3, p. 336–342, 2019.
- STEWART, H. L. et al. Changes in the faecal bacterial microbiota during hospitalisation of horses with colic and the effect of different causes of colic. **Equine Veterinary Journal**.v.1, p. 1 - 13, 2020.
- THOEFNER, M. B. et al. Diagnostic decision rule for support in clinical assessment of the need for surgical intervention in horses with acute abdominal pain. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 1, p. 20–29, 2003.
- TINKER, M. K. et al. Prospective study of equine colic incidence and mortality. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 6, p. 448–453, 1997.
- TRAUB-DARGATZ, J. L. et al. Estimate of the national incidence of and operation-level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to 1999. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 1, p. 67–71, 2001.

- TRAUB-DARGATZ, J. L.; SALMAN, M. D.; VOSS, J. L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 10, p. 1745–1747, 1991.
- UNDERWOOD, C. et al. Hepatic and metabolic changes in surgical colic patients: A pilot study. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 6, p. 578–586, 2010.
- URAYAMA, S. et al. Blood glucose is unlikely to be a prognostic biomarker in acute colitis with systemic inflammatory response syndrome in Thoroughbred racehorses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 1, p. 15–19, 2018.
- VALADÃO, C. A. A.; ÁVILA JUNIOR, O. S.; CAMPOS FILHO, E. Biochemical aspects of plasma and peritoneal fluid from horses with colic. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 4, n. 1, p. 32–35, 1996.
- VAN HOOGMOED, L. et al. Evaluation of peritoneal fluid pH, glucose concentration, and lactate dehydrogenase activity for detection of septic peritonitis in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 7, p. 1032–1036, 1999.
- VAN LOON, J. P. A. M. et al. Colic Surgery in Horses: A Retrospective Study Into Short- and Long-Term Survival Rate, Complications and Rehabilitation toward Sporting Activity. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 90, p. 103012, 2020.
- VENABLE, E. B.; KERLEY, M. S.; RAUB, R. Assessment of equine fecal microbial profiles during and after a colic episode using pyrosequencing. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 5, p. 347–348, 2013.
- VILJOEN, A. et al. After-hours equine emergency admissions at a university referral hospital (1998–2007): Causes and interventions. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 80, n. 3, p. 169–173, 2009.
- WANG, X. et al. Current applications of absolute bacterial quantification in microbiome studies and decision-making regarding different biological questions. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, 2021.
- WEESE, J. S. et al. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post-partum colic. **Equine Veterinary Journal**, p. 641–649, 2015.
- WHEAT, J. D. Causes of colic and types requiring surgical intervention. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 46, n. 1, p. 95–99, 1975.
- WHITE, N. A. **Determining the Diagnosis and Prognosis of the Acute Abdomen. In: The Equine Acute Abdomen.** Philadelphia: Lea & Febiger: 5<sup>th</sup> edition, 1990.
- WHYARD, J. M.; BROUNTS, S. H. Complications and survival in horses with surgically confirmed right dorsal displacement of the large colon. **Canadian Veterinary Journal**, v. 60, n. 4, p. 381–385, 2019.
- WIMMER-SCHERR, C. et al. Comparison of fecal microbiota of horses suffering from atypical myopathy and healthy co-grazers. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 1–17, 2021.
- WOLFMAN JR, E. F. Determination of Intestinal Viability. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 5, n. 2, p. 295–307, 1989.

WONG, D. M.; MOORE, R. M.; BROCKUS, C. W. Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Horses: Pathogenesis and Therapeutics. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, n.3, p. 1–6, 2012.

WORMSTRAND, B. H. et al. Surgical treatment of equine colic - a retrospective study of 297 surgeries in Norway 2005-2011. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 1–9, 2014.

YAMOUT, S. Z. et al. Peritoneal and Plasma d-lactate Concentrations in Horses with Colic. **Veterinary Surgery**, v. 40, n. 7, p. 817–824, 2011.

ZARINS, C. K. et al. Prediction of viability of revascularized intestine with radioactive microspheres. Zarins CK, Skinner DB, Rhodes BA, et al. **Surgery Gynecology and Obstetrics**, v. 138, p. 576, 1974.

### **3. Capítulo 2 – Artigo Científico I: Alterações na microbiota intestinal e fecal de equinos com cólica cirúrgica**

#### **3.1 Resumo**

A síndrome cólica é uma enfermidade importante em equinos, que pode apresentar alterações significativas na microbiota do trato gastrointestinal. A compreensão dessas alterações pode abrir caminho para novas abordagens preventivas e terapêuticas. O objetivo deste estudo foi avaliar a microbiota fecal e intestinal de equinos com síndrome cólica submetidos à celiotomia exploratória. Para isso, 35 cavalos foram utilizados, em que conteúdo fecal, cecal e do segmento acometido foram colhidos, bem como fezes pós-operatórias (dia 1, 2 e 3) e 6 meses após a cirurgia. Doze cavalos residentes da mesma propriedade do companheiro com cólica também tiveram fezes colhidas. Foi realizado sequenciamento genético região V4 do gene 16S rRNA para análise dos conteúdos. A microbiota fecal de equinos com cólica de resolução cirúrgica difere em diversidade da de seus pares clinicamente saudáveis, revelando um processo de disbiose. Bactérias como *Escherichia/Shigella* e *Akkermansia* foram associadas às fezes de cavalos com esse distúrbio. A duração da cólica, o segmento intestinal acometido e o tipo de lesão são fatores que influenciam na riqueza, diversidade e composição bacteriana, tanto em amostras fecais como de conteúdo intestinal, sugerindo uma interconexão complexa de fatores que influenciam a disbiose nessa enfermidade. A diferença entre fezes e os conteúdos do intestino grosso destacaram a singularidade de cada segmento intestinal durante episódios de cólica, reforçando a importância de considerar múltiplos parâmetros ao interpretar amostras de fezes em casos clínicos e cirúrgicos. A ausência de alterações nas amostras fecais colhidas seis meses após a intervenção cirúrgica em comparação às dos pares saudáveis, demonstram que esse tratamento permite o restabelecimento da microbiota normal após esse período.

**Palavras-chave:** cavalos, disbiose, abdome agudo, cirurgia gastrointestinal, sequenciamento genético

### 3.2 Introdução

A comunidade de microorganismos presente no trato gastrointestinal desempenha um papel fundamental na saúde e processos digestivos dos cavalos (BLIKSLAGER, 2019; COSTA; WEESE, 2018; STEWART et al., 2018; WEESE et al., 2015). Diversos estudos foram realizados no intuito de classificar a composição da microbiota bacteriana de equinos saudáveis e atualmente, com o conhecimento mais consolidado, já se sabe que ela pode ser influenciada por diversos fatores, como dieta, manejo, uso de antimicrobianos e entre outros fatores (COLLINET et al., 2021; COSTA et al., 2015a; COSTA; WEESE, 2018; DOUGAL et al., 2013; GARBER; HASTIE; MURRAY, 2020a; JULLIAND; GRIMM, 2017; PERRY et al., 2018; SCHOSTER et al., 2015).

A síndrome cólica é uma enfermidade importante em equinos, capaz de causar diversos prejuízos econômicos e alta taxa de mortalidade, quando comparada a outras doenças na espécie (TRAUB-DARGATZ et al., 2001; WORMSTRAND et al., 2014). Considerando que a microbiota intestinal pode sofrer alterações significativas em certas condições do trato gastrointestinal, a compreensão dessas alterações em casos de abdome agudo, pode abrir caminho para novas abordagens preventivas e terapêuticas (COSTA; WEESE, 2012; GOULET, 2015; STEWART et al., 2020).

Alguns estudos têm demonstrado alterações na microbiota em casos de cólica clínica e cirúrgica, bem como em casos de cólica pós-parto (SALEM et al., 2019; STEWART et al., 2019; WEESE et al., 2015). No entanto, mais pesquisas são necessárias para compreender de forma mais aprofundada o comportamento da microbiota nessas situações, uma vez que a síndrome cólica possui diversas apresentações, regiões intestinais de acometimento e intensidade de gravidade. Assim, poderemos chegar cada vez mais perto de informações mais precisas de quais são as reais

alterações nos diferentes tipos de cólica e se a disbiose encontrada nesses casos são causa ou consequência.

Dessa forma, objetivou-se com esse estudo avaliar e comparar as abundâncias relativas e composição da comunidade microbiana de conteúdo de segmentos intestinais e fezes de cavalos com cólica de resolução cirúrgica, bem como avaliar as fezes ao longo do tempo (pré-cirúrgico, durante 3 dias de pós cirúrgico e 6 meses pós cirúrgico) e compará-las com cavalos saudáveis provenientes da propriedade de origem.

### **3.3 Material e métodos**

#### *3.3.1 Seleção de Animais*

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP e possui protocolo CEUA 5405101019. Foram incluídos no estudo equinos machos e fêmeas com síndrome cólica de resolução cirúrgica, recebidos no Hospital Veterinário da FZEA/USP e cavalos saudáveis, residentes da mesma propriedade de origem dos cavalos enfermos. Animais com menos de dois anos ou que receberam antibiótico dentro de 90 dias antes das colheitas não participaram do estudo, assim como, aqueles com ruptura de estômago ou alça intestinal detectados no momento da admissão.

#### *3.3.2 Delineamento experimental e colheita de amostras*

Os equinos diagnosticados com síndrome cólica ficaram alojados em tronco de contenção para tratamento clínico e suporte imediato, até serem encaminhados para o centro cirúrgico. Nesse momento pré-cirúrgico (PreOp), foram obtidas informações do histórico do paciente e colhidas amostras de fezes.

Para as amostras de fezes, foram colhidos 30g, obtidos com a introdução da mão na ampola retal dos equinos, após colocação de luvas de palpação e lubrificante estéril. Apenas 1g do

conteúdo central do bolo fecal foi introduzido em dois eppendorfes, para serem posteriormente destinados para análise de microbiota.

Após encaminhamento para cirurgia (Intraoperative), estando o animal em decúbito dorsal, sob anestesia geral inalatória e após devido preparo cirúrgico, foi realizada a abertura da cavidade abdominal, sempre pelo mesmo cirurgião, através da linha alba, com posterior abertura do peritônio e, realizada, enfim, a exposição das alças intestinais. O ceco foi exteriorizado e, por meio de agulha 40x16 e seringa de 5 mL, ambas estéreis, 4ml do conteúdo líquido foram aspirados, na região do ápice, próximo ou sobre a tênia dorsal.

Após isso, por meio de exploração da cavidade abdominal, foi localizado o segmento intestinal acometido. Neste momento, a afecção era classificada quanto a região de injúria (intestino grosso ou delgado), quanto ao tipo de obstrução (estrangulativa ou não estrangulativa) e tipo de cólica (obstrução intraluminal de intestino grosso, torção de cólon maior, deslocamento de cólon maior, obstrução intraluminal de intestino delgado e obstrução estrangulativa de intestino delgado). Para o conteúdo do segmento acometido, a colheita era realizada imediatamente após a enterotomia. Quando não havia indicação de enterotomia, a amostra era colhida por meio de aspiração com agulha 40x16 e seringa de 5 mL. Nos casos de afecções cecais, era colhido apenas o conteúdo desse segmento.

As amostras eram homogeneizadas e distribuídas em dois eppendorfes, os quais eram acondicionados em isopor com gelo e, posteriormente, transferidos para freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , em um período de até 3 horas, para posterior análise de sequenciamento de DNA. Após as colheitas de materiais biológicos e avaliações macroscópicas das alças intestinais, o procedimento cirúrgico foi conduzido conforme técnica cirúrgica preconizada para correção da afecção. No período pós-

cirúrgico, 24h (Feces Day 1), 48h (Feces Day 2) e 72h (Feces Day 3) após a recuperação anestésica, foram colhidas as amostras de fezes, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Após 6 meses do procedimento cirúrgico, 12 equinos do grupo experimental foram selecionados aleatoriamente, e foram colhidas fezes (Feces 6 months) para avaliação da microbiota. Ainda, nesse mesmo momento, foram colhidas amostra de fezes, de 12 cavalos saudáveis (Feces Control), residentes da mesma propriedade e com a mesma dieta do cavalo do grupo experimental.

Foi realizada a antibioticoterapia com penicilina potássica, na dose de 22.000UI/kg, a cada 6 horas, por 5 dias e gentamicina, na dose de 6,6mg/kg, a cada 24 horas, por 5 dias. Como anti-inflamatório e analgésico foi utilizado flunixin meglumine, na dose de 1,1mg/kg, a cada 12 horas, por 3 dias, e a cada 24h por mais dois dias. As medicações tiveram sua aplicação inicial no período trans cirúrgico, imediatamente após a colheita das amostras de conteúdo intestinal. O retorno da alimentação ocorreu de forma variada, de acordo com a evolução de cada caso, mas a intenção foi de incluir com cerca de 12 horas pós cirúrgico para casos de intestino grosso e com cerca de 18h a 24 horas, para casos de intestino delgado que não apresentavam refluxo. Todos os animais foram acompanhados até a completa cicatrização das feridas cirúrgicas, e, por fim, classificados como sobreviventes ou não sobreviventes.

### *3.3.3 Extração, Amplificação da região V4 do gene 16S rRNA e sequenciamento*

O DNA das amostras colhidas foi extraído a partir do kit comercial QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen)<sup>®</sup> em que, foram seguidas as recomendações do fabricante. A concentração de DNA das amostras foi feita no aparelho Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer (Life Technologies) com os kits de ensaio Qubit<sup>™</sup> dsDNA Broad Range (Invitrogen<sup>®</sup>). A amplificação foi feita após a extração do DNA metagenômico, por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) a 95°C por três



minutos, seguido por 35 ciclos de, 95°C por 30 segundos, 55°C por 90 segundos e 72°C por 30 segundos; e extensão final a 72°C por cinco minutos, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 e R806 para a região V4 do gene 16S rRNA (CAPORASO et al., 2011). Os produtos de PCR foram purificados em três etapas, sendo as duas primeiras segundo o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina e a terceira, a partir do gel de agarose 2% com o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit Supplied with capped columns (Zymo Research®), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação das amostras/bibliotecas utilizando o Qubit Assay kit de acordo com as recomendações do fabricante. As bibliotecas purificadas e quantificadas foram misturadas de maneira equimolar e sequenciadas (2x150pb) com o MiSeq® Reagent Kit v2 (300 ciclos) de acordo com as especificações do fabricante, utilizando-se a plataforma Illumina. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas (FCAV/UNESP).

#### *3.3.4 Análise de bioinformática e estatística*

A análise de bioinformática foi realizada usando o software Mothur (versão 1.47.0) (SCHLOSS et al., 2009) seguindo o protocolo padrão de análises MiSeq, que foi acessado em setembro de 2021 (KOZICH et al., 2013). Resumidamente, arquivos originais fastq foram montados em contigs excluindo as sequências maiores que 325 pb de comprimento, as que tinham ambiguidade nos pares de bases e também as que tinham polímeros maiores que 8 pb.

As sequências foram alinhadas usando o banco de dados de referência de rRNA SILVA 16S (QUAST et al., 2013). Quimeras foram identificadas e removidas usando o software vsearch. Sequências foram então agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com 97% de similaridade. A classificação taxonômica foi obtida do banco de dados RDP (Ribosomal Database

Project) (COLE et al., 2014). Leituras classificadas como o mesmo gênero foram agrupadas em filotipos.

A alfa diversidade foi indicada pelo número de OTUs (número de gêneros) e índice de Chao (riqueza) e pelos índices Simpson e Shannon (diversidade). Para analisar as relações entre as variáveis independentes e dependentes, foi utilizado um Modelo Linear Generalizado (GLM) usando a função `glm()` do R. Após ajustar o modelo GLM, foi realizada uma análise post hoc para comparar as médias das variáveis independentes. Para isso, foi utilizado o pacote `emmeans` (Least Squares Means) no R. A função `emmeans()` foi aplicada para calcular as médias ajustadas e realizar comparações entre grupos específicos. Para avaliar a significância estatística das diferenças entre as médias calculadas com o `emmeans`, foram utilizados testes de comparações múltiplas (com o teste de Tukey).

A beta diversidade foi avaliada usando o índice de Jaccard, que avalia a composição da comunidade (ou seja, quais bactérias estão presentes ou ausentes em uma comunidade), e pelo índice de Yue e Clayton, que avalia a estrutura da comunidade (ou seja, quais bactérias estão presentes com base em sua abundância em uma comunidade).

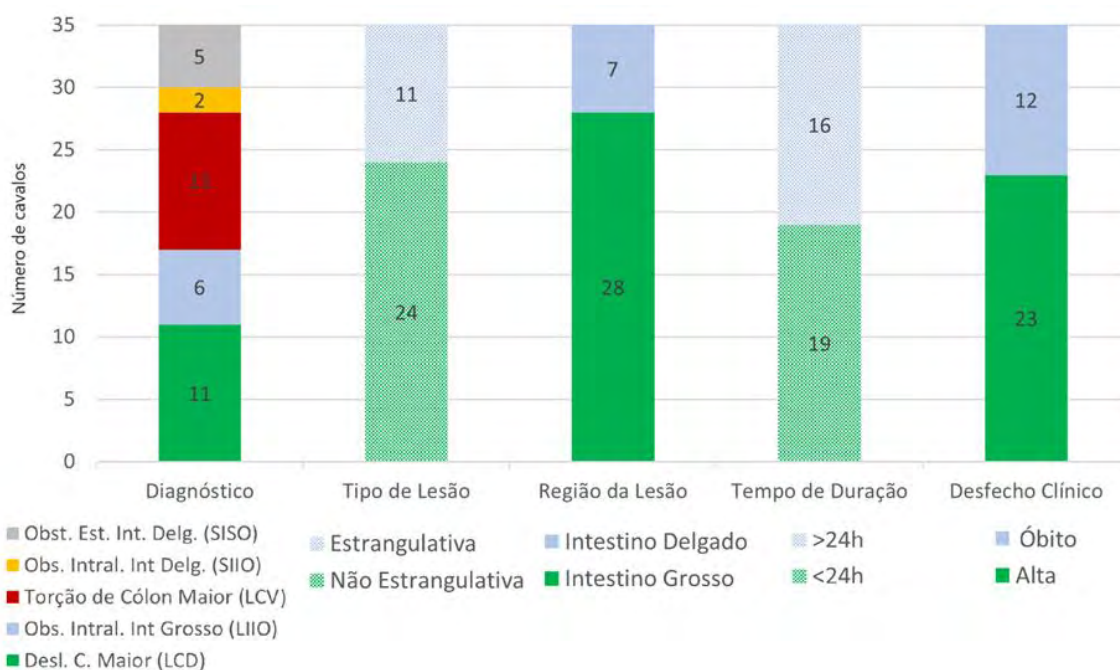
Gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA), realizado em 2 dimensões, foram obtidos para comparar as amostras de cada grupo. A análise de variância molecular (AMOVA) foi usada para comparar a composição e a estrutura da comunidade entre os grupos. A análise linear discriminante pelo efeito de tamanho (LEfSe) foi usada para encontrar associações significativas entre abundâncias relativas de ambos os grupos (SEGATA et al., 2011). Nesse caso, foi aplicado o Kruskal-Wallis, teste não paramétrico para detectar diferenças entre os grupos e, em seguida, um Wilcoxon não pareado, que é um teste de soma de classificação, seguido da Análise Discriminante

Linear (LDA), que quando maior que 2 foi considerada significativa. Para todas as análises foi considerado significativo quando  $p < 0.05$ .

### 3.4 Resultados

Foram incluídos nesse estudo 35 cavalos que apresentaram síndrome cólica e foram submetidos à cirurgia de celiotomia exploratória. Os dados gerais quanto ao diagnóstico, tipo de lesão, região da lesão, tempo de duração da cólica até a admissão no hospital e desfecho clínico dos cavalos incluídos no estudo, podem ser visualizados na Figura 1, e os dados individuais, na Tabela Suplementar 1.

Figura 1. Dados individuais de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos à celiotomia exploratória e identificados quanto ao diagnóstico, tipo de lesão, região da lesão, tempo de duração até a admissão no hospital e desfecho clínico.



Dentre as lesões incluídas em obstruções intraluminais de intestino grosso, constam compactações de cólon maior por areia ou por fibras, enterolitíase e compactações de cólon menor,

associadas a compactações de cólon maior. Compactações de ceco foram excluídas do estudo devido a um único cavalo admitido durante esse período.

Para análise de microbiota intestinal, foi utilizado o valor de corte de 5.263 leituras para cada amostra, para que assim elas pudessem apresentar uniformidade entre si. Utilizando esse número de leituras, foi atingido um valor de cobertura de  $99.43\% \pm 0.13\%$ , o que significa que a maior parte do número de gêneros contidos das amostras, foi devidamente detectada na análise de bioinformática. Para adequada interpretação dos resultados, além dos animais serem considerados como um único grupo de cavalos com cólica, todas as amostras foram avaliadas quanto ao tipo de cólica, tipo de lesão, região de acometimento, duração da cólica e desfecho clínico. Os resultados contendo todas as amostras em conjunto, bem como os significativos dentro de cada avaliação, serão demonstrados a seguir. O desfecho clínico (alta ou óbito), foi o único método comparativo que não apresentou diferença entre grupos em nenhuma análise e por isso não será demonstrado.

### 3.4.1 Alfa diversidade

Os dados de média e desvio padrão dos índices de alfa diversidade das amostras de intestino delgado, ceco, cólon maior e fezes, em todos os momentos avaliados, de cavalos com cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória, bem como das amostras de fezes de cavalos saudáveis (controle) estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrões de dos índices de alfa diversidade (Espécies Observadas, Chao, Simpson e Shannon) das amostras de intestino delgado, ceco, cólon maior e fezes (pre-operatório, dia 1 pós-cirúrgico, dia 2 pós-cirúrgico, dia 3 p pós-cirúrgico e 6 meses pós cirúrgico), de cavalos com cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória e valores médios e desvio padrão, das amostras de fezes de cavalos controle saudáveis.

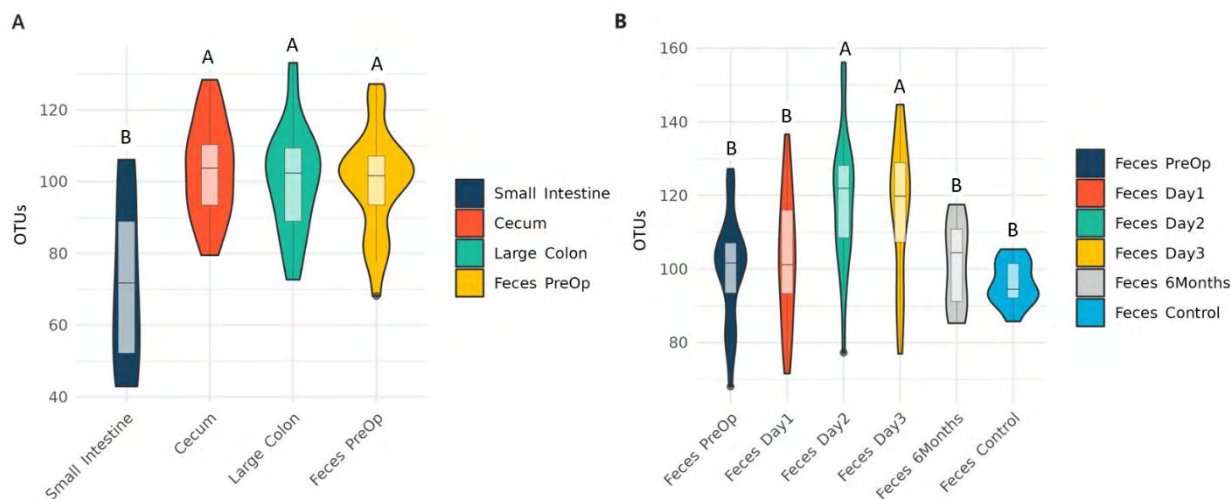
	Gêneros Observadas (OTUs)	Chao	Simpson	Shannon
<b>Intestino Delgado</b>	72 ± 23	91 ± 30	7.8 ± 3.9	2.6 ± 0.3
<b>Ceco</b>	103 ± 13	143 ± 22	10.6 ± 2.7	2.9 ± 0.2
<b>Intestino Grosso</b>	101 ± 14	143 ± 23	10.1 ± 2.2	2.8 ± 0.2
<b>Fezes Pre-Operatórias</b>	100 ± 14	138 ± 24	11.2 ± 2.7	2.9 ± 0.2
<b>Fezes Dia 1 Pós Cirurgico</b>	103 ± 17	144 ± 27	10.6 ± 4.1	2.9 ± 0.3

Fezes Cirúrgico	Dia 2 Pós	119 ± 18	160 ± 26	10.7 ± 2.3	3.1 ± 0.2
Fezes Cirúrgico	Dia 3 Pós	117 ± 18	153 ± 29	11.5 ± 4.9	3.0 ± 0.4
Fezes Cirúrgico	6 meses Pós	101 ± 11	147 ± 17	9.9 ± 1.6	2.8 ± 0.2
Fezes Controle		96 ± 6	135 ± 13	9.7 ± 1.2	2.8 ± 0.1

Em relação à alfa diversidade, entende-se que os índices de riqueza, indicam a quantidade de gêneros detectados na amostra (OTUs) ou, a quantidade estimada (que é calculada de acordo com o que foi observado, pelo índice de Chao), ou seja, quanto maior o número de gêneros presentes naquele conteúdo, maior a riqueza, independente de quem eles sejam. Já os índices de diversidade (Shannon e Simpson), referem-se à equidade entre esses gêneros dentro daquela amostra, ou seja, quanto mais proporcionais eles forem entre si, maior será a diversidade daquela amostra.

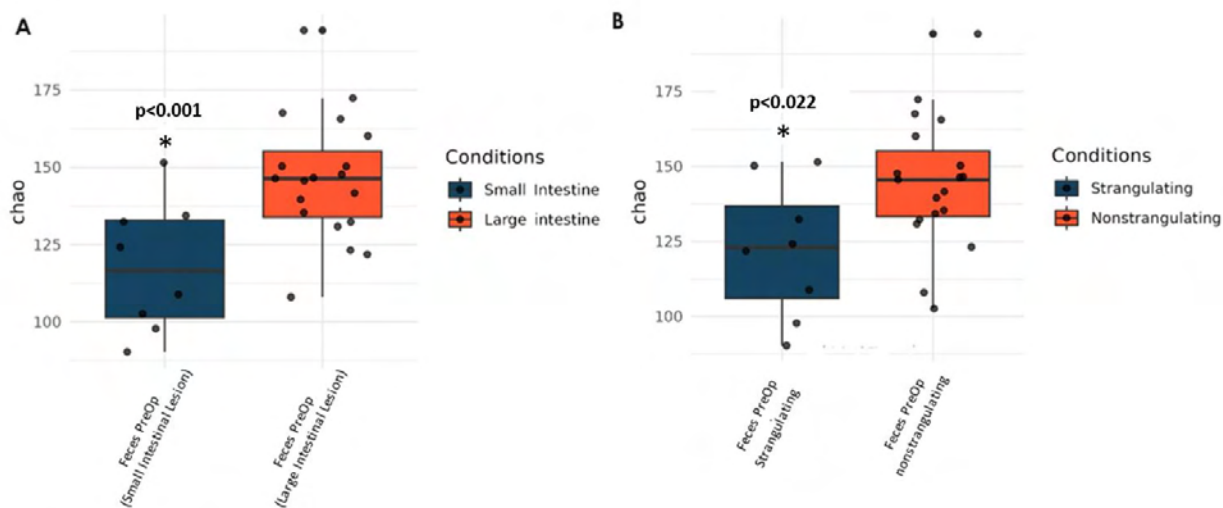
Assim sendo, em relação à alfa diversidade das amostras avaliadas em conjunto (todos os cavalos incluídos no estudo para cada local ou momento de colheita), pôde-se observar que os índices de riqueza e diversidade são menores no intestino delgado, quando comparados aos de intestino grosso e fezes ( $p < 0.01$ ) (Figura 2A). E fezes pré-operatórias possuem riqueza e diversidade similar às de cavalos saudáveis, mas possuem menor riqueza quando comparadas ao dia 2 e 3 pós-operatórios ( $p < 0.01$ ) (Figura 2B).

Figura 2. Gráficos de violino representando mediana, intervalo interquartil e densidade, do número de espécies observadas (OTUs) das amostras de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos à cirurgia de celiotomia exploratória. A) Amostras de conteúdo de intestino delgado (Small Intestine), ceco (Cecum), cólon maior (Large Colon) e fezes pré-operatórias (Feces PreOp). Existe diferença significativa quando intestino delgado é comparado com os outros segmentos intestinais e fezes ( $p < 0.01$ ) B) Amostras de fezes pré-operatórias (Feces PreOp), colhidas no momento da admissão hospitalar, um dia após a cirurgia de celiotomia exploratória (Day 1), dois dias depois (Day 2), três dias depois (Day 3), 6 meses depois (Feces 6Months) e de cavalos saudáveis (Feces Control). Existem diferenças significativas entre fezes pré-operatórias quando comparadas com fezes dos dias 2 e 3 pós-operatórios avaliados ( $p < 0.01$ ).



Quando as fezes pré-operatórias foram avaliadas perante o diagnóstico, região de acometimento, tipo de lesão, tempo de duração e desfecho clínico, pode ser observado que há diferença na riqueza quanto a região de acometimento (intestino grosso x delgado) ( $p < 0.001$ ) e quanto ao tipo de lesão (estrangulativa x não estrangulativa) ( $p < 0.022$ ), sendo os cavalos de lesões de intestino grosso responsáveis por possuir mais gêneros bacterianos nas fezes, do que os com lesões no intestino delgado, bem como as cólicas não estrangulativas, mais gêneros que as estrangulativas (Figura 3). Essas diferenças por região de acometimento e tipo de lesão, também foram encontradas nas amostras de fezes dos dias 2 e 3 pós-operatório, de intestino delgado e, para as amostras de ceco, apenas para o tipo de lesão ( $p$  valores  $< 0.05$ ). E todas as diferenças foram tanto para OTUs observadas, bem como para o índice de Chao, ambos representantes de riqueza da comunidade bacteriana.

Figura 3. Diagramas de caixa representando valores de mediana, mínimo e máximo do índice de Chao de amostras de fezes pré-operatórias de cavalos com cólica que foram submetidos a cirurgia de laparotomia exploratória. A) Em azul, valores de Chao de amostras de fezes de cavalos com lesões de intestino delgado e em vermelho, de cavalos com lesões em intestino grosso. B) Em azul, valores de Chao de amostras de fezes de cavalos com lesões estrangulativas e em vermelho, de cavalos com lesões não estrangulativas.



### 3.4.2. Abundância relativa, beta diversidade e análise de LEfSe

A média das abundâncias relativas das amostras representada pelas bactérias que compunham ao menos 1% da população total de bactérias das fezes pré-operatórias e de cada segmento intestinal é apresentada na Figura 4 e a comparação da composição das diferentes comunidades bacterianas é demonstrada na Figura 5.

Figura 4. Valores médios de abundância relativa dos principais gêneros (>1%) contidos em amostras de conteúdo de intestino delgado (Small Intestine), ceco (Cecum), cólon maior (Large Colon) colhidas durante a cirurgia de celiotomia exploratória, e fezes pré-operatórias (Feces PreOp), colhidas no momento da admissão de todos os cavalos com cólica que necessitaram de correção cirúrgica incluídos no estudo.

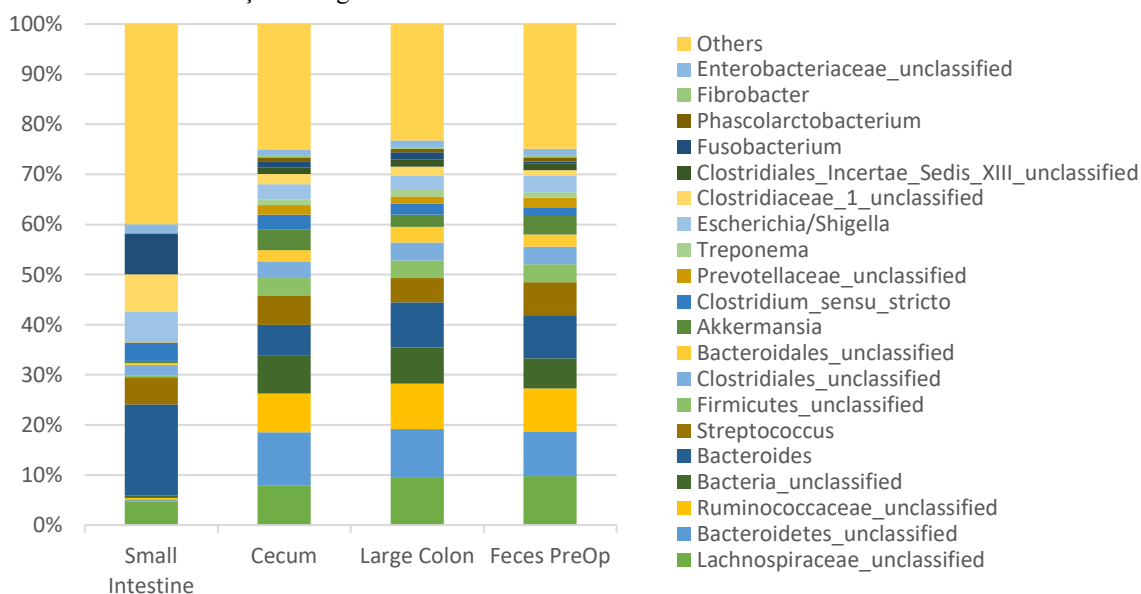
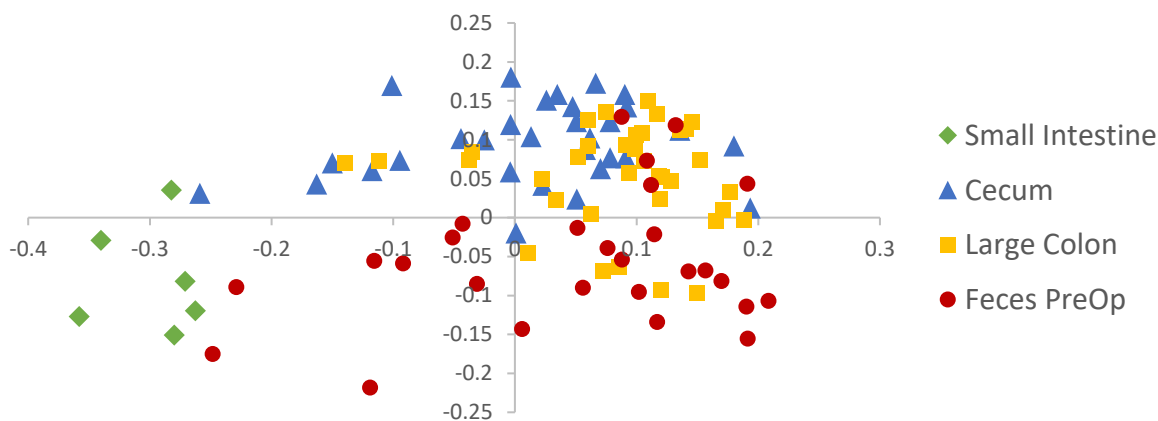


Figura 5. Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível de gênero pela análise de Jaccard de amostras de conteúdo de intestino delgado (Small Intestine), ceco (Cecum), cólon maior (Large Colon), colhidas durante a cirurgia de celiotomia exploratória, e fezes pré-operatórias (Feces PreOp), colhidas no momento da admissão, de cavalos com cólica que necessitaram de correção cirúrgica. Existem diferenças significativas entre todos os grupos (small intestine, cécum, large colon e feces preop) quando comparados entre si (AMOVA – todos p-valores <0.001).



Avaliando os resultados demonstrados nas figuras anteriores, pode ser observado que a composição da microbiota (quais gêneros a compõe) de cavalos com cólica é diferente em cada região intestinal e fezes, quando comparadas entre si (AMOVA  $p < 0.001$ ). Isso pode ser visualizado, principalmente no gráfico de PCoA (Figura 5), uma vez que pontos distantes entre si, implicam em dissimilaridade entre amostras, e pontos próximos entre si, similaridade, ou seja, quanto mais próximos, mais gêneros bacterianos possuem em comum. Dessa forma, pode ser observado que os segmentos do intestino grosso e fezes possuem maior similaridade entre as amostras, pois embora tenham separações características testadas estatisticamente e observadas no gráfico de PCoA, estão mais próximos entre si, do que quando comparados às amostras de intestino delgado.

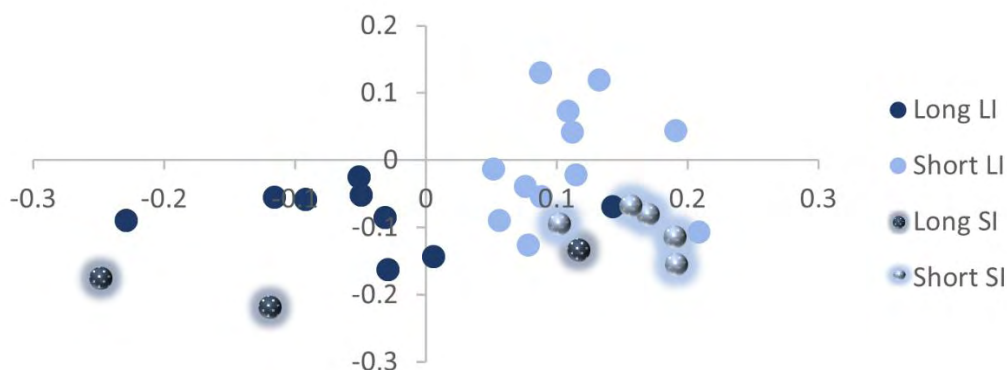
Além disso, os resultados confluem com o que foi observado na parte de abundância relativa, que é uma forma de resultados responsável por demonstrar qual a proporção de cada bactéria, dentro de determinada amostra. E pode ser observado que, as três bactérias de maior abundância relativa nos segmentos de intestino grosso, são representadas pelos mesmos gêneros,



sendo eles *Lachnospiraceae* não classificadas, *Bacterioidetes* não classificadas e *Ruminococcaceae* não classificadas. Em contrapartida, a composição das bactérias de intestino delgado, foi demasiadamente distinta das de intestino grosso e fezes, como pode ser observado na Figura 4, em que apresentaram outras três bactérias com maior abundância relativa, sendo elas *Bacterioides*, *Cetobacterium* e *Fusobacterium*.

Para as fezes, foi encontrada diferença em relação ao tempo de duração da cólica. Cavalos com mais de 24h de duração de cólica (Long), possuíam composição dos gêneros bacterianos e proporção entre esses gêneros, diferente de cavalos com 24h ou menos de duração de cólica (Short) ( $p < 0.001$ ), conforme representado na Figura 6. Quando os cavalos de lesões de intestino grosso e delgado são avaliados separadamente, também pode ser observado que existe diferença entre as cólicas de curta duração de intestino delgado (Short SI), para as cólicas de curta duração de intestino grosso (Short LI) ( $p = 0.017$ ).

Figura 6 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível de gênero pela análise de Jaccard de amostras de fezes pré-operatórias subdivididas em: cólicas de intestino grosso de duração >24h (Long LI), cólicas de intestino grosso de duração < 24h (Short LI), cólicas de intestino delgado de duração >24h (Long SI), cólicas de intestino delgado de duração < 24h (Short SI), colhidas no momento da admissão hospitalar. Existem diferenças significativas por meio do teste de AMOVA entre cólicas de longa duração (Long LI + Long SI) x cólicas de curta duração ( $p < 0.001$ ).



A média das abundâncias relativas das amostras, representada pelas bactérias que compunham ao menos 1% da população total de bactérias das fezes ao longo do tempo dos cavalos com cólica e em um único momento dos cavalos controle, é apresentada na Figura 7 e a

comparação da composição das diferentes comunidades bacterianas é demonstrada nas Figuras 8 e 9.

Figura 7 – Valores médios de abundância relativa dos principais gêneros (>1%) contidos em amostras de fezes pré-operatórias (Feces PreOp), colhidas no momento da admissão hospitalar, um dia após a cirurgia de celiotomia exploratória (Day 1), dois dias depois (Day 2), três dias depois (Day 3) e seis meses depois (6 months), de cavalos com cólica que necessitaram de correção cirúrgica. E de fezes de cavalos controles (Control), animais saudáveis provenientes da mesma propriedade de parte dos cavalos com cólica.

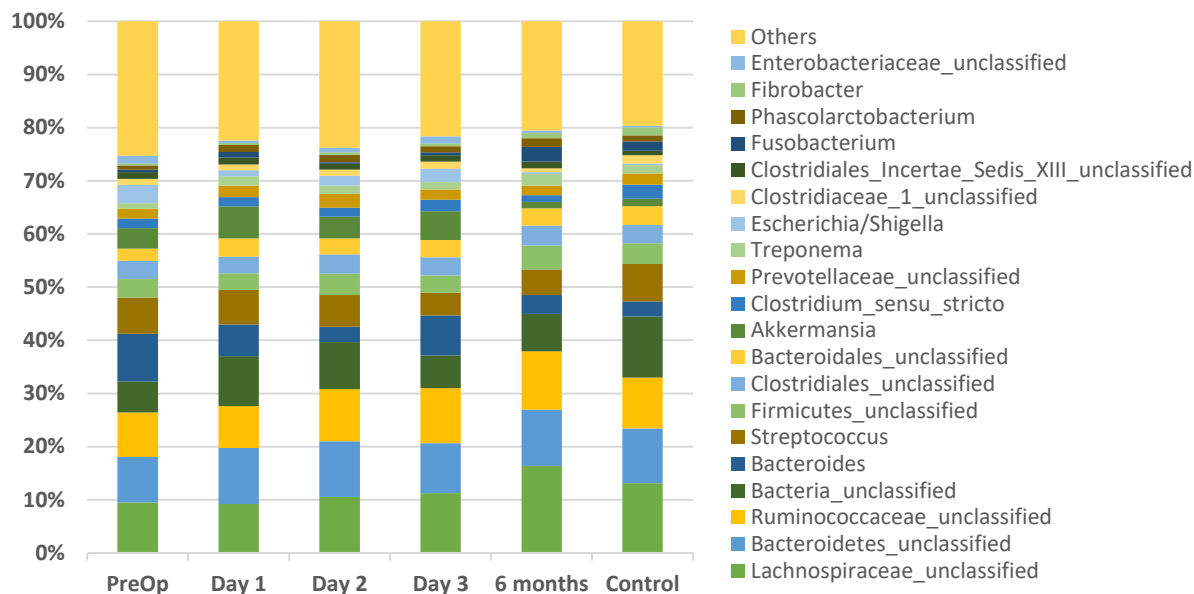


Figura 8 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível gênero pela análise de Jaccard de amostras de fezes pré-operatórias (Feces PreOp), colhidas no momento da admissão hospitalar, um dia após a cirurgia de celiotomia exploratória (Day 1), dois dias depois (Day 2), três dias depois (Day 3), de cavalos com cólica que necessitaram de correção cirúrgica. Existem diferenças significativas entre as fezes pré-operatórias quando comparadas com fezes de todos os dias de pós-operatórios avaliados (Day 1, Day 2, Day 3) (AMOVA – todos p-valores <0.001).

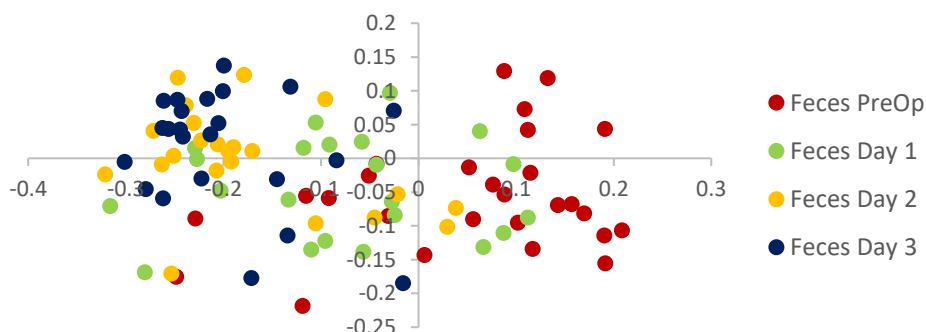
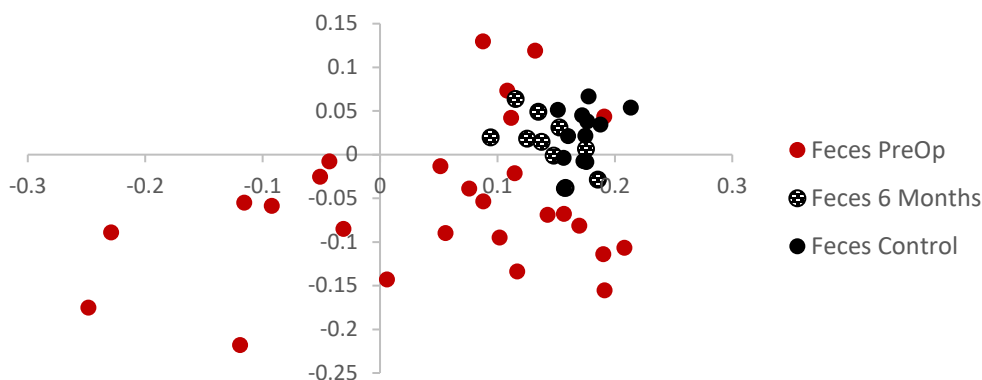


Figura 9 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível gênero pela análise de Jaccard de amostras de fezes pré-operatórias (Feces PreOp, N=27), colhidas no momento

da admissão hospitalar, após 6 meses da celiotomia exploratória (Feces 6 months, N=12) e de fezes de cavalos controles (Feces Control, N=12), animais saudáveis provenientes da mesma propriedade dos cavalos com cólica. Existem diferenças significativas por meio do teste de AMOVA entre Feces PreOp x Feces Control ( $p < 0.001$ ), entre Feces PreOp x Feces 6 Months ( $p=0.03$ ) e não há diferença entre Feces PreOp x Feces Control ( $p=0.088$ ).

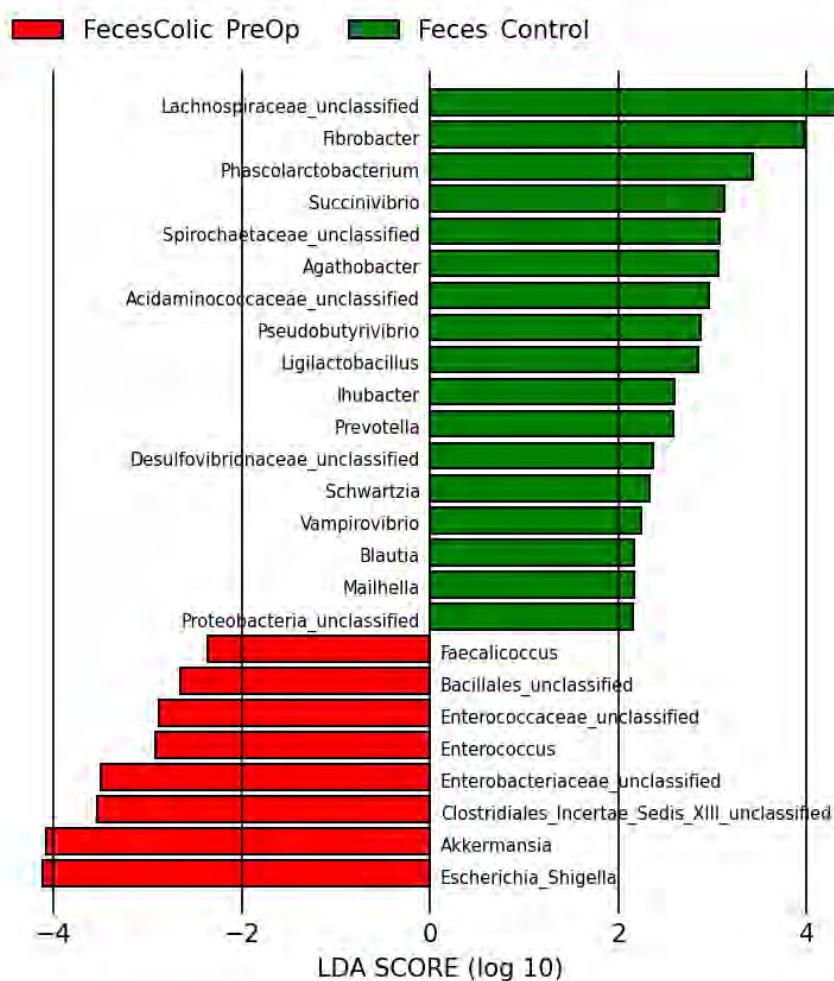


Foi observado que os cavalos com cólica no período de admissão hospitalar, possuem microbiota distinta de cavalos saudáveis que pertenciam ao mesmo local de alojamento ( $p < 0.001$ ) e dos cavalos que tiveram alta e foram avaliados após 6 meses da cirurgia ( $p=0.03$ ). A diferença significativa é válida tanto para a comparação da população total do estudo de cavalos com cólica *versus* os outros grupos, bem como quando comparamos apenas as amostras de fezes nesses 3 momentos, dos 12 cavalos com cólica que tiveram suas fezes colhidas após 6 meses e de seus cavalos controle ( $p < 0.001$ ). Também pôde ser observado que após 6 meses da cirurgia de cólica, a microbiota fecal não apresentou diferenças significativas da de cavalos saudáveis do grupo controle ( $p=0.088$ ).

As principais bactérias que foram significativamente diferentes entre o grupo cólica (Feces PreOp) e o grupo controle (Feces Control), pela análise linear discriminante pelo efeito de tamanho (LefSe -  $LDA > 2$ ), estão descritas na Figura 10. Essa análise leva em consideração todos os gêneros presentes na amostra e suas respectivas abundâncias relativas dentro de cada amostra, dessa forma, consegue comparar os grupos entre si, para determinar qual bactéria é associada a qual grupo

analisado. Se o resultado dessa análise, representado pelo escore de LDA, for maior do que 2, significa que aquela bactéria é significativamente associada àquele grupo.

Figura 10 - Análise Discriminante Linear pelo Efeito de Tamanho (LefSe) demonstrando os gêneros bacterianos significativamente associados a cada grupo (escore LDA > 2), sendo em vermelho o grupo cólica, representado pelas amostras de fezes pré-operatórias (Feces PreOp), e em verde, amostras de fezes de cavalos saudáveis, provenientes da mesma propriedade de parte dos cavalos com cólica (Feces Control).



Como pode ser observado na Figura 10, as bactérias de escore LDA mais significativo, associadas ao grupo controle foram *Lachnospiraceae não classificadas*, *Fibrobacter* e *Phascolarctobacterium*. Enquanto para o grupo cólica, foram *Escherichia/Shigella*, *Akkermansia* e *Clostridiales Incertae Sedis XIII não classificada*. Quando fazemos essa comparação entre as

cólicas de longa duração *versus* as de curta duração, mostra que a bactéria mais fortemente associada ao grupo de longa duração foram *Bacterioides*, *Streptococcus* e *Escherichia/Shigella* e ao de curta duração foram *Lachnospiraceae não classificadas* e *Ruminococcaceae não classificadas*. Em concordância com o resultado apresentado em gênero, quando avaliado no nível de filo, o *Fibrobacteres* foi fortemente associado ao grupo controle (LDA=4.2).

Quando temos associação de determinada bactéria a um grupo controle, que não foi submetido a nenhum tipo de tratamento, podemos inferir que houve redução dessa mesma bactéria no grupo alvo de estudo. Por exemplo, se *Phascolarctobacterium* foi associado ao grupo controle, significa que possuía em maior abundância relativa e em um maior número de amostras do grupo controle, quando comparado ao grupo cólica. Dessa forma, se foi associada aos cavalos saudáveis, consequentemente, significa que tem menor abundância relativa ou é encontrada em um menor número de amostras de cavalos com cólica.

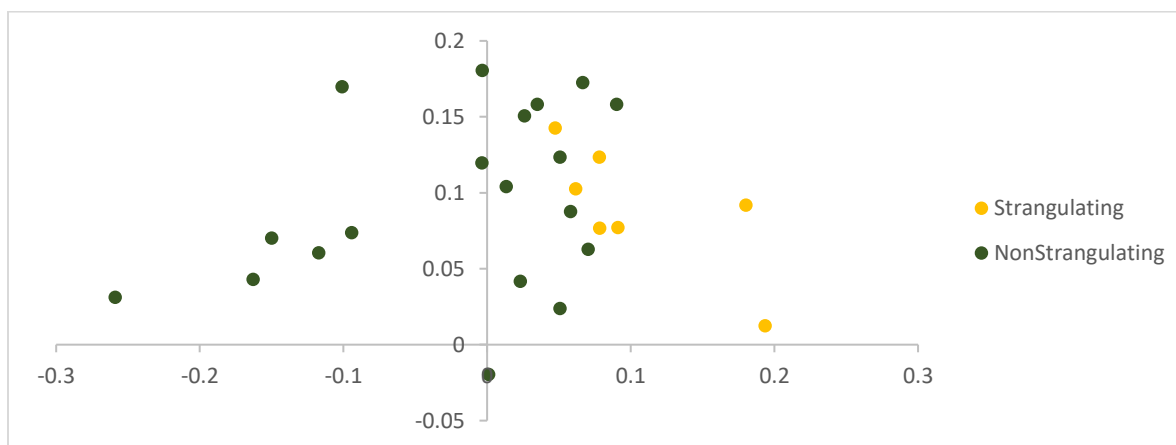
Conforme demonstrado anteriormente nas Figuras 8 e 9, quando comparamos as amostras de fezes ao longo do tempo de internação inicial, de todos os cavalos com síndrome cólica, sendo os momentos, pré-operatório (PreOp), dia 1 (Day 1), dia 2 (Day 2) e dia 3 (Day 3) pós cirúrgicos, podem ser observadas mudanças de composição microbiana. A partir do primeiro dia pós cirúrgico (Day 1), as amostras já possuíam microbiota significativamente diferente do momento pré-operatório (PreOp) ( $p=0.021$ ) e nos dias 2 e 3 (Day 2 e Day 3) com diferença ainda mais expressiva ( $p<0.001$ ), sendo apenas os dias 2 e 3, iguais estatisticamente entre si ( $p=0.142$ ). Além disso, no dia 3 pós-cirúrgico, as amostras de fezes das cólicas de lesões de intestino grosso, possuem composição diferente das de intestino delgado ( $p<0.001$ ).

Quando utilizada a análise de LefSe para comparar os grupos das cólicas de intestino grosso, de fezes pre-operatórias (Feces PreOp) *versus* fezes do dia 3 (Feces\_Day3) pós operatórias,

puderam ser associados os gêneros *Bacterioidetes não classificadas* e *Clostridium sensu strictu* ao grupo de Feces PreOp como as mais significativas e *Egghertela*, *Bacterioides*, *Escherichia/Shigella* e *Enterobacteriaceae não classificadas* para o grupo Feces\_Day3.

Em relação às amostras de conteúdo cecal (Figura 11), pôde ser observado que houve diferença significativa entre lesões estrangulativas e não estrangulativas, sejam elas de intestino grosso ou delgado ( $p=0.004$ )

Figura 11 - Análise de coordenadas principais (PCoA) do conjunto de membros da comunidade bacteriana utilizando o nível de gênero pela análise de Jaccard de amostras líquidas de conteúdo cecal aspiradas no momento transcirúrgico de celiotomia exploratória de cavalos com síndrome cólica. Os pontos amarelos representam as amostras cecais de todas as cólicas estrangulativas (Strangulating) incluídas no estudo e os pontos verdes escuros, as não estrangulativas (NonStrangulating) (AMOVA -  $p=0.004$ ).

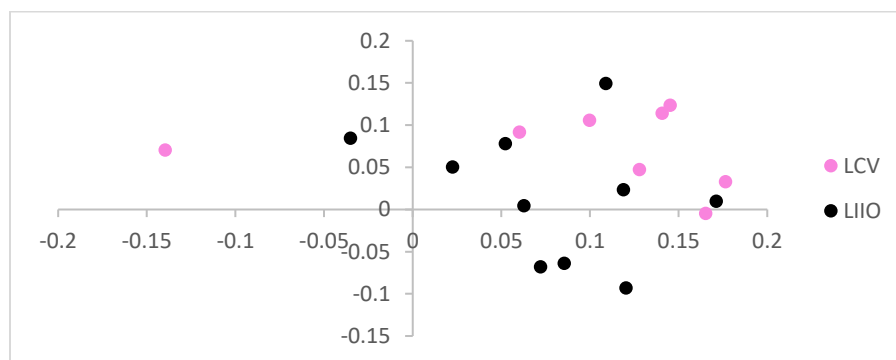


No LefSe, as bactérias contidas em ceco, mais fortemente associadas ao grupo de cólicas não estrangulativas foram *Pasteurellaceae não classificadas*, *Bacterioides*, *Fusobacterium*, *Escherichia/Shigella* e *Actinobacillus* e, ao grupo das estrangulativas, a *Bacterioidales não classificadas* e *Eggerthellaceae não classificadas*.

Outras diferenças nas amostras de conteúdo cecal foram encontradas quando comparamos cólicas por torção de cólon *versus* obstrução intraluminal de intestino grosso ( $p=0.016$ ) e de intestino delgado ( $p=0.042$ ). Ainda, quando comparamos deslocamento de cólon maior *versus* lesão estrangulativa de intestino delgado ( $p=0.046$ ) e obstrução intraluminal de intestino grosso *versus* obstrução intraluminal de intestino delgado ( $p=0.045$ ).

Em relação ao conteúdo de cólon maior, pôde ser observada diferença na parte de estrutura da comunidade bacteriana, ou seja, diferentemente dos resultados apresentados anteriormente, em que a significância ocorreu de acordo com uma diferença dos gêneros das bactérias que compunham as comunidades amostrais, agora elas ocorrem considerando as suas abundâncias relativas dentro de cada amostra. Nesse ínterim, as torções de cólon maior foram significativamente diferentes das obstruções intraluminais de intestino grosso ( $p=0.014$ ), conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12 - Análise de coordenadas principais (PCoA) da estrutura da comunidade bacteriana utilizando o nível de gênero pela análise de Yue & Clayton de amostras de conteúdo de cólon maior colhidas no momento transcirúrgico de celiotomia exploratória de cavalos com síndrome cólica. Os pontos rosas representam as amostras de conteúdo de cólon maior de cavalos com torção de cólon maior (LCV) e os pontos pretos, as cólicas por obstrução intraluminal de intestino grosso (LIIO) (AMOVA -  $p=0.014$ ).



No LefSe, a bactéria *Lachnospiraceae* não classificada foi fortemente associada ao grupo de torção de cólon maior enquanto a bactéria *Ruminococcus* ao grupo de obstrução intraluminal do intestino grosso. Para amostras de intestino delgado não foram encontradas diferenças significativas.

### 3.5 Discussão

Nosso trabalho demonstrou que foi possível encontrar alterações de microbiota fecal e em outros segmentos intestinais, em cavalos com síndrome cólica de resolução cirúrgica, independente do tipo e origem da cólica. Para riqueza e diversidade, as alterações foram mais

evidentes no período trans-cirúrgico e pós operatório e também quando comparadas por região da lesão (intestino grosso ou delgado) e tipo de lesão (estragulativa ou não estrangulativa). Para abundâncias relativas e beta diversidade (composição da comunidade microbiana), foram mais evidentes para cavalos com cólicas de maior tempo de duração (>24h) e em distúrbios do intestino grosso. As amostras fecais apresentaram composição microbiana diferente de outros segmentos do intestino grosso, assim como na sua avaliação ao longo tempo de pós cirúrgico inicial. Não foram encontradas alterações quanto ao desfecho clínico. As amostras fecais de cavalos com cólica foram significativamente diferentes de cavalos saudáveis, bem como, após 6 meses de cirurgia, haviam retornado à composição similar a de cavalos saudáveis.

Nos índices de alfa diversidade desse estudo, quando comparamos todos os cavalos com cólica em conjunto, pudemos observar que as amostras de conteúdo de intestino delgado foram as que apresentaram menor riqueza, sendo significativamente diferentes dos conteúdos de segmentos de intestino grosso e fezes, conforme relatado também em cavalos saudáveis (SCHOSTER et al., 2013). Para amostras de fezes, conteúdos de intestino delgado e ceco, as principais diferenças encontradas tiveram a região intestinal (intestino grosso x delgado) e/ou o tipo de lesão (estragulativa x não estrangulativa) envolvidos. Para amostras de fezes, já existem estudos que também relatam diferenças de riqueza e diversidade quanto a região intestinal acometida (PARK et al., 2021; STEWART et al., 2019) assim como encontrado nesse estudo, mas para o tipo de lesão e em amostras de conteúdo de delgado e ceco, ainda não há relatos na literatura.

Não pudemos encontrar diferenças na alfa diversidade entre as fezes de cavalos com cólica e cavalos saudáveis, ao contrário do que foi relatado em um estudo, que encontrou redução da riqueza e diversidade quando cavalos com cólica foram comparados a cavalos que passariam por cirurgia ortopédica eletiva (STEWART et al., 2019). Porém, nossos resultados foram semelhantes



ao descrito em um estudo, que comparou fezes de cavalos com cólica e de cirurgia ortopédica de emergência e também não encontrou diferenças em alfa diversidade (SALEM et al., 2019), bem como, um outro estudo, que comparou fezes de cavalos com cólicas clínicas, com fezes de cavalos saudáveis e para as cólicas clínicas de lesões em intestino delgado, também não encontrou diferenças (PARK et al., 2021).

Foi possível encontrarmos diferenças na beta diversidade (composição da comunidade microbiana), quando comparamos fezes de cavalos com cólica, com a de cavalos saudáveis. Esse resultado foi diferente do observado em um estudo, que nem para alfa ou beta diversidades de fezes, diferenças puderam ser encontradas, porém, um número amostral menor (9 cavalos) foi utilizado (SALEM et al., 2019). As diferenças encontradas na beta diversidade das fezes avaliadas nesse estudo foram mais expressivas quando comparadas em relação ao tempo de duração da cólica (>24h) e nos casos de cólica com envolvimento de intestino grosso. Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo, que ao comparar cólicas clínicas e cirúrgicas de menos que 60h de duração *versus* maiores que 60h, também puderam notar diferenças entre as comunidades microbianas, bem como diferenças mais expressivas em cólicas envolvendo intestino grosso, do que intestino delgado (STEWART et al., 2021).

As mudanças observadas nas fezes de cólicas de tempo de duração maior que 24 horas, observadas nesse estudo, sugerem que pode ser necessário um período considerável para que essas alterações de disbiose se manifestem nas amostras de fezes, conforme foi relatado em outros estudos (SALEM et al., 2019; STEWART et al., 2021). Isso faz sentido, considerando que a taxa de passagem no trato gastrointestinal dos cavalos pode levar até 120 horas para percorrer o caminho da cavidade oral à ampola retal (DROGOUL; PONCET; TISSERAND, 2000) e, provavelmente por esse motivo, que as amostras de fezes de cavalos com lesões no intestino

delgado do presente estudo, se assemelham mais às fezes de cavalos saudáveis e têm menos variações entre si.

Na beta diversidade de conteúdo de ceco e cólon, foram encontradas diferenças entre tipo de lesão (estrangulativa x não estrangulativa) e tipo de cólica (torção de cólon maior x obstrução intraluminal de intestino grosso), respectivamente, o que demonstra que a comunidade bacteriana pode variar independente do tempo de duração, resultados esses não encontrados nas amostras de fezes desse estudo. Embora seja relatado na literatura a representatividade das fezes em relação aos conteúdos de segmentos de intestino grosso em cavalos saudáveis (COSTA et al., 2015; DOUGAL et al., 2012), pudemos observar diferenças significativas entre as amostras de fezes e os segmentos do intestino grosso em cavalos com cólica, destacando a necessidade de considerar a avaliação de diferentes tipos de amostras do trato gastrointestinal para uma compreensão mais completa da disbiose nessa doença.

Nas análises de fezes ao longo do tempo, observou-se uma mudança na composição bacteriana e um aumento na riqueza no segundo e terceiro dia pós-operatório, o que foi inesperado, pois geralmente o uso de antibióticos e doenças gastrointestinais reduzem a riqueza (COSTA et al., 2012, 2015b). De fato, em um estudo com cólicas, a riqueza se demonstrou reduzida quando compararam um momento posterior ao da admissão, porém, eram cólicas clínicas e cirúrgicas, com diferentes protocolos de tratamento terapêutico e, colhidas no terceiro dia ou menos, dependendo do momento da alta, o que pode explicar as diferenças nos resultados (STEWART et al., 2021). A associação de fatores, como cólica, anestesia, cirurgia e restrição alimentar podem ter contribuído para os resultados divergirem dos da literatura, em que cada um desses fatores é considerado, normalmente, de forma isolada (GARBER; HASTIE; MURRAY, 2020). Além disso, considerando que todas as cólicas foram cirúrgicas e com o mesmo protocolo de antibioticoterapia, pode ser que

tenha sido possível captar, que após a resolução da cólica e melhora do quadro clínico, a diversidade riqueza volte a aumentar.

Além disso, a composição microbiana das fezes mostrou um agrupamento no PCoA conforme o tempo pós-operatório evoluía. Isso indica que a maioria dos cavalos apresentou comunidades bacterianas semelhantes nesse período, quando comparadas às fezes pré-operatórias, que variavam bastante quanto a sua composição interindividual. Isso provavelmente ocorreu em decorrência da utilização de antibióticos, realizada em todos os animais. Entretanto, no terceiro dia pós-operatório, houve diferenças notáveis entre fezes de cirurgias de intestino grosso e delgado, tanto para riqueza, bem como para composição, resultado semelhante ao reportado na literatura (STEWART et al., 2021). Além da localização da origem da lesão ser um fator importante a ser considerado, uma hipótese é que essa diferença também pode ter ocorrido devido à lavagem intestinal realizada na maioria dos casos de intestino grosso, que não foi realizada nos de intestino delgado, e/ou por cavalos de lesões de intestino delgado terem tido maior tempo de restrição alimentar, quando comparados aos de intestino grosso.

Pudemos observar que as amostras de fezes de cavalos com cólica, apresentaram redução na abundância relativa de algumas bactérias em relação aos cavalos saudáveis, entre as principais, *Lachnospiraceae não classificadas*, *Fibrobacter* e *Phascolarctobacterium* e no grupo de cólicas >24h em comparação às <24h, de *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*. Exceto pela bactéria *Phascolarctobacterium*, todas as outras associadas são bactérias normalmente descritas como comensais da microbiota distal do intestino do cavalo, ou seja, existe na microbiota de cavalos saudáveis. Além disso, são responsáveis pela digestão de fibras e celulose, produção de ácidos graxos de cadeia curta e auxílio na manutenção da homeostase intestinal, portanto, normalmente associadas à saúde digestiva (BIDDLE; BLACK; BLANCHARD, 2013; JULLIAND; GRIMM,

2016; MEEHAN; BEIKO, 2014; NEDJADI et al., 2014). Redução desses táxons como *Lachnospiraceae* e/ou *Ruminococcaceae* também foram encontradas em cavalos com colite (COSTA et al., 2012) e em cavalos com cólica de outros estudos (STEWART et al., 2018, 2020; WEESE et al., 2015). Porém, para *Fibrobacter* e *Phascolarctobacterium*, ainda não há descrição na literatura, em cavalos com cólica.

Em relação às bactérias que tiveram um aumento na abundância relativa nas fezes pré cirúrgicas de cavalos com cólica em relação aos saudáveis, tivemos *Escherichia/Shigella*, *Akkermansia* e *Clostridiales Incertae Sedis XIII não classificadas* e as que demonstraram aumento relativo, nas fezes de cólicas de longa duração, foram *Bacteroides*, *Streptococcus* e *Escherichia/Shigella*. Sabemos que *Escherichia* é uma bactéria comensal em equinos, a depender da cepa bacteriana, (SCHOSTER et al., 2012; VAN DUIJKEREN; VAN ASTEN; GAASTRA, 2000), mas em um estudo que comparou colite *versus* saudáveis, esse gênero bacteriano foi observado apenas em cavalos com colite e o mesmo se deu para *Shigella* (COSTA et al., 2012). A *Akkermansia* costuma ser mais presente em colon ventral de cavalos (SU et al., 2020). Para humanos, costuma ser benéfica, mas, em amostras de fezes, já foi associada a aumento em pós cirúrgico, com conseqüente diminuição de ácidos graxos de cadeia curta, que são importantes pra integridade da barreira intestinal (LIANG et al., 2019). Em fezes de cavalos com cólica envolvendo intestino delgado, foi também encontrada aumentada (PARK et al., 2021) e em cavalos com miopatia, correlacionando-a a um pior prognóstico (WIMMER-SCHERR et al., 2021). A família *Clostridiales* apresentou aumento relativo, e embora seja uma família que possui gêneros comensais e oportunistas, também costuma apresentar aumento, por exemplo, pelo gênero *Clostridium*, em estudos de cólica ou colite (ARROYO et al., 2020; SCHOSTER et al., 2019; UZAL et al., 2022). O mesmo resultado de aumento ocorreu para *Streptococcus*, outra bactéria

oportunista que pode causar prejuízos (PARK et al., 2021; STEWART et al., 2018, 2020). Por fim, *Bacteroides* é um gênero que pode ser associado a infecções importantes em cavalos (OVESEN et al., 2016), e foi encontrado aumentado no nosso estudo.

Muito se discute sobre diversos fatores que são capazes de alterar a microbiota intestinal como dieta, ambiente, entre outros que já foram citados (JULLIAND; GRIMM, 2016) e, isso, pode tornar os estudos clínicos e cirúrgicos gastrointestinais, bastante desafiadores. Entretanto, mesmo que nesse estudo os cavalos tivessem injúrias intestinais, origens, ambientes, tratamentos até a admissão e dietas variadas, ainda assim, foi possível encontrar resultados clínicos que agrupassem esses animais, tanto para os cavalos com cólica, bem como para saudáveis e 6 meses pós cirurgia, em que os últimos dois grupos, demonstraram composição e estrutura da comunidade bacteriana bastante homogêneas entre as amostras de fezes de cada indivíduo. Ademais, foi interessante verificar que alguns dos resultados foram similares aos reportados na literatura, mesmo que todos os trabalhos com cólica em equinos tenham sido realizados no hemisfério norte, e o nosso tenha sido o primeiro a ser realizado em um país tropical do hemisfério sul.

Vale ressaltar que para todas as amostras de segmentos do trato gastrointestinal avaliadas, poucas alterações foram encontradas em relação à estrutura da comunidade microbiana. Isso significa que a proporção da maioria das bactérias não foi alterada nos cavalos com cólica avaliados.

Foi importante verificar que existem diferenças clínicas entre as cólicas, tanto em amostras de fezes, como em outros segmentos intestinais. Esse foi o primeiro estudo que distintas regiões amostrais foram colhidas e comparadas, com evidências diferentes sendo demonstradas em cada compartimento, como, por exemplo, quando comparadas ao tipo de lesão e ao tipo de cólica, enquanto nas fezes apresentou-se mais relacionada ao tempo. Isso nos trouxe algumas hipóteses,

de que talvez as alterações de microbiota aconteçam primariamente nas regiões intestinais lesadas ou adjacentes, podendo possivelmente ser uma das causas da cólica, uma vez que são diferenciadas entre si, quando comparadas por tipo de lesão ou de cólica. Com o tempo de evolução e a progressão do fluxo da ingesta, essas alterações continuam acontecer, não só como causa, mas também como consequência da cólica, pois o desequilíbrio previamente gerado, provavelmente é capaz de provocar mais desequilíbrio, sendo isso evidenciado principalmente nas fezes de cólicas de duração mais longa. Entretanto, são apenas hipóteses que não podem ser comprovadas com o presente estudo. Mais pesquisas são necessárias para que nos seja permitido detectar se a disbiose encontrada na cólica é uma das causas dessa enfermidade, apenas a consequência, ou ambos.

Como limitações desse estudo, podemos citar a heterogeneidade da população estudada, bem como o menor número de cavalos com lesões de intestino delgado, quando comparados aos de intestino grosso. Além disso, consideramos apenas a comunidade microbiana, sem avaliações de metaboloma ou de outros microorganismos (fungos, protozoários, etc), que também são importantes para digestão e funcionalidade do trato gastrointestinal. E por fim, alterações que não puderam ser detectadas, talvez pudessem ser evidentes se a técnica de PCR Quantitativo (qPCR) tivesse sido agregada ao estudo, uma vez que é capaz de detectar a quantidade de DNA bacteriano, podendo este ser um fator importante a ser considerado em casos de doença gastrointestinal.

### **3.6 Conclusão**

A microbiota fecal de equinos com cólica de resolução cirúrgica difere em diversidade da de seus pares clinicamente saudáveis, revelando um processo de disbiose. Bactérias como *Escherichia/Shigella* e *Akkermansia* foram associadas às fezes de cavalos com esse distúrbio. A duração da cólica, o segmento intestinal acometido e o tipo de lesão são fatores que influenciam na riqueza, diversidade e composição bacteriana, tanto em amostras fecais como de conteúdo

intestinal, sugerindo uma interconexão complexa de fatores que influenciam a disbiose nessa enfermidade. A diferença entre fezes e os conteúdos do intestino grosso destacaram a singularidade de cada segmento intestinal durante episódios de cólica, reforçando a importância de considerar múltiplos parâmetros ao interpretar amostras de fezes em casos clínicos e cirúrgicos. A ausência de alterações nas amostras fecais colhidas seis meses após a intervenção cirúrgica em comparação às dos pares saudáveis, demonstram que esse tratamento permite o restabelecimento da microbiota normal após esse período.

### 3.7 Referências

ARROYO, L. G. et al. Luminal and mucosal microbiota of the cecum and large colon of healthy and diarrheic horses. **Animals**, v. 10, n. 8, p. 1–12, 2020.

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, 2013.

BLIKSLAGER, A. Colic Prevention to Avoid Colic Surgery: A Surgeon's Perspective. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 76, p. 1–5, 2019.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4516–4522, 2011.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 633–642, 2014.

COLLINET, A. et al. Multidimensional Approach for Investigating the Effects of an Antibiotic–Probiotic Combination on the Equine Hindgut Ecosystem and Microbial Fibrolysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. March, p. 1–14, 2021.

COSTA, M. C. et al. 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. 1–11, 31 jul. 2012.

COSTA, M. C. et al. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 19, p. 1–12, 2015a.

COSTA, M. C. et al. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. **Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 74–80, 2015b.

- 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. **Vet Clin Equine**, v. 34, p. 1–12, 2018.
- DOUGAL, K. et al. 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. et al. Identification of a Core Bacterial Community within the Large Intestine of the Horse. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.
- 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, p.117-130, 2000.
- GARBER, A.; HASTIE, P.; MURRAY, J. A. Factors Influencing Equine Gut Microbiota: Current Knowledge. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 88, p. 102943, 2020.
- GOULET, O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. **Nutrition Reviews**, v. 73, p. 32–40, 2015.
- JULLIAND, V.; GRIMM, P. Horse species symposium: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge 1. **Journal of Animal Science**, v. 94, 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.
- KOZICH, J. J. et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112–5120, 2013.
- LIANG, W. et al. Gut microbiota shifts in patients with gastric cancer in perioperative period. **Medicine (United States)**, v. 98, n. 35, 2019.
- MEEHAN, C. J.; BEIKO, R. G. A phylogenomic view of ecological specialization in the lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 703–713, 2014.
- NEDJADI, T. et al. Characterization of butyrate transport across the luminal membranes of equine large intestine. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 10, p. 1335–1347, 2014.
- OVESEN, A. L. et al. Antimicrobial Susceptibility of Bacteroides spp. From Clinical Samples From Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 45, p. 46–52, 2016.
- PARK, T. et al. Comparison of the fecal microbiota of horses with intestinal disease and their healthy counterparts. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 6, 2021.
- PERRY, E. et al. Journal of Equine Veterinary Science Effect of Road Transport on the Equine Cecal Microbiota. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 68, p. 12–20, 2018.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.



SALEM, S. E. et al. Acute changes in the colonic microbiota are associated with large intestinal forms of surgical colic. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, 2019.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SCHOSTER, A. et al. Longitudinal study of *Clostridium difficile* and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* in healthy horses in a community setting. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3–4, p. 364–370, 2012.

SCHOSTER, A. et al. Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 9, p 1-9, 2013.

SCHOSTER, A. et al. Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 48, p. 595–602, 2015.

SCHOSTER, A. et al. Prevalence of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in Swiss horses with and without gastrointestinal disease and microbiota composition in relation to *Clostridium difficile* shedding. **Veterinary Microbiology**, v. 239, 2019.

SEGATA, N. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, 2011.

STEWART, H. L. et al. Differences in the equine faecal microbiota between horses presenting to a tertiary referral hospital for colic compared with an elective surgical procedure. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 3, p. 336–342, 2019.

STEWART, H. L. et al. Changes in the faecal bacterial microbiota during hospitalisation of horses with colic and the effect of different causes of colic. **Equine Veterinary Journal**, v. 53, n. 6, p. 1119–1131, 2021.

SU, S. et al. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments of Mongolian horses. **MicrobiologyOpen**, v. 9, n. 6, p. 1085–1101, 2020.

TRAUB-DARGATZ, J. L. et al. Estimate of the national incidence of and operation-level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to 1999. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 1, p. 67–71, 2001.

UZAL, F. A. et al. Clostridial Diseases of Horses: A Review. **Vaccines**. v. 10, n.318, p. 1-21, 2022.

VAN DUIJKEREN, E.; VAN ASTEN, A. J. A. M.; GAASTRA, W. Characterization of *Escherichia coli* isolated from adult horses with and without enteritis. **Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 3, p. 162–166, 2000.

WEESE, J. S. et al. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post-partum colic. **Equine Veterinary Journal**, p. 641–649, 2015.

WIMMER-SCHERR, C. et al. Comparison of fecal microbiota of horses suffering from atypical myopathy and healthy co-grazers. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 1–17, 2021.

WORMSTRAND, B. H. et al. Surgical treatment of equine colic - a retrospective study of 297 surgeries in Norway 2005-2011. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 56, n. 1, p. 1–9, 2014.

### 3.8 Material Suplementar

Tabela Suplementar 1. Dados individuais de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória e identificados quanto ao diagnóstico, tipo de lesão, região da lesão, tempo de duração até a admissão no hospital e desfecho clínico.

Animal	Diagnóstico	Tipo de Lesão	Região da Lesão	Tempo de Duração	Desfecho Clínico
1	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
2	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Alta
3	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
4	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Óbito
5	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
6	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
7	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
8	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
9	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
10	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Alta
11	Desl. Cólon Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
12	Vôlvulo de C. Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Óbito
13	Vôlvulo de C. Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Óbito
14	Vôlvulo de C. Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
15	Vôlvulo de C. Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Óbito
16	Vôlvulo de C. Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Alta
17	Vôlvulo de C. Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Óbito
18	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Alta
19	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Alta
20	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Óbito
21	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Óbito
22	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Alta
23	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Alta
24	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
25	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Alta
26	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta
27	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	>24h	Óbito
28	Obs. Intr. Int. Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Óbito
29	Obs. Intr. Int. Delg (SIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Delgado	>24h	Alta
30	Obs. Intr. Int. Delg (SIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Delgado	>24h	Alta
31	Obs. Est. Int. Delg. (SISO)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Alta

<b>32</b>	Obs. Est. Int. Delg. (SISO)	Estrangulativa	Intestino Delgado	>24h	Óbito
<b>33</b>	Obs. Est. Int. Delg. (SISO)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Alta
<b>34</b>	Obs. Est. Int. Delg. (SISO)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Óbito
<b>35</b>	Obs. Est. Int. Delg. (SISO)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Óbito
<b>Total</b>	<b>Desl. Colon maior (11)</b> Vôlvulo de C. Maior (6) Obs. Intr.Int. Grosso (11) Obs. Intr. Int. Deslg (2) Obs. Est. Int. Deslg. (5)	<b>Não Estrangulativa (24)</b> <b>Estrangulativa (11)</b>	<b>Intestino Gross (28)</b> <b>Intestino Delgado (7)</b>	<b>&lt;24h (19)</b> <b>&gt;24h(16)</b>	<b>Alta (23)</b> <b>Óbito (12)</b>

## Capítulo 3 – Artigo 2: Translocação bacteriana em casos de síndrome cólica cirúrgica: o que sabemos além da cultura?

### 3.1 Resumo

A translocação bacteriana envolve a passagem de bactérias ou seus derivados através da barreira intestinal, para tecidos estéreis do corpo, como o líquido peritoneal. Embora existam evidências clínicas, estudos que comprovem a translocação em equinos são incipientes e apenas baseados em métodos de cultura. O objetivo desse estudo foi avaliar o líquido peritoneal de cavalos com síndrome cólica de resolução cirúrgica quanto a parte microbiológica, a fim de detectar a translocação bacteriana, e verificar quais as possíveis correlações com os parâmetros sanguíneos (hemograma e bioquímica sérica), de líquido peritoneal (citologia e bioquímica) e alterações macroscópicas intestinais. Para isso, foram selecionados 41 cavalos com síndrome cólica de resolução cirúrgica, que tiveram sangue e líquido peritoneal colhidos, bem como as alças intestinais e feridas cirúrgicas avaliadas macroscopicamente, além de três cavalos saudáveis, que tiveram o líquido peritoneal colhido. Para a análise microbiológica do líquido peritoneal foram realizados os métodos de cultura e sequenciamento genético (região V4 16S rRNA). Nesse estudo, foi observado que a técnica de sequenciamento genético é desafiadora para amostras de baixa biomassa, como o líquido peritoneal, mas foi possível identificar a translocação bacteriana, por meio de diferenças entre as amostras de líquido peritoneal do trans cirúrgico quando comparados aos animais saudáveis ou ao momento do pós-operatório, quando estavam sob efeito de antibióticos. Essas diferenças foram evidenciadas tanto para alfa diversidade (quantidade de gêneros observados e proporção entre eles) e beta diversidade (diferença da composição da comunidade microbiana e sua proporção, quando comparada entre os grupos). Os cavalos com lesões de intestino grosso apresentaram maior riqueza e diversidade da comunidade bacteriana, indicando maiores indícios de translocação bacteriana, bem como animais com essas características microbiológicas apresentaram maior chance de complicações incisionais.

**Palavras-chave:** cavalos, abdome agudo, sequenciamento genético, peritonite, cirurgia abdominal

### 3.2 Introdução

A translocação bacteriana é descrita pela ocorrência de uma falha na função da barreira intestinal, permitindo com que bactérias viáveis ou seus derivados (lipopolissacarídeos e endotoxinas) atravessem a mucosa em direção aos tecidos estéreis como líquido peritoneal, linfonodos mesentéricos e outros órgãos internos (GATT; REDDY; MACFIE, 2007).

A barreira intestinal possui três principais pilares: a microbiota intestinal, as células epiteliais intestinais e a imunidade da mucosa (MENG; KLINGENSMITH; COOPERSMITH, 2017). Em humanos, sabe-se que alterações da microbiota e lesões de epitélio são capazes de diminuir a proteção da barreira pelo aumento da permeabilidade intestinal e podem possibilitar a translocação de patógenos, como em casos de manipulação e obstrução intestinal (IACOB; IACOB, 2019; MACFIE et al., 2006; MCDONALD et al., 2016; STÄRKEL et al., 2018).

Em equinos, tem-se evidências clínicas de que devido à distensão, obstrução ou estrangulamento podem haver translocações bacterianas (GATT; REDDY; MACFIE, 2007; HANN et al., 2020a; MOORE; VANDENPLAS, 2014; WONG; MOORE; BROCKUS, 2012), o que, conseqüentemente, pode gerar flebite, laminite, peritonite, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, complicações incisionais, entre outros (BIDDLE; BLACK; BLANCHARD, 2013; BLIKSLAGER et al., 2017; CAPEWELL; BOSTON, 2004; DÓRIA et al., 2020; HANN et al., 2020a; JACOBS; STEFANOVSKI; SOUTHWOOD, 2019; POUYADE et al., 2009; URAYAMA et al., 2018). Entretanto, nessa espécie, estudos que comprovem a translocação são incipientes e apenas baseados em métodos de cultura (HURCOMBE; MUDGE; DANIELS, 2012).

Atualmente, estudos começaram a identificar microorganismos raros em líquido peritoneal de humanos, responsáveis por peritonite e isso só foi possível devido à utilização de técnicas moleculares de identificação bacteriana (ADAPA et al., 2019, 2020). Entretanto, deve-se

levar em consideração, que o sequenciamento e análise de amostras de baixa biomassa são desafiadores, uma vez que podem ser influenciados pelo momento da colheita, sequenciamento e análise de bioinformática (OLOMU et al., 2020; SELWAY; EISENHOFER; WEYRICH, 2020).

O objetivo desse estudo foi avaliar o líquido peritoneal de cavalos com síndrome cólica de resolução cirúrgica quanto a parte microbiológica, a fim de detectar translocação bacteriana e verificar quais as possíveis correlações com os parâmetros sanguíneos (hemograma e bioquímica sérica) no pré-operatório e de líquido peritoneal (citologia e bioquímica), juntamente às alterações macroscópicas intestinais, no trans cirúrgico.

### **3.3 Material e métodos**

#### *3.3.1 Seleção de Animais*

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP e possui protocolo CEUA 5405101019. Foram incluídos no estudo equinos machos e fêmeas com síndrome cólica de resolução cirúrgica e, cavalos saudáveis, provenientes da universidade. Animais com menos de dois anos ou que receberam antibiótico dentro de 90 dias antes das colheitas não participaram do estudo.

#### *3.3.2 Delineamento experimental*

Os equinos diagnosticados com abdome agudo cirúrgico ficaram alojados em tronco de contenção para tratamento clínico e suporte imediato, até serem encaminhados para o centro cirúrgico. Neste momento pré-cirúrgico (PreOp), logo após a admissão, foi realizado exame físico, foram obtidas informações do histórico do paciente e colhidas amostras de sangue. Após encaminhamento para cirurgia (Intraoperative), estando o animal em decúbito dorsal, sob anestesia geral inalatória, após devido preparo cirúrgico, a linha alba foi incisada e o sangramento foi contido

com compressas estéreis e com pinças hemostáticas, quando necessário, a fim de evitar que o sangue atingisse a cavidade abdominal e o líquido peritoneal. Após completa hemostasia, o peritônio foi incisado, expondo a cavidade abdominal. Após isso, sangue e o líquido peritoneal foram colhidos, sendo o último colhido na região caudal ao fígado. Após isso, foi feita a classificação da afecção e análise macroscópica da alça intestinal, sempre pelo mesmo cirurgião. No período pós-cirúrgico, 24h (PF Day 1) e 48h (PF Day 2) após a recuperação anestésica, o líquido peritoneal foi colhido novamente. Após as colheitas de materiais biológicos e avaliações macroscópicas das alças intestinais, o procedimento cirúrgico foi conduzido conforme técnica cirúrgica preconizada para correção da afecção.

Foi realizada a antibioticoterapia com penicilina potássica, na dose de 22.000UI/kg, a cada 6 horas, por 5 dias e gentamicina, na dose de 6,6mg/kg, a cada 24 horas, por 5 dias. Como anti-inflamatório e analgésico foi utilizado flunixin meglumine, na dose de 1,1mg/kg, a cada 12 horas, por 3 dias, e a cada 24h por mais dois dias. As medicações tiveram sua aplicação inicial no período trans cirúrgico, imediatamente após a colheita das amostras de líquido peritoneal e sangue. Todos os animais foram acompanhados até a completa cicatrização das feridas cirúrgicas, e, por fim, classificados como sobreviventes ou não sobreviventes.

Além disso, foram selecionados 3 equinos saudáveis pertencentes à universidade para a colheita dos líquidos peritoneais controle (PF Healthy Horses), os quais foram colhidos com os cavalos em estação, na região ventral do abdome, na linha alba, atrás do processo xifóide, após bloqueio local com lidocaína, incisão perfurativa com lâmina de bisturi e introdução de cânula mamária.

Os cavalos do estudo foram comparados quanto à região de injúria (intestino grosso ou delgado), quanto ao tipo de obstrução (estrangulativa ou não estrangulativa), tipo de cólica

(obstrução intraluminal de intestino grosso, torção de cólon maior, deslocamento de cólon maior, obstrução intraluminal de intestino delgado e obstrução estrangulativa de intestino delgado), tempo de duração dos sinais clínicos até a admissão (<24h ou >24h), risco de vida (baixo ou alto) e desfecho clínico (alta ou óbito).

### *3.3.3 Classificação da afecção e análise macroscópica da alça intestinal*

Após a abertura da cavidade abdominal, as vísceras eram inspecionadas e o segmento intestinal que apresentasse a maior injúria foi definido como o segmento intestinal acometido. Nesse momento, era feita a classificação quanto a região de injúria (intestino grosso ou delgado), quanto ao tipo de obstrução (estrangulativa ou não estrangulativa) e tipo de cólica (obstrução intraluminal de intestino grosso, torção de cólon maior, deslocamento de cólon maior, obstrução intraluminal de intestino delgado e obstrução estrangulativa de intestino delgado).

O segmento intestinal acometido foi avaliado de forma clínica, sempre pelo mesmo avaliador e os parâmetros foram classificados por escores variando de 0 a 3, sendo o escore 0 para a ausência de alterações e 3 com as alterações mais expressivas / graves.

Foram observados os parâmetros de coloração de serosa e mucosa, manchas vasculho-sanguíneas, distensão e espessura, representados pelas respectivas características de escore, segundo Freeman (2014) modificado, conforme demonstrado na Figura 1 e Tabela 1, abaixo:

Figura 1. Representação dos escores e classificação da escala de pontuação de avaliação macroscópica intestinal de equinos submetidos a celiotomia exploratória. Coloração da serosa e mucosa: rósea (0), avermelhada/congesta (1), roxa (2) e negra (3); Manchas vasculo-sanguíneas: ausente (0), petéquias (1), equimoses (2) e hematomas (3) (Figura 3); Distensão: ausente (0), pouca distensão (1), moderada distensão (2) e demasiada distensão (3); Espessura: fisiológica (0), pouco espessa (1), moderadamente espessa (2) e demasiadamente espessa (3).





Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 1. Representação dos escores e classificação da escala de pontuação de avaliação macroscópica intestinal de equinos submetidos a celiotomia exploratória. Coloração da serosa e mucosa: rósea (0), avermelhada/congesta (1), roxa (2) e negra (3); Manchas vâsculo-sanguíneas: ausente (0), petéquias (1), equimoses (2) e hematomas (3) (Figura 3); Distensão: ausente (0), pouca distensão (1), moderada distensão (2) e demasiada distensão (3); Espessura: fisiológica (0), pouco espessa (1), moderadamente espessa (2) e demasiadamente espessa (3).

AValiação / ESCORE	0	1	2	3	PONTUAÇÃO
<b>Coloração da serosa</b>	Rósea	Avermelhada / Congesta	Roxa	Negra	
<b>Coloração da mucosa</b>	Rósea	Avermelhada / Congesta	Roxa	Negra	
<b>Manchas vâsculo sanguíneas</b>	Ausente	Petéquias	Equimoses	Hematomas	
<b>Distensão</b>	Ausente	Pouca distensão	Moderada distensão	Demasiada distensão	
<b>Espessura de parede</b>	Fisiológica	Pouco espessa	Moderadamente espessa	Demasiadamente espessa	

**Pontuação Total**  
(máxima 15 pontos)

A avaliação do segmento intestinal acometido foi realizada após 15 minutos da correção da lesão, exceto para o parâmetro distensão, quando a avaliação foi realizada no primeiro momento de observação da alça intestinal.

Ao final da avaliação, era realizada uma somatória dos valores, atingindo uma pontuação final, em que o valor máximo era de 15 pontos, quando todas as cinco características macroscópicas puderam ser avaliadas. Além da pontuação numérica total, foi realizada uma subdivisão em três categorias, sendo a primeira caracterizada por alterações de intensidade: 1) Leve (pontuação de 0 a 5); 2) Moderado (pontuação de 6 a 9) e 3) Intenso (pontuação de 10 a 15). Da mesma forma, a avaliação de mucosa só era realizada quando o segmento intestinal fosse submetido à enterotomia. Além da anotação dos dados, foram realizadas fotografias das avaliações.

#### *3.3.4 Colheita de amostras*

O sangue venoso foi colhido por meio da venopunção da jugular com agulhas de vacuteiner, adaptadas ao tubo de EDTA, para hemograma e proteína; ao tubo de fluoreto de sódio 1%, para análise da concentração de lactato e glicose; e no tubo com ativador de coágulo, para as análises de fósforo inorgânico e fosfatase alcalina.

O líquido peritoneal foi colhido imediatamente após abertura da cavidade abdominal e sequencialmente, 24h (PF Day 1) e 48h (PF Day 2) após a recuperação anestésica, por paracentese abdominal, em abertura mínima previamente realizada no período transoperatório com lâmina de bisturi número 15, caudal ao processo xifóide e cranial à incisão. O líquido peritoneal foi colhido em três eppendorfes estéreis para análises microbiológicas, em frascos estéreis com EDTA a 10%, tubo com fluoreto de sódio e tubo com ativador de coágulo para posterior análise laboratorial proteínas totais, citologia (contagem de células nucleadas e classificação) lactato, glicose, fósforo inorgânico e fosfatase alcalina.

As amostras destinadas às análises microbiológicas eram acondicionadas em isopor com gelo e, posteriormente, realizado o procedimento para cultura ou transferidos para freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , em um período de até 3 horas, para posterior análise de sequenciamento.

### *3.3.5 Classificação do risco de vida*

De acordo com os resultados encontrados no exame físico, amostras de sangue e líquido peritoneal os cavalos foram classificados como baixo ou alto risco de vida. Os fatores utilizados são os consolidados na literatura como indicadores de prognóstico ruim em cavalos com síndrome cólica (SOUTHWOOD, 2012; WALTON, 2012; WALTON; SOUTHWOOD, 2012). Dessa forma, foram considerados fatores de prognóstico ruim para critério de inclusão do grupo alto risco: frequência cardíaca  $> 60\text{bpm}$ , hematócrito  $>48\%$ , lactato sanguíneo  $>6\text{mmol/L}$ , lactato peritoneal  $>6\text{mmol/L}$  e glicose  $>135\text{mg/dL}$ . Cada cavalo que apresentasse ao menos 3 desses fatores era incluído no grupo alto risco. Os que apresentassem dois ou menos, no grupo de baixo risco.

### *3.3.6 Avaliação incisional*

A incisão foi avaliada no terceiro, sétimo e 14 dias de pós-cirúrgico, pelo mesmo avaliador. Foi realizada verificação da presença de edema, seroma, exsudato e deiscência de pontos. Quando edema ou exsudato eram evidenciados de forma isolada, não era caracterizado como complicação incisional, mas se encontrado juntamente ao exsudato, era considerado como complicação. Conteúdo purulento e deiscência de pontos, de forma isolada ou em conjunto a outros fatores também eram considerados fatores de complicação incisional. E foi caracterizado animal com complicação positiva, quando havia a ocorrência de fatores de complicação incisional em ao menos uma das 3 avaliações.

### 3.3.7 *Análises das amostras colhidas*

#### 3.3.7.1 *Hemograma, proteína, análises bioquímicas e citologia*

O hemograma foi realizado com sangue total em EDTA, com o equipamento automático Mindray BC- 2800 Vet (China), para contagem de leucócitos totais, hemácias, hematócrito e plaquetas. A contagem diferencial de leucócitos e avaliação da morfologia dos elementos figurados do sangue foi realizada com o uso de esfregaços sanguíneos corados com corante de Rosenfeld (método May-Grunwald-*Giemsa modificado*). Para o líquido peritoneal, foi realizada a contagem de células totais por meio do mesmo equipamento e realizadas lâminas para análise citológica.

Para obtenção dos valores das análises de proteína e bioquímicas de amostras de sangue e líquido peritoneal (lactato, glicose, fósforo inorgânico e fosfatase alcalina), o respectivo tubo de cada variável foi centrifugado por 15 minutos na rotação de 3.000 rotações por minuto. Feito isso, o sobrenadante foi transferido para eppendorfs de 2 mL e armazenados no freezer para posterior análise. A análise foi realizada em equipamento automatizado Mindray BS 120 (China), com uso de kits comerciais Labtest (Brasil).

#### 3.3.7.2 *Cultura bacteriana, coloração de gram e MALDI-TOF*

Posteriormente à chegada da amostra de líquido peritoneal refrigerada no laboratório, a mesma era colocada em temperatura ambiente. Em seguida, a partir de alça de semeadura calibrada, era aliquoteado 10µl do fluido para as placas de Petri, que continham meio sólido de Ágar Sangue (sangue de carneiro desfibrinado estéril + ágar base Biolog®) ou McConkey (Biolog®). Em seguida, era utilizada a técnica de semeadura sinuosa e, posteriormente, incubação a 37°C por 72 horas, em aerobiose e em anaerobiose, sendo a última por meio da técnica de jarra,

associada a filtro gerador de anaerobiose (Anaerobac®). A amostragem era sempre realizada em duplicata.

Quando constatado o crescimento bacteriano, era realizada a transferência da colônia para outra placa de Petri, a fim de realizar o isolamento. Para isso, era utilizada a técnica de esgotamento em estrias múltiplas e, na sequência, a placa era incubada a 37°C por 24 horas, em aerobiose ou por 48h em anaerobiose. Para qualquer crescimento bacteriano era feita coloração de Gram. Para isso, era realizada a confecção de lâmina, onde, com auxílio de alça bacteriológica, era transferida uma pequena amostra do material da placa, para a lâmina contendo uma gota de água estéril. Após secagem em bico de Bunsen era feita a coloração de Gram, para identificação da classificação gram da bactéria.

As colônias isoladas também eram identificadas pela técnica de Ionização/dessorção a Laser Assistida por Matriz Acoplada a Espectrometria de Massa por Tempo de Voo (MALDI-TOF). O algoritmo utilizado pelo MALDI Biotyper compara os espectros da amostra a ser analisada com as amostras de referência existentes no banco de dados. Essa análise leva em consideração as massas e as intensidade relativas dos espectros desconhecidos.

### *3.3.7.3 Extração, Amplificação da região V4 16s rRNA e sequenciamento*

O DNA das amostras colhidas foi extraído a partir do kit comercial QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen)<sup>®</sup> em que, foram seguidas as recomendações do fabricante, exceto pelo fato de que como as amostras eram líquidas, foi realizada uma adaptação, que em vez de 250mg de conteúdo amostral sólido, foram adicionados 500µL de líquido. A concentração de DNA das amostras foi feita no aparelho Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer (Life Technologies) com os kits de ensaio Qubit<sup>™</sup> dsDNA High Sensitivity (Invitrogen<sup>®</sup>). A amplificação foi feita após a extração do DNA metagenômico, por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) a 95°C por três minutos,

seguido por 35 ciclos de, 95°C por 30 segundos, 55°C por 90 segundos e 72°C por 30 segundos; e extensão final a 72°C por cinco minutos, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 e R806 para a região V4 do gene 16S rRNA (CAPORASO et al., 2011). Os produtos de PCR foram purificados em três etapas, sendo as duas primeiras segundo o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina e a terceira, a partir do gel de agarose 2% com o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit Supplied with capped columns (Zymo Research®), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação das amostras/bibliotecas utilizando o Qubit Assay kit de acordo com as recomendações do fabricante. As bibliotecas purificadas e quantificadas foram misturadas de maneira equimolar e sequenciadas (2x150pb) com o MiSeq® Reagent Kit v2 (300 ciclos) de acordo com as especificações do fabricante, utilizando-se a plataforma Illumina.

#### *3.3.7.4 Análise de bioinformática e estatística*

A análise de bioinformática foi realizada usando o Mothur (versão 1.47.0) (SCHLOSS et al., 2009) seguindo o MiSeq SOP, que foi acessado em setembro de 2021 (KOZICH et al., 2013). Resumidamente, arquivos originais fastq foram montados em contigs excluindo as sequências maiores que 325 pb de comprimento, as que tinham ambiguidade nos pares de bases e também as que tinham polímeros maiores que 8 pb.

As sequências foram alinhadas usando o banco de dados de referência de rRNA SILVA 16S (QUAST et al., 2013). Quimeras foram identificadas e removidas. Sequências foram então agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) pertencentes ao mesmo gênero. A classificação taxonômica foi obtida do banco de dados RDP (Ribossomal Database Project) (COLE et al., 2014). Leituras classificadas como o mesmo gênero foram agrupadas em filotipos.

A alfa diversidade foi indicada pelo número de OTUs (número de gêneros) e índice de Chao (riqueza) e pelos índices Simpson e Shannon (diversidade). Para analisar as relações entre as variáveis independentes e dependentes, ajustamos um Modelo Linear Generalizado (GLM) usando a função `glm()` do R. Após ajustar o modelo GLM, foi realizada uma análise post hoc para comparar as médias das variáveis independentes. Para isso, foi utilizado o pacote `emmeans` (Least Squares Means) no R. A função `emmeans()` foi aplicada para calcular as médias ajustadas e realizar comparações entre grupos específicos. Para avaliar a significância estatística das diferenças entre as médias calculadas com o `emmeans`, foram utilizados testes de comparações múltiplas (como o teste de Tukey).

A beta diversidade foi avaliada usando o índice de Jaccard, que avalia a composição da comunidade (ou seja, quais bactérias estão presentes ou ausentes em uma comunidade), e pelo índice de Yue e Clayton, que avalia a estrutura da comunidade (ou seja, quais bactérias estão presentes com base em sua abundância em uma comunidade).

Gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA), realizado em 2 dimensões, foram obtidos para comparar as amostras de cada grupo. A análise de variância molecular (AMOVA) foi usada para comparar a composição e a estrutura da comunidade entre os grupos. A análise linear discriminante pelo efeito de tamanho (LEfSe) foi usado para encontrar associações significativas entre abundâncias relativas de ambos os grupos (SEGATA et al., 2011). Nesse caso, foi aplicado o Kruskal-Wallis, teste não paramétrico para detectar diferenças entre os grupos e, em seguida, um Wilcoxon não pareado, que é um teste de soma de classificação. O resultado de Análise Discriminante Linear (LDA) maior que 2 foi considerado significativo. Para todas as análises foi considerado significativo quando  $p < 0.05$ .

### 3.3.7.5 Análise de dados das correlações

Foi utilizado o ambiente de programação R 4.3.1 para as análises de correlação. A metodologia utilizada variou de acordo com a natureza da variável. Variáveis contínuas numéricas (A), categóricas com dois fatores (B), e variáveis categóricas com mais de dois fatores (C) foram comparadas entre e dentro do seu respectivo tipo.

Variáveis categóricas com mais de dois fatores foram transformadas em dois fatores sendo desmembradas de acordo com o nível de sua classificação. Ex: Serosa contendo níveis 0, 1, 2, 3 foi classificada como 0 (quando não era 3), e 1 (quando era 3), originando, Serosa 3.

Para cada tipo de correlação, foi realizado um teste de correlação específico para aquela situação. Para valores numéricos contínuos, correlação de Spearman; para valores contínuos x categóricos binomiais, correlação Ponto-Bisserial; e para binomiais x binomiais, a correlação Tetrachoric. Para essa última correlação o p-valor foi calculado utilizando a correlação baseada no bootstrap de mil interações.

## 3.4 Resultados

Foram incluídos na avaliação 41 cavalos com síndrome cólica que passaram por tratamento de celiotomia exploratória. Os dados de cada cavalo e suas respectivas classificações, seguem abaixo, na Tabela 2.

Tabela 2. Dados individuais de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória e identificados quanto ao diagnóstico, tipo de lesão, região da lesão, tempo de duração até a admissão no hospital, desfecho clínico, risco de vida e escore de avaliação macroscópica intestinal.

Animal	Diagnóstico	Tipo de Lesão	Região da Lesão	Tempo de Duração	Desfecho Clínico	Risco	Escore Intestinal
1	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Leve
2	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Alta	Alto	Moderado
3	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Leve
4	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Óbito	Alto	Leve
5	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Leve
6	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Moderado
7	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Alto	Moderado
8	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Moderado



9	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Leve
10	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Alta	Alto	Leve
11	Desl. C. Maior (LCD)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Leve
12	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Alta	Baixo	Moderado
13	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Alta	Alto	Moderado
14	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Óbito	Alto	Leve
15	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Óbito	Baixo	Leve
16	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Alto	Moderado
17	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Alta	Baixo	Leve
18	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Leve
19	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Alta	Baixo	Leve
20	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Alto	Leve
21	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Óbito	Alto	Moderado
22	Obs. Intral. Int Grosso (LIIO)	Não Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Óbito	Baixo	Moderado
23	Torção de Cólon Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Óbito	Baixo	Intenso
24	Torção de Cólon Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Óbito	Alto	Moderado
25	Torção de Cólon Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Intenso
26	Torção de Cólon Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	> 24h	Óbito	Alto	Moderado
27	Torção de Cólon Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Alta	Baixo	Intenso
28	Torção de Cólon Maior (LCV)	Estrangulativa	Intestino Grosso	<24h	Óbito	Alto	Intenso
29	Obs. Intral. Int Delg. (SIIO – Tum.Jej)	Não Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Alta	Baixo	Intenso
30	Obs. Intral. Int Delg. (SIIO – C.Ileo)	Não Estrangulativa	Intestino Delgado	> 24h	Alta	Baixo	Leve
31	Obs. Intral. Int Delg. (SIIO- C.Ileo)	Não Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Alta	Baixo	Moderado
32	Obs. Intral. Int Delg. (SIIO - C.Ileo)	Não Estrangulativa	Intestino Delgado	> 24h	Alta	Baixo	Moderado
33	Obst. Est. Int. Delg. (SISO – HIE)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Alta	Baixo	Intenso
34	Obst. Est. Int. Delg. (SISO – HIE)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Óbito	Alto	Intenso
35	Obst. Est. Int. Delg. (SISO – HIE)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Alta	Alto	Intenso
36	Obst. Est. Int. Delg. (SISO-TJ)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Óbito	Alto	Intenso
37	Obst. Est. Int. Delg (SISO-EJ)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Óbito	Baixo	Moderado
38	Obst. Est. de Int. Delg. (SISO – EFE)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Óbito	Alto	Intenso
39	Obst. Est. de Int. Delg (SISO – TRM)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Óbito	Alto	Intenso
40	Obst. Est. Int. Delg. (SISO- TJ)	Estrangulativa	Intestino Delgado	<24h	Alta	Baixo	Leve
41	Obst. Est. Int. Delg. (SISO – H.Richter)	Estrangulativa	Intestino Delgado	> 24h	Alta	Baixo	Moderado
<b>Total</b>	<b>Desl. Colon maior (11) Obs. Intr.Int. Grosso (11) Vôlvulo de C. Maior (6) Obs. Intr. Int. Delg (4) Obs. Est. Int. Deslg. (9)</b>	<b>Estrangulativa (26) Não Estrangulativa (15)</b>	<b>Intestino Grosso (28) Intestino Delgado (13)</b>	<b>&lt;24h (27) &gt;24h (13)</b>	<b>Alta (27) Óbito (14)</b>	<b>Baixo (24) Alto (17)</b>	<b>Leve (14) Moderado (16) Intenso (12)</b>

Em relação aos cavalos admitidos, foram incluídos dentro do grupo de obstrução intraluminal de intestino grosso, os casos de sablose, de compactação por fibras, por enterólitos e fecalomas de cólon menor, associados a compactações de cólon maior. Não foi incluída nenhuma compactação de ceco. Dois cavalos incluídos no estudo (A12 e A15), foram submetidos ao procedimento de tiflocentese antes da colheita de líquido peritoneal.

### 3.4.1 Sequenciamento genético das amostras de líquido peritoneal

Para realização da análise de bioinformática do líquido peritoneal, utilizamos um valor fixo de 12.993 leituras por amostras, para que não houvesse variabilidade entre elas. Com esse valor, foi possível atingir uma cobertura de  $99.76\% \pm 0.05\%$ . Isso nos sinaliza que a grande maioria das bactérias foi detectada durante o processamento de bioinformática. Para melhor compreensão dos dados, os cavalos foram agrupados de acordo com cada categoria descrita na metodologia e os resultados serão apresentados a seguir.

#### 3.4.1.1 Alfa diversidade

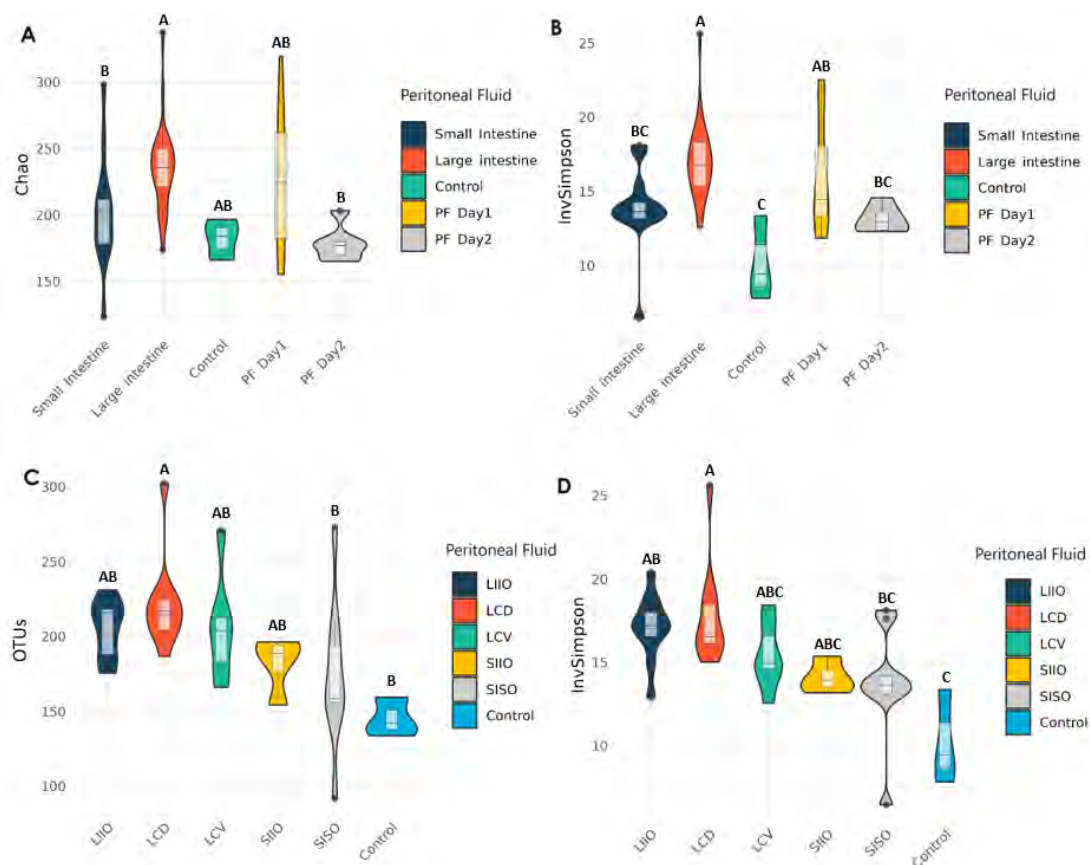
Os valores médios e desvios padrões dos índices de alfa diversidade das amostras de líquido peritoneal colhidas de cavalos com síndrome cólica de resolução cirúrgica, nos tempos trans cirúrgico, pós-operatório e de cavalos controle, estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrões dos índices de alfa diversidade (gêneros observados (OTUs), Chao, Simpson e Shannon) das amostras de líquido peritoneal no trans-cirúrgico (PF All Colics), dia 1 pós-cirúrgico (PF PostOp Day 1), dia 2 pós-cirúrgico (PF PostOp Day 2) de cavalos com cólica que foram submetidos a celiotomia exploratória e de amostras de líquido peritoneal de cavalos controle saudáveis (Control). Letras maiúsculas na mesma coluna denotam diferença entre as médias de cada grupo experimental ou momento de colheita  $p < 0.05$ .

	OTUs	Chao	Simpson	Shannon
<b>PF All Colics</b>	195±42 <sup>A</sup>	220±45 <sup>A</sup>	15.6±3.3 <sup>A</sup>	3.4±0.3 <sup>A</sup>
<b>PF Postop Day 1</b>	198±25 <sup>A</sup>	226±21 <sup>A</sup>	16.0±2.4 <sup>A</sup>	3.4±0.3 <sup>A</sup>
<b>PF Postop Day 2</b>	158±15 <sup>B</sup>	178±14 <sup>B</sup>	13.1±0.4 <sup>B</sup>	3.2±0.1 <sup>AB</sup>
<b>Control</b>	145±11 <sup>B</sup>	182±13 <sup>B</sup>	10.2±2.3 <sup>B</sup>	2.9±0.2 <sup>B</sup>

As amostras de cólica no período trans cirúrgico foram avaliadas de acordo com todas as classificações realizadas no estudo e foi possível encontrar diferenças quanto à região intestinal, sendo que as cólicas com o intestino grosso acometido, possuíam maiores índices de riqueza e diversidade quando comparados ao de intestino delgado ( $p < 0.01$ ), assim como quando comparados aos cavalos controle e dia 2 pós cirúrgico (Figura 2).

Figura 2. Gráficos de violino representando mediana, intervalo interquartil e densidade do número de gêneros observadas (OTUs), índice de Chao ou índice de Simpson das amostras de líquido peritoneal de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos à cirurgia de celiotomia exploratória e cavalos saudáveis. A) Dados do índice de Chao comparando os grupos pela região intestinal acometida B) Dados de Índice de Simpson comparando os grupos pela região intestinal acometida C) Dados do número de gêneros observados (OTUs) comparando os grupos pelo tipo de cólica. D) Dados do Índice de Simpson comparando os grupos pelo tipo de cólica. Legenda: Líquido peritoneal (PF) de cavalos com lesão de intestino delgado (Small Intestine) e intestino grosso (Large Intestine), do dia 1 pós-operatório (PF Day1) e dia 2 pós-operatório (PF Day2) assim como amostras de PF de cavalos saudáveis (Control). Líquido peritoneal (PF) de cavalos com lesão intraluminal obstrutiva simples (LIIO), deslocamento de cólon maior (LCD), torção de cólon maior (LCV), obstrução intraluminal de intestino delgado (SIIO), obstrução estrangulativa de intestino delgado (SISO). Letras maiúsculas dentro do mesmo gráfico denotam diferença entre as médias de cada grupo experimental ou momento de colheita ( $p < 0.1$ ).



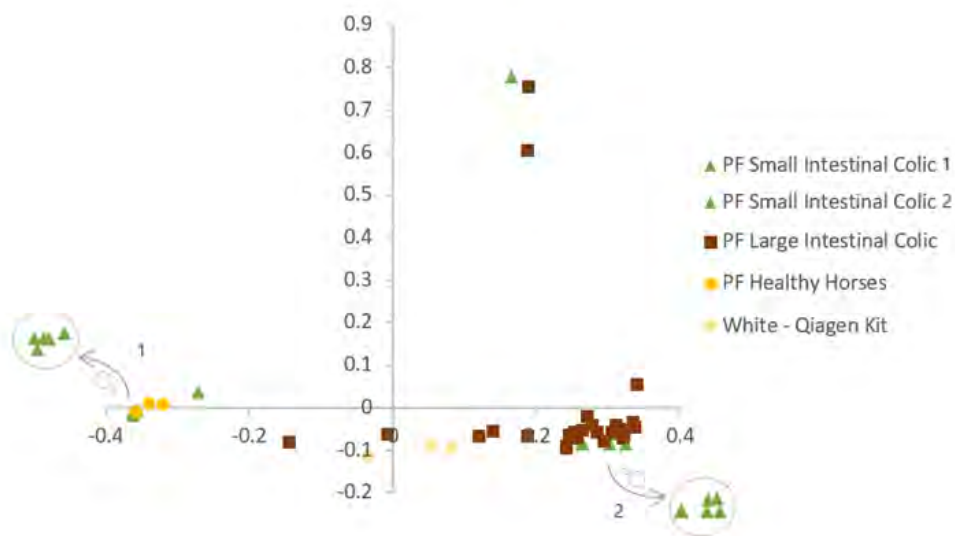
O grupo com maior riqueza e diversidade foi o do deslocamento de cólon maior (LCD) e o de menor, o de lesão estrangulativa de intestino delgado (SISO) ( $p < 0.05$ ). Também foram encontradas diferenças quanto ao tipo de lesão, estrangulativa *versus* não estrangulativa, para o número de espécies observadas (OTUs) ( $p = 0.08$ ) e para a diversidade, no Simpson ( $p = 0.02$ ), sendo eles maiores no grupo de lesões não estrangulativas. As amostras de PF de intestino delgado foram significativamente iguais às amostras PF Control em todos os índices ( $p > 0.05$ ), bem como as de PF PostOp Day2.

Podemos notar que as amostras de líquido peritoneal de cavalos saudáveis (PF Control) também apresentaram valores expressivos de alfa diversidade. Essas amostras, juntamente às amostras de controle negativo (amostras com conteúdo de reagentes do kit de extração e preparo da biblioteca para sequenciamento) foram colocadas na placa de sequenciamento no intuito de manter a qualidade, reduzir vieses e favorecer a interpretação correta dos resultados. Dessa forma, não significa que obrigatoriamente existem bactérias nessas amostras, que são originárias do líquido peritoneal, e esse assunto será mais bem aprofundado ao longo dos resultados, e principalmente, na discussão.

#### 3.4.1.2 Beta diversidade

A comparação da estrutura das comunidades bacterianas dos diferentes grupos está demonstrada na Figura 3.

Figura 3. Análise de coordenadas principais (PCoA) da estrutura das comunidades bacterianas utilizando o nível gênero pela análise de Yue anda Clayton das amostras de líquido peritoneal de cavalos com síndrome cólica com lesões de intestino delgado (PF Small Intestinal Colic 1 e 2) e de intestino grosso (PF Large Intestinal Colic) que foram submetidos à cirurgia de celiotomia exploratória, bem como de cavalos saudáveis (PF Healthy Horses), e do grupo controle negativo composto apenas por reagentes do kit de extração de DNA (White – Qiagen Kit). Existem diferenças significativas por meio do teste de AMOVA entre PF Large Intestinal Colic x PF Healthy Horses ( $p < 0.001$ ), PF Large Intestinal Colic x White – Qiagen Kit ( $p = 0.017$ ), PF Small Intestinal Colic 2 x PF Healthy Horses ( $p = 0.010$ ), PF Small Intestinal Colic 1 x PF Large Intestinal Colic ( $p < 0.001$ ).



Como podemos observar, as amostras de líquido peritoneal de animais com cólicas com lesões em intestino grosso (PF Large Intestinal Colic) se agruparam em locais distintos do grupo controle (PF Healthy Horses) e do controle negativo (White – Qiagen Kit), sendo diferentes entre si (AMOVA –  $p < 0.001$ ;  $p = 0.017$ , respectivamente). Entretanto, o grupo de intestino delgado, se dividiu em dois grupos, um distinto do grupo controle (PF Small Intestinal Colic 2) (AMOVA –  $p = 0.010$ ) e igual ao grupo de intestino grosso ( $p = 0.218$ ) e outro igual ao grupo controle (PF Small Intestinal Colic 1) ( $p = 0.391$ ) e distinto do grupo de intestino grosso (AMOVA –  $p < 0.001$ ), neste último, sugerindo apenas a presença de bactérias por questões relacionadas à colheita, extração de DNA e sequenciamento genético.

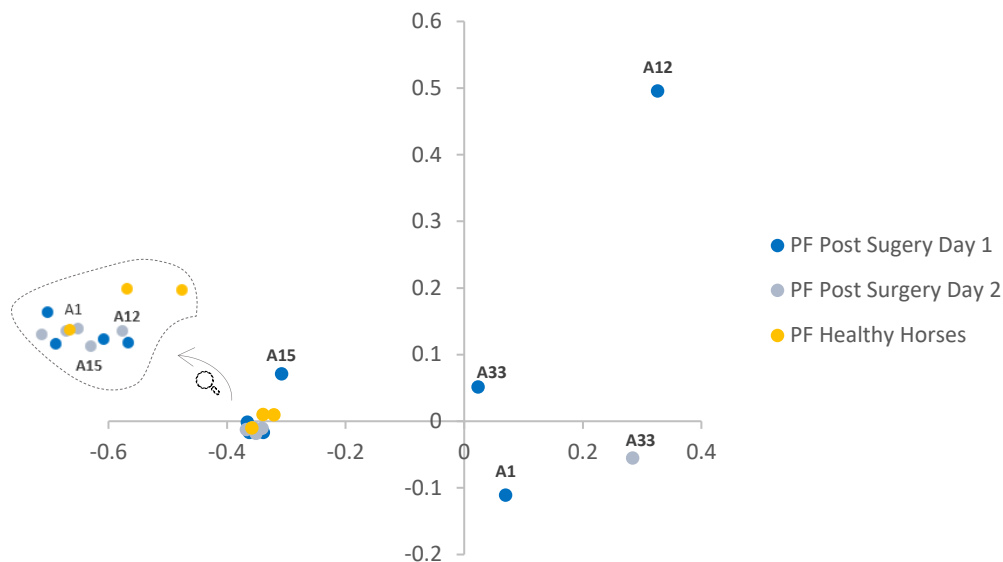
Podemos observar que para ambos os grupos de cólica, temos alguns animais outliers (A2, A25 e A39), que se agruparam entre si no quadrante superior direito. Contudo, das classificações avaliadas (tipo de cólica, tempo de duração, etc), não houve nenhuma que agrupasse os três animais. Porém, pudemos notar que A25 e A39 tiveram graves lesões (torção na base do cólon e torção de raiz de mesentério), com extenso comprometimento intestinal.

Em relação ao grupo de cólicas de delgado localizado ao lado esquerdo do PCoA, composto pelos animais A30, A33, A34, A35, A37, A38, pudemos notar que ele agrupava todas as hérnias inguinoescrotais com intestino localizado na bolsa escrotal, bem como dois encarceramentos (mesoduodeno e forame epiplóico), parecendo ser um grupo que era composto quase em sua totalidade por animais encarcerados, mesmo que em localizações diferentes. O único animal que não se enquadrava nesse cenário, foi o A30, que apresentou uma compactação de íleo, com leve comprometimento intestinal. O grupo de animais localizados do lado direito do PCoA foi composto por todos os cavalos com lesões não estrangulativas de delgado (SIIO) (exceto pelo A30), bem como todas as torções de jejuno. O único animal que não se enquadrava nessas classificações, foi o A41, que apresentou uma Hérnia de Richter, com apenas uma pequena parte do jejuno localizada no interior do anel inguinal, sem a entrada do mesentério no mesmo.

Para os cavalos de lesões de intestino grosso mais afastados do agrupamento principal, não pudemos fazer associações que contemplassem todos eles, mas eram em maioria lesões não estrangulativas, com duração menor que 24h.

Na Figura 4 pode ser observado a comparação dos líquidos peritoneais nos dois momentos pós-operatórios (dia 1 e 2) e líquido peritoneal de cavalos saudáveis.

Figura 4. Análise de coordenadas principais (PCoA) da estrutura das comunidades bacterianas utilizando o nível gênero pela análise de Yue and Clayton das amostras de líquido peritoneal de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos à cirurgia de celiotomia exploratória, no dia 1 pós-operatório (PF Post Surgery Day 1), no dia 2 pós-operatório (PF Post Surgery Day 2), bem como de cavalos saudáveis (PF Healthy Horses). Não existem diferenças significativas entre grupos por meio do teste de AMOVA ( $p > 0.05$ ).



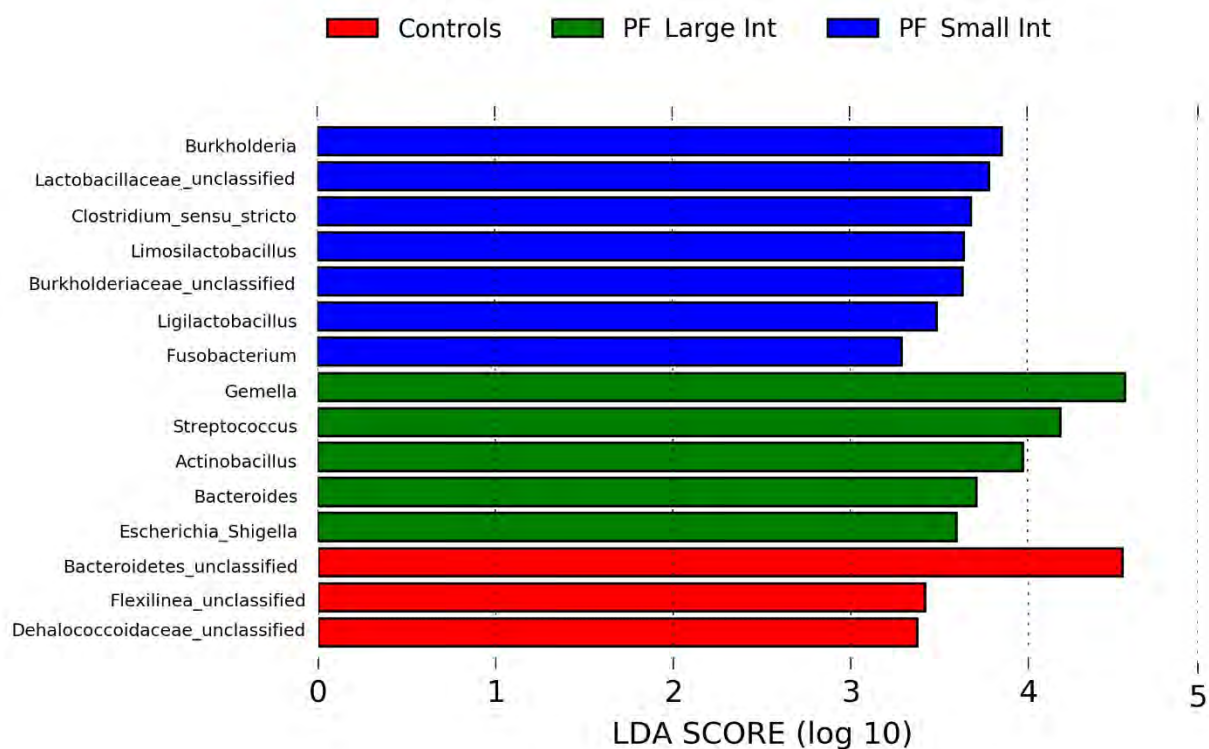
Podemos ver que inicialmente, embora não haja um agrupamento definido dos animais no primeiro dia pós-operatório, ele já foi suficiente para ser semelhante ao grupo controle ( $p=0.172$ ) e já no segundo dia, ainda mais semelhantes ( $p=0.368$ ). Pudemos observar que o A12, animal mais distante do restante dos animais, foi um dos submetidos à tiflocetese, assim como o A15. Para A1 e A33, não pudemos encontrar associações que os diferenciasses do restante.

### 3.4.1.3 LefSe

Foram encontrados diversos gêneros de bactérias em comum entre os grupos cólica, cavalos controle e controle negativo quando observada a abundância relativa das amostras. Para evitar vieses de interpretação, e conclusões falsas positivas para determinados gêneros, serão apresentados apenas os resultados do teste de LefSe, que é capaz de distinguir com poder estatístico, qual bactéria é associada a qual grupo. Para aumentar o poder e confiabilidade da nossa análise, optamos por unir o grupo controle ao controle negativo (reagentes do kit de extração e de sequenciamento), formando o grupo Controls. Essa junção foi realizada na intenção de eliminar os vieses de contaminação desde o momento da colheita, bem como das bactérias potencialmente

presentes nos kits de extração ou provenientes de qualquer etapa do processo de sequenciamento e bioinformática. A Figura 5, com as bactérias mais associadas a cada grupo, segue abaixo.

Figura 5. Análise Discriminante Linear pelo Efeito de Tamanho (LefSe) demonstrando os gêneros bacterianos significativamente associados a cada grupo (escore LDA > 2), sendo em vermelho, as bactérias das amostras de líquido peritoneal de cavalos saudáveis juntamente às amostras do controle negativo (Controls), em verde, as bactérias das amostras de líquido peritoneal de cavalos com cólica cirúrgica de lesões de intestino grosso (PF Large Int) e, em azul, as bactérias das amostras de líquido peritoneal de cavalos com cólica cirúrgica de lesões de intestino delgado (PF Small Int)



Foram associadas ao grupo cólica de intestino grosso as bactérias *Gemella*, *Streptococcus*, *Actinobacillus*, *Bacterioides* e *Escherichia/Shigella*. Ao grupo de intestino delgado, *Burkholderia*, *Lactobacillaceae* não classificada, *Clostridium sensu stricto*, *Limosilactobacillus*, *Burkholderiaceae* não classificada, *Ligilactobacillus* e *Fusobacterium*.



### 3.4.2 Achados clínicos e comparações com sequenciamento genético

A seguir, na Tabela 4, serão apresentados os dados da avaliação macroscópica intestinal, que foram demonstrados primeiramente pela quantidade de animais que cada escore contemplou (frequência) e mediana, bem como, valores numéricos da pontuação final. Os dados de hemograma, bioquímica sérica e bioquímica do líquido peritoneal podem ser observados na Tabela Suplementar 1.

Tabela 4. Dados de avaliação macroscópica intestinal (distensão, coloração da mucosa e serosa, manchas vásculo-sanguíneas, espessura e pontuação final), avaliação da ferida cirúrgica e tempo de duração da cólica de cavalos submetidos à celiotomia exploratória. Escores dos parâmetros da avaliação macroscópica intestinal: coloração da serosa e mucosa: rósea (0), avermelhada/congesta (1), roxa (2) e negra (3); manchas vásculo-sanguíneas: ausente (0), petéquias (1), equimoses (2) e hematomas (3) (Figura 3); distensão: ausente (0), pouca distensão (1), moderada distensão (2) e demasiada distensão (3); espessura: fisiológica (0), pouco espessa (1), moderadamente espessa (2) e demasiadamente espessa (3).

Parâmetros Intestinais / Escore (Frequência)	0	1	2	3	N/A	Mediana
<b>Distensão</b>	2	0	10	29		3
<b>Coloração da Mucosa</b>	16	10	4	9	2	1
<b>Coloração da Serosa</b>	10	17	7	7		1
<b>Manchas vásculo-sanguíneas</b>	15	2	7	17		2
<b>Espessura</b>	11	14	7	9		1
<b>Aval. macroscópica intestinal</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>
<b>Pontuação Final</b>	2	15	8.0	7.5	4.2	0.7
<b>Avaliação da Ferida Cirúrgica</b>	<b>Ausência (freq)</b>	<b>Presença (freq)</b>	<b>N/A (freq)</b>	<b>Int Delg. (%)</b>	<b>Int Grosso (%)</b>	<b>Todos (%)</b>
<b>Complicações Incisionais</b>	12	14	14	25	67	53,
<b>Tempo de Duração</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>
<b>Tempo (h)</b>	4	168	33	19	41	6.5

Considerando todos os dados previamente apresentados, foram realizados testes de correlação para verificar como as variáveis de alfa diversidade e avaliação macroscópica intestinal, se relacionavam com as demais variáveis.

Para a melhor interpretação dos resultados de correlação, quando as variáveis foram numéricas (ex. lactato sérico x lactato peritoneal) e a correlação foi positiva, os parâmetros seguiram na mesma direção, ou seja, quando um aumentou, o outro também aumentou e quando

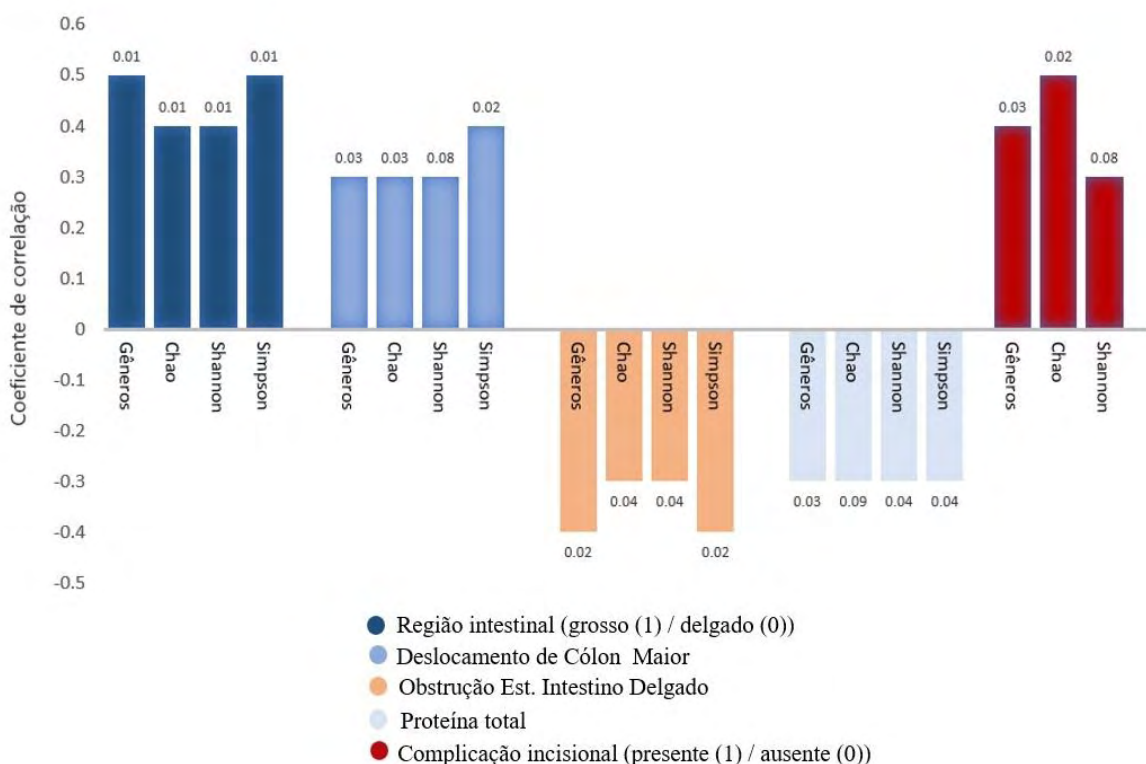
um diminuiu, o outro diminuiu. Já quando foram negativas, seguiram em direções contrárias, ou seja, quando um aumentou o outro diminuiu e vice-versa. Quando foi feita a comparação de uma variável numérica com uma categórica (ex. lactato peritoneal x grupo torção de cólon maior (LCV)) e essa correlação foi positiva, significou que quanto maior o lactato, maior a chance de pertencer ao grupo de torção de cólon maior (chance = valor do coeficiente de correlação, ex.  $cc=0.3$ ). Por fim, quando foi feita a comparação de duas variáveis categóricas (ex. Coloração Serosa Grau 3 x Coloração Mucosa Grau 3), significou que quando uma ocorreu a outra teve chance de ocorrer (chance = ex.  $cc=1$ ). Os valores absolutos de correlações entre 0.3 e 0.49, foram consideradas baixas, as 0.5 a 0.69 moderadas, as de 0.7 a 0.89 altas e entre 0.9 e 1, muito altas.

#### *3.4.2.1 Correlações envolvendo dados de alfa diversidade (número de gêneros observados, Chao, Shannon e Simpson)*

Em relação aos dados de alfa diversidade, podemos lembrar que riqueza é representada por número observados de gêneros em uma amostra (Índices Sobs e Chao) e diversidade, diz respeito às proporções das bactérias dentro daquela amostra (Índices de Shannon e Simpson). Na Figura 6, serão demonstrados os coeficientes de correlações ( $cc$ ) e seus respectivos  $p$  valores (demonstrados acima de cada coluna), que apresentaram significância nas correlações dos índices de alfa diversidade e outros parâmetros e/ou grupos avaliados.

Figura 6. Valores absolutos de coeficiente de correlação e respectivos  $p$  valores (identificados acima de cada coluna) para índices de alfa diversidade ( $N^\circ$  de gêneros, Chao, Shannon e Simpson) que foram correlacionados com a região intestinal (intestino grosso ou delgado), deslocamento de cólon maior, obstrução de intestino delgado, proteína total e

complicação incisional (presente ou ausente). Para índices de alfa diversidade x proteína total foi utilizado o teste de correlação de Spearman e para as outras correlações, o teste de correlação Ponto Bisserial ( $p < 0.1$ )

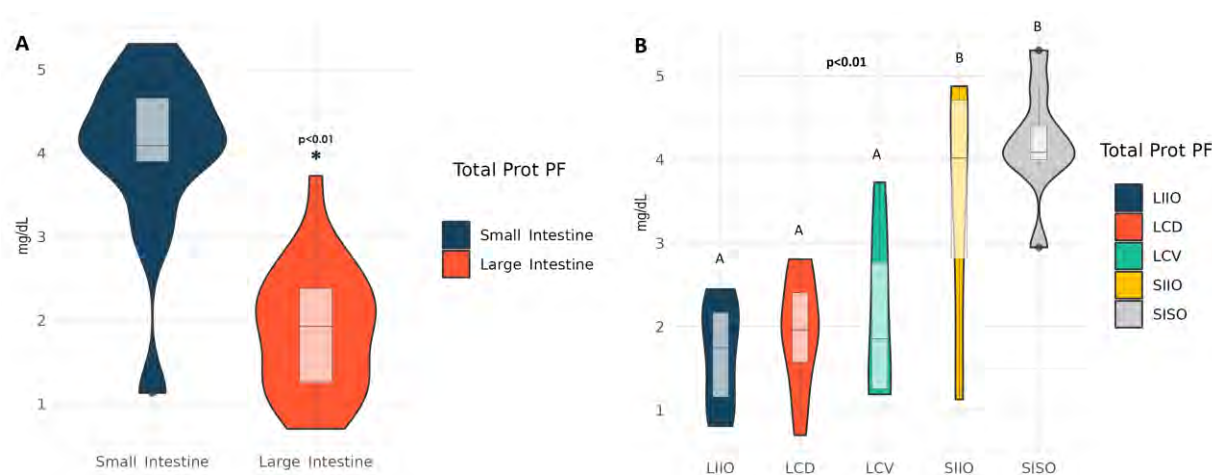


Conforme apresentado anteriormente por meio de outra análise, também pudemos observar pelo teste de correlação, que houve correlação positiva baixa a moderada para a região intestinal, em que, cavalos com lesões em intestino grosso, foram correlacionados com maior riqueza e diversidade ( $p < 0.01$ ), sendo os de deslocamento de cólon maior os mais fortemente correlacionados ( $p < 0.03$ ;  $p < 0.08$ ). Já os de torção de intestino delgado, os mais negativamente correlacionados, ou seja, associados a menores riqueza e diversidade ( $p < 0.04$ ).

Para a proteína total do líquido peritoneal (TP PF), foi denotada correlação baixa negativa quando comparada à riqueza e diversidade, isto é, quanto maior TP PF, menores riqueza ( $p < 0.09$ ) e diversidade ( $p < 0.04$ ). Aprofundando na investigação desse resultado, pudemos notar que havia diferença entre a região intestinal acometida, em que a proteína do intestino delgado era maior que

a do intestino grosso, bem como as lesões estrangulativas (dentro de cada região intestinal), possuíam maiores valores de proteína, como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Gráficos de violino representando mediana, intervalo interquartil e densidade dos valores de proteína total do líquido peritoneal (Total Protein PF) em mg/dL de cavalos com síndrome cólica que foram submetidos à celiotomia exploratória. A) Dados de proteína total do líquido peritoneal comparando os grupos pela região intestinal acometida B) Dados de proteína total do líquido peritoneal comparando os grupos pelo tipo de cólica. Legenda: Líquido peritoneal (PF) de cavalos com lesão de intestino delgado (Small Intestine) e intestino grosso (Large Intestine). Líquido peritoneal (PF) de cavalos com lesão intraluminal obstrutiva simples (LIIO), deslocamento de cólon maior (LCD), torção de cólon maior (LCV), obstrução intraluminal de intestino delgado (SIIO), obstrução estrangulativa de intestino delgado (SISO). Letras maiúsculas dentro do mesmo gráfico denotam diferença entre as médias de cada grupo experimental ( $p < 0.01$ ).



Pudemos também observar correlação positiva baixa a moderada, para riqueza e diversidade, quando comparadas a complicações incisionais, isto é, quanto maior o número de gêneros observados e quanto maior a proporção entre eles, maior a chance de complicações incisionais ( $p < 0.03$  e  $p < 0.08$ , respectivamente). Quando comparados os grupos lesões de intestino grosso *versus* intestino delgado, o intestino grosso apresentou maior frequência de complicações incisionais ( $p < 0.05$ ) e o grupo de deslocamento de cólon maior foi o que apresentou maior prevalência (78%), embora sem diferenças significativas. Da mesma maneira, a complicação incisional também apresentou correlação negativa baixa, para proteína total, ou seja, quanto maior a proteína, menor a chance de complicação incisional ( $p < 0.03$ ).

Não houve correlação de índices de alfa diversidade com achados citológicos (bactérias encontradas na lâmina), bem como para os resultados de cultura positivo apenas para um equino, em que foi possível observar as espécies *Pseudomonas monteei* e *Rhodococcus corynebacterioides*, porém, esse paciente havia sido submetido à tiflocentese, previamente. A cultura foi descontinuada do projeto após o 24º cavalo operado, uma vez que tinha sido negativa para todos os animais que haviam sido submetidos à cirurgia, sem nenhuma outra intercorrência.

#### 3.4.2.2 Correlações envolvendo dados de Avaliação Macroscópica Intestinal

Em relação ao valor final de escore de avaliação intestinal, pudemos encontrar correlações fortes ( $cc= 0.7$ ) para os todos os parâmetros contidos dentro da avaliação (coloração de mucosa e serosa, manchas vasculho-sanguíneas e espessura) ( $p<0.01$ ), com exceção do parâmetro de distensão, que foi moderadamente associado ( $cc= 0.5 - p<0.01$ ). Dessa forma, podemos demonstrar que quase em sua totalidade, os parâmetros individualmente, foram representativos do todo. Assim como as lesões estrangulativas também foram fortemente associadas (coef. Correl. = 0.7) à alta pontuação final ( $p<0.01$ ) e aos escores 3 dos parâmetros coloração de mucosa e serosa (0.9) e manchas vasculosanguíneas ( $cc=0.7$ ).

Além disso, também foram encontradas correlações positivas moderadas para todas as razões líquido peritoneal / sangue quando comparadas a pontuação final da avaliação macroscópica intestinal, ou seja, lactato ( $cc=0.5$ ), fosfatase alcalina ( $cc=0.4$ ), fósforo inorgânico ( $cc=0.4$ ) e proteína total ( $cc=0.4$ ) ( $p<0.03$ ). Bem como correlação negativa moderada para glicose ( $cc= -0.6$ ;  $p<0.01$ ). A correlação da TP PF com os parâmetros individuais se deu baixa positiva ( $cc=0.4$ ) para mucosa e serosa grau 3, bem como a razão líquido peritoneal/ sangue para espessura grau 3.

Houve correlação baixa negativa ( $cc = 0.3$ ) para escore intestinal final e duração da cólica, ou seja, cólicas de maior duração, tendem a ter menores valores de escore final ( $p < 0.03$ ).

### 3.5 Discussão

Esse foi o primeiro estudo que avaliou o líquido peritoneal de cavalos pelo método de sequenciamento genético, com a intenção de verificar a translocação bacteriana em cavalos com síndrome cólica de resolução cirúrgica. Pode ser observado que a técnica de sequenciamento genético é desafiadora para amostras de baixa biomassa, como o líquido peritoneal, mas que foi possível identificar a translocação bacteriana, por meio de diferenças entre as amostras de líquido peritoneal do trans cirúrgico quando comparadas às amostras de animais saudáveis ou ao momento do pós-operatório, quando estavam sob efeito de antibióticos. Essas diferenças foram evidenciadas tanto para alfa diversidade (quantidade de gêneros observados e proporção entre eles) e beta diversidade (a diferença da composição da comunidade microbiana e sua proporção, quando comparada entre os grupos). O animais com lesões de intestino grosso apresentaram maior riqueza e diversidade da comunidade bacteriana do líquido peritoneal, bem como, animais com essas características, apresentaram maior chance de complicações incisionais.

O número de gêneros observados e a proporção entre eles foi maior no grupo de lesões do intestino grosso quando comparado ao de delgado, assim como, também foi maior nas lesões não estrangulativas, quando comparadas às estrangulativas sendo que o grupo de deslocamento de cólon maior foi o que apresentou maiores índices e grupo de obstrução estrangulativa de intestino delgado, menores índices. Faz sentido esperar maior riqueza e diversidade em lesões de intestino grosso, uma vez que sua superfície de contato com a cavidade abdominal é maior, bem como apresenta maior quantidade de bactérias, em números absolutos e em espécies, por ser a principal

região do trato gastrointestinal responsável pela digestão microbiana dos alimentos nos equinos (COSTA et al., 2015; VARLOUD et al., 2004).

Entretanto, foi surpreendente o fato de que as lesões estrangulativas, independente da região intestinal, não foram as que apresentaram maiores indicativos de translocação. Considera-se que a injúria intestinal é um fator chave na fisiopatogenia da translocação bacteriana, por conta da lesão de epitélio e quebra da barreira intestinal, favorecendo para que as bactérias e/ou seus derivados sejam passíveis de translocar (BLIKSLAGER; GONZALEZ, 2018; GOTO; IVANOV, 2013; STÄRKEL et al., 2018). Dessa forma, esperava-se que nos casos de lesões estrangulativas desse estudo, poderia ser vista uma maior intensidade nos índices de alfa e beta diversidade, embora não tenha sido o resultado encontrado. Devemos levar em consideração dois pontos para interpretação desse resultado, o primeiro deles, é que a técnica de sequenciamento genético, aplicada de forma isolada, não mensura a quantidade em valores absolutos de bactérias, e sim, em quantidade de gêneros, quem são eles e a abundância relativa deles dentro de cada amostra (COSTA; WEESE, 2019). Dessa forma, pode ser que as cólicas não estrangulativas tenham apresentado riqueza e diversidade maiores, mas não necessariamente em quantidades absolutas maiores de bactérias. Em contrapartida, devemos levar em consideração que modelos de alta sobrecarga de amido (BUSTAMANTE et al., 2022), bem como, as cólicas geradas por essa questão (ERMERS et al., 2023), são amplamente reconhecidas por apresentarem translocações de metabólitos bacterianos como o LPS ou mesmo de bactérias, sem ter ocorrido uma lesão estrangulativa nesses pacientes, apenas inflamação e distensão (BLIKSLAGER et al., 2017; CAPEWELL; BOSTON, 2004; FALEIROS et al., 2011), ou seja, já é sabido clinicamente, que a injúria intestinal severa não é um fator providencial para que a translocação bacteriana aconteça.

Além disso, as amostras de líquido peritoneal dos cavalos de lesões de intestino delgado apresentaram-se divididas em dois grupos significativamente diferentes. No grupo que pode ser considerado igual ao grupo controle, ou seja, com poucas evidências de translocação bacteriana, possuía majoritariamente animais com diagnóstico de encarceramento de variadas origens (hérnia inguinoescrotal, forame epiplóico, etc). Nesses mesmos tipos de caso, resultados semelhantes são encontrados para análises de líquido peritoneal de outras naturezas (macroscópica, bioquímica, etc.), em que podem apresentar resultados inconsistentes, com alterações subestimadas e que não acompanham o status clínico do paciente, pois essa alça intestinal está compartimentalizada, sem dividir as suas alterações com a maior parte do líquido peritoneal (RADCLIFFE et al., 2022). Em contrapartida, o outro grupo de delgado, composto por obstruções intraluminais e torções com o segmento intestinal posicionado dentro da cavidade, apresentou-se diferente do grupo controle, indicando que houve translocação bacteriana.

Além disso, observou-se que a proteína total do líquido peritoneal (PT PF) apresentou correlação negativa com os índices de alfa diversidade, indicando que quanto maior o valor de proteína, menor o número de gêneros observados, bem como menor a equidade entre eles na amostra. Os maiores valores de PT PF, foram correlacionados à região intestinal, em que cólicas por lesões de intestino delgado eram as principais responsáveis pelos valores altos desse parâmetro. Ademais, quando os tipos de cólica eram comparados dentro de cada região intestinal, por exemplo, obstrução não estrangulativa de intestino delgado *versus* obstrução estrangulativa de intestino delgado ou obstrução não estrangulativa de intestino grosso *versus* obstrução estrangulativa de intestino grosso, as lesões estrangulativas eram as de maior valor de PT PF, assim como já reportado na literatura (NIETO, 2018; WALTON; SOUTHWOOD, 2012).



O aumento da PT PF é amplamente descrito na literatura em casos de síndrome cólica (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002; NIETO, 2018; WALTON; SOUTHWOOD, 2012), bem como, há um estudo que utiliza a PT PF para determinar a indicação de necessidade de enteroanastomose, em casos de cólica cirúrgica de intestino delgado, em que as de maior valor, apresentaram maior demanda por ressecção (PYE et al., 2019). Entretanto, a evidência da diferença de valores de proteína total do líquido peritoneal entre lesões de intestino grosso e delgado, ainda não havia sido reportada na literatura. Hipotetizamos que esse aumento possa ser mais evidente no intestino delgado, pois possui menor capacidade e volume de distensão que o intestino grosso, o que faz com que haja maiores alterações, mesmo que com injúrias de magnitude semelhante no outro segmento. Dessa forma, ocorreria uma maior alteração na pressão hidrostática e uma estase maior do fluxo sanguíneo nessa porção intestinal (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002), o que levaria a uma maior perda de proteína para a cavidade pelo intestino delgado, do que pelo grosso.

Em relação às amostras de pós operatório, quando comparadas ao grupo controle, na análise de sequenciamento genético das bactérias, pudemos observar que no dia 1 (PF D1), o grupo cólica já se apresentava igual estatisticamente ao grupo controle, em questões de composição da microbiota, indicando que a maior parte das bactérias em maior abundância eram similares entre si, ou seja, provavelmente às que foram provenientes do kit de extração de DNA e/ou outras etapas do processo de sequenciamento e bioinformática (OLOMU et al., 2020). Porém, ainda apresentava diferenças em relação ao grupo controle, para o número de espécies observadas, bem como a equidade entre elas dentro das amostras. Além disso, para a composição, alguns animais não estavam totalmente agrupados com o restante, como foi observado no gráfico de PCoA. Embora esses animais já estivessem sob efeito de antibióticos, a diferença do grupo controle pode ter ocorrido, por conta de toda manipulação intestinal, bem como abertura do intestino, favorecendo

uma maior chance de presença de bactérias, conforme também foi relatado em um estudo realizado com humanos em situações similares (MACFIE et al., 2006).

Vale ressaltar também, que no PF D1, dois animais que apresentaram líquido peritoneal de riqueza e diversidade aumentadas, bem como, composição da estrutura da comunidade bacteriana diferente dos animais do mesmo grupo, haviam passado pelo procedimento de tiflocentese, que, por conta de extravasamento de microorganismos (UNGER et al., 2014), é um método responsável por causar alterações celulares e bioquímicas em líquido peritoneal, que são mais expressivas a partir de 24h, e principalmente 3 a 7 dias após o insulto (DÓRIA et al., 2022), e por esse motivo, talvez não tenham apresentado-se diferentes logo no momento da cirurgia no sequenciamento genético, pois o insulto havia sido realizado menos de 3 horas antes da cirurgia e um, imediatamente antes da cirurgia. Na amostra do transoperatório, um desses animais apresentou cultura positiva de microorganismos já relatados na literatura (ARNDT et al., 2021; DART; CHAPMAN, 2015; DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002), e o outro, cultura negativa. E, mesmo com a cultura positiva, não pudemos observar diferença dessa amostra, perante as outras, pelo sequenciamento genético.

A cultura do líquido peritoneal é desafiadora, tendo baixa taxa de resultados positivos, como demonstrado no presente estudo e em outro realizado também com cólicas cirúrgicas (HANN et al., 2020). Até mesmo os casos de peritonite clínica, apresentam taxas menores de 40%, mesmo que haja indícios clínicos, de celularidade e de citologia, que confirmam presença de bactérias (ARNDT et al., 2021). Por conta desse cenário, a indicação para cultura de líquido peritoneal, costuma se dar principalmente em casos de peritonite séptica (RADCLIFFE et al., 2022), mas realizamos ambas as técnicas, na intenção de apresentarmos o contraste de que a cultura negativa não exclui a possibilidade de presença de bactérias, como visto nesse estudo.

Nesse ínterim, foi observada a associação de bactérias aos dois grupos de cólica, intestino grosso e delgado, que já foram anteriormente descritas na literatura em cultura de líquido peritoneal, como *Streptococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Actinobacillus*, *Burkholderia*, *Bacterioides* e *Fusobacterium* (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002; HANN et al., 2020; NIETO, 2018; RADCLIFFE et al., 2022). Porém, foram detectadas bactérias que não foram encontradas reportadas na literatura, em amostras de líquido peritoneal de equinos, como *Gemella*, *Clostridium sensu stricto* e as da família *Lactobacillaceae*, como, por exemplo, *Limosilactobacillus* e *Ligilactobacillus*. Para *Gemella* e outro gênero da família *Lactobacillaceae*, como o *Lactobacillus*, foi possível encontrar relatos na literatura em humanos, como agentes raros de causa de peritonite (AZAP et al., 2005; HADANO et al., 2018; LEE et al., 2004). Mas, especificamente para *Clostridium sensu stricto*, *Limosilactobacillus* e *Ligilactobacillus*, não há relatos em amostras de líquido peritoneal em nenhuma espécie.

No segundo dia pós-operatório, exceto pelo líquido peritoneal de um cavalo, todos os outros se agruparam junto aos do grupo controle, em relação à composição da estrutura da comunidade bacteriana, bem como reduziram os índices de riqueza e diversidade, iguais estatisticamente aos do grupo controle, sugerindo a ausência de bactérias nas amostras. Possivelmente, isso foi em decorrência do tratamento com antibiótico (ARNDT et al., 2021), aliado ao fato da cólica, origem de todo o distúrbio, ter sido resolvida. Não foi possível achar um motivo, para um dos animais ter se comportado de maneira diferente, considerando os parâmetros que foram avaliados, porém, hipotetizamos que pode ter sido por resistência bacteriana, mas apenas inicialmente, uma vez que esse paciente não apresentou complicações pós-operatórias.

Foi observada correlação de que quanto maior a riqueza e diversidade no líquido peritoneal, maior a chance de complicações incisionais. As cólicas de intestino grosso tiveram maior

ocorrência quando comparadas às de delgado e as de deslocamento de cólon maior, as de maior prevalência (78%), o que também conflui com os índices de alfa diversidade, que se apresentaram maiores nesses grupos. Quando a comparação sobre ocorrência de bactérias no líquido peritoneal *versus* complicações incisionais foi feita por métodos de cultura, em outro estudo, essa correlação não existiu (HANN et al., 2020), assim como também não existiu no nosso, que foi correlacionado apenas pela técnica de sequenciamento e não pela de cultura. Porém, em peritonites induzidas experimentalmente em celiotomia exploratória de cavalos saudáveis, foi possível comprovar a associação da peritonite com complicações incisionais e, também, com o desenvolvimento de hérnias (DÓRIA et al., 2020).

O escore de avaliação macroscópica intestinal se demonstrou eficiente para as avaliações realizadas, uma vez que apresentou diversas correlações positivas com importantes parâmetros que determinam a existência de injúria intestinal, como lactato, proteína total, fósforo inorgânico e fosfatase alcalina (PELOSO; COHEN, 2012; RADCLIFFE et al., 2022; SHEARER; NORBY; CARR, 2018; YAMOUT et al., 2011). Essas associações foram mais evidentes, principalmente quando comparadas com as razões desses parâmetros líquido peritoneal / sangue, que costumam ser mais fidedignas do que utilizadas isoladamente (PYE et al., 2019; RADCLIFFE et al., 2022). Porém, não pudemos fazer associações com os resultados encontrados no sequenciamento genético, implicando mais uma vez, que a translocação bacteriana provavelmente não ocorre apenas devido à severidade da injúria intestinal, conforme já evidenciado na literatura (BLIKSLAGER; GONZALEZ, 2018; STEWART; PRATT-PHILLIPS; GONZALEZ, 2017), mas também por outros fatores, como a depender da região intestinal acometida e do tipo de cólica.

Ademais, um dos grandes pontos chave desse estudo foi evidenciar que, assim como encontrado em outros trabalhos em humanos e equinos, podemos encontrar DNA bacteriano nas

amostras de controle negativo, que normalmente é composto por reagentes de extração de DNA e do sequenciamento genético, e nesses casos, a sua composição microbiana costuma ser classificada como “kitoma” (GLASSING et al., 2016; OLOMU et al., 2020; SALTER et al., 2014; THOMSON et al., 2022; VAN DER HORST et al., 2013). Sejam elas de origem dos reagentes, manipulação, sequenciamento ou interferências causadas pela bioinformática, esses resultados têm grande importância e nunca devem ser desconsiderados ao se avaliar amostras de baixa biomassa. No estudo presente, por exemplo, foram encontradas diferenças evidentes entre cavalos com cólica e cavalos controle, mas foram encontradas bactérias no último grupo. Porém, é pouco provável que existam bactérias viáveis em líquido peritoneal de cavalos saudáveis e mais provável que seja em decorrência do “kitoma”. Portanto, é importante ressaltar que esses resultados devem ser interpretados com cautela e responsabilidade, para que falsas informações não sejam propagadas.

Como limitações desse estudo podemos salientar as características do sequenciamento genético, que é uma técnica não quantitativa, informação essa extremamente importante sobretudo para amostras de baixa biomassa, como o líquido peritoneal. Desta forma, quantidade ínfimas de DNA são amplificadas durante o PCR produzindo milhões de amplicons que são sequenciados. Portanto, a utilização de outros testes que detectassem a quantidade de bactérias nas amostras, como por exemplo, o PCR quantitativo (qPCR), seria importante para que fosse possível fazer comparações, não só em abundâncias relativas, mas também em abundâncias absolutas. Além disso, seria melhor existir um número mais equilibrado de animais que continham afecções de intestino grosso e delgado, para que as alterações ocorridas no último grupo pudessem ser melhor exploradas, bem como evidenciar com mais clareza possíveis diferenças entre os dois grupos.

### 3.6 Conclusão

Por meio do sequenciamento genético, foi possível detectar a translocação bacteriana na maioria dos cavalos com síndrome cólica cirúrgica utilizados nesse estudo. As alterações foram mais evidentes em cavalos com lesão em intestino grosso do que em intestino delgado, bem como, houve correlação de cavalos com líquido peritoneal com maior número de gêneros de bactérias, apresentarem maior chance de complicações incisionais. Cavalos com lesões de encarceramento de intestino delgado, em sua maioria, não apresentaram indícios de translocação bacteriana. O sequenciamento genético de amostras de baixa biomassa é desafiador e, por esse motivo, mais estudos são necessários para repetibilidade e aprimoramento da técnica nesse tipo de amostra, para futuras aplicações clínicas e cirúrgicas serem possíveis.

### 3.7 Referências

- ADAPA, S. et al. Peritonitis from Anaerobic Gram-positive Cocci Likely Due to Translocation of Bacteria from Gut in a Patient Undergoing Peritoneal Dialysis. **Cureus**, v. 11, n. 11, p. 10–14, 2019.
- ADAPA, S. et al. Peritonitis from facultative anaerobic gram-negative bacilli likely due to translocation of bacteria from gut in a patient undergoing peritoneal dialysis. **Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 8376, p. 12–14, 2020.
- ARNDT, S. et al. Clinical and diagnostic findings, treatment, and short- and long-term survival in horses with peritonitis: 72 cases (2007-2017). **Veterinary Surgery**, v. 50, n. 2, p. 323–335, 2021.
- AZAP, Ö. K. et al. Gemella morbillorum peritonitis in a patient being treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.4. p330-339, 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. 1–13, 2013.
- BLIKSLAGER, A.; GONZALEZ, L. Equine Intestinal Mucosal Pathobiology. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 6, n. 8, p. 1–19, 2018.
- BLIKSLAGER, A. T. et al. **The equine acute abdomen**. 3rd edition, 2017.
- BUSTAMANTE, C. C. et al. Effects of Starch Overload and Cecal Buffering on Fecal Microbiota of Horses. **Animals**, v. 12, n. 23, 2022.

- CAPEWELL, L.; BOSTON, R. Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization. **Journal of the American Veterinary Medical Association** p. 885–889, 2004.
- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4516–4522, 2011.
- COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 633–642, 2014.
- COSTA, M. C. et al. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. **Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 74–80, 2015.
- COSTA, M.; WEESE, J. S. Methods and basic concepts for microbiota assessment. **Veterinary Journal**, v. 249, p. 10–15, 2019.
- DART, A. J.; CHAPMAN, H.-S. Peritonitis. Em: **Robinson's Current Therapy in Equine Medicine**. Elsevier, 2015. p. 349–352, 2015.
- DEHEER, H. L.; PARRY, B. W.; GRINDEM, C. B. **Peritoneal fluid**. Second Edition, Mosby, Inc., 2002.
- DÓRIA, R. G. S. et al. Correlation Between Peritonitis and Incisional Infections in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 87, p. 1–8, 2020.
- DÓRIA, R. G. S. et al. Complications following transcutaneous cecal trocarization in horses with a cattle trocar and a cecal needle. **PLoS ONE**, v. 17, n. 11, 2022.
- ERMERS, C. et al. The Fibre Requirements of Horses and the Consequences and Causes of Failure to Meet Them. **Animals**. v. 13, n. 1414, p. 1-16, 2023.
- FALEIROS, R. R. et al. Laminar Leukocyte Accumulation in Horses with Carbohydrate Overload-Induced Laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 107–115, 2011.
- GATT, M.; REDDY, B. S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, n. 25, p. 741–757, 2007.
- GLASSING, A. et al. Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, 2016.
- GOTO, Y.; IVANOV, I. I. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal – host immune crosstalk. **Immunology and Cell Biology**, v. 91, n. 3, p. 204–214, 2013.
- HADANO, Y. et al. *Gemella haemolysans* bacteremia in a patient with secondary peritonitis due to a duodenal ulcer perforation: A case report. **ID Cases**, v. 12, p. 133–135, 2018.
- HANN, M. et al. Bacterial translocation in horses with colic and the potential association with surgical site infection: A pilot study. **Veterinary Record**, v. 187, n. 2, p. 1–7, 2020.
- HURCOMBE, S. D.; MUDGE, M. C.; DANIELS, J. B. Presumptive bacterial translocation in horses with strangulating small intestinal lesions requiring resection and anastomosis. v. 22, n. 6, p. 653–660, 2012.
- IACOB, S.; IACOB, D. G. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–17, 2019.

JACOBS, C. C.; STEFANOVSKI, D.; SOUTHWOOD, L. L. Use of perioperative variables to determine the requirement for repeat celiotomy in horses with postoperative reflux after small intestinal surgery. **Veterinary Surgery**, p. 1–7, 2019.

KOZICH, J. J. et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112–5120, 2013.

LEE, S. Y. et al. Lactobacillus peritonitis: A rare cause of peritonitis in peritoneal dialysis patients. **Renal Failure**, v. 26, n. 4, p. 419–423, 2004.

MACFIE, J. et al. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. **British Journal of Surgery**, v. 93, n. 1, p. 87–93, 2006.

MCDONALD, D. et al. Extreme Dysbiosis of the Microbiome in Critical Illness. **mSphere**, v. 1, n. 4, p. 1–6, 2016.

MENG, M.; KLINGENSMITH, N. J.; COOPERSMITH, C. M. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure. p. 143–148, 2017.

MOORE, J. N.; VANDENPLAS, M. L. Is it the Systemic Inflammatory Response Syndrome or Endotoxemia in Horses with Colic? **Veterinary Clinics of NA: Equine Practice**, p. 1–15, 2014.

NIETO, J. Peritoneal Fluid. Em: PUSTERLA, N.; HIGGINS, J. (Eds.). **Interpretation of Equine Laboratory Diagnostics**. First Edit ed.p. 357–362., 2018.

OLOMU, I. N. et al. Elimination of “kitome” and “splashome” contamination results in lack of detection of a unique placental microbiome. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, 2020.

PELOSO, J. G.; COHEN, N. D. Use of serial measurements of peritoneal fluid lactate concentration to identify strangulating intestinal lesions in referred horses with signs of colic. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 240, n. 10, p. 1208–1217, 2012.

POUYADE, G. R. et al. Evaluation of low-molecular-weight heparin for the prevention of equine laminitis after colic surgery. **Veterinary Emergency and Critical Care Society** v. 19, n. 1, p. 113–119, 2009.

PYE, J. et al. Preoperative factors associated with resection and anastomosis in horses presenting with strangulating lesions of the small intestine. **Veterinary Surgery**, v. 48, n. 5, p. 786–794, 2019.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

RADCLIFFE, R. M. et al. Interpreting abdominal fluid in colic horses: Understanding and applying peritoneal fluid evidence. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 32, p. 81–96, 2022.

SALTER, S. J. et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. **BMC Biology**, v. 12, n. 1, 2014.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.



- SEGATA, N. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, 2011.
- SELWAY, C. A.; EISENHOFER, R.; WEYRICH, L. S. Microbiome applications for pathology: challenges of low microbial biomass samples during diagnostic testing. **Journal of Pathology: Clinical Research**, v. 6, n. 2 p. 97-106, 2020
- SHEARER, T. R.; NORBY, B.; CARR, E. A. Peritoneal Fluid Lactate Evaluation in Horses With Nonstrangulating Versus Strangulating Small Intestinal Disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 61, p. 18–21, 2018.
- SOUTHWOOD, L. L. Physical Examination. Em: **Practical Guide to Equine Colic**. Wiley, 2012. p. 12–21., 2012.
- STÄRKEL, P. et al. Intestinal dysbiosis and permeability: the yin and yang in alcohol dependence and alcoholic liver Peter St arkel. **Clinical Science**, v. 132, p. 199–212, 2018.
- STEWART, A. S.; PRATT-PHILLIPS, S.; GONZALEZ, L. M. Alterations in Intestinal Permeability: The Role of the “Leaky Gut” in Health and Disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.52, p. 10-22, 2017.
- THOMSON, P. et al. Characterization of microbial communities and predicted metabolic pathways in the uterus of healthy mares. **Open Veterinary Journal**, v. 12, n. 6, p. 797–805, 2022.
- UNGER, L. et al. Peritonitis, abscessation and haemorrhage: Complications of transcutaneous caecal decompression. **Equine Veterinary Education**, v. 26, n. 8, p. 430–435, 2014.
- URAYAMA, S. et al. Blood glucose is unlikely to be a prognostic biomarker in acute colitis with systemic inflammatory response syndrome in Thoroughbred racehorses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 1, p. 15–19, 2018.
- VAN DER HORST, J. et al. Sterile paper points as a bacterial DNA-contamination source in microbiome profiles of clinical samples. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 12, p. 1297–1301, 2013.
- VARLOUD, M. et al. 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.
- WALTON, R. M. Clinical Laboratory Data. Em: **Practical Guide to Equine Colic**, p. 78–86, 2012.
- WALTON, R. M.; SOUTHWOOD, L. L. Abdominocentesis and Peritoneal Fluid Analysis. Em: **Practical Guide to Equine Colic**, Wiley, p. 87–98, 2012.
- WONG, D. M.; MOORE, R. M.; BROCKUS, C. W. Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Horses: Pathogenesis and Therapeutics. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, n.4, p. 1–6, 2012.
- YAMOUT, S. Z. et al. Peritoneal and Plasma d-lactate Concentrations in Horses with Colic. **Veterinary Surgery**, v. 40, n. 7, p. 817–824, 2011.

### 3.8 Material suplementar

Tabela Suplementar 1. Dados de valor mínimo, máximo, média, mediana, desvio padrão (DP) e erro padrão (EP) dos parâmetros avaliados ao realizar o hemograma, a bioquímica sérica, bioquímica do líquido peritoneal, razões entre líquido peritoneal/sangue e frequência cardíaca.

<b>Blood</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	5.0	12.6	8.5	8.1	1.9	0.3
Hemoglobina (g/dL)	8.1	23.5	15	13.7	3.7	0.6
Hematócrito (%)	25	66	40	38	10.0	1.6
Leucócitos (x10 <sup>6</sup> /μL)	2300	22500	7497	6500	4116.7	659.2
Proteína total (g/dL)	3.4	8.8	5.9	5.7	1.1	0.2
Plaquetas (x10 <sup>6</sup> /μL)	56.000	341.000	205.359	204.000	62.416	9.995
Glicose (mg/dL)	73	330	160	138	57.3	9.2
Lactato (mmol/L)	1.3	28	6.2	3.5	6.3	1.0
Fosfatase alcalina (U/L)	28	559	255	235	133.0	21.3
Fósforo inorgânico (mg/dL)	2.0	11.8	4.3	3.6	1.9	0.3
<b>Líquido Peritoneal</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>
Contagem de células nucleadas (CNNs/ μL)	100	79000	6490	1000	14977	2398
Proteína total (g/dL)	0.7	5.31	2.58	2.3	1.3	0.2
Glicose (mg/dL)	60	276	155	147	51	8
Lactato (mmol/L)	1.5	32.2	8.4	6.0	7.0	1.1
Fosfatase alcalina (U/L)	18	890	125	70	167	27
Fósforo inorgânico (mg/dL)	2.2	12.1	5.2	4.3	2.5	0.4
<b>Razão líquido peritoneal/sangue</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>
Razão glicose	0.35	2.42	1.09	1.12	0.37	0.06
Razão lactato	0.65	2.51	1.31	1.19	0.49	0.08
Razão fosfatase alcalina	0.08	3.56	0.58	0.34	0.72	0.11
Razão fósforo inorgânico	0.59	2.63	1.12	1.02	0.41	0.07
Razão proteína total	0.12	0.90	0.50	0.45	0.23	0.04
<b>Parâmetro</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>
Frequência Cardíaca (bpm)	36	102	64	62	14	2