



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Relação entre o microbioma bacteriano gastrointestinal com a doença inflamatória intestinal e o linfoma em cães e gatos

Coimbra, julho 2021

Inês Ribeiro Rodrigues Almeida Medeiros

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora Liliana

Cristina Pereira Montezinho

Arguente: Professora Doutora Ana Cristina

Silvestre Ferreira

Orientador: Professora Doutora Sofia Alexandra

Cancela Duarte

Orientador Interno

Professora Doutora Sofia Alexandra

Cancela Duarte

Coorientador Interno

Professor Doutor Hugo Vilhena

Orientadora Externa

Ana Cláudia Carriço

Hospital Veterinário Bom Jesus

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG

Dedicatória

Aos meus pais e irmãos, Maria, Carlota e Manuel

Agradecimentos

Quero agradecer à Professora Doutora Sofia Duarte e ao Professor Doutor Hugo Vilhena pela constante orientação, prestabilidade e preocupação durante todo o processo de escrita da dissertação.

A toda a equipa do Hospital Veterinário do Bom Jesus, por tudo o que me ensinaram ao longo de seis meses de estágio, pelo quanto me fizeram crescer e por acabarem por ser um apoio em Braga. Por todos os momentos de risota, mesmo quando uma gata fez diarreia no meu cabelo.

Às minhas colegas de estágio, Diana, Paula e Paulina, por todo o companheirismo, amizade e trocas de horários.

Ao meu grupinho de Coimbra, que desde o primeiro ano me acompanharam, quem sabe dizer se foi mesmo desde o meu primeiro dia. Por todas as saídas, jantares, serenatas, praxes, companheirismo e amizade. À Maria por todas as boleias, à Raquel por todas as noites de loucura, à Mafalda por todos os dramas, ao Tiago por nunca existirem momentos enfadonhos na sua presença e a todos pelas gargalhadas das quais nunca me vou esquecer.

Ao Cerca, pelo arroz de verdes, pelos jantares diários, saídas intermináveis, por nos rirmos da chata da colega de casa dele, pelos berros que se ouviam por toda a faculdade, pelos beijos molhados de manhã, por todos os shots, dias de “estudo” no TAGV, noites de saída na Associação, por todos os risos, discussões estúpidas, almoços, jantares, por ter piada mesmo quando está de mau humor e pela amizade dele. Por estares sempre desesperado comigo e estarmos sempre juntos, na saúde e na tristeza, na contínua exames e recursos.

À Mariana Pinheiro, por me deixar comer banana no carro dela às oito da manhã todos os dias, por nunca estar de mau humor, por ser a calma da minha tempestade. Por cinco anos de mensagens a perguntar-me se estou bem, mesmo quando sabia que estava a dormir e a faltar à aula, por todas as mensagens a avisar que amanhã é preciso levar kit cirúrgico/bata/galochas/assinar papeis/mudar de sala/entregar folhas/inscrever-me em bancos e tanto mais... Por nunca me deixar falhar prazos nem datas, sem ti não teria sido possível realizar este curso porque como sabes, sem ti estaria perdida. Por todos os almoços no Pão de açúcar, no Mcdonalds e no fórum com o Cerca atrás. Por teres sido família em Coimbra.

À Mariana Domingues e à Mariana Matos, pelos momentos passados na Solum, por nunca me deixarem jantar sozinha, pelos sustitos, pelas piadas, por aturarmos a chata em conjunto, e pela amizade que levo para a vida.

À Francisca Abreu, por me ter ensinado a ver Coimbra com outros olhos. Por me mostrar tudo o que a Cidade dos estudantes tem de melhor. Por me ter mostrado que é possível conseguirmos atingir todos os nossos objetivos e continuar a sair. Por me ter adotado, por todas as tardes do bar, saídas, latadas, queimas e cortejos que a seu lado tiveram outro encanto. Pelas black Fridays, saladetis, cinemas e laollaos. Por todas as nossas coisas, piadas e loucura, pelos gritos, pelas cantigas e pela nossa própria Balada especial. Pela lealdade, confiança e amizade insubstituível e acima de tudo pelo amor que só uma amiga de infância sabe dar.

Ao Bruno Silva, por tudo e por nada. Por se rir de tudo, mesmo quando mais ninguém acha piada, por termos tema de conversa interminável, pela hora da batata frita, boleias com smell a Estarreja, pelas noites inesperadas que se tornaram inesquecíveis e pelos cortejos épicos. Pela lealdade, confiança e amizade inigualável.

Às amigas da minha vida, Cachim, Serrano e Kika. Pelos últimos dez anos a aturarem-me, por já serem família. Por terem ido a Coimbra uma vez, durante seis anos, são umas queridas.

Ao Jota, por acreditar em mim, por me apoiar incondicionalmente, por nunca me deixar duvidar de mim mesma e por ser um exemplo de força e dedicação. Por mesmo há seis anos atrás ter sido uma força que me levou a tomar a decisão de mudar de cidade e de vida. Por todas as músicas, guitarradas, palavras e gargalhadas. Pelo amor, lealdade e amizade.

À minha família, tios e primos, por todo o amor e carinho. Por todos terem influenciado a pessoa que sou hoje. Em especial à minha Tia Inês por todo apoio e amizade e por me ter emprestado a Xareti. Sem ela teria sido muito mais difícil deslocar-me durante todo o curso, deu-me anos de vida. Às minhas primas Catarina, Mariana, Joana e Matilde, por serem primas quase irmãs, por terem acompanhado a minha vida desde sempre, por serem as minhas primeiras melhores amigas.

Aos meus avós, Avô António, Avó Teresa, Avô Guilherme e Avó Ana. Tenho a maior sorte do mundo em ser vossa neta. Por todo o carinho e cuidado, por me terem apoiado durante toda a minha vida, por todas as histórias, ensinamentos, beijinhos e abraços e muito mais.

Ao Fritz, à Trufa e à Broa, por me deixarem usá-los como cobaias ao longo do curso, mas principalmente por me mostrarem o verdadeiro significado de amor incondicional.

Aos meus irmãos, Maria, Carlota e Manel. Por celebrarem todas as minhas vitórias como se fossem deles, por serem os meus melhores amigos.

Aos meus pais, por tudo. Por terem feito de mim o que sou hoje. Por serem o meu porto de abrigo. Porque sem eles, nada disto seria possível. Obrigada.

A Coimbra. A cidade que me acolheu durante este percurso, que me recebeu a chorar de tristeza e que me vê partir com lágrimas de amor e saudade. Esta cidade que me acompanhou a cada segundo, em todas as vitórias e derrotas, esta cidade que só quem a vive é que a compreende.

Índice	
Dedicatória.....	iii
Agradecimentos	iv
Índice	vi
Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	viii
Lista abreviaturas e acrónimos	ix
Página de título	1
Resumo.....	2
<i>Abstract</i>	3
1. Introdução	4
2. O Microbioma	5
1.1 Constituição do microbioma canino e felino	6
1.2 Métodos de estudo da componente bacteriana do microbioma gastrointestinal.....	8
1.3 O Microbioma na doença Gastrointestinal	11
2. Doença inflamatória intestinal	12
2.1 Alterações da composição do microbioma gastrointestinal em IBD.....	16
3. Linfoma Alimentar	18
3.1 Alterações do microbioma em linfoma alimentar.....	20
4. Considerações finais	21
Referências Bibliográficas	23

Índice de figuras

Figura 1.....21

Figura 2.....21

Índice de tabelas

Tabela 1.....	25
Tabela 2.....	26
Tabela 3.....	28
Tabela 4.....	29

Lista abreviaturas e acrónimos

FelV – do Inglês *feline leukemia virus*

FISH – do Inglês *fluorescence in situ hybridization*

FIV – do Inglês *feline immunodeficiency virus*

HGAL – do Inglês *high grade intermediate lymphoma*

IBD – do Inglês *inflammatory bowel disease*

LA - linfoma alimentar

LGAL – do Inglês *low grade intermediate grade alimentary lymphoma*

PAAF - punção aspirava por agulha fina

PCR – do Inglês *polymerase chain reaction*

TREG - Celulas T reguladoras

UFC - unidades formadoras de colónias

Relação entre o microbioma bacteriano gastrointestinal com a doença inflamatória intestinal e o linfoma em cães e gatos

Inês Medeiros^a, Hugo Vilhena^{a,b,c}, Sofia Duarte^{a,d}.

^a Centro de Investigação Vasco da Gama/ Departamento de Medicina Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco EB, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal

^b Hospital Veterinário do Baixo Vouga, Estrada Nacional 1, 355, Segadães, 3750-742 Águeda

^c Centro de Investigação em Ciência Animal e Veterinária (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, Apartado 1013, 5001-801, Vila Real, Portugal

^d LAQV, REQUIMTE, Group of Bromatology, Pharmacognosy and Analytical Sciences, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

Resumo

O microbioma gastrointestinal caracteriza-se como o conjunto de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal, sendo considerado um componente integral do sistema digestivo. Apesar da sua constituição ser composta por bactérias, fungos, protozoários e vírus, a presente dissertação aborda apenas a componente bacteriana, pela representatividade e pelos benefícios que oferecem ao hospedeiro. Nos cães e gatos saudáveis, os filos predominantes são *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. O microbioma canino e felino tem uma constituição semelhante, apesar da possibilidade de variação interindividual devido a numerosos fatores tanto endógenos como exógenos. A saúde dos animais de companhia está interligada com a sua composição microbiana, a qual se encontra alterada em diferentes doenças gastrointestinais, tais como em linfoma e doença inflamatória intestinal (IBD). Nestas enteropatias ocorre uma alteração da composição microbiana, sendo que o seu estudo é essencial para que no futuro seja possível utilizar esta informação na modulação do tratamento, adaptado às alterações características de cada doença ou indivíduo tal como na determinação do prognóstico.

Na presente dissertação, pretende-se efetuar uma revisão, de forma sumária, sobre o microbioma bacteriano em cães e gatos, relativamente ao conhecimento atual sobre composição e funções, bem como as principais técnicas de avaliação. A influência e alterações do microbioma na doença gastrointestinal, em particular na doença inflamatória intestinal e no linfoma alimentar serão adicionalmente abordados.

Palavras-chave: bactérias, IBD, linfoma, microbioma gastrointestinal

Abstract

The gastrointestinal microbiome is characterized as the group of microorganisms that inhabit the gastrointestinal system, being considered an essential component of the gastrointestinal system. Despite being composed of bacteria, fungus, protozoa and viruses, the present dissertation focuses on the bacterial component. In healthy animals, the predominant phyla are Fusobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. The canine and feline microbiome have a similar constitution, although it can differ between individuals due to a number of endogenous and exogenous factors. Companion animal health is interconnected with the microbiome composition. In fact, the composition is altered in different gastrointestinal diseases such as lymphoma and inflammatory bowel disease (IBD). In these enteropathies occurs a change in the microbiome composition. The study of these alterations is essential so that this information can be used in the future for modulation of treatment, adapted to characteristic changes of each disease, and in determining the prognosis. In the present dissertation, a summarized review is made on the bacterial component of the microbiome in cats and dogs, relatively to the knowledge there is today about its composition and functions as well as the methods used to evaluate these parameters. The influence and alterations of the microbiome in gastrointestinal disease, in particular in inflammatory bowel disease and in alimentary lymphoma will be additionally approached.

Key-words: *bacteria, gastrointestinal microbiome, IBD, lymphoma*

1. Introdução

Os animais domésticos coabitam com os humanos há milhares de anos, tendo sido essenciais em várias funções tanto de companhia como de trabalho. Hoje em dia, coabitam com os humanos em regiões urbanas e rurais, sendo mesmo considerados parte da família por muitos tutores (Grzeškowiak *et al.*, 2015). Esta alteração de ambiente foi uma evolução gradual para os humanos, mas uma alteração brusca no habitat e modo de vida destes animais que passaram a coabitar com os humanos com benefício mútuo num registo que difere daquele ao qual se encontravam habituados. Devido a esta proximidade, durante as últimas décadas o interesse na saúde e bem-estar dos animais de companhia tem vindo a aumentar, tal como a investigação científica relativa à saúde e prevenção de doenças destes animais. Neste contexto encontra-se incluída a saúde gastrointestinal, que engloba uma grande parte das doenças que possivelmente poderão afetar animais de companhia. Uma das áreas de investigação referente à saúde animal engloba o estudo da composição microbiana do sistema gastrointestinal, com o propósito da manutenção e promoção da saúde do hospedeiro (Alessandri *et al.*, 2020; Mondo *et al.*, 2019).

Os cães e gatos têm vindo a alterar a sua dieta ao longo do tempo, sendo que historicamente ingeriam uma maior quantidade de proteína, em oposição às dietas ricas em hidratos de carbono que são mais comuns hoje em dia. A saúde e bem-estar destes animais, tal como a dos seus tutores, depende do microbioma gastrointestinal, sendo que a composição e atividade do mesmo tem vindo a ser associada a várias doenças tanto em animais como nos seus tutores (Grzeškowiak *et al.*, 2015).

A relação entre a comunidade microbiana e o hospedeiro tem uma grande importância na saúde dos animais. Desta forma, pela ligação indissociável com a saúde animal, o microbioma gastrointestinal nos animais de companhia tem vindo a alcançar importância crescente tanto na clínica de animais de companhia como na área da investigação. O alimento tem um papel fundamental na manutenção, composição e modulação do microbioma gastrointestinal de cães e gatos, funcionando como substrato do mesmo (Wernimont *et al.*, 2020). A importância de uma população microbiana equilibrada deve-se ao facto de proporcionar inúmeros benefícios nutricionais e gastrointestinais, proteger o intestino de agentes patogénicos e promover uma estrutura intestinal saudável tal como uma função intestinal otimizada (Lyu *et al.*, 2020). Existem estudos que sugerem que o microbioma, para além do seu papel no sistema gastrointestinal, também influencia o desenvolvimento e regula o sistema nervoso, renal, digestivo, dérmico, endócrino, imunitário e respiratório (Tizard & Jones, 2018; Wernimont *et al.*, 2020). Desta forma, os tutores têm um papel essencial nesta modulação, nomeadamente através da seleção do alimento dos seus animais (Wernimont *et al.*, 2020).

2. O Microbioma

O microbioma intestinal refere-se ao conjunto de microrganismos que habitam o sistema gastrointestinal. Este é composto por bactérias, protozoários, fungos e vírus, sendo considerado um componente integral do sistema digestivo (Honneffer *et al.*, 2014; Lyu *et al.*, 2020; Suchodolski, 2011b; Wernimont *et al.*, 2020). A definição inclui também o seu material genético. Tradicionalmente este era considerado como “um agregado de material genético da totalidade dos microrganismos que habitam um habitat definido” (Wernimont *et al.*, 2020), mas hoje em dia devido aos seus possíveis efeitos na saúde humana e animal, o microbioma gastrointestinal é reconhecido como um órgão com funções metabólicas únicas (Possemiers *et al.*, 2011). De acordo com estudos recentes, o trato gastrointestinal dos mamíferos tem aproximadamente 10^{10} a 10^4 microrganismos, sendo este valor aproximadamente 10 vezes maior que o número das células do hospedeiro (Lyu *et al.*, 2020; Suchodolski, 2011a). Na presente dissertação será abordada a componente bacteriana do microbioma, uma vez que representa o maior número da população gastrointestinal dos mamíferos (Suchodolski, 2011b, 2016). A sua representatividade deve-se maioritariamente aos benefícios que oferecem ao hospedeiro, sendo estas atividades metabólicas a fermentação de hidratos de carbono complexos em ácidos gordos de cadeia curta, a síntese de vitaminas como por exemplo a vitamina A, K2 e a B12, a conversão de ácidos biliares, entre outros (Suchodolski, 2016)

Hoje em dia é reconhecido que o microbioma tem um desenvolvimento *in utero* (Stinson *et al.*, 2019), e terá uma influência ao longo da vida do hospedeiro, incluindo na sua fisiologia, anatomia, reprodução e atividade física (Wernimont *et al.*, 2020). Em humanos e ratos, está comprovado que o seu desenvolvimento antecede o nascimento. Não existem estudos que comprovem que a colonização microbiana gastrointestinal ocorre previamente ao nascimento em cães e gatos, contudo considerando as semelhanças fisiológicas e o facto de serem mamíferos e sugerida essa possibilidade (Grześkowiak *et al.*, 2015). O microbioma habita em simbiose com o seu hospedeiro. Desta forma, o hospedeiro promove um ambiente propício à sobrevivência do microbioma, proporcionando um ambiente com temperatura e níveis de oxigénio adequados aos microrganismos, bem como defesa contra agentes patogénicos. Por sua vez o microbioma cumpre o seu papel, sendo que a sua ação influencia vários componentes da função do sistema gastrointestinal – tamanho das vilosidades, *turnover* de enterócitos e motilidade. A presença de um microbioma estável e saudável é essencial para o desenvolvimento e para o constante equilíbrio do sistema imunitário, incluindo da mucosa gastrointestinal (Ettinger *et al.*, 2017). Tem também uma ação importante na prevenção da colonização de agentes patogénicos, pois liberta nutrientes e metabolitos que vão influenciar as células imunitárias (Tizard & Jones, 2018). Esta ação é essencial para o correto desenvolvimento fisiológico do intestino, sendo moldada pela ação do microbioma (Mondo *et al.*, 2019; Tizard & Jones, 2018). Nos casos de doença gastrointestinal a composição do microbioma encontra-se alterada, e a sua diversidade reduzida. A alteração da composição resulta numa alteração das espécies que constituem a flora de um animal saudável, o que poderá resultar num aumento de espécies com propriedades nocivas (Ettinger *et al.*, 2017)

A composição microbiana intestinal não é uniforme: vai-se alterando ao longo do trato gastrointestinal, estando identificadas comunidades qualitativamente e quantitativamente distintas em cada região anatômica (Wernimont *et al.*, 2020). A biodiversidade e o número de bactérias vai aumentando gradualmente ao longo do trato gastrointestinal e a composição deste sistema complexo pode ser influenciada por fatores exógenos (Honneffer *et al.*, 2017; Ritchie *et al.*, 2008; Suchodolski *et al.*, 2008). A dieta, a presença ou ausência de muco, alterações metabólicas, enteropatias agudas ou crônicas e o sistema imunitário do hospedeiro são os principais fatores que vão influenciar e moldar a localização e a composição da população microbiana gastrointestinal (Alessandri *et al.*, 2020; Donaldson *et al.*, 2015). Em cães e em humanos existe evidência que a administração de antibióticos poderá resultar na alteração da composição de alguns grupos de bactérias, resultando em alterações significativas da composição microbiana. Estas alterações podem estender-se durante várias semanas (Lyu *et al.*, 2020). A bibliografia consultada (Inness *et al.*, 2007; Janeczko *et al.*, 2008) refere que foi possível comprovar alterações relevantes na composição da microbiota intestinal em casos de enteropatias crônicas em humanos e animais.

1.1 Constituição do microbioma canino e felino

Os animais de companhia não dependem do seu microbioma para obtenção de energia. Estes animais sofreram uma evolução carnívora e o seu trato gastrointestinal é muito simples quando comparado com o trato gastrointestinal do ser Humano ou de animais de espécies pecuárias (Deng & Swanson, 2015). Apesar de apresentarem muitas semelhanças anatômicas com os gatos, os cães são animais omnívoros que ingerem hidratos de carbono como fonte energética, sendo possível digerirem, absorverem e metabolizarem estes compostos (Deng & Swanson, 2015). Os gatos domésticos têm maior exigência de proteína, alimentando-se de tecidos animais para satisfazerem as suas necessidades nutricionais. Estes animais estão metabolicamente adaptados, pois têm uma utilização menor de glicose e um metabolismo proteico mais elevado, que fornece energia (Deng & Swanson, 2015; Wernimont *et al.*, 2020).

Apesar das diferenças descritas anteriormente, a composição do microbioma gastrointestinal em cães e gatos saudáveis é, na sua base, muito semelhante (Hoffmann *et al.*, 2016). Isto não significa que não existam diferenças entre ambos, nomeadamente entre raças, idade, género, constituição genética, doenças e respetivo tratamento e áreas geográficas. Estes fatores resultam numa diversidade individual entre espécies, mas também entre indivíduos da mesma espécie, tendo cada animal uma composição individual (Deusch *et al.*, 2015; Wernimont *et al.*, 2020). Nas Figuras 1 e 2 observam-se os microrganismos bacterianos dominantes no trato gastrointestinal de cães e gatos (Grzeškowiak *et al.*, 2015).

Apesar de ser conhecido que existem variações ao longo do trato gastrointestinal, quer seja de acordo com a sua taxonomia ou número, a maioria dos estudos publicados foram realizados utilizando amostras fecais, que não traduzem as diferenças nas distintas regiões. As amostras fecais apresentam como vantagem a maior facilidade na recolha de amostra e menores questões éticas associadas

comparativamente à colheita de amostras provenientes de múltiplas porções do trato gastrointestinal (Alessandri *et al.*, 2020).

A biodiversidade e a quantidade microbiana gastrointestinal em animais saudáveis vai aumentando gradualmente ao longo do trato gastrointestinal (Honneffer *et al.*, 2017; Ritchie *et al.*, 2008; Suchodolski *et al.*, 2008). A composição varia entre 10^2 a 10^{10} unidades formadoras de colônias (ufc)/g de conteúdo luminal, sendo que no estômago e intestino delgado o número é significativamente mais baixo que no trato gastrointestinal distal (Ritchie *et al.*, 2008). No intestino delgado estão presentes bactérias aeróbias e também anaeróbias (Alessandri *et al.*, 2020). No cólon e no ceco, os locais com maior fermentação do trato gastrointestinal, verifica-se a proliferação de bactérias anaeróbias, pela ausência de oxigênio (Honneffer *et al.*, 2017; Suchodolski, 2016; Suchodolski *et al.*, 2008).

Apesar das diferenças no microbioma entre os animais de companhia, (Handl *et al.*, 2011; Jha *et al.*, 2020), são de forma comum predominantes os filos *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (Alessandri *et al.*, 2020; Handl *et al.*, 2011; Minamoto *et al.*, 2012; Ritchie *et al.*, 2008; Wernimont *et al.*, 2020). No filo *Firmicutes* as bactérias com maior representatividade pertencem à classe *Bacilli*, *Clostridia* e *Erysipelotrichi*. Estes números são comuns a cães e gatos, não existindo diferenças entre o seu trato gastrointestinal. Apesar das classes não apresentarem uma variação marcada entre espécies, dentro destas ocorre uma especificação sendo que a classe *Bacilli* está representada predominantemente pelo gênero *Streptococcus* e *Lactobacillus* em cães e *Enterococcus* e *Lactobacillus* em gatos (Handl *et al.*, 2011). A classe *Clostridia* encontra-se representada por clusters de *Clostridium IV* (família *Ruminococcaceae* e *Faecalibacterium prausnitzii*), *XI* (família *Peptostreptococcaceae*) e *XIVa* (família *Lachnospiraceae* e *Blautia*), enquanto a classe *Erysipelotrichi* se encontra representada pelos gêneros *Turicibacter*, *Catenibacterium* e *Coprobacillus* (Handl *et al.*, 2011; Pilla & Suchodolski, 2020; Ritchie *et al.*, 2008). Os filos bacterianos mais comuns do microbioma de gatos saudáveis inclui *Enterobacteriaceae*, *Bacterioides* spp, *Helicobacter* spp, *Fusobacterium* spp, *Firmicutes*, incluindo clusters IV e XIVa de *Clostridium* spp, e *Faecalibacterium* spp. (Honneffer *et al.*, 2014; Ritchie *et al.*, 2008; Tizard & Jones, 2018).

Nas amostras fecais existe a predominância de *Firmicutes* em ambas as espécies (Alessandri *et al.*, 2020), mais especificamente os clusters XIVa e IV de *Clostridium*, mas também *Bacterioides* e *Prevotella* (Handl *et al.*, 2011; Honneffer *et al.*, 2014; Ritchie *et al.*, 2008). Nos casos em que foi possível recolher amostras gástricas verificou-se uma maior prevalência de *Helicobacter* representando mais de 90% das leituras de sequenciação (Honneffer *et al.*, 2014). No duodeno identificaram-se *Enterobacteriaceae*, *Clostridiales*, *Bacteriales* e *Lactobacilales* (Honneffer *et al.*, 2014).

O gênero *Fusobacterium*, pertencente ao filo *Fusobacteria*, encontra-se presente em número significativo no trato gastrointestinal de animais de companhia, sendo considerado um dos principais constituintes do microbioma gastrointestinal. Apesar de presente em ambas as espécies, este gênero tem uma menor abundância relativa em gatos (Alessandri *et al.*, 2020; Suchodolski *et al.*, 2008). Apresenta-se no trato gastrointestinal de animais carnívoros saudáveis, não sendo associada a sua presença a doença gastrointestinal (Deng & Swanson, 2015).

Os filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria* estão representados em menor quantidade relativamente aos filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, e *Fusobacteria* que são predominantes no microbioma intestinal (Tun *et al.*, 2012). Destes, *Actinobacteria* tem uma maior abundância em felinos enquanto que *Proteobacteria* apresenta uma abundância mais marcada no trato gastrointestinal de caninos (Alessandri *et al.*, 2020; Handl *et al.*, 2011).

Apesar dos constituintes do microbioma canino e felino serem semelhantes e a sua constituição incluir os mesmos microrganismos, como já foi referido anteriormente, este pode variar de acordo com vários fatores tanto exógenos como endógenos, sendo um destes fatores doenças gastrointestinais (Deng & Swanson, 2015).

A saúde dos animais de companhia está intimamente ligada à sua interação com o microbioma gastrointestinal. Tal como acontece em humanos, um desequilíbrio no microbioma gastrointestinal destes animais pode resultar na proliferação de agentes patogénicos entéricos ou na alteração dos mecanismos fisiológicos e metabólicos essenciais para o hospedeiro que dependem destes microrganismos, podendo resultar em doença gastrointestinal (Deng & Swanson, 2015).

1.2 Métodos de estudo da componente bacteriana do microbioma gastrointestinal

Nos estudos pioneiros que pretendiam identificar os constituintes do microbioma, foram utilizados métodos tradicionais, baseados em culturas microbianas, cuja contagem apresentava valores baixos, entre 10^2 a 10^5 ufc/g (Honneffer *et al.*, 2014). Estes métodos baseavam-se na cultura e posterior isolamento e identificação dos microrganismos presentes nas amostras de acordo com as suas taxas de crescimento. A identificação através de culturas era utilizada maioritariamente para determinar se existia ou não uma infeção ativa ou para efetuar antibiogramas, permitindo a identificação de agentes patogénicos entéricos tais como *Salmonella* spp. ou *Campylobacter* spp. (Johnston *et al.*, 2000; Pepin-Puget *et al.*, 2020). O método de cultura, apesar das vantagens, apresenta várias desvantagens, tal como a necessidade de processamento imediatamente após recolha, dado que os resultados são afetados pelas condições laboratoriais utilizadas. A complexidade do ambiente gastrointestinal resulta numa dificuldade na sua replicação em laboratório e, desta forma a avaliação da biodiversidade intestinal é difícil de efetuar por métodos de cultura, só permitindo a avaliação de constituintes específicos que beneficiem das condições laboratoriais (Hoffmann *et al.*, 2016; Suchodolski, 2016).

Atualmente as limitações dos métodos de cultura foram ultrapassadas por métodos de identificação mais recentes tais como tecnologias de sequenciação molecular. Estas permitem um maior conhecimento e uma avaliação mais precisa do microbioma gastrointestinal, com metodologias independentes de culturas microbiológicas, que incluem a avaliação metagenómica e metatranscriptómica (Alessandri *et al.*, 2020).

A avaliação metagenómica permite efetuar o estudo da composição e funções da comunidade microbiana intestinal. Permite a identificação de bactérias que não têm classificação taxonómica e para as quais ainda não foi possível a cultura *in vitro*. Para além das bactérias, também é possível a deteção e identificação de outros microrganismos que habitam o trato gastrointestinal e que também compõem

o microbioma intestinal, também é possível (Blake & Suchodolski, 2016; Hamady & Knight, 2009). Estes microrganismos incluem protozoários, fungos, archaea e vírus (Suchodolski, 2011). As funções, interações e influências destes microrganismos no estado de saúde dos hospedeiros ainda são desconhecidas, sendo necessários mais estudos para avaliar a prevalência e abundância dos mesmos no trato gastrointestinal (Blake & Suchodolski, 2016).

O primeiro método molecular a ser utilizado foi o método de sequenciação do gene 16s rRNA. Este aplica *primers* universais para amplificação pela técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês *polymerase chain reaction*) e sequenciação subsequente de uma ou múltiplas regiões hipervariáveis (Dams *et al.*, 1988; Hamady & Knight, 2009). Este método apresenta algumas limitações, não existindo consenso entre a comunidade científica sobre os *primers* mais adequados para a amplificação ou qual região hipervariável do gene 16S rRNA para maior especificidade taxonômica. Para além disto, este método normalmente permite apenas a identificação bacteriana taxonômica até ao género, e apresenta falhas na identificação na identificação de grupos taxonômicos bacterianos sub-representados. Isto leva a que os resultados sejam parciais de acordo com o estudo efetuado e *primers* escolhidos (Alessandri *et al.*, 2020).

Atualmente existe outro método para determinar o perfil microbiano, pela sequenciação do espaçador interno transcrito, que permite uma maior precisão taxonômica, pois utiliza um marcador filogenético mais específico permitindo uma identificação mais precisa em termos de espécie e até subespécie. A única desvantagem é que este método apenas se encontra disponível para géneros microbianos específicos tais como *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* (Milani *et al.*, 2014, 2018). Também existe a opção de utilizar a técnica de sequenciação metagenômica *shotgun* que, para além de identificar a composição de acordo com a taxonomia, confere também informação acerca do conteúdo e funções dos microrganismos. Apesar de ter maior precisão, esta técnica tem também um custo muito superior às técnicas apresentados anteriormente, pelo que a maior parte dos estudos publicados apresenta resultados utilizando as técnicas descritas anteriormente (Alessandri *et al.*, 2020).

O método de hibridização *in situ* fluorescente (FISH do inglês *fluorescence in situ hybridization*) permite estudar a população bacteriana *in situ*, ou seja, as bactérias que se encontram nos tecidos, permitindo preservar o biofilme. Desta forma, é possível avaliar a quantidade e diversidade bacteriana nos tecidos analisados (Amann *et al.*, 2001; Giaretta *et al.*, 2020). Esta técnica permite superar técnicas tais como o PCR, que permitem a deteção de bactérias, mas oferecem informação limitada acerca da sua distribuição e número (Amann *et al.*, 2001). A técnica de FISH permite identificar as bactérias através de sondas de moléculas de rRNA, que através de fluorescência permitem a sua análise (Amann *et al.*, 2001; Garraway *et al.*, 2018; Giaretta *et al.*, 2020).

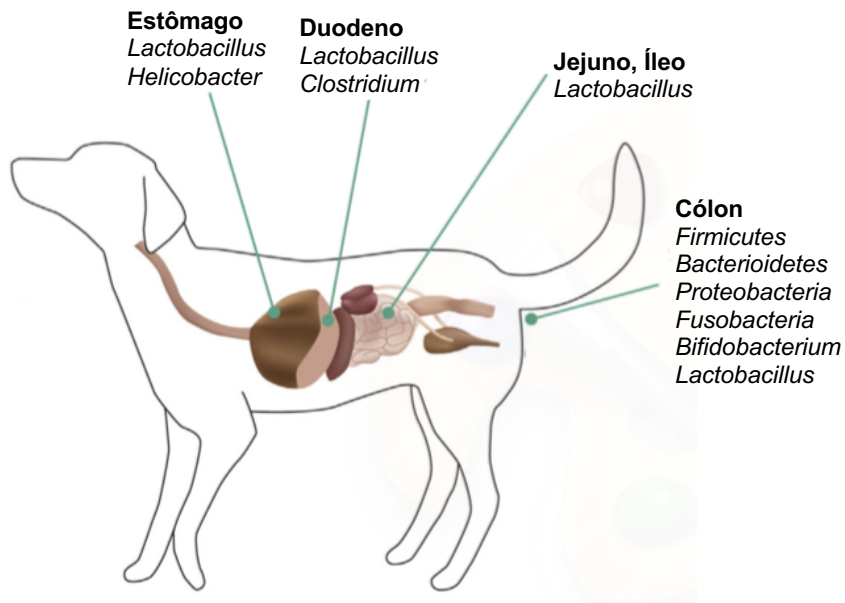


Figura 1 – Microrganismos bacterianos dominantes nos diferentes segmentos do trato gastrointestinal de caninos (Adaptado de Grześkowiak *et al.*, 2015).

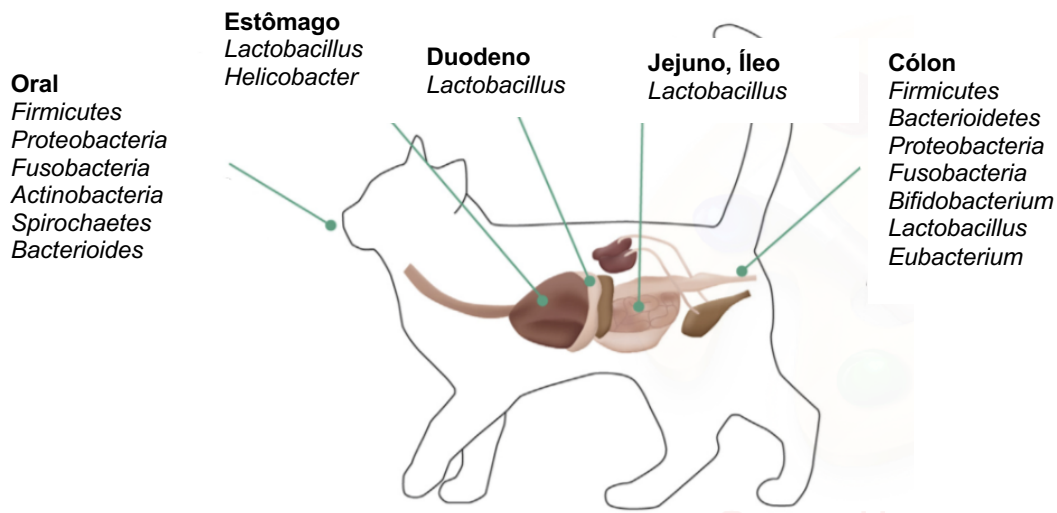


Figura 2 – Microrganismos bacterianos dominantes nos diferentes segmentos do trato gastrointestinal de felinos (Adaptado de Grześkowiak *et al.*, 2015).

1.3 O Microbioma na doença Gastrointestinal

Nas doenças gastrointestinais ocorrem alterações da barreira epitelial intestinal, com variação na permeabilidade da membrana que eventualmente originam uma perturbação da homeostasia intestinal (Honneffer *et al.*, 2014). Da mesma forma, mudanças abruptas na composição e/ou na quantidade de microrganismos presentes no microbioma, tal como em alterações na atividade funcional do microbioma podem resultar numa desregulação da resposta imunitária. Esta alteração traduz-se na ativação de um processo inflamatório, com consequente aumento de suscetibilidade a infeções oportunistas. Uma ou várias destas perturbações da homeostasia gastrointestinal estão normalmente associadas ao desencadeamento de doenças tais como enteropatias crónicas, diarreia aguda hemorrágica ou não-hemorrágica ou mesmo neoplasias em cães e gatos (Alessandri *et al.*, 2020; Kieler *et al.*, 2016; Minamoto *et al.*, 2012; Suchodolski & Markel, *et al.*, 2012). As alterações na permeabilidade da membrana vão resultar em maior biodisponibilidade de oxigénio no lúmen intestinal resultante da inflamação da mucosa. A permeabilidade também interfere na composição do microbioma, sendo que a inflamação leva a uma alteração pelo favorecimento de microrganismos anaeróbios facultativos tais como da família *Enterobacteriaceae* (Alessandri *et al.*, 2020; Janeczko *et al.*, 2008). A alteração do metabolismo dos ácidos biliares encontra-se muitas vezes associada à inflamação intestinal porque a bilis é essencial para a digestão e absorção de lípidos, e tem um papel anti-inflamatório significativo. Os ácidos biliares primários são transformados em ácidos biliares secundários pela comunidade microbiana presente no lúmen intestinal através de reações de desconjugação e desidroxilação. Os metabolitos produzidos acumulam-se no lúmen com posterior ação anti-inflamatória (Suchodolski, 2016).

Os ácidos biliares de cadeia curta têm também função anti-inflamatória. Aquando da disbiose intestinal, estes encontram-se em concentrações baixas devido a um decréscimo significativo de certos géneros ou espécies bacterianas que fermentam hidratos de carbono complexos. Os ácidos biliares de cadeia curta estimulam a diferenciação de linfócitos T CD4+ (do inglês T *helper* -Th) que são precursores de células T reguladoras (T_{reg}) (Alessandri *et al.*, 2020; Suchodolski, 2016).

Os estudos que investigam as alterações do microbioma em doença gastrointestinal são numerosos. Contudo, ainda não foi possível chegar a uma conclusão se as alterações taxonómicas microbianas que ocorrem no intestino são a causa ou o efeito de doenças inflamatórias intestinais. Nos animais de companhia, o diagnóstico de doença inflamatória intestinal é efetuado geralmente apenas após descartar outras doenças, nomeadamente após um ensaio empírico de antibioterapia. A ausência de resposta ao tratamento poderá permitir o diagnóstico, contudo a alteração resultante no microbioma dificultará a interpretação da composição do mesmo (Pilla & Suchodolski, 2020). A investigação neste campo vai ser essencial para identificar possíveis biomarcadores que permitam diagnosticar doença inflamatória intestinal (IBD do inglês *inflammatory bowel disease*) numa fase mais inicial da doença e também para modular possíveis intervenções terapêuticas, sendo importante continuar a investigação para identificar as alterações microbianas e metabólicas (Blake & Suchodolski, 2016).

A etiologia de enteropatias crônicas, tais como IBD e neoplasias alimentares, permanece desconhecida. Os estudos nesta área sugerem que a disbiose gastrointestinal poderá ter influência na mesma, sendo que estudos utilizando regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA demonstraram que as enteropatias crônicas caninas estão associadas a alterações na composição microbiana gastrointestinal, nomeadamente na diversidade e aumento seletivo de espécies bacterianas (Allenspach *et al.*, 2010; Cassmann *et al.*, 2016; Suchodolski *et al.*, 2010; Suchodolski, Dowd, *et al.*, 2012; Xenoulis *et al.*, 2008).

Recentemente o estudo da constituição do microbioma gastrointestinal e a sua incidência e influência nas doenças crônicas gastrointestinais tem vindo a aumentar (Wernimont *et al.*, 2020). A IBD tem recebido maior atenção, sendo que os estudos são realizados sobretudo em cães. Em comparação com cães saudáveis, os cães com enteropatias crônicas apresentam menores concentrações de ácidos gordos de cadeia curta, tal como alterações na composição o microbioma fecal (Minamoto *et al.*, 2019). Os gatos com IBD também apresentam alterações na composição microbiana intestinal quando comparados com gatos saudáveis. Em gatos com linfoma gastrointestinal, o género *Fusobacterium* spp. encontra-se aumentado em comparação com gatos com IBD (Garraway *et al.*, 2018).

2. Doença inflamatória intestinal

A IBD é um termo que se refere a doenças gastrointestinais que são caracterizadas por sinais clínicos gastrointestinais persistentes ou recorrentes que se encontram associados a um infiltrado inflamatório intestinal, ou seja, com evidências histológicas de inflamação intestinal (Ettinger *et al.*, 2017).

A etiologia de IBD em cães e gatos permanece desconhecida. Em medicina humana a etiologia também não é totalmente conhecida, sendo considerado que estão envolvidos fatores ambientais, para além da composição do microbioma intestinal e respostas imunes desreguladas em hospedeiros geneticamente suscetíveis a doença gastrointestinal, no caso de doença de Crohn e colite ulcerativa (Jergens, 2012). O estudo de IBD em animais de companhia também sugere que os fatores genéticos e o tipo de bactérias entéricas têm interferência no desenvolvimento de doença, podendo mesmo o hospedeiro ter respostas imunes anormais à flora comensal resultando em inflamação (Ettinger *et al.*, 2017; Jergens, 2012). A bibliografia que sustenta a consideração da importância genética refere a predisposição que algumas raças caninas apresentam no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais específicas. A título de exemplo, as enteropatias imunoproliferativas na raça Basenjis, as enteropatias com perda de proteína na raça *Soft coated Wheaton Terrier*, e a colite granulomatosa na raça Boxer (Jergens, 2012; Handl *et al.*, 2013; Magro *et al.*, 2013). Os Pastores Alemães demonstram suscetibilidade a enteropatias crônicas caracterizadas por inflamação linfocítica-plasmocítica com resposta ao tratamento com antibióticos, dieta ou imunossuppressores (Allenspach *et al.*, 2010). A disbiose intestinal também está correlacionada com inflamação gastrointestinal, pois quando ocorre uma mudança na composição do microbioma há um desequilíbrio que poderá eventualmente resultar

na inflamação intestinal e posterior evolução para IBD (Cassmann *et al.*, 2016; Honneffer *et al.*, 2014; Lyu *et al.*, 2020).

As manifestações clínicas de IBD são variadas, sendo que os sinais clínicos apresentados se encontram relacionados com os órgãos afetados, sendo muitas vezes intermitentes devido às diferentes fases da doença, que poderá estar ativa ou inativa. A IBD canina e felina tem maior incidência em animais de meia idade (Jergens, 2012; Cerquetella *et al.*, 2010). Os sinais clínicos mais frequentes são a diarreia e o vômito, sendo comum estarem associados a anorexia relacionada com inflamação grave ou polifagia com perda de peso significativa. A gravidade pode variar entre indivíduos dependendo da extensão e das porções anatómicas afetadas (Jergens, 2012; Jergens *et al.*, 2003). Nos gatos o sinal clínico mais comumente associado a IBD é o vômito. Estes animais têm predisposição para o desenvolvimento de triadite, podendo a inflamação intestinal estar também associada a inflamação pancreática e hepática (Jergens, 2012).

Clinicamente o diagnóstico de IBD é geralmente feito por exclusão, sendo que é necessário associar um bom exame clínico a exames complementares de diagnóstico poderá fim de excluir doenças que mimetizem a IBD (Jergens, 2012; Cerquetella *et al.*, 2010). A avaliação histopatológica das amostras recolhidas do sistema gastrointestinal continua a ser o exame de diagnóstico considerado *golden standard* para a IBD (Couëttil *et al.*, 2007). A inflamação intestinal é comprovada através de biópsia, que pode ser realizada através de endoscopia, colonoscopia ou laparotomia exploratória, dependendo das circunstâncias de cada animal (Cerquetella *et al.*, 2010). A endoscopia vai permitir uma visualização da mucosa sendo os achados mais comuns em IBD canina e felina a friabilidade da mucosa, a presença de tecido de granulação e erosões na mucosa (Jergens, 2012; Allenspach *et al.*, 2007; Suchodolski *et al.*, 2010; Zentek *et al.*, 2007). As amostras obtidas por endoscopia podem não ser suficientes, pois não é possível recolherem-se amostras de porções do íleo, que conferem maior valor de diagnóstico (Garraway *et al.*, 2018). Na endoscopia as alterações visualizadas em gatos não são compatíveis com o estado clínico do animal nem com os resultados histopatológicos das lesões (Jergens *et al.*, 2010) As amostras recolhidas podem não ser compatíveis com um diagnóstico, pelo que é recomendado que sejam recolhidas amostras na porção do íleo. Estas recolhas são importantes, visto que o linfoma intestinal é um diagnóstico diferencial de IBD em gatos (Evans *et al.*, 2006). É importante salientar que o trato gastrointestinal tem uma extensão significativa, sendo que biópsias inconclusivas não excluem a possibilidade de existir doença inflamatória intestinal noutras localizações (Cerquetella *et al.*, 2010).

A histopatologia tem limitações tais como a interpretação entre patologistas nem sempre ser concordante, a qualidade das amostras pode variar de acordo com a técnica utilizada ou de acordo com o profissional que a executar, a amostra pode não apresentar alterações devido à sua localização, a distinção entre amostras sem alteração com enterite linfoplasmocitária leve são difíceis e a distinção entre amostras com enterite linfoplasmocitária grave e linfoma também é complicada (Jergens, 2012; Willard *et al.*, 2002). A padronização da avaliação histopatológica entre patologistas não é fácil, pelo que foram criados critérios de avaliação histológica, em formato de orientações (descritos na Tabela 1 e 2). Apesar da falta de consenso entre especialistas, é recomendada a utilização destes critérios

aquando da interpretação das amostras, de forma a tentar reduzir variações (Couëtil *et al.*, 2007; Day *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Orientações Histopatológicas para o Diagnóstico de IBD em cães e gatos – Avaliação da mucosa duodenal (Adaptado de ACIVM Consensus Statement - Endoscopic, Biopsy, and Histopathologic Guidelines for the Evaluation of Gastrointestinal Inflammation in Companion Animals) (Day *et al.*, 2008)

Características Morfológicas	Avaliação de alterações
Atrofia das vilosidades	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Lesão Epitelial	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Distensão das criptas	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Linfangiectasia	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Fibrose da mucosa	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Inflamação	Avaliação de alterações
Linfócitos Intraepiteliais	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Linfócitos na lâmina própria	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Neutrófilos na lâmina própria	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Eosinófilos na lâmina própria	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado

Tabela 2 - Orientações Histopatológicas para o Diagnóstico de IBD em cães e gatos - Avaliação da mucosa do cólon (Adaptado de ACIVM Consensus Statement - Endoscopic, Biopsy, and Histopathologic Guidelines for the Evaluation of Gastrointestinal Inflammation in Companion Animals) (Day et al., 2008)

Características Morfológicas	Avaliação de alterações
Lesão epitelial de superfície	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Hiperplasia das criptas	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Dilatação/Distorção das criptas	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Fibrose/Atrofia da mucosa	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Inflamação	Avaliação de alterações
Linfócitos na lâmina própria	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Macrófagos na lâmina própria	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Neutrófilos na lâmina própria	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado
Eosinófilos na lâmina própria	Normal
	Ligeiramente alterado
	Moderadamente alterado
	Gravemente alterado

2.1 Alterações da composição do microbioma gastrointestinal em IBD

Os cães com IBD apresentam alterações na composição do microbioma gastrointestinal, sendo que a disbiose se encontra identificada como uma alteração do microbioma no geral, aliada à diminuição de espécies que produzem ácidos gordos de cadeia curta (Omori *et al.*, 2017; Wernimont *et al.*, 2020). A abundância relativa de *Fusobacteria*, do filo *Bacteroidetes*, nomeadamente *Bacteroidaceae* e *Prevotellaceae*, do filo *Firmicutes* que inclui *Megamonas*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Turicibacter* e da família *Lachnospiraceae*, encontra-se reduzida quando comparada com controlos saudáveis (Minamoto *et al.*, 2015; Ramadan *et al.*, 2014; Suchodolski, Dowd, *et al.*, 2012; Suchodolski, Markel, *et al.*, 2012). Em animais saudáveis nos quais avaliaram as bactérias aderentes em amostras de mucosa intestinal utilizando a técnica de sequenciação do gene 16S rRNA, demonstrou-se um aumento significativo de *Fusobacteria*, *Clostridiales*, *Bacteroidaceae* e *Prevotellaceae*. Demonstrou-se também que os cães diagnosticados com IBD possuíam um aumento no número de bactérias do género *Proteobacteria*, incluindo *Acinetobacter* e *Diaphorobacter*, relativamente aos animais saudáveis (Suchodolski, Dowd, *et al.*, 2012). Foi igualmente descrito um aumento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* em cães diagnosticados com IBD, particularmente *E. coli* (Alessandri *et al.*, 2020; Minamoto *et al.*, 2015; Suchodolski, Dowd, *et al.*, 2012). Esta bactéria encontrou-se maioritariamente aderida ao epitélio celular ou mesmo no interior da mucosa intestinal (Cassmann *et al.*, 2016). De acordo com outro estudo mais recente, *E.coli* encontrou-se aumentada em cães com enteropatias crónicas, apesar de *Helicobacter* spp. e *Akkermansia* spp. estarem diminuídas (Giaretta *et al.*, 2020). Em humanos, o género *Akkermansia* spp. tem uma abundância significativa no trato gastrointestinal, contudo de acordo com um estudo recente, este não tem um número significativo em animais de companhia. Em humanos este género está associado a função de degradação do muco gastrointestinal (Garcia-Mazcorro *et al.*, 2020).

Os diferentes métodos de identificação da população microbiana gastrointestinal demonstram resultados que diferem entre si, apesar de serem utilizadas as mesmas amostras. Uma estudo de cães com IBD, através de bibliotecas genómicas de clones 16s rRNA identificou-se uma maior abundância de *Proteobacteria* e abundâncias reduzidas de *Clostridia*. A análise das mesmas amostras utilizando amplificação do gene 16s rRNA baseado em pirosequenciação 454 obteve resultados de maior abundância de *Proteobacteria* mas menor abundância de *Clostridia*, *Fusobacteria*, *Bacteroidaceae* e *Prevotellaceae* (Suchodolski *et al.*, 2010; Suchodolski, Dowd, *et al.*, 2012).

A principal bibliografia referente a alterações de microbioma em animais de companhia é baseada em amostras fecais, sendo a informação sobre a distribuição espacial da microbiota na mucosa é mais limitada. Estudos envolvendo a técnica de FISH demonstraram que existem diferenças na composição da microbiota da mucosa gastrointestinal entre cães com enteropatia crónica e cães saudáveis. Nos animais com IBD, observou-se um aumento na concentração de *Bacterioides*, *Enterobacteriaceae* em amostras da mucosa do íleo e do ceco. Nas amostras de íleo verificou-se um aumento de *Clostridia* e nas amostras de cólon um aumento de *E.coli*. (Cassmann *et al.*, 2016) O aumento de *E.coli* e outras *Enterobacteriaceae* destacou-se com relevância científica pois demonstra uma

alteração em amostras fecais e intestinais concordante com outros estudos em cães, gatos e humanos, com utilização de métodos diferentes dos métodos de identificação de microrganismos (Allenspach *et al.*, 2010; Cassmann *et al.*, 2016; Janeczko *et al.*, 2008; Suchodolski *et al.*, 2010; Suchodolski, Dowd, *et al.*, 2012; Xenoulis *et al.*, 2008). A variedade dos resultados pode depender não só da diferença entre amostras e métodos (Deng & Swanson, 2015), mas também da própria variabilidade do microbioma em si, sendo que este difere entre indivíduos e depende de vários fatores referidos anteriormente como por exemplo a idade, o ambiente e a administração de fármacos como antibióticos (Alessandri *et al.*, 2020).

A Tabela 3 sumariza as alterações do microbioma gastrointestinal em cães diagnosticados com IBD.

Tabela 3 – Alterações do microbioma gastrointestinal em cães diagnosticados com IBD. (IBD do inglês inflammatory bowel disease; FISH do inglês fluorescence in situ hybridization; PCR do inglês polymerase chain reaction)

Referência	Tipo de amostra	Amostra (n)	Método	Alteração
(Giaretta <i>et al.</i> , 2020)	Biópsia intestinal	Controlos (n=11) Enteropatia inflamatória crónica (n=22)	FISH	↑ <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>E.coli</i> ↓ <i>Helicobacter</i>
(Cassmann <i>et al.</i> , 2016)	Biópsia intestinal	Controlos (n=15) IBD (n=19) Adenocarcinoma (n=9) Linfossarcoma (n=3)	FISH	↑ <i>Bacterioides</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Clostridia</i> , <i>E.coli</i>
(Xu <i>et al.</i> , 2016)	Amostra fecal	Controlos (n=10) IBD (n=23)	Pirosequenciação 454	↓ <i>Lactobacillus</i>
(Rossi <i>et al.</i> , 2014)	Amostra fecal	IBD (n=20) Controlo (n=10) Biópsias de cães eutanasiados (n=3)	qPCR	↓ <i>Faecalibacterium</i> spp, <i>Turibacterspp</i>
(Suchodolski, Markel, <i>et al.</i> , 2012)	Amostra fecal	Controlo (n = 32) Diarreia agudão hemorrágica (n= 12) Diarreia aguda hemorrágica (n= 13) IBD idiopática, ativa e controlada (n = 10)	Pirosequenciação 454	↑ <i>Sutterella</i> , <i>Clostridiumperfringens</i> ↓ <i>Blautia</i> , Ruminococcaceae, <i>Turibacter</i>
(Suchodolski, Markel, <i>et al.</i> , 2012)	Biópsia duodenal	Controlo (n = 6) IBD idiopática, ativa e controlada (n = 14)	Pirosequenciação 454 e qPCR	↑ <i>Proteobacteria</i> ↓ <i>Fusobacteria</i> , <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Prevotellaceae</i>
(Suchodolski <i>et al.</i> , 2010)	Biópsia duodenal	Controlo (n=7) IBD (n=7)	Biblioteca genómica de clones (gene 16s rRNA)	↑ <i>Proteobacteria</i> ↓ <i>Clostridia</i>
(Xenoulis <i>et al.</i> , 2008)	Raspagem duodenal	Controlo (n=9) IBD (n=10)	Biblioteca genómica de clones	↑ <i>Enterobacteriaceae</i>

Existem poucos estudos sobre as alterações do microbioma em gatos com doença gastrointestinal (Lyu *et al.*, 2020). No entanto algumas alterações já foram descritas. Os gatos com IBD apresentam também uma redução na abundância geral de microrganismos gastrointestinais, sendo que *Bacterioides*, *Bacteroidetes*, a família *Ruminococcaceae* e o género *Turicibacter* encontram-se reduzidos quando comparados com controlos saudáveis (Inness *et al.*, 2007; Lyu *et al.*, 2020; Marsilio *et al.*, 2019). Gatos com diarreia crónica apresentaram uma abundância elevada de *Erysipelotrichia* e do género *Lactobacillus* (Suchodolski *et al.*, 2015). Um estudo em que foi avaliada a composição do microbioma gastrointestinal em gatos diagnosticados com IBD ou Linfoma intestinal, demonstrou que a abundância de *Enterobacteriaceae* e *Streptococcaceae* se encontrava elevada enquanto que a abundância de *Ruminococcaceae*, *Turicibacteraceae*, *Bifidobacterium* e *Bacteroidetes* se encontrava reduzida (Marsilio *et al.*, 2019).

A Tabela 4 sumariza as alterações do microbioma gastrointestinal em gatos diagnosticados com IBD.

Tabela 4 - Alterações do microbioma gastrointestinal em gatos diagnosticados com IBD (IBD do inglês inflammatory bowel disease; FISH do inglês fluorescence in situ hybridization)

Referência	Tipo de amostra	Amostra (n)	Método	Alteração
(Marsilio <i>et al.</i> , 2019)	Amostra fecal	Controlo (n=38) IBD (n=13) Linfoma de baixo grau (n=14)	Sequenciação Illumina	↑ <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> ↓ <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Turicibacteraceae</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroidetes</i>
(Janeczko <i>et al.</i> , 2008)	Biópsia duodenal	Controlo (n=10) IBD (n=17)	FISH	↑ <i>Enterobacteriaceae</i>
(Inness <i>et al.</i> , 2007)	Amostra fecal	Controlo (n= 34) IBD (n=11)	FISH	↑ <i>Desulfovibrio</i> ↓ Total de bactérias, <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Bacterioides</i>

3. Linfoma Alimentar

O linfoma é a neoplasia mais comum em gatos, sendo que a localização anatómica mais comum é o trato gastrointestinal (Barrs & Beatty, 2012; Gieger, 2011; Guillermo Couto, 2001; Richter, 2003). O linfoma alimentar (LA; Sin. Linfoma gastrointestinal) caracteriza-se pela infiltração de linfócitos neoplásicos e pode ocorrer afeção dos gânglios linfáticos mesentéricos (Barrs & Beatty, 2012; Gieger, 2011).

Os fatores de risco incluem infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV do inglês *feline leukaemia virus*), o vírus da imunodeficiência felina (FIV do inglês *feline immunodeficiency virus*) (Lingard *et al.*, 2009; Louwerens *et al.*, 2005) e inflamação intestinal crónica (Barrs & Beatty, 2012). O FeLV é considerado um retrovírus oncogénico, apesar de no caso do LA, apresentar a menor associação oncogénica comparativamente a outras localizações anatómicas. No LA apenas uma reduzida proporção (0-12%) dos animais são positivos ao antígeno do FeLV (Stützer *et al.*, 2011). No caso do FIV, a infecção deste vírus resulta num risco mais elevado de desenvolvimento de linfócitos neoplásicos comparativamente a gatos não infetados (Barrs & Beatty, 2012).

O LA pode ser diagnosticado em gatos com 1 até aos 20 anos de idade, sendo a média de idade 13 anos (Louwerens *et al.*, 2005). Os sinais clínicos mais característicos são a perda de peso, vômito, diarreia, anorexia ou hiporexia, e letargia (Barrs & Beatty, 2012; Fan, 2003; Gieger, 2011; Richter, 2003).

Histologicamente o LA pode ser diferenciado em subclassificações de acordo com o grau histológico como segue: baixo grau (LGAL do inglês *low grade alimentary lymphoma*), grau intermédio (IGAL do inglês *intermediate grade alimentary lymphoma*) e alto grau (HGAL do inglês *high grade intermediate lymphoma*) (Valli *et al.*, 2000).

O diagnóstico de LA pode ser efetuado com recurso a vários testes, sendo indispensáveis o hemograma, um painel bioquímico, testes de FIV e FeLV, análise de urina e testes de função da tiróide (Gieger, 2011). A ecografia abdominal permite avaliar possíveis alterações. Contudo as alterações detetadas no exame ecográfico são difíceis de diferenciar de IBD, particularmente no caso de LGAL. Estas incluem aumento da espessura da parede intestinal, embora também possam apresentar ausência de alteração, com preservação da diferenciação entre camadas intestinais (Carreras *et al.*, 2003; Lingard *et al.*, 2009). Também pode estar presente linfadenomegalia, intussuscepção, e massas intestinais diferenciáveis (Gieger, 2011). No caso de HGAL, os achados ecográficos incluem espessamento intestinal transmural, alteração da disposição das camadas intestinais, hipomotilidade localizada, linfadenomegalia, alterações de ecogenicidade da parede intestinal e a presença de massas intestinais (Zwingenberger *et al.*, 2010). O diagnóstico final de LA é efetuado através de histopatologia, podendo as amostras ser recolhidas utilizando o método de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de massas intestinais ou gânglios linfáticos aumentados. No caso de inflamação intestinal generalizada, recomenda-se a realização de biópsias intestinais (Gieger, 2011; Paulin *et al.*, 2018; Richter, 2003).

O LA é menos comum em cães, representando apenas 7% dos linfomas caninos. Frequentemente encontra-se confinado ao trato gastrointestinal, embora também possa estar envolvido no linfoma multicêntrico (Rassnick *et al.*, 2009). Tal como nos gatos, os sinais clínicos incluem vômito, diarreia, perda de peso, anorexia e letargia. Ao exame físico os achados mais frequentes são ascite, má condição corporal, massa abdominal palpável e espessamento das ansas intestinais (Frank *et al.*, 2007; Gieger, 2011; Rassnick *et al.*, 2009)

3.1 Alterações do microbioma em linfoma alimentar

O papel do microbioma na imunidade e homeostasia gastrointestinal já foi descrito anteriormente. Em humanos e animais de laboratório existe uma associação causal entre a presença de infeções bacterianas invasivas da mucosa gastrointestinal persistentes em linfoma gastrointestinal (Hoehne *et al.*, 2017), sendo que vários estudos revelam que as bactérias invasivas da mucosa gastrointestinal promovem uma inflamação crónica de mucosa. Esta inflamação resulta num ambiente propício a possíveis alterações malignas, nomeadamente linfomagénesis (Perry *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2017; Yamamoto & Schiestl, 2014). A patogenia de 20% de doenças malignas em humanos inclui desequilíbrios microbianos, incluindo neoplasias gastrointestinais, nas quais se incluem adenocarcinomas colorrectais e carcinomas gástricos (Garraway *et al.*, 2018). Em gatos com linfoma de grau elevado, foram detetadas bactérias invasivas da mucosa utilizando a técnica de FISH (Hoehne *et al.*, 2017), contrastando com animais diagnosticados com IBD, que apresentam bactérias aderentes da mucosa, ao invés de bactérias invasivas (Janeczko *et al.*, 2008). Desta forma, verifica-se uma associação entre uma alteração da composição do microbioma gastrointestinal e a inflamação da mucosa gastrointestinal e malignidade linfoide gastrointestinal (Allenspach *et al.*, 2010; Hoehne *et al.*, 2017; Janeczko *et al.*, 2008; Suchodolski *et al.*, 2010; Suchodolski, 2011b; Xenoulis *et al.*, 2008).

Um estudo que avaliou a presença de bactérias invasivas em linfoma gastrointestinais em gatos com linfoma de baixo grau (n=33) e linfoma de alto grau (n=17) detetou bactérias invasivas da mucosa gastrointestinal em 82% dos gatos com linfoma de grau elevado e em 18% dos gatos com linfoma de baixo grau. A alteração da estrutura da mucosa, nomeadamente dos enterócitos, pode resultar numa maior concentração bacteriana (Hoehne *et al.*, 2017). Os animais diagnosticados com linfoma de grau elevado estão mais predispostos a translocação bacteriana, septicémia e peritonite devido à presença de bactérias invasivas no interior dos vasos sanguíneos (29%) e na serosa (57%) (Hoehne *et al.*, 2017; Richter, 2003; Wilson, 2008). Em humanos, a doença de Crohn também apresenta inflamação intestinal crónica. A gravidade de inflamação e ulceração gastrointestinal encontra-se relacionada com alterações da distribuição espacial de bactérias intestinais em humanos com doença de Crohn bem como em roedores utilizados como modelos de ileíte (Baumgart *et al.*, 2007; Craven *et al.*, 2012).

Em medicina humana existe um aumento do risco de neoplasias colorrectais e pancreáticas quando associados à presença de *Fusocabacterium* spp., nomeadamente *Fusobacterium nucleatum*, sendo que contribuem para a tumorigénese, pois interferem com a morfologia celular levando à sua expansão (Garraway *et al.*, 2018; Gholizadeh *et al.*, 2017; Nosho *et al.*, 2016).

Em gatos saudáveis os números de *Bacterioides* são mais elevados comparativamente a gatos com IBD em estudos realizados utilizando amostras fecais (Inness *et al.*, 2007; Suchodolski *et al.*, 2015). Em biópsias intestinais de felinos com linfoma gastrointestinal de baixo grau, bactérias *Bacterioides-Prevotella* encontram-se em quantidades superiores quando comparadas com felinos diagnosticados com IBD, de acordo com amostras de biópsia intestinal (Garraway *et al.*, 2018). Em

humanos, o aumento de *Bacterioides* spp. está descrito como estando associado a um aumento das suas subespécies enteropatogénicas (Purcell *et al.*, 2017; Wexler, 2007). Nos gatos diagnosticados com linfoma gastrointestinal de baixo grau, o aumento de *Bacterioides* spp. também poderá estar relacionado com subespécies enteropatogénicas (Garraway *et al.*, 2018).

Em cães, gatos e humanos com inflamação intestinal crónica, a população de *Enterobacteriaceae* encontra-se aumentada enquanto que *Clostridium* spp. se encontra diminuída e com menor diversidade (Garraway *et al.*, 2018; Inness *et al.*, 2007; Suchodolski *et al.*, 2010; Suchodolski, Dowd, *et al.*, 2012; Suchodolski, Markel, *et al.*, 2012). Em gatos com enteropatias crónicas identificou-se um decréscimo de *Faecalibacterium* spp. enquanto que *Enterobacteriaceae* se encontrava aumentada em felinos com diarreia e também em cães com IBD (Suchodolski, Dowd, *et al.*, 2012; Vázquez-Baeza *et al.*, 2016).

Um estudo recente revelou alterações significativas na composição bacteriana do microbioma em cães com linfoma gastrointestinal, nomeadamente aumento da família *Eubacteriaceae*, pertencente à ordem *Clostridiales* (Omori *et al.*, 2017). A família *Clostridiales* inclui o género *Clostridium*, sendo que esta compreende membros dos clusters IV e XIVa que produzem ácidos gordos de cadeia curta e butirato, clusters estes que tem potencial para induzir células T reguladoras (Tregs) em ratos e humanos, respetivamente (Atarashi *et al.*, 2011, 2013).

Em ratos utilizados como modelos de cancro colorretal associou-se *Bacterioides* e *Parabacterioides* a tumorigénese (Zhu *et al.*, 2014) e em cães com linfoma gastrointestinal encontrou-se um aumento significativo de *Parabacterioides* (Omori *et al.*, 2017). Sendo assim, é possível que esta espécie possa ter alguma influência no desenvolvimento de linfoma canino gastrointestinal, podendo refletir a gravidade da doença (Omori *et al.*, 2017).

4. Considerações finais

A componente bacteriana do microbioma gastrointestinal tem influência na saúde gastrointestinal dos animais de companhia (Blake & Suchodolski, 2016). A sua composição pode ser alterada por fatores exógenos ou endógenos, sendo que a sua composição poderá ter alterações significativas no caso de enteropatias crónicas (Honneffer *et al.*, 2017; Inness *et al.*, 2007; Richter, 2003; Ritchie *et al.*, 2008; Wernimont *et al.*, 2020).

Atualmente existem métodos que permitem identificar as bactérias que coabitam com os hospedeiros, formando o microbioma gastrointestinal, tais como o PCR, FISH, Pirosequênciação 454, entre outros (Alessandri *et al.*, 2020; Amann *et al.*, 2001; Blake & Suchodolski, 2016; Giaretta *et al.*, 2020; Guard *et al.*, 2015). Desta forma é possível avaliar a composição microbiana em animais saudáveis e comparar com a composição microbiana de animais com doença gastrointestinal (Honneffer *et al.*, 2014).

A bibliografia consultada descreve alterações na composição microbiana na presença de doença gastrointestinal, sendo que na presente dissertação foram abordadas a IBD e o linfoma alimentar. Diferentes estudos comprovam que existem diferenças na composição do microbioma bacteriano entre

animais saudáveis (controlo) e animais diagnosticados com IBD (Cassmann *et al.*, 2016; Giaretta *et al.*, 2020; Guard *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2014; Suchodolski *et al.*, 2010; Suchodolski, Markel, *et al.*, 2012; Xenoulis *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016). Em gatos com IBD, apesar de menor número de bibliografia disponível, foram descritas alterações microbianas intestinais (Inness *et al.*, 2007; Janeczko *et al.*, 2008; Marsilio *et al.*, 2019). No caso do linfoma alimentar, existem também estudos que comprovam também alterações do microbioma bacteriano em animais de companhia (Garraway *et al.*, 2018; Hoehne *et al.*, 2017; Omori *et al.*, 2017). Em ratos de laboratório e em Humanos, também existem alterações do microbioma gastrointestinal no caso de Linfoma Alimentar (Purcell *et al.*, 2017; Wexler, 2007).

O estudo do microbioma bacteriano gastrointestinal em animais de companhia é importante, pois no futuro o conhecimento da sua composição poderá ser não só permitir a orientação do tratamento como auxiliar no prognóstico.

Referências Bibliográficas

- Albert E. Jergens, K. W. S. (2012). *Inflammatory bowel disease in veterinary medicine*. 1404–1419.
- Alessandri, G., Argentini, C., Milani, C., Turroni, F., Cristina Ossiprandi, M., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2020). Catching a glimpse of the bacterial gut community of companion animals: a canine and feline perspective. *Microbial Biotechnology*, 13(6), 1708–1732.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13656>
- Allenspach, K., House, A., Smith, K., McNeill, F. M., Hendricks, A., Elson-Riggins, J., Riddle, A., Steiner, J. M., Werling, D., Garden, O. A., Catchpole, B., & Suchodolski, J. S. (2010). Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies. *Veterinary Microbiology*, 146(3–4), 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.025>
- Allenspach, K., Wieland, B., Gröne, A., & Gaschen, F. (2007). Chronic enteropathies in dogs: Evaluation of risk factors for negative outcome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(4), 700–708. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[700:CEIDEO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[700:CEIDEO]2.0.CO;2)
- Amann, R., Fuchs, B. M., & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 231–236.
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00204-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00204-4)
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., ... Honda, K. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 500(7461), 232–236.
<https://doi.org/10.1038/nature12331>
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K., & Honda, K. (2011). Induction of Colonic Regulatory T Cells. *Science*, 331(January), 337–342.
- Barrs, V., & Beatty, J. (2012). Feline alimentary lymphoma: 2. Further diagnostics, therapy and prognosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14(3), 191–201.
<https://doi.org/10.1177/1098612X12439266>
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R. H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S. G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., & Simpson, K. W. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME Journal*, 1(5), 403–418. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.52>
- Bertone, E. R., Snyder, L. A., & Moore, A. S. (2002). Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *American Journal of Epidemiology*, 156(3), 268–273.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwf044>

- Blake, A. B., & Suchodolski, J. S. (2016). Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. *Animal Frontiers*, 6(3), 37–42. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0032>
- Carreras, J. K., Goldschmidt, M., Lamb, M., McLearn, R. C., Drobatz, K. J., & Sørenmo, K. U. (2003). Feline Epitheliotropic Intestinal Malignant Lymphoma: 10 Cases (1997-2000). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(3), 326–331. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2003\)017<0326:FEIMLC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2003)017<0326:FEIMLC>2.3.CO;2)
- Cassmann, E., White, R., Atherly, T., Wang, C., Sun, Y., Khoda, S., Mosher, C., Ackermann, M., & Jergens, A. (2016). Alterations of the Ileal and Colonic Mucosal Microbiota in Canine Chronic Enteropathies. *PLoS ONE*, 11(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147321>
- Cerquetella, M., Spaterna, A., Laus, F., Tesei, B., Rossi, G., Antonelli, E., Villanacci, V., & Bassotti, G. (2010). Inflammatory bowel disease in the dog: Differences and similarities with humans. *World Journal of Gastroenterology*, 16(9), 1050–1056. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i9.1050>
- Couëtil, L., Hoffman, A., Hodgson, J., Buechner-Maxwell, V., Viel, L., Wood, J., & Lavoie, J.-P. (2007). ACVIM Consensus Statement. *J Vet Intern Med*, 21, 356–361.
- Craven, M., Egan, C. E., Dowd, S. E., McDonough, S. P., Dogan, B., Denkers, E. Y., Bowman, D., Scherl, E. J., & Simpson, K. W. (2012). Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's Disease. *PLoS ONE*, 7(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041594>
- Dams, E., Hendriks, L., Van De Peer, Y., Neefs, J. M., Smits, G., Vandenbempt, I., & de Wachter, R. (1988). Compilation of small ribosomal subunit rna sequences. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 16). <https://doi.org/10.1093/nar/16.suppl.r87>
- Day, M. J., Bilzer, T., Mansell, J., Wilcock, B., Hall, E. J., Jergens, A., Minami, T., Willard, M., & Washabau, R. (2008). Histopathological Standards for the Diagnosis of Gastrointestinal Inflammation in Endoscopic Biopsy Samples from the Dog and Cat: A Report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *Journal of Comparative Pathology*, 138(SUPPL. 1), 1–43. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.01.001>
- Deng, P., & Swanson, K. S. (2015). Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *The British Journal of Nutrition*, 113, S6–S17. <https://doi.org/10.1017/S0007114514002943>
- Deusch, O., O'Flynn, C., Colyer, A., Swanson, K. S., Allaway, D., & Morris, P. (2015). A longitudinal study of the feline faecal microbiome identifies changes into early adulthood irrespective of sexual development. *PLoS ONE*, 10(12), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144881>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Ettinger, S. J., Feldman, E. C., & Côté, E. (2017). *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult, 8e (2Volumes)* (8th ed.). Elsevier.
- Evans, S. E., Bonczynski, J. J., Broussard, J. D., Han, E., & Baer, K. E. (2006). Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*,

- 229(9), 1447–1450. <https://doi.org/10.2460/javma.229.9.1447>
- Fan, T. M. (2003). Lymphoma updates. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 33(3), 455–471. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00005-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00005-6)
- Frank, J. D., Reimer, S. B., Kass, P. H., & Kiupel, M. (2007). Clinical outcomes of 30 cases (1997–2004) of K9 GI lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 43(6), 313–321. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975213>
- Garcia-Mazcorro, J. F., Minamoto, Y., Kawas, J. R., Suchodolski, J. S., & de Vos, W. M. (2020). Akkermansia and microbial degradation of mucus in cats and dogs: Implications to the growing worldwide epidemic of pet obesity. *Veterinary Sciences*, 7(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/vetsci7020044>
- Garraway, K., Johannes, C. M., Bryan, A., Peuroi, J., Rossi, G., Zhang, M., Wang, C., Allenspach, K., & Jergens, A. E. (2018). Relationship of the mucosal microbiota to gastrointestinal inflammation and small cell intestinal lymphoma in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(5), 1692–1702. <https://doi.org/10.1111/jvim.15291>
- Gholizadeh, P., Eslami, H., & Kafil, H. S. (2017). Carcinogenesis mechanisms of *Fusobacterium nucleatum*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 918–925. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.102>
- Giarretta, P. R., Suchodolski, J. S., Jergens, A. E., Steiner, J. M., Lidbury, J. A., Cook, A. K., Hanifeh, M., Spillmann, T., Kilpinen, S., Syrjä, P., & Rech, R. R. (2020). Bacterial Biogeography of the Colon in Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy. *Veterinary Pathology*, 57(2), 258–265. <https://doi.org/10.1177/0300985819891259>
- Gieger, T. (2011). Alimentary Lymphoma in Cats and Dogs. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(2), 419–432. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.02.001>
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, 34, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>
- Guard, B. C., Barr, J. W., Reddivari, L., Klemashevich, C., Jayaraman, A., Steiner, J. M., Vanamala, J., & Suchodolski, J. S. (2015). Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PLoS ONE*, 10(5), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127259>
- Guillermo Couto, C. (2001). What is new on feline lymphoma? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 3(4), 171–176. <https://doi.org/10.1053/jfms.2001.0146>
- Hamady, M., & Knight, R. (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Research*, 19(7), 1141–1152. <https://doi.org/10.1101/gr.085464.108>
- Handl, S., Dowd, S. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2011). Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(2), 301–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x>
- Handl, S., German, A. J., Holden, S. L., Dowd, S. E., Steiner, J. M., Heilmann, R. M., Grant, R. W.,

- Swanson, K. S., & Suchodolski, J. S. (2013). Faecal microbiota in lean and obese dogs. *FEMS Microbiology Ecology*, *84*(2), 332–343. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12067>
- Hoehne, S. N., McDonough, S. P., Rishniw, M., & Simpson, K. W. (2017). Identification of Mucosa-Invading and Intravascular Bacteria in Feline Small Intestinal Lymphoma. *Veterinary Pathology*, *54*(2), 234–241. <https://doi.org/10.1177/0300985816664792>
- Hoffmann, A. R., Proctor, L. M., Surette, M. G., & Suchodolski, J. S. (2016). The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Veterinary Pathology*, *53*(1), 10–21. <https://doi.org/10.1177/0300985815595517>
- Honneffer, J. B., Minamoto, Y., & Suchodolski, J. S. (2014). Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(44), 16489–16497. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16489>
- Honneffer, J. B., Steiner, J. M., Lidbury, J. A., & Suchodolski, J. S. (2017). Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics*, *13*(3), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1165-3>
- Inness, V. L., McCartney, A. L., Khoo, C., Gross, K. L., & Gibson, G. R. (2007). Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *91*(1–2), 48–53. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00640.x>
- Janeczko, S., Atwater, D., Bogel, E., Greiter-Wilke, A., Gerold, A., Baumgart, M., Bender, H., McDonough, P. L., McDonough, S. P., Goldstein, R. E., & Simpson, K. W. (2008). The relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine mRNA, and clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology*, *128*(1–2), 178–193. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.014>
- Jergens, A. E., Crandell, J. M., Evans, R., Ackermann, M., Miles, K. G., & Wang, C. (2010). A clinical index for disease activity in cats with chronic enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *24*(5), 1027–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0549.x>
- Jergens, Albert E., Schreiner, C. A., Frank, D. E., Niyo, Y., Ahrens, F. E., Eckersall, P. D., Benson, T. J., & Evans, R. (2003). A Scoring Index for Disease Activity in Canine Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *17*(3), 291–297. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2003\)017<0291:ASIFDA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2003)017<0291:ASIFDA>2.3.CO;2)
- Jha, A. R., Shmalberg, J., Tanprasertsuk, J., Perry, L. A., Massey, D., & Honaker, R. W. (2020). Characterization of gut microbiomes of household pets in the United States using a direct-to-consumer approach. *PLoS ONE*, *15*(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227289>
- Johnston, K. L., Lamport, A. I., Ballèvre, O. P., & Batt, R. M. (2000). Effects of oral administration of metronidazole on small intestinal bacteria and nutrients of cats. *American Journal of Veterinary Research*, *61*(9), 1106–1112. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.1106>
- Kieler, I. N., Mølbak, L., Hansen, L. L., Hermann-Bank, M. L., & Bjornvad, C. R. (2016). Overweight and the feline gut microbiome - a pilot study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*,

100(3), 478–484. <https://doi.org/10.1111/jpn.12409>

- Lingard, A. E., Briscoe, K., Beatty, J. A., Moore, A. S., Crowley, A. M., Krockenberger, M., Churcher, R. K., Canfield, P. J., & Barrs, V. R. (2009). Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(8), 692–700. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.021>
- Louwerens, M., London, C. A., Pedersen, N. C., & Lyons, L. A. (2005). Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(3), 329–335. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2005\)19\[329:FLITPL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19[329:FLITPL]2.0.CO;2)
- Lyu, Y., Su, C., Verbrugghe, A., Van de Wiele, T., Martos Martinez-Caja, A., & Hesta, M. (2020). Past, Present, and Future of Gastrointestinal Microbiota Research in Cats. *Frontiers in Microbiology*, 11(July). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01661>
- Magro, F., Langner, C., Driessen, A., Ensari, A., Geboes, K., Mantzaris, G. J., Villanacci, V., Becheanu, G., Nunes, P. B., Cathomas, G., Fries, W., Jouret-Mourin, A., Mescoli, C., de Petris, G., Rubio, C. A., Shepherd, N. A., Vieth, M., & Eliakim, R. (2013). European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7(10), 827–851. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.06.001>
- Marsilio, S., Pilla, R., Sarawichitr, B., Chow, B., Hill, S. L., Ackermann, M. R., Estep, J. S., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2019). Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55691-w>
- Milani, C., Duranti, S., Mangifesta, M., Lugli, G. A., Turrone, F., Mancabelli, L., Viappiani, A., Anzalone, R., Alessandri, G., Ossiprandi, M. C., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2018). Phylotype-level profiling of lactobacilli in highly complex environments by means of an internal transcribed spacer-based metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(14). <https://doi.org/10.1128/AEM.00706-18>
- Milani, C., Lugli, G. A., Turrone, F., Mancabelli, L., Duranti, S., Viappiani, A., Mangifesta, M., Segata, N., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2014). Evaluation of bifidobacterial community composition in the human gut by means of a targeted amplicon sequencing (ITS) protocol. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(2), 493–503. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12410>
- Minamoto, Y., Hooda, S., Swanson, K. S., & Suchodolski, J. S. (2012). Feline gastrointestinal microbiota. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 13(1), 64–77. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000060>
- Minamoto, Y., Minamoto, T., Isaiah, A., Sattasathuchana, P., Buono, A., Rangachari, V. R., McNeely, I. H., Lidbury, J., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2019). Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(4), 1608–1618. <https://doi.org/10.1111/jvim.15520>
- Minamoto, Y., Otoni, C. C., Steelman, S. M., Büyükleblebici, O., Steiner, J. M., Jergens, A. E., & Suchodolski, J. S. (2015). Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 6(1), 33–47.

<https://doi.org/10.1080/19490976.2014.997612>

- Mondo, E., Marliani, G., Accorsi, P. A., Cocchi, M., & Di Leone, A. (2019). Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open Veterinary Journal*, 9(3), 253–258.
<https://doi.org/10.4314/ovj.v9i3.10>
- Nosho, K., Sukawa, Y., Adachi, Y., Ito, M., Mitsuhashi, K., Kurihara, H., Kanno, S., Yamamoto, I., Ishigami, K., Igarashi, H., Maruyama, R., Imai, K., Yamamoto, H., & Shinomura, Y. (2016). Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(2), 557–566.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.557>
- Omori, M., Maeda, S., Igarashi, H., Ohno, K., Sakai, K., Yonezawa, T., Horigome, A., Odamaki, T., & Matsuki, N. (2017). Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(11), 1840–1847.
<https://doi.org/10.1292/jvms.17-0045>
- Paulin, M. V., Couronné, L., Beguin, J., Le Poder, S., Delverdier, M., Semin, M. O., Bruneau, J., Cerf-Bensussan, N., Malamut, G., Cellier, C., Benchechrone, G., Turet, L., German, A. J., Hermine, O., & Freiche, V. (2018). Feline low-grade alimentary lymphoma: An emerging entity and a potential animal model for human disease. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1635-5>
- Pepin-Puget, L., El Garch, F., Bertrand, X., Valot, B., & Hocquet, D. (2020). Genome analysis of enterobacteriaceae with non-wild type susceptibility to third-generation cephalosporins recovered from diseased dogs and cats in Europe. *Veterinary Microbiology*, 242(October 2019), 108601.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108601>
- Perry, A. M., Warnke, R. A., Hu, Q., Gaulard, P., Copie-Bergman, C., Alkan, S., Wang, H. Y., Cheng, J. X., Bacon, C. M., Delabie, J., Ranheim, E., Kucuk, C., Hu, X., Weisenburger, D. D., Jaffe, E. S., & Chan, W. C. (2013). Indolent T-cell lymphoproliferative disease of the gastrointestinal tract. *Blood*, 122(22), 3599–3606. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-512830>
- Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2020). The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(January), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498>
- Possemiers, S., Bolca, S., Verstraete, W., & Heyerick, A. (2011). The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*, 82(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.012>
- Purcell, R. V., Pearson, J., Aitchison, A., Dixon, L., Frizelle, F. A., & Keenan, J. I. (2017). Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia. *PLoS ONE*, 12(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171602>
- Ramadan, Z., Xu, H., Laflamme, D., Czarniecki-Maulden, G., Li, Q. J., Labuda, J., & Bourqui, B. (2014). Fecal microbiota of cats with naturally occurring chronic diarrhea assessed using 16S rRNA Gene 454-pyrosequencing before and after dietary treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(1), 59–65. <https://doi.org/10.1111/jvim.12261>

- Rassnick, K. M., Moore, A. S., Collister, K. E., Northrup, N. C., Kristal, O., Chretien, J. D., & Bailey, D. B. (2009). Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *23*(2), 317–322. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0270.x>
- Richter, K. P. (2003). Feline gastrointestinal lymphoma. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *33*(5), 1083–1098. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00054-8](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00054-8)
- Ritchie, L. E., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2008). Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, *66*(3), 590–598. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00609.x>
- Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Piccionello, A. P., Steiner, J. M., Cohen, N. D., Jergens, A. E., & Suchodolski, J. S. (2014). Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, *9*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094699>
- Stinson, L. F., Boyce, M. C., Payne, M. S., & Keelan, J. A. (2019). The not-so-sterile womb: Evidence that the human fetus is exposed to bacteria prior to birth. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01124>
- Stützer, B., Simon, K., Lutz, H., Majzoub, M., Hermanns, W., Hirschberger, J., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2011). Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *13*(2), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.09.015>
- Suchodolski, J. S. (2011). Companion animals symposium: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science*, *89*(5), 1520–1530. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3377>
- Suchodolski, Jan S. (2011a). Companion animals symposium: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science*, *89*(5), 1520–1530. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3377>
- Suchodolski, Jan S. (2011b). Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: A Bigger World than We Thought. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *41*(2), 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.12.006>
- Suchodolski, Jan S. (2016). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Veterinary Journal*, *215*, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011>
- Suchodolski, Jan S., Camacho, J., & Steiner, J. M. (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, *66*(3), 567–578. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x>
- Suchodolski, Jan S., Dowd, S. E., Wilke, V., Steiner, J. M., & Jergens, A. E. (2012). 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the Duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, *7*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039333>
- Suchodolski, Jan S., Foster, M. L., Sohail, M. U., Leutenegger, C., Queen, E. V., Steiner, J. M., &

- Marks, S. L. (2015). The fecal microbiome in cats with diarrhea. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127378>
- Suchodolski, Jan S., Markel, M. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Unterer, S., Heilmann, R. M., Dowd, S. E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E. M., Steiner, J. M., Cook, A. K., & Toresson, L. (2012). The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051907>
- Suchodolski, Jan S., Xenoulis, P. G., Paddock, C. G., Steiner, J. M., & Jergens, A. E. (2010). Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology*, *142*(3–4), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.002>
- Tizard, I. R., & Jones, S. W. (2018). The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *48*(2), 307–322. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.008>
- Tsai, J. H., Rabinovitch, P. S., Huang, D., Small, T., Mattis, A. N., Kakar, S., & Choi, W. T. (2017). Association of Aneuploidy and Flat Dysplasia With Development of High-Grade Dysplasia or Colorectal Cancer in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, *153*(6), 1492–1495.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.031>
- Tun, H. M., Brar, M. S., Khin, N., Jun, L., Hui, R. K. H., Dowd, S. E., & Leung, F. C. C. (2012). Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing. *Journal of Microbiological Methods*, *88*(3), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.001>
- Valli, V. E., Jacobs, R. M., Norris, A., Couto, C. G., Morrison, W. B., McCaw, D., Cotter, S., Ogilvie, G., & Moore, A. (2000). The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *12*(4), 295–306. <https://doi.org/10.1177/104063870001200401>
- Vázquez-Baeza, Y., Hyde, E. R., Suchodolski, J. S., & Knight, R. (2016). Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nature Microbiology*, *1*(October), 1–5. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.177>
- Wernimont, S. M., Radosevich, J., Jackson, M. I., Ephraim, E., Badri, D. V., MacLeay, J. M., Jewell, D. E., & Suchodolski, J. S. (2020). The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, *11*(June), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01266>
- Wexler, H. M. (2007). Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(4), 593–621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>
- Willard, M. D., Jergens, A. E., Duncan, R. B., Leib, M. S., McCracken, M. D., Denovo, R. C., Helman, R. G., Slater, M. R., & Harbison, J. L. (2002). Interobserver variation among histopathologic from dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *220*(April 15), 1177–1182. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20345772>
- Wilson, H. M. (2008). Feline Alimentary Lymphoma: Demystifying the Enigma. *Topics in Companion Animal Medicine*, *23*(4), 177–184. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.10.003>

- Xenoulis, P. G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J. M., Van House, A. M., & Suchodolski, J. S. (2008). Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3), 579–589. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00556.x>
- Xu, J., Verbrugge, A., Lourenço, M., Janssens, G. P. J., Liu, D. J. X., Van de Wiele, T., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Van de Maele, I., Niu, Y., Bosch, G., Junius, G., Wuyts, B., & Hesta, M. (2016). Does canine inflammatory bowel disease influence gut microbial profile and host metabolism? *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0736-2>
- Yamamoto, M. L., & Schiestl, R. H. (2014). Intestinal microbiome and lymphoma development. *Cancer Journal (United States)*, 20(3), 190–194. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000047>
- Zentek, J., Hellweg, P., Khol-Parisini, A., Weingart, C., Kohn, B., & Münster, M. (2007). Inflammatory bowel disease in dogs and cats. *Kleintierpraxis*, 52(6), 356–367.
- Zhu, Q., Jin, Z., Wu, W., Gao, R., Guo, B., Gao, Z., Yang, Y., & Qin, H. (2014). Analysis of the intestinal lumen microbiota in an animal model of colorectal cancer. *PLoS ONE*, 9(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090849>
- Zwingenberger, A. L., Marks, S. L., Baker, T. W., & Moore, P. F. (2010). Ultrasonographic evaluation of the muscularis propria in cats with diffuse small intestinal lymphoma or inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(2), 289–292. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0457.x>

