

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA
NASAL EM CÃES BRAQUICEFÁLICOS DA RAÇA
BULDOQUE FRANCÊS AFETADOS OU NÃO PELA
SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA BRAQUICEFÁLICA
(SOAB)**

Herlem Camila Pinto da Silva

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA
NASAL EM CÃES BRAQUICEFÁLICOS DA RAÇA
BULDOQUE FRANCÊS AFETADOS OU NÃO PELA
SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA BRAQUICEFÁLICA
(SOAB)**

Herlem Camila Pinto da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Dissertação apresentada à banca examinadora
da Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para obtenção de
título de Mestre em Ciências Veterinárias.

2026

S586d

Silva, Herlem Camila Pinto da

Determinação da composição da microbiota nasal em cães braquicefálicos da raça Buldogue francês afetados ou não pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB) / Herlem Camila Pinto da Silva. -- Jaboticabal, 2026

43 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Paola Castro Moraes

1. Anatomia. 2. Análise de sequência de RNA. 3. Inflamação. 4. Microbioma. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Os resultados deste estudo contribuem para uma compreensão mais abrangente da Síndrome Obstrutiva das Vias Aéreas Braquicefálicas (SOAB) em buldogues franceses, ao comparar aspectos anatômicos, fisiológicos e microbiológicos. A investigação da microbiota nasal, associada às alterações decorrentes da hipóxia intermitente, evidencia a complexidade dos efeitos sistêmicos da síndrome e sua possível influência sobre comunidades microbianas comensais. Para a medicina veterinária, a caracterização taxonômica do microbioma nasal, fornece parâmetros de referência importantes para a comparação entre animais saudáveis e afetados. Embora não tenha sido observada associação significativa entre o grau de estenose nasal e a variação microbiana, os achados reforçam a relevância de considerar o microbioma como parte integrante da avaliação clínica, ampliando as perspectivas diagnósticas e incentivando novas linhas de investigação sobre a interação entre hipóxia, inflamação e microbiota. Para os tutores, a pesquisa amplia o entendimento sobre os impactos da síndrome, evidenciando que suas consequências extrapolam a dificuldade respiratória. Esse conhecimento favorece a valorização do diagnóstico precoce e do acompanhamento contínuo, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida dos animais. Dessa forma, o estudo fortalece a integração entre microbiologia, fisiopatologia e prática clínica, abrindo caminho para abordagens mais completas e individualizadas no cuidado de buldogues franceses acometidos pela SOAB.

Potential Impact of This Research

The results of this study contribute to a broader understanding of Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome (BOAS) in French Bulldogs by comparing anatomical, physiological, and microbiological aspects. The investigation of the nasal microbiota, associated with changes resulting from intermittent hypoxia, highlights the complexity of the syndrome's systemic effects and its potential influence on commensal microbial communities. For veterinary medicine, the taxonomic characterization of the nasal microbiome provides important reference parameters for comparing healthy and affected animals. Although no significant association was observed between the degree of nasal stenosis and microbial variation, the findings reinforce the importance of considering the microbiome as an integral part of clinical evaluation, expanding diagnostic perspectives and encouraging new lines of investigation into the interaction between hypoxia, inflammation, and microbiota. For pet owners, this research broadens the understanding of the syndrome's impacts, demonstrating that its consequences extend beyond respiratory difficulty. This knowledge supports the importance of early diagnosis and continuous monitoring, contributing to the improvement of animals' quality of life. Thus, the study strengthens the integration of microbiology, pathophysiology, and clinical practice, paving the way for more comprehensive and individualized approaches in the care of French Bulldogs affected by BOAS.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA NASAL EM CÃES BRAQUICEFÁLICOS DA RAÇA BULDOGUE FRANCÊS AFETADOS OU NÃO PELA SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA BRAQUICEFÁLICA (SOAB)

AUTORA: HERLEM CÂMILA PINTO DA SILVA

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **PAOLA CASTRO MORAES**
Data: 02/03/2026 13:24:57 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANO MELO DE SOUZA**
Data: 02/03/2026 01:22:31 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. LUCIANO MELO DE SOUZA (Participação Virtual)
Departamento de Zoonoses e Saúde Pública / Universidade Brasil (UnB) - Descalvado/SP

Documento assinado digitalmente
 **CAIO JOSÉ XAVIER ABIMUSSI**
Data: 02/03/2026 10:46:24 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. CAIO JOSÉ XAVIER ABIMUSSI (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2026.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Herlem Camila Pinto da Silva, natural de Rio Claro – SP, nascida no dia 21 de julho de 1997. Realizou graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Brasil, Campus de Descalvado, entre os anos de 2017 e 2021. Durante esse período, participou de vários projetos de pesquisa e extensão, dentre eles o GEPA (Grupo de Estudos em Pequenos Animais), LCV (Liga de Cirurgia Veterinária) e o GECIVET (Grupo de Estudos em Cirurgia Veterinária Brasil). Além disso, foi integrante e colaboradora do grupo de pesquisas GAP (Group of Animal Pharmacology), auxiliando em projetos sobre fisiopatologia da reação inflamatória, tendo peixes como modelo experimental (Processo FAPESP 2019/12307-0). Realizou aprimoramento em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais pela Universidade Brasil. Atualmente é aluna do curso de Mestrado do programa de Ciências Veterinárias da Faculdade de Ciências Agronômicas e Veterinárias – FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes, sendo bolsista FAPESP (Processo 2023/18069-9). Atua junto ao Serviço de Cirurgia Geral e Endoscopia Veterinária (CIGEV).

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me guiou e me sustentou em minha jornada até aqui. O senhor sempre esteve ao meu lado em todos os momentos.

À minha família, minha mãe Mércia, meu pai George e meus irmãos Thiago e Miriã que sempre me apoiaram nessa jornada. Vocês foram inspiração para mim.

Aos meus animais Claudécia, Cecílio, Marvin Gay, Jorginho, Negrolito, Samuel e Nicole que foram meu ponto de luz e apoio durante esse período.

Professora Paola, agradeço imensamente por todos os ensinamentos. A senhora sempre foi uma inspiração e ter o prazer de acompanhar e aprender com você foi extremamente gratificante. Obrigada pelo carinho e pela forma como me acolheu desde o início.

Aos meus amigos Thales, Nathály, Larissa e Carol que tornaram essa etapa da minha vida mais leve.

Agradeço a toda a equipe com a qual trabalhei no decorrer deste trabalho, especialmente à Isabella, Diego, Carol, Júlia, Mirella, Jéssica e Mareliza. Sem vocês, esse período teria sido muito mais difícil e prolongado, e eu não teria aprendido tanto. À FCAV e a toda equipe CIGEV, por terem proporcionado a estrutura e ajuda necessária para o desenvolvimento deste estudo.

À Universidade de Copenhagen pelo acolhimento e ensinamento, em especial ao Luca, Mattia, Gabriela e Sina, agradeço muito por toda a ajuda, sem vocês, esse trabalho não seria possível.

A todos os animais que cruzaram meu caminho, me ensinando sobre resiliência, cuidado e empatia.

Agradeço o apoio e financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (nº 2023/18069-9) e pela oportunidade de realizar o BEPE na Dinamarca (nº. 2025/01611-0). Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – PROEX pelo financiamento inicial da discente com bolsa de mestrado.

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

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo geral.....	5
3.2 Objetivos específicos.....	5
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
CAPÍTULO 2 - MICROBIOTA NASAL E OROFARÍNGEA EM BULDOGUES FRANCÊSES AFETADOS OU NÃO PELA SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA BRAQUICEFÁLICA (SOAB).....	10



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado **"Determinação da composição da microbiota nasal em cães braquicefálicos da raça buldogue francês afetados ou não pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB)"**, está inserido dentro do projeto intitulado **"Avaliação de marcadores de inflamação aguda e crônica e determinação da composição da microbiota nasal, laríngea e intestinal em cães braquicefálicos das raças buldogue francês e pug, afetados ou não pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB)"**, com Certificado CEUA protocolo nº 9555/23, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes com aprovação em reunião ordinária em 21 de novembro de 2023, pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

Jaboticabal, 21 de novembro de 2023.


Prof. Dr. Luis Antônio Mathias
Membro titular – CEUA / FCAV

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA NASAL EM CÃES BRAQUICEFÁLICOS DA RAÇA BULLDOGUE FRANCÊS AFETADOS OU NÃO PELA SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA BRAQUICEFÁLICA (SOAB)

RESUMO - A Síndrome Obstrutiva das Vias Aéreas Braquicefálicas (SOAB) é uma condição bem reconhecida, caracterizada por alterações anatomopatológicas que levam à obstrução parcial das vias aéreas em cães braquicefálicos. Essas alterações resultam em diversas manifestações clínicas que impactam na saúde geral dos animais afetados. Semelhante a pacientes humanos com síndrome da apneia obstrutiva do sono, cães com SOAB apresentam hipóxia intermitente, que pode desencadear inflamação sistêmica e geração de radicais livres. Isso, por sua vez, pode afetar múltiplos sistemas orgânicos e potencialmente influenciar a composição da microbiota comensal. Este estudo prospectivo teve como objetivo avaliar a composição taxonômica de microrganismos na cavidade nasal bulldogues franceses afetados pela SOAB (graus II e III) e não afetados (grau 0). A análise metagenômica foi realizada utilizando sequenciamento de rRNA 16S, demonstrando predominância de *Moraxella* no microbioma nasal, principalmente em bulldogues franceses não afetados, corroborando achados em animais mesocefálicos na literatura. O grau de estenose nasal não apresentou diferença estatística em comparação com a variação taxonômica.

Palavras-chave: Anatomia, análise de sequência de RNA, inflamação, microbioma.

**DETERMINATION OF THE NASAL MICROBIOTA COMPOSITION IN
BRACHYCEPHALIC DOGS OF THE FRENCH BULLDOG BREED AFFECTED OR
UNAFFECTED BY BRACHYCEPHALIC OBSTRUCTIVE AIRWAY SYNDROME
(BOAS)**

ABSTRACT – Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome (BOAS) is a well-recognized condition characterized by anatomopathological changes that lead to partial obstruction of the airways in brachycephalic dogs. These alterations result in several clinical manifestations that impact the overall health of affected animals. Similar to human patients with obstructive sleep apnea syndrome, dogs with BOAS experience intermittent hypoxia, which can trigger systemic inflammation and the generation of free radicals. This, in turn, may affect multiple organ systems and potentially influence the composition of the commensal microbiota. This prospective study aimed to evaluate the taxonomic composition of microorganisms in the nasal cavity of French Bulldogs affected by BOAS (grades II and III) and unaffected animals (grade 0). Metagenomic analysis was performed using 16S rRNA sequencing, demonstrating a predominance of *Moraxella* in the nasal microbiome, particularly in unaffected French Bulldogs, corroborating findings reported in mesocephalic animals in the literature. The degree of nasal stenosis showed no statistically significant difference when compared to taxonomic variation.

Keywords: Anatomy, RNA sequence analysis, inflammation, microbiome.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 Sistema de graduação da Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB), antes e após teste de tolerância ao exercício (TTE).....	24
---	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação gráfica da coleta do microbioma nasal (A) e orofaríngeo (B) utilizando cotonetes estéreis em cães da raça buldogue francês afetados (“sick”; grau II-III) ou não (“healthy”; grau 0) pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB).....	25
Figura 2. Representação gráfica da beta diversidade em amostras coletadas da cavidade nasal e orofaríngea de cães braquicefálicos da raça buldogue francês afetados (“sick”; grau II-III) ou não (“healthy”; grau 0) pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB).....	25
Figura 3. Representação gráfica da diversidade alfa (A), beta (B) e abundância relativa dos gêneros bacterianos (C) do microbioma nasal de cães da raça buldogue francês afetados (“sick”; grau II-III) ou não (“healthy”; grau 0) pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB).....	26
Figura 4. Representação gráfica da diversidade alfa (A), beta (B) e abundância relativa de gêneros bacterianos (C) presentes nas narinas de cães da raça buldogue francês em relação aos graus de estenose nasal (grau 0, I, II e III)	27
Figura 5. Representação gráfica da diferença na diversidade alfa (A), beta (B) e abundância relativa dos gêneros bacterianos (C) do microbioma orofaríngeo de cães da raça buldogue francês afetados (“sick”; grau II-III) ou não (“healthy”; grau 0) pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB).....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AOS - Apneia Obstrutiva do Sono

ASV - Variante de Sequência de Amplicon

BF - Buldogue francês

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DII- Doença Intestinal Inflamatória

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

IL-6 - Interleucina-6

KG - Quilograma

LPS - Lipopolissacarídeo

PCoA - Análise de Coordenadas Principais

pH - Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ácido Ribonucleico

SOAB - Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica

SP - São Paulo

UNESP - Universidade Estadual Paulista

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Cães de raças braquicefálicas vêm aumentando sua popularidade entre as famílias por serem pouco agressivos, terem o aspecto do focinho achatado, olhos protruídos e seu pequeno porte (O'NEILL DG et al., 2022). Porém, esses animais possuem características que contribuem para o desenvolvimento da Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB), a qual é caracterizada por deformidades anatômicas.

Essa síndrome tem caráter genético, sendo que as raças mais predispostas são Shih tzu, Pequinês, Buldogue inglês, Buldogue francês, Lhasa apso, Boxer, Pug, Boston terrier, Cavalier king charles spaniel, Yorkshire terrier, Maltês e Chihuahua (LAMEU et al., 2020). As principais alterações encontradas são narinas estenosadas, prolongamento de palato mole, hipoplasia traqueal, eversão de sacos laríngeos, colapso de brônquio principal, conchas nasais aberrantes, hiperplasia de tonsilas palatinas, macroglossia, cistos na epiglote, granulomas laríngeos e anormalidades gastrintestinais (LAMEU et al., 2020).

As alterações de conformação craniofacial, principalmente pelo encurtamento do eixo longitudinal craniano sem redução dos tecidos moles nasais e orofaríngeos causam obstrução parcial das vias aéreas primárias. Como consequência, são geradas alterações secundárias que aumentam o esforço respiratório desses animais, levando a problemas respiratórios, cardíacos e gastrintestinais (JUNIOR et al., 2021; ROEDLER et al., 2013).

Os efeitos da síndrome nos outros sistemas podem variar a gravidade conforme a evolução do grau da SOAB, podendo ser de 0 a III. O grau 0 não possui sinais clínicos da patologia, sendo considerado livre da doença; o grau I é considerado leve, no qual o animal apresenta pequeno ruído estertoroso, mas sem intolerância ao exercício; o grau II apresenta clínica moderada e relevante, requerendo manejo clínico ou cirúrgico; por fim, o grau III é considerado grave, onde o animal possui indicação

cirúrgica imediata, cianose, síncope e incapacidade de execução de exercícios (LIU et al., 2015).

O esforço respiratório acarreta processo inflamatório nas vias aéreas e gastrintestinais, sendo mais severo em cães com um maior grau da síndrome (MITZE et al., 2022), e agravando-se ao decorrer da vida do animal. Essas particularidades anatômicas promovem padrão respiratório anormal semelhante ao dos humanos com síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (AOS), podendo causar distúrbios noturnos semelhantes, como ronco, apneia e sono fragmentado com hipoxemia leve (PLANELLAS et al., 2012). Diferentemente do que ocorre na AOS em humanos, essas alterações podem ser observadas em cães durante todo o dia, podendo agravar-se durante o sono, pois o relaxamento da musculatura gera obstrução da maior parte da passagem de ar (PLANELLAS et al., 2012), causando apneia e, conseqüentemente, diminuição da saturação de oxigênio por períodos prolongados (HENDRICKS et al., 1987).

As alterações cardíacas em pacientes acometidos pela SOAB podem se desenvolver por conta do aumento da atividade simpática decorrente da privação do sono e de eventos hipoxêmicos repetitivos e intermitentes, causando baixa saturação arterial de oxigênio e ativação de citocinas pró-inflamatórias (PLANELLAS et al., 2012). Os sinais gastrintestinais estão relacionados à variações anatômicas (desvio esofágico, atonia do cárdia, hérnia hiatal, estase gástrica, hiperplasia da mucosa pilórica, entre outros) (PONCET et al., 2005) e ao aumento negativo da pressão diafragmática, que somado ao esforço respiratório e à hernia hiatal (BOESCH et al., 2005), geram refluxo gastroesofágico (SHAVER et al., 2017) e conseqüente inflamação orofaríngea (BERNAERTS et al., 2010).

Estudos em humanos relatam a importância da microbiota na manutenção da saúde respiratória e gastrointestinal, afetando a resistência a patógenos e respostas imunológicas (DE STEENHUIJSEN PITERS et al., 2015), podendo ser influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Foi demonstrado que alterações na microbiota nasal em humanos afetados pela AOS estão relacionadas à inflamação local gerada pela patologia (WU et al., 2019). Em paralelo, estudos realizados em cães demonstraram que essas alterações também podem ocorrer, variando a população microbiana conforme a localização geográfica, idade, peso e sítio de colheita (nasais

ou orofaríngeos) (VANGRINSVEN et al., 2021). A correlação entre a microbiota nasal e a conformação anatômica ou racial em cães não é bem estabelecida na literatura.

Considerando a lacuna de conhecimentos em relação à composição taxonômica de microrganismos presentes nas narinas e de cães afetados pela SOAB, este estudo propõe a determinação e comparação da composição da microbiota nasal em cães da raça buldogue francês afetados (graus II-III) ou não afetados (grau 0) pela SOAB.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Considerando-se que desvios na composição microbiana do trato respiratório podem levar a desenvolvimento, persistência ou progressão de doenças respiratórias, a caracterização da sua composição é de extrema importância (VIENTÓS-PLOTTTS et al., 2023).

Um dos métodos utilizados para identificação microbiana é o sequenciamento RNA ribossômico (rRNA) 16S, o qual possui características conservadas e variáveis do genoma bacteriano (DICKSON et al., 2016). Quando o DNA é sequenciado, pode produzir milhares de sequências genômicas mais curtas, as quais podem ser agrupadas com base em um grau de similaridade, denominado unidades taxonômicas operacionais e comparadas a um banco de dados do gene de bactérias para identificação (BALVOČIŪTĖ et al., 2017).

Estudos metagenômicos de amostras coletadas do terço distal da cavidade nasal de cães braquicefálicos demonstraram que estes possuem microbiota nasal distinta quando comparados a cães mesocefálicos e dolicocefálicos. Essa diferença é caracterizada pela maior diversidade de espécies α em braquicefálicos reportada pela diminuição de espécies pertencentes ao filo Proteobacteria associada ao aumento de espécies pertencentes aos filos Actinobacteria e Firmicutes. Essa alteração é relatada como consequência do refluxo de secreções orofaríngeas que comumente afetam essas raças (VANGRINSVEN et al., 2021).

Em estudos realizados comparando a população de microrganismos em cavidade nasal e orofaríngea foram evidenciadas distinção entre as famílias de

bactérias, sendo que a dominância foi de Moraxellaceae e menos Pasteurellaceae e Pseudomonadaceae em narinas, e dominância de Pasteurellaceae e diminuição de Moraxellaceae e Pseudomonadaceae em orofaringe (ERICSSON et al., 2016).

Quando analisada a influência da localização geográfica sobre a microbiota nasal, um estudo comparou essa microbiota em cães da raça labrador presentes tanto no estado do Alabama, quanto no estado da Califórnia, constatando que há diferença significativa na diversidade alfa, ou seja, no número e abundância de espécies de bactérias presentes na região, apresentando aumento em animais que residem no Alabama (ISAIAH et al., 2017).

Apesar dos dados da diversidade taxonômica de microrganismos em diferentes sítios ainda serem escassos em cães braquicefálicos, sabe-se que o microbioma intestinal desempenha um papel importante na modulação da obesidade, anormalidades metabólicas, doenças cardiovasculares e afecções como a doença inflamatória intestinal (DII) (SINGH et al., 2017). Estudos da composição da microbiota intestinal em humanos afetados pela AOS evidenciam graves disfunções orgânicas, demonstrando que humanos com sono fragmentado, apresentam aumento nos níveis circulantes de IL-6, lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos e proteína de ligação ao lipopolissacarídeo (LPS), principalmente em pacientes obesos, sugerindo indução a processos inflamatórios e aumento da permeabilidade intestinal (Ko CY et al., 2019). Além disso, sabe-se que bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes são predominantes na microbiota intestinal, sendo que seu desequilíbrio é intimamente relacionado a distúrbios inflamatórios e imunológicos (BOULANGÉ et al., 2016). Estudos anteriores demonstraram que o aumento na relação dessas bactérias está relacionado à maior abundância de bactérias produtoras de lactato e diminuição de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta responsáveis pelo fornecimento de energia aos colonócitos, promovendo disfunção da barreira intestinal (MORENO-INDIAS et al., 2015).

Considerando-se a importância e influência da microbiota intestinal possui sobre outros sistemas, estudos em humanos evidenciaram que ela está intimamente relacionada a DII. Pacientes acometidos por esta afecção apresentam diminuição de bactérias com efeitos antiinflamatórios, tais como *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii* e aumento de bactérias patobiontes como *Escherichia*

coli (MOUSTAFA et al., 2018). A mesma hipótese foi estudada correlacionando a microbiota intestinal à DII em cães (AMARAL, 2020).

Tendo em vista o aumento progressivo da popularidade de cães braquicefálicos e suas particularidades anatômicas, que geram grave comprometimento de bem-estar, torna-se importante estudos que avaliem e forneçam evidências dos impactos da seleção genética na manutenção da homeostase dos sistemas e qualidade de vida desses animais, permitindo a elaboração de melhores estratégias para prevenção e tratamento da SOAB.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Comparar a diversidade taxonômica de microrganismos presentes na cavidade nasal de cães da raça Buldogue francês afetados (graus II-III) ou não afetados (grau 0) pela SOAB.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar e comparar a diversidade taxonômica de microrganismos presentes nas narinas de Buldogues franceses, afetados (graus II-III) e não afetados (grau 0) pela SOAB, através do sequenciamento 16S rRNA;
- Comparar a diversidade taxonômica de microrganismos presentes nas narinas de Buldogues franceses com estudos metagenômicos em cães de raças mesocefálicas previamente publicados;
- Determinar a correlação entre a prevalência de determinados grupos taxonômicos com a presença da SOAB.

4. REFERÊNCIAS

- Allemand, V. C. D., Quinzani, M., & Berl, C. A. (2013). Síndrome respiratória dos cães braquicefálicos: relato de caso. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, 11(2), 42-47.
- Amaral, A. R. (2020). Microbiota e produtos de fermentação fecal de cães com doença inflamatória intestinal suplementados com β -glucanos. **Master's Dissertation, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, University of São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/D.10.2020.tde-21012021-093129. Retrieved 2023-07-06, from www.teses.usp.br
- Bernaerts F, Talavera J, Leemans J, Hamaide A, Claeys S, Kirschvink N, Clercx C (2010). Description of original endoscopic findings and respiratory functional assessment using barometric whole-body plethysmography in dogs suffering from brachycephalic airway obstruction syndrome. **Vet J.** 183: 95-102. 10.1016/j.tvjl.2008.09.009.
- Boesch, R. P., Shah, P., Vaynblat, M., Marcus, M., Pagala, M., Narwal, S., & Kazachkov, M. (2005). Relationship between upper airway obstruction and gastroesophageal reflux in a dog model. **Journal of Investigative Surgery**, 18(5), 241-245.
- Boulangé C.L., Neves A.L., Chilloux J., Nicholson J.K. & Dumas M.E. (2016) Impact of the GM on inflammation, obesity, and metabolic disease. **Genome Med.** 8, 42 10.1186/s13073-016-0303-2.
- Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., Mcmurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2016). Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to Community analyses. **F1000Research**, 5.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, 13(7), 581-583.
- Chaumeil, P. A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., & Parks, D. H. (2020). GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, 34(17), i884-i890.
- Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A., & Callahan, B. J. (2018). Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. **Microbiome**, 6(1), 226.

de Steenhuijsen Piters, W. A., Sanders, E. A., & Bogaert, D. (2015). The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 370(1675), 20140294.

Ericsson, A. C., Personett, A. R., Grobman, M. E., Rindt, H., & Reinero, C. R. (2016). Composition and predicted metabolic capacity of upper and lower airway microbiota of healthy dogs in relation to the fecal microbiota. **PloS one**, 11(5), e0154646.

Ganji, J., Langenbach, A., Watrous, G., & Hodgson, J. (2016). Comparison of bacterial cultures of the larynx between dogs with laryngeal paralysis and normal dogs. **Journal of Small Animal Practice**, 57(11), 644-649.

Hendricks, J. C., Kline, L. R., Kovalski, R. J., O'brien, J. A., Morrison, A. R., & Pack, A. I. (1987). The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing. **Journal of Applied physiology**, 63(4), 1344-1350.

Isaiah, A., Hoffmann, A. R., Kelley, R., Mundell, P., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2017). Characterization of the nasal and oral microbiota of detection dogs. **PloS one**, 12(9), e0184899.

Kenny, D. D., Freemantle, R., Jeffery, A., & Tivers, M. S. (2022). Impact of an educational intervention on public perception of brachycephalic obstructive airway syndrome in brachycephalic dogs. **Veterinary Record**, 190(11), no-no.

Ko, C. Y., Liu, Q. Q., Su, H. Z., Zhang, H. P., Fan, J. M., Yang, J. H., ... & Zeng, Y. M. (2019). Gut microbiota in obstructive sleep apnea–hypopnea syndrome: disease-related dysbiosis and metabolic comorbidities. **Clinical Science**, 133(7), 905-917.

Lameu, G. R., da Silva, P. Í. B., Menezes, A. D. R., Alves, C. C., de Azevedo Soares, M., Bilhalva, M. A., ... & Costa, P. P. C. (2020). Síndrome braquicefálica em cães: Revisão. **Pubvet**, 14, 148.

Laflamme, D. R. P. C. (1997). Developmental and validation of a body condition score system for dogs.

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, 9(4), 357-359.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. **bioinformatics**, 25(16), 2078-2079.

Liu, N. C., Sargan, D. R., Adams, V. J., & Ladlow, J. F. (2015). Characterisation of brachycephalic obstructive airway syndrome in French bulldogs using whole-body barometric plethysmography. **PloS one**, 10(6), e0130741.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, 8(4), e61217.

Junior, A. F. M., Tanaka, B. M. B. S., de Araújo, J. M., Vaz, K. F., Cardoso, L. F., Mothé, G. B., ... & Almosny, N. R. P. (2021). Abordagem diagnóstica da síndrome braquicefálica em cães: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, 10(15), e218101522684-e218101522684.

Mitze, S., Barrs, V. R., Beatty, J. A., Hobi, S., & Bęczkowski, P. M. (2022). Brachycephalic obstructive airway syndrome: much more than a surgical problem. **Veterinary Quarterly**, 42(1), 213-223.

Moreno-Indias, I., Torres, M., Montserrat, J. M., Sanchez-Alcoholado, L., Cardona, F., Tinahones, F. J., ... & Farré, R. (2015). Intermittent hypoxia alters gut microbiota diversity in a mouse model of sleep apnoea. **European Respiratory Journal**, 45(4), 1055-1065.

Moustafa, A., Li, W., Anderson, E. L., Wong, E. H., Dulai, P. S., Sandborn, W. J., ... & Boland, B. S. (2018). Genetic risk, dysbiosis, and treatment stratification using host genome and gut microbiome in inflammatory bowel disease. **Clinical and translational gastroenterology**, 9(1), e132.

Niinikoski, I., Kouki, S., Koho, N., Aromaa, M., Holopainen, S., Laurila, H. P., ... & Rajamäki, M. M. (2022). Evaluation of VEGF-A and CCL2 in dogs with brachycephalic obstructive airway syndrome or canine idiopathic pulmonary fibrosis and in normocephalic dogs. **Research in Veterinary Science**, 152, 557-563.

O'Neill, D. G., Sahota, J., Brodbelt, D. C., Church, D. B., Packer, R. M., & Pegram, C. (2022). Health of Pug dogs in the UK: disorder predispositions and protections. **Canine Medicine and Genetics**, 9(1), 4.

Pirollo, M., Espinosa-Gongora, C., Alberdi, A., Eisenhofer, R., Soverini, M., Eriksen, E. Ø., ... & Guardabassi, L. (2023). Bacterial topography of the upper and lower respiratory tract in pigs. **Animal Microbiome**, 5(1), 5.

Poncet, C. M., Dupre, G. P., Freiche, V. G., Estrada, M. M., Poubanne, Y. A., & Bouvy, B. M. (2005). Prevalence of gastrointestinal tract lesions in 73 brachycephalic dogs with upper respiratory syndrome. **Journal of small animal practice**, 46(6), 273-279.

Planellas, M., Cuenca, R., Tabar, M. D., Bertolani, C., Poncet, C., Closa, J. M., ... & Pastor, J. (2012). Evaluation of C-reactive protein, haptoglobin and cardiac troponin 1 levels in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome. **BMC veterinary research**, 8(1), 152.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, 41(D1), D590-D596.

Riggs, J., Liu, N. C., Sutton, D. R., Sargan, D., & Ladlow, J. F. (2019). Validation of exercise testing and laryngeal auscultation for grading brachycephalic obstructive

airway syndrome in pugs, French bulldogs, and English bulldogs by using whole-body barometric plethysmography. **Veterinary Surgery**, 48(4), 488-496.

Roedler, F. S., Pohl, S., & Oechtering, G. U. (2013). How does severe brachycephaly affect dog's lives? Results of a structured preoperative owner questionnaire. **The Veterinary Journal**, 198(3), 606-610.

Weinstein, M. M., Prem, A., Jin, M., Tang, S., & Bhasin, J. M. (2019). FIGARO: An efficient and objective tool for optimizing microbiome rRNA gene trimming parameters. **BioRxiv**, 610394.

Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D. I., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., ... & Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. **Journal of translational medicine**, 15(1), 73.

Shaver, S. L., Barbur, L. A., Jimenez, D. A., Brainard, B. M., Cornell, K. K., Radlinsky, M. G., & Schmiedt, C. W. (2017). Evaluation of gastroesophageal reflux in anesthetized dogs with brachycephalic syndrome. **Journal of the American Animal Hospital Association**, 53(1), 24-31.

Tress, B., Dorn, E. S., Suchodolski, J. S., Nisar, T., Ravindran, P., Weber, K., ... & Schulz, B. S. (2017). Bacterial microbiome of the nose of healthy dogs and dogs with nasal disease. **PloS one**, 12(5), e0176736.

Vangrinsven, E., Fastrès, A., Taminiau, B., Billen, F., Daube, G., & Clercx, C. (2023). Assessment of the nasal microbiota in dogs with fungal rhinitis before and after cure and in dogs with chronic idiopathic rhinitis. **BMC microbiology**, 23(1), 104.

Vangrinsven, E., Fastrès, A., Taminiau, B., Frédéric, B., Daube, G., & Clercx, C. (2021). Variations in facial conformation are associated with differences in nasal microbiota in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**, 17(1), 361.

VIENTÓS-PLOTTS, Aida I.; ERICSSON, Aaron C.; REINERO, Carol R. (2023). The respiratory microbiota and its impact on health and disease in dogs and cats: A One Health perspective. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1641-1655.

Wu, B. G., Sulaiman, I., Wang, J., Shen, N., Clemente, J. C., Li, Y., ... & Segal, L. N. (2019). Severe obstructive sleep apnea is associated with alterations in the nasal microbiome and an increase in inflammation. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 199(1), 99-109.

CAPÍTULO 2 - MICROBIOTA NASAL E OROFARÍNGEA EM CÃES DA RAÇA BULLDOGUE FRANCÊS AFETADOS OU NÃO PELA SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA BRAQUICEFÁLICA (SOAB)

Normas do periódico BMC Microbiology (disponível em: <https://link.springer.com/journal/12866/submission-guidelines/research-article>)

RESUMO

A Síndrome Obstrutiva das Vias Aéreas Braquicefálicas (SOAB) é uma condição bem reconhecida, caracterizada por alterações anatomopatológicas que levam à obstrução parcial das vias aéreas em cães braquicefálicos. Essas alterações resultam em diversas manifestações clínicas que impactam na saúde geral dos animais acometidos, podendo afetar múltiplos sistemas orgânicos e potencialmente influenciar a composição da microbiota comensal. Este estudo prospectivo teve como objetivo avaliar e caracterizar a composição taxonômica de microrganismos na cavidade nasal e orofaríngea de cães da raça buldogue francês não afetados pela síndrome (Grau 0) e moderadamente a severamente afetados pela síndrome (graus II e III). A análise metagenômica foi realizada utilizando sequenciamento do rRNA 16S, demonstrando predominância de *Moraxella* no microbioma nasal, principalmente em buldogues franceses não afetados pela síndrome, corroborando achados em animais mesocefálicos saudáveis na literatura. O microbioma orofaríngeo demonstrou poucas alterações na composição entre animais Grau 0 e Grau II/III, com predominância de *Conchiformibius*. O grau de estenose nasal não apresentou diferença estatística em comparação com a variação taxonômica.

Palavras-chave: Anatomia, análise de sequência de RNA, inflamação, microbioma.

1. INTRODUÇÃO

Cães de raças braquicefálicas vem aumentando sua popularidade entre as famílias por serem pouco agressivos, terem o aspecto do focinho achatado, olhos protruídos e seu pequeno porte [1]. Porém, essas características contribuem para o desenvolvimento da Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB), a qual é caracterizada por deformidades anatômicas que causam obstrução parcial ou total das vias aéreas [2]. Essa síndrome tem caráter genético, sendo que as raças mais predispostas são buldogue inglês, buldogue francês, pug, shih tzu, pequinês, lhasa apso, boxer, boston terrier, cavalier king charles spaniel, yorkshire terrier, maltês, chihuahua e boxer [3].

A severidade da SOAB é classificada de acordo com quatro graus funcionais, que variam de 0 a III. O grau 0 não possui sinais clínicos da patologia, sendo livre da doença; grau I é considerado leve, no qual o animal não possui intolerância ao exercício, porém apresenta discreto estertor respiratório, normalmente após exercício; grau II é o moderado, onde a clínica é relevante, requerendo manejo clínico ou cirúrgico, e por fim, o grau III é grave, onde o animal possui indicação cirúrgica imediata [4].

Como consequência das alterações primárias, principalmente estenose de narina, prolongamento e espessamento de palato mole, são geradas alterações secundárias que aumentam o esforço respiratório desses animais, levando a problemas respiratórios, cardíacos e gastrintestinais [2,5]. O esforço respiratório acarreta processo inflamatório nas vias aéreas e gastrintestinais, sendo mais severo em cães com piores graus da síndrome [6], e agravando-se ao decorrer da vida do animal. Essas particularidades anatômicas promovem um padrão respiratório anormal

semelhante ao dos humanos com Apneia Obstrutiva do Sono (AOS), podendo causar distúrbios noturnos semelhantes, como ronco, apneia e sono fragmentado com hipoxemia leve [7]. Diferentemente do que ocorre na AOS em humanos, essas alterações podem ser observadas em cães durante todo o dia, podendo agravar-se durante o sono, pois o relaxamento da musculatura causa obstrução da maior parte da passagem de ar [7], acarretando apneia e, conseqüentemente, diminuição da saturação de oxigênio por períodos prolongados [8]. As alterações cardíacas podem se desenvolver devido ao aumento da atividade simpática decorrente da privação do sono e de eventos hipoxêmicos repetitivos e intermitentes, causando baixa saturação arterial e ativação de citocinas pró- inflamatórias [7]. Os sinais gastrintestinais estão relacionados à variação exagerada da pressão diafragmática que leva ao refluxo gastroesofágico e inflamação orofaríngea [9].

Estudos em humanos relatam a importância da microbiota na manutenção da saúde respiratória e gastrintestinal, afetando a resistência a patógenos e respostas imunológicas [10], podendo ser influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Foi demonstrado que alterações na microbiota nasal em humanos com síndrome da AOS está relacionada à inflamação local gerada pela afecção [11]. Em paralelo, estudos desenvolvidos em cães demonstraram que essas alterações também podem ocorrer, com variações na população microbiana conforme a localização geográfica, idade, peso e sítio de colheita (nasais ou orofaríngeos) [12]. Entretanto, existem poucos trabalhos associando a microbiota com a conformação anatômica ou raça desses animais.

Nos estudos realizados comparando a população de microrganismos em cavidade nasal e orofaríngea, foram evidenciadas distinção entre as famílias de bactérias,

sendo que nas narinas, a predominância foi de *Moraxellaceae*, seguida de diminuição de *Pasteurellaceae* e *Pseudomonadaceae*, enquanto em orofaringe a predominância foi de *Pasteurellaceae*, e houve diminuição de *Moraxellaceae* e *Pseudomonadaceae* [13].

Quando analisado a influência da localização geográfica sob a microbiota nasal, um estudo comparou a microbiota nasal de cães da raça labrador presentes no Alabama e Califórnia, demonstrando diferença significativa na diversidade alfa entre os grupos. Observou-se maior diversidade, refletida no número e abundância de espécies bacterianas, nos animais que residiam no Alabama, evidenciando o impacto de fatores ambientais e regionais na composição da microbiota nasal [14].

Estudos metagenômicos de amostras coletas no terço distal da cavidade nasal demonstraram que cães braquicefálicos possuem microbiota nasal distinta quando comparados a cães mesocefálicos e dolicocefálicos. Acredita-se que o importante refluxo de secreções orofaríngeas nos cães braquicefálicos afete diretamente a composição da microbiota, evidenciando maior diversidade de espécies α , diminuição de proteobacteria, além do aumento de Actinobacteria e Firmicutes [12].

Diversos estudos em pacientes humanos afetados pela AOS relatam alterações na diversidade taxonômica da microbiota de diversos sistemas orgânicos, correlacionando-se com gravidade da síndrome e o aumento em disfunções orgânicas.

Embora alterações inflamatórias associadas a SOAB possam teoricamente influenciar o ambiente das vias aéreas superiores, ainda não está claro se essas alterações se refletem de forma consistente na composição da microbiota nasal e orofaríngea em cães braquicefálicos.

Pensando nisso e tendo em vista o aumento progressivo da popularidade de cães braquicefálicos [15], e considerando-se a lacuna de conhecimentos em relação à composição taxonômica de microrganismo presentes nas narinas e orofaringe de cães afetados pela SOAB, este estudo propõe caracterizar a microbiota nasal e orofaríngea em cães da raça buldogue francês afetados ou não afetados pela SOAB, investigando se o grau da síndrome está associado à variação na composição da microbiota desses sítios.

2. MÉTODOS

2.1 Seleção dos pacientes

Os pacientes incluídos neste estudo foram recrutados durante atendimento no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, UNESP, Câmpus de Jaboticabal e Botucatu. Seguindo os princípios éticos adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), nº 9555/23.

Foram incluídos no estudo cães braquicefálicos da raça buldogue francês, alocados em grupos de acordo com o grau da síndrome (0, II e III) [16]. Os critérios de inclusão foram animais com idade entre um e oito anos e peso corporal entre cinco e 15 quilogramas. Os critérios de exclusão foram animais que foram submetidos à terapia antimicrobiana em dois meses prévios à colheita das amostras.

2.2 Classificação da síndrome obstrutiva aérea braquicefálica

Foram identificados peso e escore corporal em escala de um a nove, de acordo com Laflamme [17], além de gênero e idade. Cada paciente braquicefálico utilizado no presente estudo foi classificado de acordo com o índice SOAB, já validado por Liu [18]. Este índice estabelece sistema de escore funcional em quatro graus, baseado em

avaliação realizada antes e após teste de tolerância ao exercício de três minutos (tabela 1). Foram classificados como grau 0 os pacientes assintomáticos, sem qualquer sinal da síndrome, grau I animais sem intolerância ao exercício, porém com pequeno ruído estertoroso, grau II os pacientes que possuíam clínica relevante, apresentando algum grau de intolerância ao exercício e grau III os pacientes com síndrome grave, com indicação de intervenção cirúrgica imediata.

Além do grau da SOAB, os animais foram classificados em relação ao grau de estenose de narina, sendo o grau 0 as narinas abertas, grau I levemente estenóticas, grau II moderadamente estenóticas e grau III severamente estenóticas.

2.3 Grupos Experimentais

Os animais selecionados foram alocados em grupos de acordo com o grau da síndrome, sendo grau 0 (n=13), grau II (n=5) e grau III (n=5).

2.4 Coleta de Amostras

Amostras da cavidade nasal e orofaríngea foram coletadas com cotonetes estéreis e armazenadas em tubos secos e estéreis (Figura 1). Os cotonetes foram imediatamente congelados a -80°C. Estudos metagenômicos e análises bioinformáticas foram conduzidos na Universidade de Copenhague, Dinamarca.

2.5 Extração e Sequenciamento de DNA

O DNA total das amostras foi extraído utilizando o kit QIAamp UCP Pathogen MiniKit (QIAGEN, Copenhague, Dinamarca) de acordo com as instruções do fabricante, com a adição de uma etapa de homogeneização com esferas utilizando o tubo de lise Pathogen Lysis Tube S (QIAGEN). Um controle negativo de extração foi incluído em cada corrida de extração de DNA. Sequências parciais do gene 16S rRNA foram amplificadas utilizando o kit Quick-16S NGS Library Prep Kit (Zymo Research), que

tem como alvo a região V3-V4 do gene 16S rRNA, conforme descrito anteriormente [19]. Controles negativos e positivos (água livre de DNase/RNase ZymoBIOMICS e padrão de DNA de comunidade microbiana ZymoBIOMICS, respectivamente) foram incluídos na preparação da biblioteca. O sequenciamento foi realizado em uma plataforma Illumina MiSeq (duas leituras pareadas de 300 pb) usando o kit de reagentes MiSeq v3 (600 ciclos; Illumina), de acordo com as instruções do fabricante.

2.6 Análise Bioinformática

Os dados de sequenciamento do rRNA 16S foram processados usando o DADA2 v1.14.1 [20], implementado no R v4.2.1. Os parâmetros ideais de filtragem e corte foram identificados usando o FIGARO v3.0 [21]. Uma tabela taxonômica foi montada atribuindo-se uma taxonomia a cada variante de sequência de amplicon (ASV) usando o banco de dados taxonômico Silva v.138.1 para DADA2 [22]. Contaminantes potenciais foram identificados usando amostras de controle e removidos usando o decontam v.1.12.0 [23]. Um objeto phyloseq foi construído a partir das tabelas de ASV e taxonomia usando o phyloseq v1.30.0 [24] para análises subsequentes.

2.7 Análise estatística

Para a análise de dados os pacientes foram agrupados em dois grupos: não afetados pela SOAB (grau 0; “healthy”) e moderadamente/severamente afetados (grau II-III; “sick”)

Os índices de α -diversidade (Shannon e Chao1) e β -diversidade (métrica de dissimilaridade de Bray-Curtis) foram calculados utilizando o pacote vegan do R após rarefação com uma profundidade de 90% da profundidade mínima da amostra nos conjuntos de dados ASV (16S rRNA). A comparação dos índices de α -diversidade entre animais não afetados e moderadamente/severamente afetados foi realizada

utilizando o teste de soma de postos de Wilcoxon com correção de Holm para testes múltiplos. A β -diversidade foi visualizada utilizando um gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), e as diferenças na composição da comunidade entre os grupos (β -diversidade) foram estimadas por análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) utilizando a função Adonis. Para investigar a diferença em nível taxonômico entre animais não afetados e moderadamente/severamente afetados uma análise de abundância diferencial foi realizada utilizando o DESeq2 e os contrastes foram corrigidos para comparações múltiplas utilizando a correção de Benjamini-Hochberg.

3. RESULTADOS

Foram selecionados 23 animais, sendo que 11 (47,82%) eram fêmeas e 12 (52,18%) eram machos. O peso médio dos animais foi de 12,25 kg.

Em relação aos graus da SOAB, 13 animais foram classificados como grau 0 (56,52%), cinco como grau II (21,76%) e cinco (21,76%) como grau III. Na avaliação do grau de estenose de narina, seis animais (26,08%) apresentaram grau 0, oito (34,78%) grau I, seis (26,08%) grau II e três (13,04%) grau III.

Embora sejam sítios próximos, as amostras nasais e orofaríngeas apresentaram padrões de colonização distintos, com diferença estatisticamente significativa no índice de beta diversidade ($p < 0,05$), como demonstrado na figura 2.

Ao correlacionar o grau de SOAB com o microbioma nasal, não houve diferença estatística em alfa e beta diversidade, conforme demonstrado nas figuras 3A e 3B, respectivamente. Observou-se abundância relativa semelhante tanto em animais grau 0, quanto em II-III, com predominância marcante do gênero *Moraxella*, que representou mais de 75% da microbiota em ambos os grupos (figura 3C).

Ao avaliar o impacto da estenose nasal na microbiota nasal, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na diversidade beta (Figura 4A) ou alfa (Figura 4B). *Moraxella* foi o gênero mais abundante em todos os graus de estenose (Figura 4C).

Em relação à alfa e à beta-diversidade nas amostras orofaríngeas, não foram observadas diferenças significativas em comparação com o quadro clínico da síndrome e o microbioma orofaríngeo (Figura 5A e 5B). Analisando a abundância dos gêneros bacterianos nas amostras orofaríngeas houve predominância de *Conchiformibius*, seguido por *Porphyromonas*, *Haemophilus*, *Moraxella* e *Streptococcus*, respectivamente (Figura 5C).

4. DISCUSSÃO

Apesar da proximidade anatômica entre a cavidade nasal e orofaríngea, os resultados obtidos mostram que houve predominância de diferentes gêneros bacterianos, como *Conchiformibius* na orofaringe e *Moraxella* na cavidade nasal. Esses achados corroboram com Vangrinsven *et al* [12] que realizou um estudo envolvendo 46 cães, 12 dos quais eram de raças braquicefálicas.

Outro estudo sobre microbioma nasal e orofaríngeo em humanos mostrou que o microbioma orofaríngeo apresenta maior diversidade e abundância bacteriana do que o nasal [25]. Essas diferenças podem ser atribuídas a variações de pH, contato com a saliva e diferenças de temperatura. Um padrão semelhante foi observado no presente estudo, em que o microbioma orofaríngeo apresentou maior diversidade e abundâncias relativas distintas em comparação com o microbioma nasal, que foi fortemente dominado por *Moraxella*.

De modo geral, a maior diversidade alfa está associada a um microbioma mais saudável, enquanto índices de diversidade alfa mais baixos estão relacionados à disbiose, particularmente no microbioma fecal [27]. Entretanto, no contexto da microbiota nasal, diversos estudos descrevem predominância acentuada do gênero *Moraxella*, o qual é considerado um componente fundamental para a manutenção de um microambiente nasal saudável, sendo frequentemente encontrado em elevada abundância em cães mesocefálicos saudáveis [13].

Tress *et al* [26] examinou o microbioma nasal de três grupos de cães (saudáveis, acometidos por neoplasias e afetados por rinite crônica) relatando diminuição na abundância de *Moraxella* em cães com rinite, possivelmente associada ao grau de inflamação local. Apesar desses achados que correlacionaram inflamação nasal crônica com diminuição na abundância de *Moraxella*, cães da raça buldogue francês gravemente afetados pela SOAB não apresentaram tal variação no nosso estudo.

A predominância consistente do gênero *Moraxella* em todos os grupos avaliados, sugere que esse microrganismo pode representar um componente estável e possivelmente protetor do microambiente nasal em buldogues franceses, independente da gravidade da SOAB.

Comparado ao microbioma da laringe humana com AOS, os gêneros presentes em cães braquicefálicos neste estudo foram distintos, apresentando predominância de *Conchiformibius*, *Porphyromonas* e *Haemophilus*, enquanto humanos apresentaram maior abundância de *Streptococcus*, *Haemophilus* e *Neisseria*, conforme descrito por Lemon [25]. Além disso, o microambiente orofaríngeo não apresentou diferença significativa quando comparado com o estado clínico da SOAB. Assim, o microbioma orofaríngeo parece ser menos afetado por alterações respiratórias. Isso difere dos

achados na literatura sobre o microbioma orofaríngeo humano em indivíduos afetados pela AOS, onde são relatadas menor diversidade e abundância em comparação com humanos saudáveis [28].

A ausência de diferenças significativas na composição da microbiota nasal e orofaríngea entre cães afetados ou não pela SOAB não invalida a hipótese inicial que sugere que o microbioma das vias aéreas superiores pode apresentar relativa resiliência frente as alterações respiratórias crônicas associadas à síndrome.

Nosso estudo não está isento de limitações. O tamanho amostral reduzido, especialmente no grupo de animais classificados como grau III, pode ter limitado a detecção de diferenças entre os grupos. Além disso, por se tratar de um estágio intermediário da SOAB, o grau II representa uma condição moderadamente afetada, o que pode não refletir de forma adequada os extremos da doença. Essa limitação decorre da dificuldade em identificar pacientes da raça buldogue francês que apresentem sinais clínicos severos da síndrome na nossa região. Apesar das limitações, o delineamento adotado permite uma caracterização detalhada da microbiota nasal e orofaríngea em uma raça altamente predisposta à síndrome.

5. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que, nos graus avaliados, a SOAB não exerce influência sobre a composição da microbiota nasal e orofaríngea de cães da raça buldogue francês. *Moraxella* foi o gênero mais abundante na cavidade nasal cranial em ambos os grupos, enquanto *Conchiformibius* predominou na orofaringe. Além disso, o microbioma orofaríngeo apresentou maior diversidade relativa quando comparados ao microbioma nasal. Porém, devido às limitações, novos estudos são necessários.

6. REFERÊNCIAS

1. O'NEILL DG, SAHOTA J, BRODBELT DC, CHURCH DB, PACKER RM, PEGRAM C. 2022. Health of Pug dogs in the UK: disorder predispositions and protections. *Canine Med Genet.* 9:4. doi: 10.1186/s40575-022-00117-6. 243.
2. MENDES JUNIOR, A. F. et al.. Abordagem diagnóstica da síndrome braquicefálica em cães: revisão de literatura. *Research, Society And Development*, [S.L.], v. 10, n. 15, p. 1-9, 24 nov.2021. doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22684.
3. LAMEU, G. R. et al.. Síndrome braquicefálica em cães: revisão. *Pubvet*, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 17, out. 2020. Editora MV Valero. doi.org/10.31533/pubvet.v14n10a677.1-7.
4. LIU, N. C., SARGAN, D. R., ADAMS, V. J., & LADLOW, J. F. (2015). Characterization of Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome in French Bulldogs Using Whole-Body Barometric Plethysmography. *PloS one*, 10(6), e0130741. doi.org/10.1371/journal.pone.0130741.
5. ROEDLER, F. S., POHL, S., & OECHTERING, G. U. (2013). How does severe brachycephaly affect dog's lives? Results of a structured preoperative owner questionnaire. *The Veterinary Journal*, 198(3), 606-610. doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.09.009.
6. MITZE, S., BARRS, V. R., BEATTY, J. A., HOBI, S., & BĘCZKOWSKI, P. M. (2022). Brachycephalic obstructive airway syndrome: much more than a surgical problem. *Veterinary Quarterly*, 42(1), 213-223. doi.org/10.1080/01652176.2022.2145621.
7. PLANELLAS, M., CUENCA, R., TABAR, M. D., BERTOLANI, C., PONCET, C., CLOSA, J. M., LORENTE, J., CERÓN, J. J., & PASTOR, J. (2012). Evaluation of C-11 reactive protein, haptoglobin and cardiac troponin 1 levels in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome. *BMC veterinary research*, 8, 152. doi.org/10.1186/1746-6148-8-152.
8. HENDRICKS JC, KLINE LR, KOVALSKI RJ, O'BRIEN JA, MORRISON AR, PACK AI: The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol.* 1987, 63: 1344 1350. doi.org/ 10.1152/jappl.1987.63.4.1344.
9. BERNARTE F, TALAVERA J, LEEMANS J, HAMAIDE A, CLAEYS S, KIRSCHVINK N, CLERCX C: Description of original endoscopic findings and respiratory functional assessment using barometric whole-body plethysmography in dogs suffering from brachycephalic airway obstruction syndrome. *Vet J.* 2010, 183: 95-102. 10.1016/j.tvjl.2008.09.009.
10. DE STEENHUIJSEN PITERS, W. A., SANDERS, E. A., & BOGAERT, D. (2015). The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1675), 20140294. doi.org/ 10.1098/rstb.2014.0294.

11. WU, B. G., SULAIMAN, I., WANG, J., SHEN, N., CLEMENTE, J. C., Li, Y., ... & SEGAL, L.N. (2019). Severe obstructive sleep apnea is associated with alterations in the nasal microbiome and an increase in inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 199(1), 99-109. doi.org/ 10.1164/rccm.201801-0119OC.
12. VANGRINSVEN, E., FASTRÈS, A., TAMINIAU, B., FRÉDÉRIC, B., DAUBE, G., & CLERCX, C. (2021). Variations in facial conformation are associated with differences in nasal microbiota in healthy dogs. *BMC veterinary research*, 17(1), 1- 284 16. doi.org/10.1186/s12917-021-03055-w
13. ERICSSON AC, PERSONETT AR, GROBMAN ME, RINDT H, REINERO CR. Composition and Predicted Metabolic Capacity of Upper and Lower Airway Microbiota of Healthy Dogs in Relation to the Fecal Microbiota. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154646. doi.org/10.1371/journal.pone.0154646.
14. ISIAH, A., HOFFMANN, A. R., KELLEY, R., MUNDELL, P., STEINER, J. M., & SUCHODOLSKI, J. S. (2017). Characterization of the nasal and oral microbiota of detection dogs. *PloS one*, 12(9), e0184899. doi: 10.1371/journal.pone.0184899.
15. EKENSTEDT, K. J., CROSSE, K. R., & RISSELADA, M. (2020). Canine brachycephaly: anatomy, pathology, genetics and welfare. *Journal of comparative pathology*, 176, 109-115. doi.org/ 10.1016/j.jcpa.2020.02.008.
16. LIU, N. C., SARGAN, D. R., ADAMS, V. J., & LADLOW, J. F. (2015). Characterisation of Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome in French Bulldogs Using Whole-Body Barometric Plethysmography. *PloS one*, 10(6), e0130741. doi.org/10.1371/journal.pone.0130741.
17. LAFLAMME, D. R. P. C. (1997). Developmental and validation of a body condition score system for dogs.
18. LIU, N. C., SARGAN, D. R., ADAMS, V. J., & LADLOW, J. F. (2015). Characterisation of brachycephalic obstructive airway syndrome in French bulldogs using whole-body barometric plethysmography. *PloS one*, 10(6), e0130741. doi.org/10.1371/journal.pone.0130741.
19. PIROLO, M., ESPINOSA-GONGORA, C., ALBERDI, A., EISENHOFER, R., SOVERINI, M., ERIKSEN, E. Ø., ... & GUARDABASSI, L. (2023). Bacterial topography of the upper and lower respiratory tract in pigs. *Animal Microbiome*, 5(1), 5. doi: 10.1186/s42523-023-00226-y.
20. CALLAHAN, B. J., MCMURDIE, P. J., ROSEN, M. J., HAN, A. W., JOHNSON, A. J. A., & HOLMES, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583. doi: 10.1038/nmeth.3869.
21. SASADA R, WEINSTEIN M, PREM A, JIN M, BHASIN J. (2020). FIGARO: an efficient and objective tool for optimizing microbiome rRNA gene trimming parameters. *J Biomol Tech*. 31:S2.
22. QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., ... & GLÖCKNER, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596. doi: 10.1093/nar/gks1219.

23. DAVIS, N. M., PROCTOR, D. M., HOLMES, S. P., RELMAN, D. A., & CALLAHAN, B. J. (2018). Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*, 6(1), 226. doi: 10.1186/s40168-018-0605-2.
24. MCMURDIE, P. J., & HOLMES, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
25. LEMON KP, VSCHIFFER HKBRODIE EL, SV, R. (2010) .Comparative Analyses of the Bacterial Microbiota of the Human Nostril and Oropharynx. *mBio*1:10.1128/mbio.00129-10.<https://doi.org/10.1128/mbio.00129-10>.
26. TRESS, B. et al. (2017). Bacterial microbiome of the nose of healthy dogs and dogs with nasal disease. *PloS one*, v. 12, n. 5, p.e0176736. DOI: 10.1371/journal.pone.0176736.
27. PISANI, A., RAUSCH, P., BANG, C., ELLUL, S., TABONE, T., MARANTIDIS CORDINA, C., ... & ELLUL, P. (2022). Dysbiosis in the gut microbiota in patients with inflammatory bowel disease during remission. *Microbiology spectrum*, 10(3), e00616-22. DOI: 10.1128/espectro.00616-22.
28. YANG, W., SHAO, L., HEIZHATI, M., WU, T., YAO, X., WANG, Y., ... & LI, N. (2019). Oropharyngeal microbiome in obstructive sleep apnea: decreased diversity and abundance. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 15(12), 1777-1788. DOI: 10.5664/jcsm.8084.

TEBELA

Tabela 1. Sistema de graduação da Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB), antes e após teste de tolerância ao exercício (TTE).

Graus	Pré-Exercício Pós-exercício	Ruído Respiratório Anormal	Esforço Inspiratório	Dispneia, Cianose, Síncope
Grau 0	Pré-exercício Pós-exercício	Não audível Não audível	Não presente Não presente	Não presente Não presente
Grau I	Pré-exercício Pós-exercício	Não audível para leve a moderado, estertor nasal intermitente ao cheirar Leve a moderado, estertor nasal intermitente ao cheirar	Não presente Não presente	Não presente Não presente
Grau II	Pré-exercício Pós-exercício	Leve a moderado Moderado a grave ou estridor leve	Leve a moderado Moderado a grave	Não presente Dispneia leve, cianose e síncope não presentes
Grau III	Pré-exercício Pós-exercício	Moderado a grave Grave	Moderado a grave Grave	Dispneia moderada ou grave; com ou sem cianose; incapacidade ao exercício Dispneia grave; pode ou não apresentar dispneia ou síncope

FIGURAS

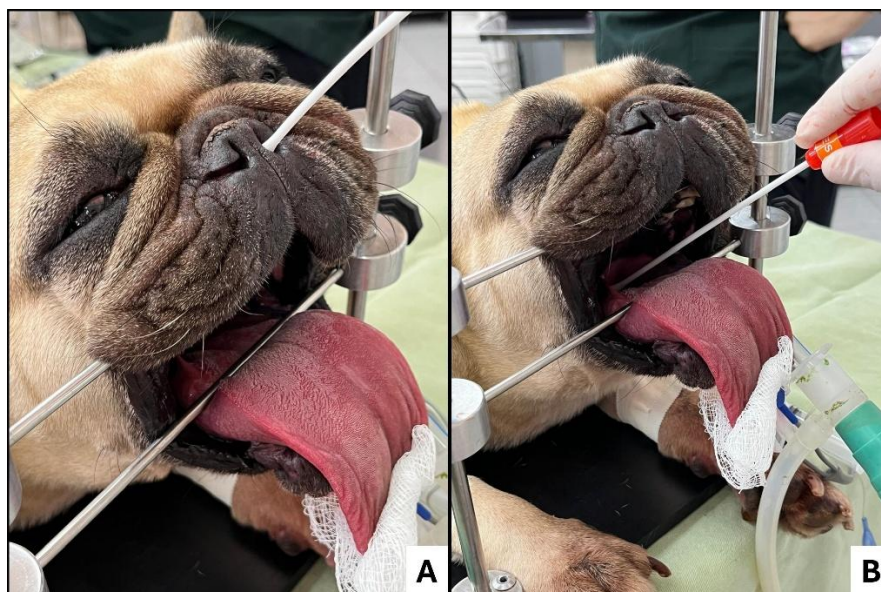


Figura 1. Representação gráfica da coleta do microbioma nasal (A) e orofaríngeo (B) utilizando cotonetes estéreis em cães da raça buldogue francês afetados (“sick”; grau II-III) ou não (“healthy”; grau 0) pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB).

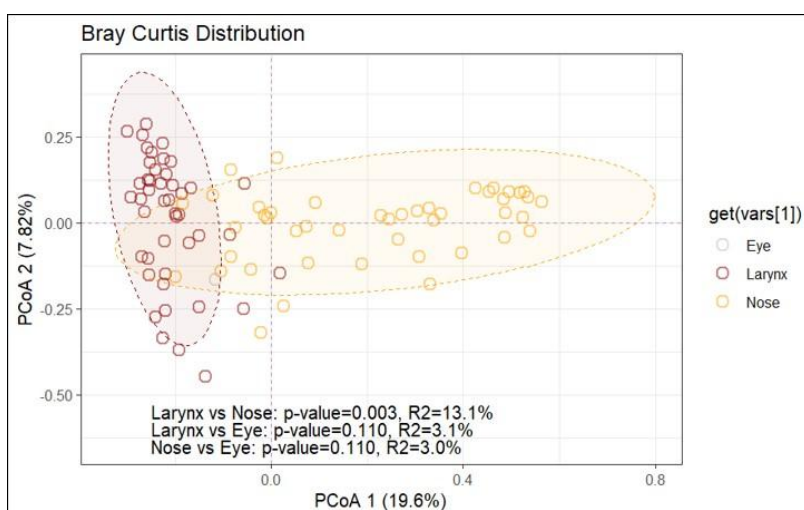


Figura 2. Representação gráfica da beta diversidade em amostras coletadas da cavidade nasal e orofaríngea de cães braquicefálicos da raça buldogue francês afetados (“sick”; grau II-III) ou não (“healthy”; grau 0) pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB).

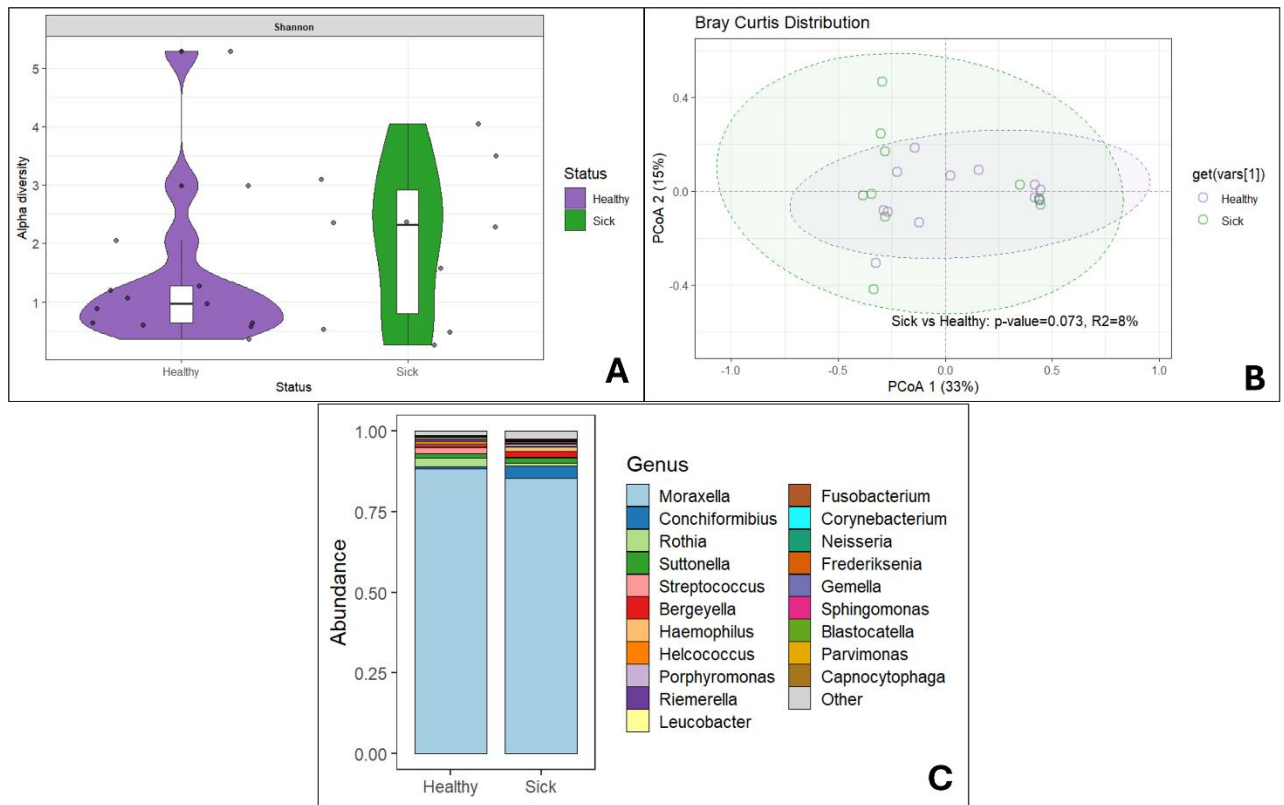


Figura 3. Representação gráfica da diversidade alfa (A), beta (B) e abundância relativa dos gêneros bacterianos (C) do microbioma nasal de cães da raça buldogue francês afetados (“sick”; grau II-III) ou não (“healthy”; grau 0) pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB).

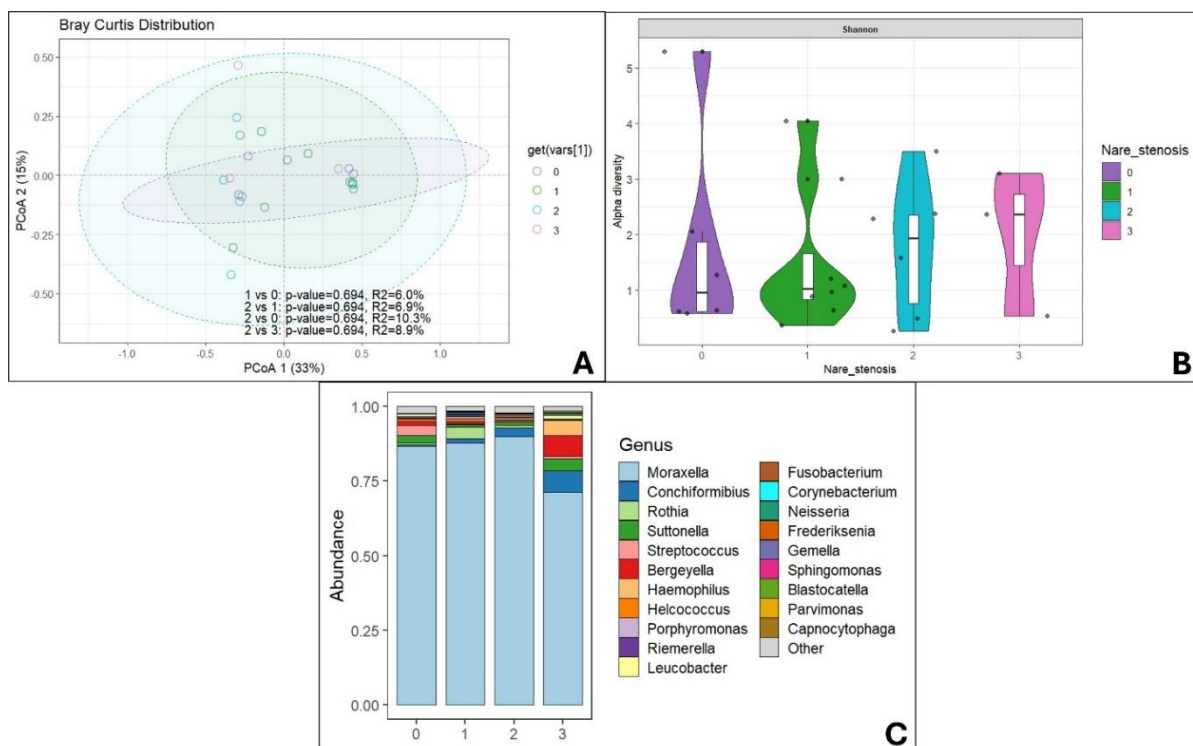


Figura 4. Representação gráfica da diversidade alfa (A), beta (B) e abundância relativa de gêneros bacterianos (C) presentes nas narinas de cães da raça buldogue francês em relação aos graus de estenose nasal (grau 0, I, II e III).

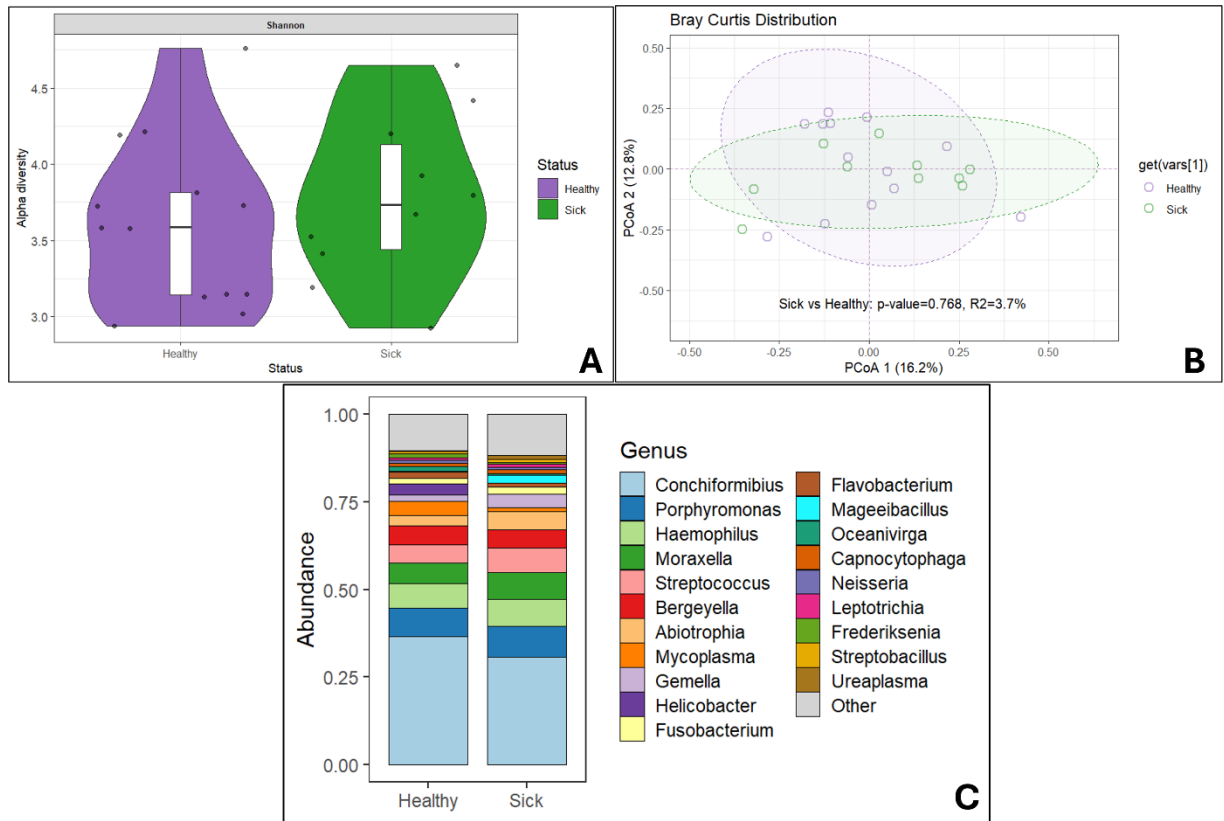


Figura 5. Representação gráfica da diferença na diversidade alfa (A), beta (B) e abundância relativa dos gêneros bacterianos (C) do microbioma orofaríngeo de cães da raça buldogue francês afetados (“sick”; grau II-III) ou não (“healthy”; grau 0) pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB).