

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA NA ÁREA SUBGLÓTICA
EM PUGS AFETADOS OU NÃO PELA SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA
BRAQUICEFÁLICA (SOAB)**

Diego Fabián Paspuel Fraga

Médico Veterinário

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA NA ÁREA SUBGLÓTICA
EM PUGS AFETADOS OU NÃO PELA SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA
BRAQUICEFÁLICA (SOAB)**

Discente: Diego Fabián Paspuel Fraga

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paola Castro Moraes

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias.

F811d

Fraga, Diego Fabián Paspuel

Determinação da composição da microbiota na área subglótica em pugs afetados ou não pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB) / Diego Fabián Paspuel Fraga. -- Jaboticabal, 2026

43 p.

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

Orientadora: Paola Castro Moraes

1. Cirurgia veterinária. 2. Medicina veterinária. 3. Microbiologia. 4. Ecologia microbiana. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

A presente pesquisa estabelece um marco científico ao determinar o perfil taxonômico do microbioma respiratório cranial em cães da raça pug, demonstrando a correlação direta entre a gravidade da Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB) e o desenvolvimento de disbiose por meio de sequenciamento de alto rendimento das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA. Os resultados revelam de forma inédita que as alterações biomecânicas e a pressão inspiratória negativa extrema geradas pela possível obstrução em pacientes Grau III impõem uma perda da dominância do gênero *Moraxella* e o que sugere uma translocação bacteriana de táxons oportunistas e tipicamente orais, como *Conchiformibius* e *Porphyromonas*, validadas estatisticamente através da análise de diversidade beta (distância de Bray-Curtis) e correlacionados com a diversidade alfa e a dominância relativa, enquanto o nicho orofaríngeo manifesta uma disbiose basal precoce e estável ligada à conformação racial e ao refluxo gastresofágico crônico.

Potential impact of this research

This research provides a significant scientific contribution by determining the taxonomic profile of the cranial respiratory microbiome in pug dogs, demonstrating a direct correlation between Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome (BOAS) severity and dysbiosis development via high-throughput sequencing of the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene. The novel findings reveal that altered respiratory biomechanics and extreme negative inspiratory pressure generated by potential obstruction in Grade III patients impose a loss of *Moraxella* genus dominance, strongly suggesting bacterial translocation of opportunistic, typically oral-associated taxa such as *Conchiformibius* and *Porphyromonas*, which was statistically validated through beta diversity analysis (Bray-Curtis distance matrices) and further correlated with alpha diversity indices and relative abundance shifts, whereas the oropharyngeal niche displays an early, stable baseline dysbiosis driven by breed conformation and chronic gastroesophageal reflux.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA NA ÁREA SUBGLÓTICA EM PUGS AFETADOS OU NÃO PELA SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA BRAQUICEFÁLICA (SOAB)

AUTOR: DIEGO FABIÁN PASPUCEL FRAGA

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

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



Documento assinado digitalmente

PAOLA CASTRO MORAES

Data: 07/05/2026 13:54:57-0300

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: 10/05/2026 18:14:59-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. LUCIANO MELO DE SOUZA (Participação Virtual)

Departamento de Parasitologia Veterinária / Universidade Brasil (UB) - Descalvado/SP



Documento assinado digitalmente

ANNELISE CARLA CAMPESI DOS SANTOS

Data: 07/05/2026 14:48:29-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPESI DOS SANTOS (Participação Presencial)

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV

Jaboticabal, 07 de maio de 2026.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Diego Fabián Paspuel Fraga - Nascido em 01 de junho de 1988 na cidade Ibarra, Imbabura, Equador. Graduado em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidade Central de Equador (UCE), Quito – Equador, entre os anos de 2018 e 2023. Atuou como estagiário fazendo intercambio internacional no Hospital veterinário “Governador Laudo Natel” no câmpus da UNESP – Jaboticabal na área de nutrição clínica de cães e gatos no atendimento clinico e o laboratório de pesquisa de nutrição entre setembro 2019 até março 2020. Atualmente, realiza o programa de Mestrado do programa de Ciências Veterinárias da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da profa. Dr^a. Paola Castro Moraes e com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – PROEX. Atua junto ao Serviço de Cirurgia Geral e Endoscopia Veterinária (CIGEV) do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Si el mal es contagioso, el bien también lo es.

Dejémonos contagiar por el bien.

Se o mal é contagioso, o bem também é.

Deixemo-nos contagiar pelo bem

Papa Francisco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me abençoado com a oportunidade de realizar este sonho. Agradeço por ser meu guia em cada viagem, por me sustentar nos momentos difíceis e por renovar meu discernimento e sabedoria em cada etapa da minha jornada acadêmica.

À minha querida mãe, Fátima Fraga, por ser meu maior exemplo de luta e perseverança. Seu apoio e seus conselhos foram o combustível que me impediu de desanimar nos momentos mais exaustivos.

À memória da minha avó, María Inés Salazar, cujas lições de vida e sabedoria continuam guiando meus passos. Espero que, de onde estiver, sinta orgulho do ser humano que me tornei.

Ao meu pai Fabián Paspuel, aos meus irmãos Dario, Pablo e Gabriel, à minha irmã Lizeth e aos meus sobrinhos Aren, Benjamín, Joshua e Thiago e minhas primas Dayitos e Nathaly, pelo amor incondicional e por entenderem que meus sonhos profissionais estavam em outro país. Agradeço por terem sido meu porto seguro, por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidei e por todo o sacrifício feito para que eu pudesse alcançar todas as minhas metas.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) e a toda a equipe CIGEV, por abrirem as portas do conhecimento e proporcionarem o ambiente ideal para minha formação profissional e pessoal, oferecendo a estrutura e a ajuda necessárias para o desenvolvimento deste estudo.

Aos amigos que, mesmo estando a mais de 6.000 km de distância, sempre me apoiaram tanto em momentos bons quanto ruins: Adriana, Edwin, Elizabeth, Gabriela, Miriam, Paola, Sofy e Viviana, que mais que amigos, tornaram-se parte importante da minha família. Além dos meus amigos equatorianos, também devo mencionar os meus amigos brasileiros que fiz em Jaboticabal durante minha jornada acadêmica; mais que amigos, são meus irmãos internacionais. Fica meu eterno agradecimento e admiração a Andressa, Amanda, Barbara, Elaine, Gabriel (Vegan), Giulia, Herlem, Isabella, Hugo, Jessica, João, Juan, Kelly, Lizeth, Madu, Pedro e Thales.

Agradeço também a toda a equipe do Grupo de Cirurgia Geral e Endoscopia Veterinária - CIGEV com a qual trabalhei no decorrer deste projeto, especialmente a Herlem, Bárbara, Ariadne, Jessica, Isabella, Guilherme, Carol, Mareliza, Júlia e Mirella. Sem vocês, todo este trajeto teria sido mais difícil; sou muito agradecido pelo aprendizado durante este período.

À minha orientadora, Professora Dr^a. Paola Castro Moraes, pela oportunidade e confiança. Agradeço por todos os ensinamentos, pela paciência e por ser um exemplo de profissionalismo que carregarei sempre comigo.

Aos docentes e funcionários, que são a engrenagem principal para que a universidade funcione. Em especial, aos profissionais e funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HV) - UNESP, que colaboraram diretamente com o meu aprendizado prático e rotina de trabalho.

Aos amigos que a pós-graduação me trouxe, por estarem ao meu lado em momentos essenciais, dividindo angústias e alegrias. Vocês tornaram essa jornada mais leve, mesmo estando longe de casa.

Às instituições de fomento (CAPES/FAPESP), pelo apoio financeiro indispensável para a condução e viabilização deste estudo.

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

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta trajetória.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Classificação da síndrome obstrutiva aérea braquicefálica (SOAB)	19
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivos Gerais.....	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. JUSTIFICATIVA	24
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	¡Error! Marcador no definido.
5.1. Seleção dos Pacientes.....	25
5.2. Classificação da síndrome obstrutiva aérea braquicefálica (SOAB)	25
5.3. Colheita de amostras	26
5.3.1. <i>Extração de DNA e sequenciamento</i>	27
5.3.2. <i>Análise bioinformática</i>	27
5.4. Análise estatística	28
6. RESULTADOS	28
7. DISCUSSÃO.....	34
8. CONCLUSÃO	25
9. REFERÊNCIAS	39



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de marcadores de inflamação aguda e crônica e determinação da composição da microbiota nasal, laringea e intestinal em cães braquicefálicos das raças buldogue francês e pug, afetados ou não pela Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB)", protocolo n.º 9555/23, sob a responsabilidade da Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 21 de novembro de 2023.

Vigência do Projeto	10/12/2023 a 07/11/2025
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	60
Peso / Idade	5 a 15 kg / 1 a 5 anos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Rotina do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – FCAV UNESP – Jaboticabal-SP.

Jaboticabal, 21 de novembro de 2023.


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

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcavunesp.br

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA NA ÁREA SUBGLÓTICA EM PUGS AFETADOS OU NÃO PELA SÍNDROME OBSTRUTIVA AÉREA BRAQUICEFÁLICA (SOAB)

RESUMO

A síndrome obstrutiva aérea braquicefálica (SOAB) é uma condição multissistêmica complexa em que deformidades anatômicas estruturais alteram a dinâmica do fluxo aéreo e induzem inflamação crônica, comprometendo a homeostase do trato respiratório cranial superior. Este estudo objetivou caracterizar e comparar a composição e diversidade da microbiota nasal e orofaríngeo de cães braquicefálicos da raça pug. Foram selecionados 22 cães desta raça, classificados clinicamente em grupos de acordo com a gravidade da SOAB: levemente afetados (grau I), moderadamente afetados (grau II) e gravemente afetados (grau III). Amostras de swabs nasal e orofaríngeo foram submetidas ao sequenciamento de alto rendimento das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA. As análises de diversidade alfa (Chao1, Shannon) e beta (Bray-Curtis PCoA) foram processadas para identificar biomarcadores microbianos. Os resultados revelaram que a gravidade da SOAB é um determinante crítico da disbiose nasal. Pacientes gravemente afetados (grau III) apresentaram uma perda significativa da dominância de *Moraxella* e um enriquecimento de táxons tipicamente orais, como *Conchiformibius* e *Porphyromonas*. A análise de diversidade beta demonstrou uma separação clara entre os perfis nasais dos diferentes graus ($p < 0,05$), sugerindo que a pressão negativa severa sugere translocação bacteriana. Em contrapartida, a microbiota orofaríngea mostrou-se estável e sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$), indicando que a conformação racial e fatores como o refluxo gastroesofágico, estabelecem disbiose basal precoce neste nicho. A progressão da SOAB altera o microambiente nasal, provavelmente favorecendo a translocação bacteriana.

Palavras-chave: 16S rRNA; braquicefálico; disbiose; microbioma; SOAB translocação bacteriana.

DETERMINATION OF THE MICROBIOTA COMPOSITION IN THE SUBGLOTTIC AREA OF PUGS AFFECTED OR NOT BY BRACHYCEPHALIC OBSTRUCTIVE AIRWAY SYNDROME (BOAS)

ABSTRACT

Brachycephalic obstructive airway syndrome (BOAS) is a complex multisystemic condition in which structural anatomical deformities alter airflow dynamics and induce chronic inflammation, thereby compromising upper cranial respiratory tract homeostasis. This study aimed to characterize and compare the composition and diversity of the nasal and oropharyngeal microbiome in brachycephalic dogs of the pug breed. Twenty-two pugs were selected and clinically classified into groups according to BOAS severity: mildly affected (grade I), moderately affected (grade II), and severely affected (grade III). Nasal and oropharyngeal swab samples were subjected to high-throughput sequencing of the V3–V4 regions of the 16S rRNA gene. Alpha diversity (Chao1, Shannon) and beta diversity (Bray-Curtis PCoA) analyses were processed to identify microbial biomarkers. The results revealed that BOAS severity is a critical determinant of nasal dysbiosis. Severely affected patients (grade III) exhibited a significant loss of *Moraxella* dominance along with an enrichment of typically oral-derived taxa, such as *Conchiformibius* and *Porphyromonas*. Beta diversity analysis demonstrated a clear separation among the nasal profiles of the different clinical grades ($p < 0.05$), suggesting that severe negative pressure could drive bacterial translocation. Conversely, the oropharyngeal microbiome remained stable, showing no statistically significant differences among groups ($p > 0.05$), which indicates that breed conformation and factors such as gastroesophageal reflux establish an early basal dysbiosis in this niche. In conclusion, BOAS progression alters the nasal microenvironment, likely promoting oronasal bacterial translocation.

Keywords: 16S rRNA; bacterial translocation; BOAS; brachycephalic; dysbiosis; microbiome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciação entre os nichos nasal e orofaríngeo de cães da raça pug acometidos pela SOAB. Jaboticabal, 2026.	29
Figura 2: Impacto da gravidade da SOAB na estrutura microbiana de cães da raça pug. Jaboticabal, 2026.	30
Figura 3: Abundância relativa de gêneros bacterianos na microbiota nasal comparando cães da raça pug levemente (Grau I) e gravemente acometidos (Grau III) pela SOAB. Jaboticabal, 2026.....	31
Figura 4: Variabilidade na diversidade alfa e beta correlacionada a estenose de narina e a progressão da Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB) em cães da raça pug. Jaboticabal, 2026.	32
Figura 5: Variabilidade na diversidade alfa (A) e beta (B) na microbiota orofaríngeo correlacionada com a progressão da Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB) em cães da raça pug. Jaboticabal, 2026.....	33
Figura 6: Análise da abundância relativa de gêneros bacterianos na microbiota orofaríngeo de pugs levemente e gravemente afetados pela SOAB. Jaboticabal, 2026.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistema de graduação visual e funcional da estenose de narinas (SOAB)	22
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sistema de graduação funcional da síndrome obstrutiva aérea braquicefálica (SOAB) baseada nos sinais respiratórios antes e após teste de tolerância ao exercício (TTE).	20
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rRNA – Gen 16S Ácido Ribonucleico Ribossômico.
AOS – Apneia Obstrutiva do Sono
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CIGEV – Serviço de Cirurgia Geral e Endoscopia Veterinária.
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
ECC – Escore de Condição Corporal.
FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
HV – Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.
PCoA – Análise de Coordenadas Principais (Principal Coordinates Analysis).
pH - Potencial Hidrogeniônico
PROEX: Pró-Reitoria de Extensão Universitária.
SOAB – Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica.
SP - São Paulo
TTE – Teste de Tolerância ao Exercício.
UCE – Universidad Central del Ecuador.
UNESP – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB) é definida como uma condição clínica resultante de anomalias anatômicas primárias e secundárias que comprometem a viabilidade do fluxo aéreo em raças que apresentam encurtamento do crânio (O'Neill *et al.*, 2015). Essas alterações são severas pelo fato de que o crescimento dos tecidos moles não acompanha a redução drástica do crânio facial (Mitze *et al.*, 2022). As principais malformações incluem a estenose de narinas, o prolongamento do palato mole, a eversão de sacos laríngeos e a hipoplasia traqueal e/ou laríngea, colapso traqueal e bronquial. Todas essas componentes da síndrome aumentam a resistência das vias aéreas, exigindo que o animal execute um esforço inspiratório superior ao normal para manter a troca gasosa adequada (Fabris *et al.*, 2025).

Essa fisiopatologia é corroborada por Mendes Junior *et al.* (2021), que ressalta que a cronicidade da síndrome leva a alterações metabólicas importantes e à fadiga da musculatura acessória, visto que o animal permanece em um estado de hipóxia relativa e estresse físico contínuo. Somado a isso, a turbulência exacerbada do fluxo aéreo e a inflamação constante alteram profundamente o microambiente local, tornando suscetível a desequilíbrios biológicos que superam as barreiras anatômicas e comprometem a proteção natural do epitélio respiratório (Mendes Junior *et al.*, 2021a). Sob essa perspectiva, a síndrome deve ser compreendida como uma patologia progressiva, na qual a agressão mecânica constante resulta na degradação funcional e biológica do trato respiratório cranial.

Essa síndrome possui caráter genético e intrínseco à conformação extrema das raças braquicefálicas, sendo resultado de uma seleção artificial que priorizou o encurtamento do crânio. Dentre as raças mais predispostas, destacam-se: boston terrier, boxer, buldogue francês, buldogue inglês, cavalier king charles spaniel, chihuahua, lhasa apso, maltês, pequinês, pug, shih tzu e yorkshire terrier (Bilhalva, 2020).

As implicações da SOAB transcendem o trato respiratório, manifestando-se como uma desordem multissistêmica. As alterações cardíacas nesses pacientes podem se desenvolver devido ao aumento da atividade simpática, resultante da privação do sono e causas de hipoxemia repetitivas, levando a baixa saturação arterial e ativação de citocinas pró-inflamatórias (Planellas *et al.*, 2012). Além disso, sinais gastrintestinais estão frequentemente presentes e relacionados a variações anatômicas como a atonia do cárdias, desvio esofágico, e estase gástrica (Poncet *et al.*, 2005). O aumento da pressão negativa diafragmática, exacerbado pelo esforço respiratório e pela ocorrência de hérnia hiatal, favorece o refluxo gastroesofágico e a consequente inflamação orofaríngea nestes cães (Bernaerts *et al.*, 2010; Poncet *et al.*, 2005).

A inflamação crônica e a presença de conteúdo gástrico decorrente do refluxo introduzem variáveis críticas ao ecossistema microbiano, alterando o pH local e as condições ambientais dessa região, além da pressão negativa exacerbada da SOAB que facilita a translocação bacteriana, funcionando como um mecanismo físico que aspira microrganismos da orofaringe para a cavidade nasal ou vice-versa (Ruparell *et al.*, 2020). Esse fenômeno é potencializado por diferenças anatômicas no esôfago cervical de braquicefálicos, que favorecem a estase e o refluxo (Santos *et al.*, 2025), servindo como uma condição para migração de táxons entre nichos orais distintos, como a gengiva e a mucosa bucal, que normalmente abrigam populações bacterianas isoladas (Ruparell *et al.*, 2020).

No caso específico dos pugs, a conformação estreita das narinas e o edema persistente da mucosa, frequentemente documentados em achados endoscópicos de obstrução das vias aéreas, onde criam um ambiente propício para o estabelecimento desses táxons oportunistas (De Carvalho *et al.*, 2022). Essa instabilidade rompe as barreiras biológicas naturais, alterando a diversidade das comunidades respiratórias conforme a progressão da síndrome (De Carvalho *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2025).

Portanto, o presente estudo justifica-se pela necessidade de unir a compreensão da fisiopatologia e inflamação com a análise da ecologia microbiana. A caracterização do microbioma de pugs afetados pela SOAB visa identificar como a obstrução física gera uma disbiose que altera o microbioma nesses nichos. Compreender a translocação e a perda de diversidade microbiana é um passo

essencial para caracterizar o microbioma nasal e orofaringe de acordo com o grau de acometimento e progressão da síndrome.

Considerando a lacuna de conhecimentos em relação a composição taxonômica de microrganismo presentes na área orofaringe de cães afetados pela SOAB, este estudo propõe a determinação e comparação da composição da microbiota orofaríngea em cães da raça pug gravemente afetados (grau III) e levemente afetados (grau I) pela SOAB.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A Síndrome Obstrutiva Respiratória Braquicefálica (BOAS), que afeta cães e gatos, levando-os a desenvolver distúrbios respiratórios por deformidades anatômicas, é atualmente muito comum na clínica diária de pequenos animais devido à crescente popularidade dessas raças como animais de companhia (Andrews *et al.*, 2023).

Alguns estudos tem mostrado que as raças de cães braquicefálicos mais afetadas pela síndrome BOAS foram: pugs, bulldog francês e inglês (Liu *et al.*, 2017), levando-os a uma expectativa de vida mais curta e predisposição a desenvolver doenças do trato respiratório superior em comparação com outros tipos de raças de cães com outros tipos de conformação como: mesocéfalos ou dolicocefalos (O'Neill *et al.*, 2015). Atualmente se conhece que a síndrome varia conforme ao acometimento e evolução dos graus da BOAS, que vão de 0 a III. Sendo que o grau 0 não apresenta sinais clínicos patológicos, pelo que é considerado livre da doença, grau I é considerado leve, onde o cão não apresenta intolerância ao exercício, mas tem ruído estertoroso, grau II é moderado, a clínica do animal é proeminente, requerendo um manejo já seja clínico ou cirúrgico dependendo da avaliação da progressão da síndrome, e finalmente, o grau III é grave, onde o animal pode apresentar uma obstrução contínua e grave do trato respiratório superior e pelo que é importante a indicação cirúrgica imediata (Liu *et al.*, 2015).

Cães da raça pug foram selecionados e classificados em grupos de acordo com o grau de severidade da SOAB (item 2.1). Os critérios de inclusão foram: animais com idade entre 1 e 8 anos e peso médio entre 5 e 15 quilogramas. Foram excluídos animais que receberam terapia antimicrobiana nos dois meses antes à colheita das

amostras. O recrutamento dos pacientes ocorreu por meio de redes sociais, panfletos (flyers) e contato com criadores.

2.1. Classificação da síndrome obstrutiva aérea braquicefálica (SOAB)

O escore de peso e condição corporal (ECC, escala de 1 a 9) foram registrados de acordo com o estabelecido por LaFlamme (1997), conjuntamente com a idade e o sexo de cada animal. Cada cão incluído neste estudo foi classificado de acordo com o índice SOAB, validado por Liu *et al.* (2015). Este índice utiliza graduação funcional dividida em quatro graus (Quadro 1) baseado nas avaliações realizadas antes e após três minutos do teste de tolerância ao exercício. Grau 0 são pacientes que não apresentam sinais da síndrome, grau I inclui cães que apresentam sinais respiratórios discretos que não pioravam após o teste de tolerância ao exercício e são considerados clinicamente estáveis para a sua raça. Pacientes classificados como grau II (síndrome moderada) são aqueles que requerem atenção médica para perda de peso e/ou tratamento cirúrgico. Grau III (síndrome grave) são aqueles cães que requerem intervenção cirúrgica imediata.

Neste estudo, optou-se por utilizar como grupos amostrais estritos apenas indivíduos classificados nos graus I e III. Essa delimitação metodológica justifica-se pela ausência de indivíduos grau 0 e também pela necessidade de estabelecer um contraste biológico e fenotípico claro entre os extremos da manifestação clínica da enfermidade (comparando indivíduos leve e gravemente afetados).

Quadro 1: Sistema de graduação funcional da síndrome obstrutiva aérea braquicefálica (SOAB) baseada nos sinais respiratórios antes e após teste de tolerância ao exercício (TTE).

		Sons respiratórios ^a	Esforço inspiratório ^b	Dispneia, síncope ^c	cianose,
Grau 0	Pré TTE	Não audíveis	Ausente	Ausente	
	Pós TTE	Não audíveis	Ausente	Ausente	
Grau I	Pré TTE	Não audíveis ou discretos	Ausente	Ausente	
	Pós TTE	Discretos	Ausente discreto	ou Ausente	
Grau II	Pré TTE	Discretos moderados	Discreto moderado	a Ausente	
	Pós TTE	Moderados a graves	Moderado severo	a Dispneia discreta, cianose ou síncope ausentes	
Grau III	Pré TTE	Moderados a graves	Moderado severo	a Dispneia moderada a grave, pode ou não apresentar cianose. Intolerância ao exercício	
	Pós TTE	Graves	Graves	Dispneia grave, pode ou não apresentar cianose ou síncope	

Fonte: CIGEV adaptado de(Liu *et al.*, 2017)

Este sistema de graduação foi estabelecido e validado previamente (Liu *et al.*, 2015).. A classificação clínica é baseada em sinais respiratórios antes (pré TTE) e imediatamente após teste de tolerância a exercício de três minutos (pós TTE) com velocidade de trote de aproximadamente 6 a 8 quilômetros por hora realizado pelos investigadores. Apresentação de pelo menos um sinal do grau mais alto determina o resultado final em escore.

- a) **Sons respiratórios** serão diagnosticados por meio de auscultação nasofaríngea. Discretos: aquelas audíveis apenas sob auscultação; moderados: audíveis de forma intermitente, sem a necessidade de estetoscópio; severos: constantemente audíveis, sem necessidade de estetoscópio.
- b) **Ciclo respiratório** anormal caracterizado por evidência de aumento do esforço para inalar o ar, com uso do diafragma e ou músculos acessórios e ou alargamento nasal com aumento de ofegação. Suave: respiração com padrão regular e mínimo

uso do diafragma; moderado: evidência de uso do diafragma e músculos acessórios da respiração; grave: marcado uso do diafragma e músculos acessórios da respiração.

- c) Cães que apresentarem episódios de síncope e ou cianose como documentado pelo tutor, por meio da avaliação por questionário, serão classificados como grau III sem o TTE. Dispneia suave: apresentação de sinais de desconforto; moderada: respiração irregular e sinais de desconforto; grave: respiração irregular com sinais de desconforto e dificuldade respiratória.

Tal avaliação fundamentou-se em critérios subjetivos validados, incluindo a auscultação faringolaríngea para detecção de estertor e estridor, observação do esforço inspiratório e monitoramento de sinais de hipóxia. Nos casos de intolerância grave ao esforço, em que os animais não conseguiram concluir o tempo total de teste devido à dispneia exacerbada, o grau III foi atribuído imediatamente.

Além disso, foi realizada a avaliação da estenose de narinas de acordo com a classificação visual proposta por Liu *et al.* (2017), que categoriza o grau de obstrução em quatro níveis: A) narinas abertas; B) estenose leve com um discreto estreitamento; C) estenose moderada com narinas abertas apenas na porção inferior; e D) estenose grave com narinas virtualmente fechadas. Esta escala permite correlacionar a restrição do fluxo de ar nasal com a gravidade clínica da SOAB, sendo um indicador preditivo fundamental para a necessidade de intervenção cirúrgica.

Tabela 1: Sistema de graduação visual e funcional da estenose de narinas (SOAB)

Aberta (A)		Moderadamente estenosada (C)	
Levemente estenosada (B)		Gravemente estenosada (D)	

Fonte: CIGEV adaptado de (Liu *et al.*, 2017)

Na Tabela 1, observa-se que a estenose de narinas é classificada em quatro categorias: A) Aberta: as narinas estão bem abertas e a asa do nariz não obstrui a passagem de ar, permitindo um intercâmbio gasoso adequado. B) Levemente estenosada: nota-se uma leve estenose na asa do nariz, mas a abertura e o fluxo de ar são minimamente afetados. C) Moderadamente estenosada: a asa do nariz toca o septo nasal, estreitando a abertura da narina. D) Gravemente estenosada: as narinas estão quase totalmente fechadas, sendo a abertura apenas uma fenda estreita que restringe a passagem do ar.

Adicionalmente, também já foi observado que alterações na microbiota nasal em humanos acometidos pela AOS está relacionada com processo de inflamação local (Wu *et al.*, 2019) e estudo em cães tem demonstrado alterações semelhantes (Vangrinsven *et al.*, 2023). Estudos metagênicos de amostras coletadas no terço distal da cavidade nasal de cães braquicefálicos demonstraram que estes possuem uma microbiota distinta aos cães meso e dolicocefálicos, apresentando maior diversidade de espécies α , e diminuição de proteobacteria associada ao aumento de

Actinobacteria e *Firmicutes*. Acredita-se que isso ocorra pelo refluxo de secreções orofaríngeas (Vangrinsven *et al.*, 2023).

Diversos estudos em humanos afetados pela AOS apresentaram alterações na população microbiana presente em diversos sistemas orgânicos, correlacionando-se em aumento de comorbidades de acordo com a gravidade da síndrome. Dada a semelhança da SOAB com a AOS, muitas evidências corroboram com repercussões sistêmicas similares (Castro Moraes *et al.*, 2025). Dessa forma, em decorrência ao aumento progressivo da popularidade de cães braquicefálicos em detrimento da perda de bem-estar devido às alterações estéticas, torna-se importante estudos que avaliem os impactos dessas alterações na manutenção da homeostase dos sistemas orgânicos, buscando evidências para elaboração de melhores estratégias de prevenção e tratamento (Ekenstedt *et al.*, 2020; Mitze *et al.*, 2022).

O microbioma constitui um ecossistema crítico para a homeostase do organismo, tanto na modulação imunológica quanto na exclusão competitiva de patógenos (de Córdoba-Ansón *et al.*, 2025). Em humanos, estudos demonstram que a estabilidade biológica da mucosa nasal está intrinsecamente associada à permeabilidade das vias aéreas. Nesse contexto, gêneros como *Moraxella* predominam no microbioma nasal de indivíduos saudáveis, exercendo um papel protetor potencial contra infecções oportunistas e emergentes (Yu *et al.*, 2022). No entanto, alterações estruturais e processos inflamatórios crônicos, tais como a hipertrofia de adenoides ou a AOS, induzem estados de disbiose e mudanças funcionais impulsionadas pela inflamação local e pela hipóxia (Jiang *et al.*, 2025; Xue *et al.*, 2025).

Analogamente, em estudos com cães, observou-se que a relação entre a homeostase e o microbioma nasal é influenciada por fatores como idade, peso, localização geográfica e características individuais, impactando na capacidade olfativa canina (Jenkins *et al.*, 2018). Segundo Tress *et al.* (2017), o microbioma nasal em cães saudáveis caracteriza-se por uma elevada diversidade taxonômica, com predominância dos gêneros *Moraxella*, *Neisseria* e *Pasteurella*. No entanto, partindo da premissa de que a composição microbiana apresenta natureza dinâmica, torna-se necessário investigar como variações na arquitetura anatômica das vias aéreas craniais podem induzir uma disbiose associada a processos inflamatórios crônicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Caracterizar a diversidade taxonômica de microrganismos presentes na orofaringe e nasal de cães da raça pug gravemente afetados (grau III) e levemente acometidos (grau I) pela SOAB.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a diversidade taxonômica de microrganismos presentes na área orofaríngea de cães pug gravemente acometidos (grau III) e levemente acometidos (grau I) pela SOAB, através do sequenciamento 16s rRNA.
- Comparar a diversidade taxonômica de microrganismos presentes na orofaringe de cães pug com estudos metagênicos em cães de raças mesocefálicas previamente publicados.
- Determinar a correlação entre a prevalência de determinados grupos taxonômicos microbianos em cães braquicefálicos da raça pug com a progressão da SOAB.

4. JUSTIFICATIVA

Este projeto dará a conhecer a importância do papel da microbiota de cães normais e com alterações ou grau superior de BOAS, proporcionando assim uma melhor compreensão e identificação dos microrganismos que estão presentes na cavidade nasal e orofaríngea de cães braquicéfalos da raça pug com a caracterização genética dos microrganismos isolados nestes sítios anatômicos, através do sequenciamento 16S rRNA das espécies bacterianas que estão presentes na cavidade nasal e orofaríngea de cães acometidos com diferentes graus da síndrome BOAS. Portanto, esta pesquisa servirá de base para trabalhos posteriores que relacionem a microbiota pertencente com à cavidade nasal e orofaríngea com um possível tratamento cirúrgico ou terapia de manejo clínico para o paciente acometido pelo BOAS (Mendes Junior *et al.*, 2021).

Além disso, pretende-se contribuir para futuras pesquisas sobre a microbiota normal da cavidade nasal desses cães braquicefálicos da raça pug que atualmente são muito comuns no atendimento de clínicas veterinárias, o que ajudará a saber quais antibióticos podem auxiliar no tratamento e prevenir a progressão da doença, evitando também danificar a microbiota benéfica dessa área.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Seleção dos Pacientes

Os pacientes incluídos neste estudo foram recrutados nas dependências do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HVGLN) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal. O estudo seguiu as normas e diretrizes éticas de experimentação animal aprovadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela CEUA da instituição (protocolo nº 9555/23).

Cães da raça pug foram selecionados e classificados em grupos de acordo com o grau de severidade da SOAB (item 2.2). Os critérios de inclusão foram: animais com idade entre 1 e 8 anos e peso entre 5 e 15 quilogramas. Foram excluídos cães que receberam terapia antimicrobiana nos dois meses anteriores à colheita das amostras. Embora a padronização da dieta não tenha sido estabelecida como critério de inclusão devido à dificuldade de controle estrito em animais de companhia, considera-se que esse parâmetro reflete a heterogeneidade da população clínica real. O recrutamento dos pacientes ocorreu por meio de redes sociais, panfletos (flyers) e contato com criadores.

5.2. Classificação da síndrome obstrutiva aérea braquicefálica (SOAB)

O escore de peso e condição corporal (ECC, escala de 1 a 9) foram registrados de acordo com o estabelecido por LaFlamme (1997), conjuntamente com a idade e o sexo de cada cão. Cada cão incluído neste estudo foi classificado de acordo com o índice SOAB, validado por Liu *et al.* (2015). Este índice utiliza graduação funcional dividida em quatro graus baseado nas avaliações realizadas antes e após três minutos do teste de tolerância ao exercício. Grau 0 são pacientes que não apresentam sinais

da síndrome, grau I inclui cães que apresentam sinais respiratórios não audíveis ou discretos que não pioravam após o teste de tolerância ao exercício e são considerados clinicamente estáveis para a sua raça. Pacientes classificados como grau II (síndrome moderada) são aqueles que requerem atenção médica para perda de peso e/ou tratamento cirúrgico. Grau III (síndrome grave) são aqueles cães que requerem intervenção cirúrgica imediata.

Tal avaliação fundamentou-se em critérios validados, incluindo a auscultação faringolaríngea para detecção de estertor e estridor, observação do esforço inspiratório e monitoramento de sinais de hipóxia. Nos casos de intolerância grave ao esforço, em que os cães não conseguiram concluir o tempo total de teste devido à dispneia exacerbada, o teste foi interrompido. Nos casos de cães classificados como grau III, não houve necessidade de realização do TTE, sendo atribuída a graduação imediatamente.

Além disso, foi realizada a avaliação da estenose de narinas de acordo com a classificação visual proposta por Liu *et al.* (2015), que categoriza o grau de obstrução em quatro níveis: A) narinas abertas; B) estenose leve com um discreto estreitamento; C) estenose moderada com narinas abertas apenas na porção inferior; e D) estenose grave com narinas virtualmente fechadas. Esta escala permite correlacionar a restrição do fluxo de ar nasal com a gravidade clínica da SOAB, sendo um indicador preditivo fundamental para a necessidade de intervenção cirúrgica.

5.3. Colheita de amostras

A colheita das amostras foi realizada sob diferentes protocolos de contenção física e química, adaptados conforme a gravidade clínica e a necessidade de intervenção cirúrgica de cada paciente. Nos cães classificados como grau III, a contenção foi de natureza química, aproveitando o plano anestésico necessário para a correção cirúrgica da SOAB. Nesses cães, as amostras foram obtidas imediatamente após a indução anestésica leve e antes de qualquer manipulação ou antissepsia local, garantindo a ausência de contaminantes externos. Para os cães de grau I, que não apresentavam indicação cirúrgica imediata, optou-se pela contenção física, realizado de forma cuidadosa por profissionais treinados, garantindo minimizar o estresse respiratório e o bem-estar. Ressalta-se que, independentemente do método de contenção (físico ou químico), a técnica de execução da colheita foi

rigorosamente padronizada entre todos os cães do estudo, assegurando a comparabilidade dos locais analisados.

Em ambos grupos as amostras da cavidade nasal foram obtidas por meio da introdução de swab estéril, direcionado paralelamente ao palato duro até a porção média da cavidade nasal, correspondente à região do meato nasal médio. Simultaneamente, realizou-se a colheita na região orofaríngea, utilizando cotonetes de algodão estéreis, os quais foram imediatamente armazenados em tubos secos e submetidos ao congelamento a -80 °C para preservação da integridade do material genético. As amostras foram acondicionadas em embalagens criogênicas homologadas, contendo gelo seco para a manutenção da cadeia de frio durante o transporte logístico internacional. As análises de bioinformática e estudos metagênicos foram realizados na Universidade de Copenhague, Dinamarca, sob a coordenação do Prof. Dr. Luca Guardabassi e do Dr. Mattia Pirolo.

5.3.1. *Extração de DNA e sequenciamento*

O DNA total das amostras foi extraído utilizando o kit QIAmp UCP Pathogen Minikit (QIAGEN, Copenhague, Dinamarca), seguindo as instruções do fabricante, com a adição de uma etapa de ruptura mecânica mediante bead-beating utilizando o Pathogen Lysis Tube S (QIAGEN). Em cada extração de DNA, foi incluído um controle negativo (extração em branco).

As sequências parciais do gene 16S rRNA foram amplificadas utilizando o kit QUICK-16S NGS Library Prep Kit (Zymo Research), direcionado à região V3-V4 do gene 16S rRNA, tal como descrito previamente (Pirolo *et al.*, 2023). Durante a preparação das bibliotecas, foram incluídos controles negativos e positivos (ZymoBIOMICS DNase/RNase-Free Water e ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard, respectivamente). O sequenciamento foi realizado em uma plataforma Illumina MiSeq (leituras pareadas de 300 pb) utilizando o kit MiSeq Reagent Kit v3 (600 ciclos; Illumina), de acordo com as instruções do fabricante.

5.3.2. *Análise bioinformática*

Os dados de sequenciamento do gene 16S rRNA foram processados utilizando

o pacote DADA2 v1.14.1 (Callahan *et al.*, 2016), implementado em R v4.2.1. Os parâmetros ideais de filtragem e recorte foram determinados por meio do FIGARO v 3.0 (Sasada *et al.*, 2020). A assinatura taxonômica de cada variante de sequência de amplicon (ASV) foi realizada utilizando a base de dados taxonômica Silva v.138.1 para DADA2 (Quast *et al.*, 2013). Os possíveis contaminantes foram identificados a partir das amostras controle e eliminados mediante o pacote decontam v.1.12.0 (Davis *et al.*, 2018). Posteriormente, foi construído um objeto phyloseq a partir das tabelas de ASV e taxonomia utilizando phyloseq v1.30.0 (McMurdie; Holmes, 2013) para as análises subsequentes.

5.4. Análise estatística

Os índices de α -diversidade (Shannon) e β -diversidade (métrica de dissimilaridade de Bray-Curtis) foram calculados utilizando o pacote vegan do R, após uma rarefação a uma profundidade equivalente a 90% da menor profundidade de amostra nos conjuntos de dados de ASV (16S rRNA) e MAG (shotgun). A comparação dos índices de α -diversidade entre animais saudáveis e doentes foi realizada mediante o teste de soma de postos de Wilcoxon, aplicando a correção de Holm para comparações múltiplas.

A β -diversidade foi visualizada por meio de uma análise de coordenadas principais (PCoA), e as diferenças na composição das comunidades microbianas entre grupos foram avaliadas mediante uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), utilizando a função Adonis. Para investigar as diferenças em nível taxonômico entre animais saudáveis e doentes, foi realizada uma análise de abundância diferencial utilizando o DESeq2, com correção das comparações múltiplas pelo método de Benjamini-Hochberg.

6. RESULTADOS

No total, foram avaliados e selecionados 22 indivíduos, todos da raça pug, para a composição deste estudo. De cada um desses cães, foram coletadas duas amostras (uma da cavidade nasal e outra da orofaríngea), totalizando 44 amostras analisadas. As amostras apresentaram distribuição equitativa entre os sexos (50% fêmeas e 50%

machos, $n = 11$ para cada), com peso médio de 12,35 kg. Quanto à estratificação do escore SOAB, 13 pugs (59,1%) foram classificados como grau III e nove (40,9%) como grau I; não foram identificados indivíduos com grau 0 durante o período do estudo. No que se refere ao grau de estenose de narinas, nove cães (40,9%) apresentaram grau I, 11 (50,0%) grau II e dois (9,1%) grau III.

Realizou-se a análise da microbiota de amostras coletadas das regiões nasal e orofaríngea de cães pug. Devido à ausência de indivíduos classificados como grau 0, as amostras foram agrupadas para análise comparativo entre cães levemente acometidos (grau I) e gravemente acometidos (grau III).

A análise da beta-diversidade baseada na métrica de Bray-Curtis, evidenciou uma segregação robusta entre os nichos biológicos amostrados (Figura 1). O sítio anatômico constituiu o principal determinante da estrutura microbiana, exibindo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e explicando 13,1% da variância total observada. A separação é evidente entre as comunidades bacterianas da orofaringe e da cavidade nasal. Enquanto as amostras orofaríngeas demonstraram um agrupamento homogêneo, a microbiota nasal exibiu uma dispersão acentuada ao longo dos eixos, indicando uma maior variabilidade interindividual.

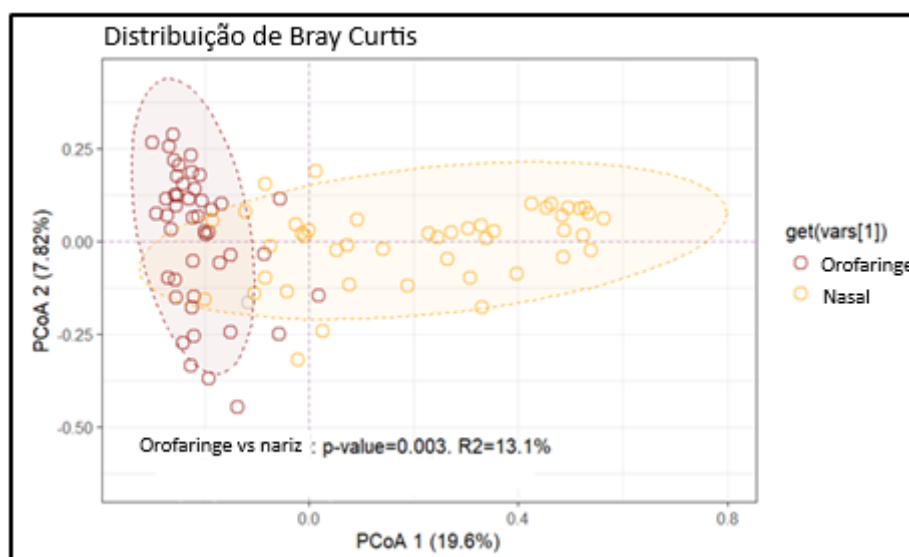


Figura 1: Diferenciação entre os nichos nasal e orofaríngeo de cães da raça pug acometidos pela SOAB. Jaboticabal, 2026.

Ao analisar o impacto do estado clínico na ecologia microbiana nasal (Figura 2), observou-se uma influência significativa do grau da síndrome (SOAB) na composição bacteriana. A diversidade alfa, mensurada pelo índice de Shannon (Figura 2A), tendeu a apresentar valores de diversidade superiores nos cães gravemente afetados (Grau III), o que sugere uma alta variabilidade individual nesse grupo. Na beta-diversidade (Figura 2B), baseado em Bray-Curtis, também se observou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), confirmando que a progressão da SOAB altera a estrutura da comunidade microbiana global nos pugs avaliados.

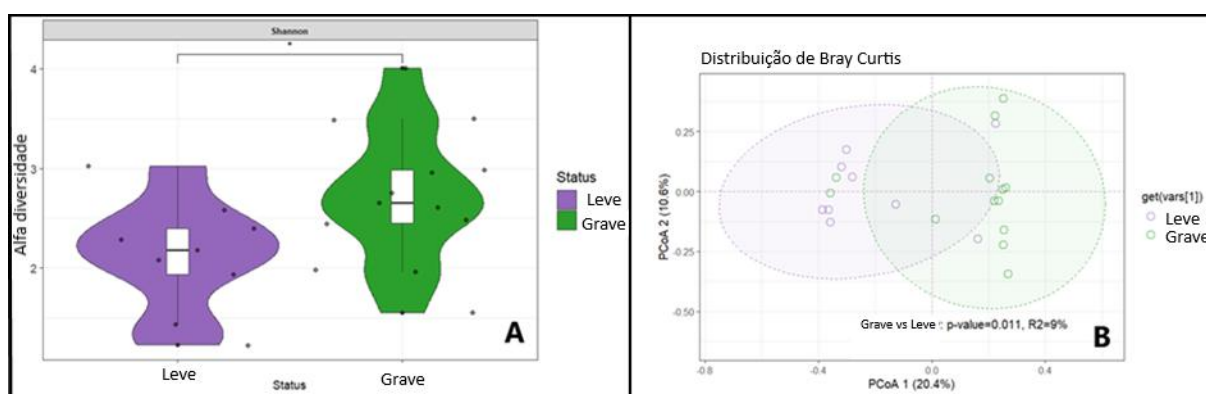


Figura 2: Impacto da gravidade da SOAB na estrutura microbiana de cães da raça pug. Jaboticabal, 2026.

A análise da abundância relativa na microbiota nasal revelou variações marcantes entre os grupos (Figura 3). Nos pugs saudáveis (Grau I), observou-se uma dominância robusta do gênero *Moraxella*, representando mais de 60% da comunidade bacteriana. Em contraste, nos cães gravemente afetados (Grau III), verifica-se um quadro de disbiose caracterizado pela redução acentuada da representatividade de *Moraxella* para aproximadamente 25%. Na redistribuição taxonômica se evidencia o aumento expressivo na abundância relativa de gêneros como *Conchiformibius*, *Porphyromonas* e *Haemophilus*, sugerindo a perda da identidade da microbiota nasal em função da progressão clínica da SOAB.

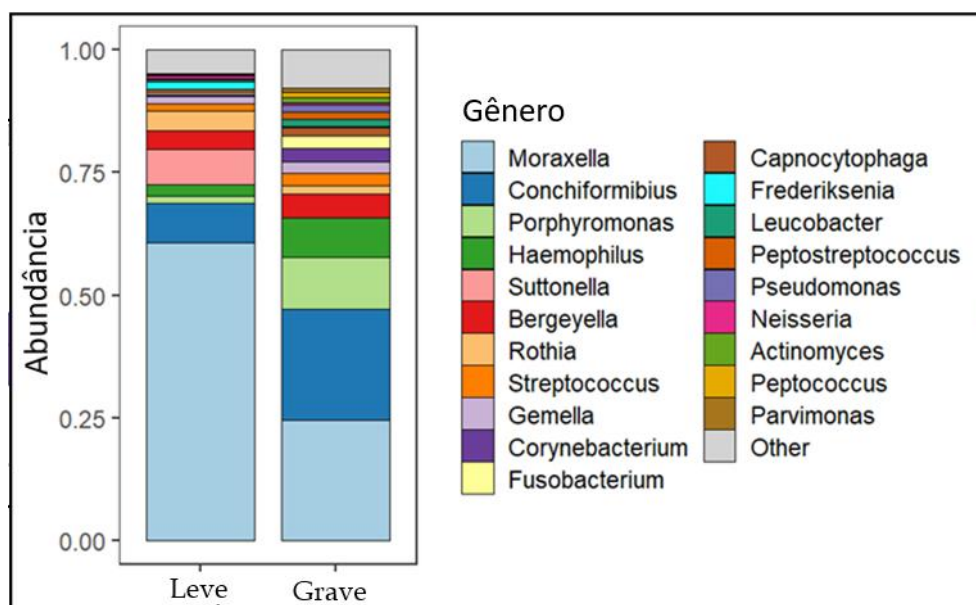


Figura 3: Abundância relativa de gêneros bacterianos na microbiota nasal comparando cães da raça pug levemente (Grau I) e gravemente acometidos (Grau III) pela SOAB. Jaboticabal, 2026.

A análise da microbiota nasal em função da gravidade da estenose de narinas revelou padrões distintos de distribuição bacteriana (Figura 4). Na beta-diversidade (Figura 4A), a análise de Bray-Curtis não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na comparação entre os grupos levemente acometidos (Grau I) e acometidos (Graus II e III). Esse resultado indica que, embora haja uma sobreposição nas comunidades bacterianas, o grau de fechamento das narinas isoladamente não é o fator determinante para a segregação das comunidades bacterianas.

Em relação à diversidade alfa (Figura 4B), o índice de Shannon não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos de estenose analisados. Observou-se uma homogeneidade nos valores de riqueza e diversidade, sugerindo que a complexidade da microbiota nasal tende a se manter estável mesmo diante das variações anatômicas externas das narinas.

Taxonomicamente (Figura 4C), a abundância relativa evidenciou que a composição bacteriana sofre influência da severidade da estenose nasal. Nota-se que, ao comparar os cães levemente acometidos (especialmente Grau I) com os grupos de acometidos (Grau II, III), ocorre uma redução na dominância característica de *Moraxella*. Essa queda é acompanhada por um aumento progressivo na

participação de gêneros como *Conchiformibius* e *Porphyromonas*, sugere que a alteração física na passagem do ar impacta a estabilidade e a identidade do nicho nasal.

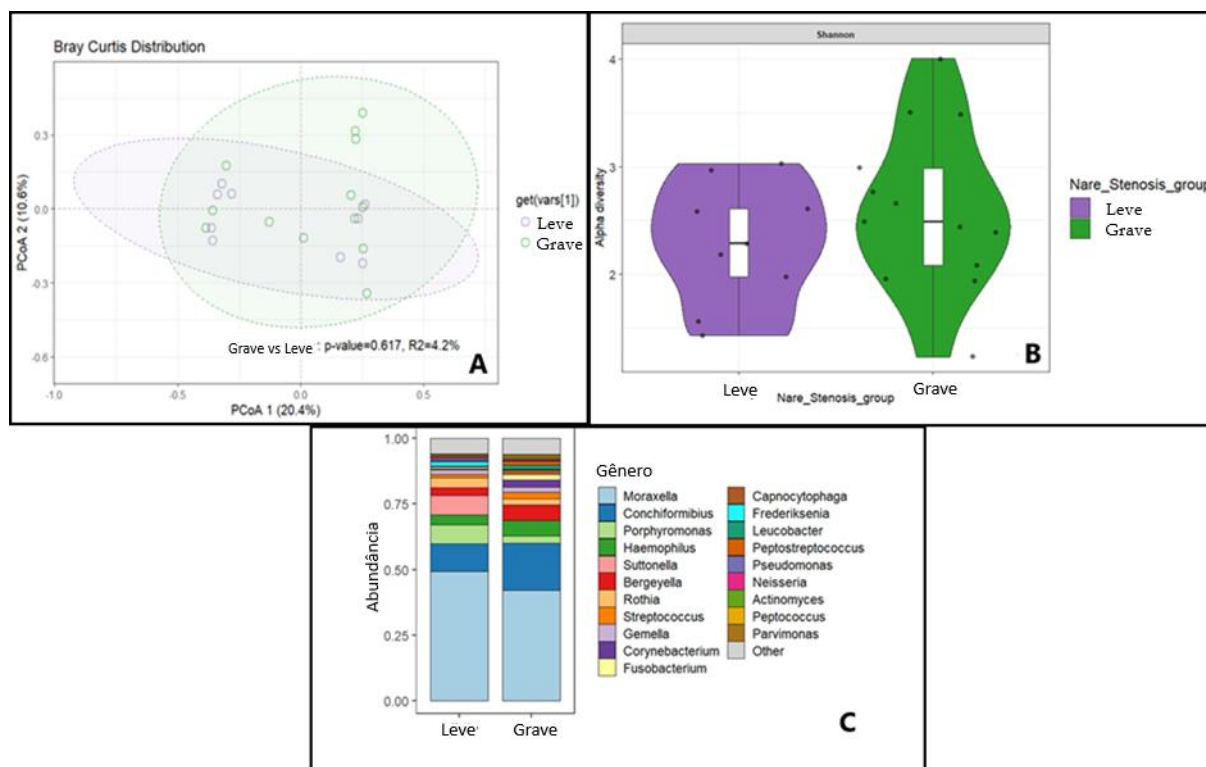


Figura 4: Variabilidade na diversidade alfa e beta correlacionada a estenose de narina e a progressão da Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB) em cães da raça pug. Jaboticabal, 2026.

A análise da diversidade bacteriana na região orofaríngea de cães pug demonstrou estabilidade entre os diferentes estados clínicos entre grau I e grau III (Figura 5).

No que se refere à diversidade alfa (Figura 5A), medida pelo índice de Shannon, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre cães levemente afetados (Grau I) e gravemente afetados (Grau III), evidenciando uma manutenção da riqueza e equidade bacteriana independentemente da progressão da síndrome.

Para a diversidade beta (Figura 5B) baseada na distância de Bray-Curtis não revelou diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$). O estado clínico explicou apenas 4,6% da variabilidade total observada, o que indica que a condição clínica da SOAB exerce baixo impacto na estruturação da comunidade microbiana

orofaríngea, mantendo a diversidade ecológica deste nicho mesmo em cães gravemente afetados.

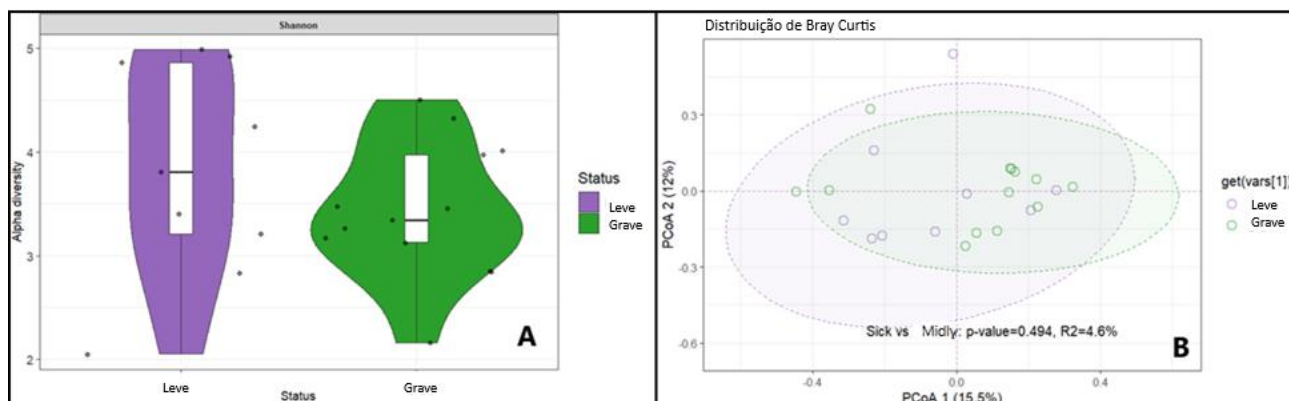


Figura 5: Variabilidade na diversidade alfa (A) e beta (B) na microbiota orofaríngeo correlacionada com a progressão da Síndrome Obstrutiva Aérea Braquicefálica (SOAB) em cães da raça pug. Jaboticabal, 2026.

Ao analisar a composição taxonômica da orofaringe (Figura 6), os dados corroboram que a composição bacteriana desta população de cães pugs apresenta uma maior abundância relativa em ordem decrescente pelos gêneros *Conchiformibius*, *Porphyromonas*, *Streptococcus* e *Moraxella*. Esse padrão de distribuição foi observado de forma consistente tanto nos cães levemente afetado (grau I) quanto nos gravemente afetado (grau III). Diferente do observado na microbiota nasal, esta região não apresenta uma redução drástica dos seus principais gêneros em função da progressão da síndrome, apresentando distribuição percentual bastante semelhante.

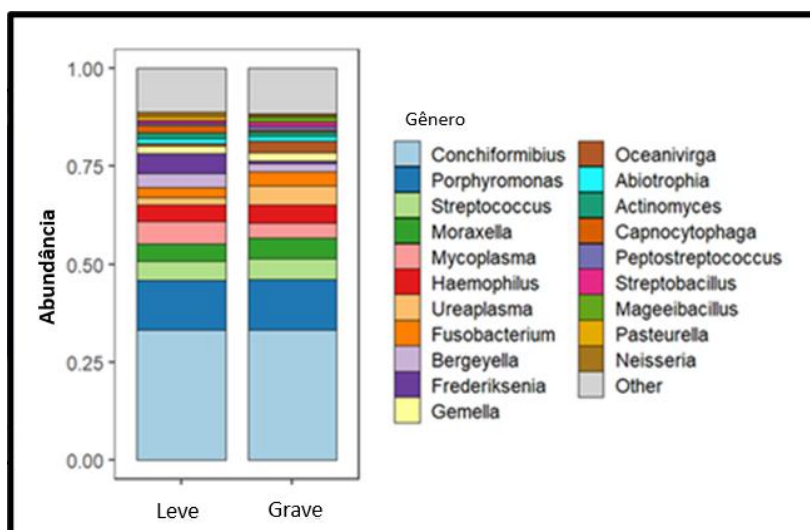


Figura 6: Análise da abundância relativa de gêneros bacterianos na microbiota orofaríngeo de pugs levemente e gravemente afetados pela SOAB. Jaboticabal, 2026.

7. DISCUSSÃO

A ausência de cães classificados como grau 0 neste estudo reflete uma característica fenotípica crítica da raça pug. Como discutido por Riggs *et al.* (2019), muitos tutores negligenciam sinais clínicos por considerá-los intrínsecos ou “normais” para a raça. A dificuldade em recrutar indivíduos não acometidos pelo SOAB corrobora a teoria de Liu *et al.* (2017), de que a conformação braquicefálica extrema no pug, manifestada principalmente pela estenose de narinas e a hipertrofia de tecidos moles, pode ser considerado preditor de risco para determinar a distinção fisiológica entre cães “saudáveis” e “acometidos”. Assim, a amostra final reflete a realidade da população hospitalar e de criadores, em que a síndrome se apresenta de forma moderada a grave na maioria dos casos.

No que se refere à diversidade alfa (Figura 2A), o índice de Shannon mostrou que a microbiota nasal de pugs com graus avançados da SOAB (grau III) apresenta uma distribuição de dados mais heterogênea em comparação aos cães levemente afetados (grau I). Enquanto Vangrinsven *et al.* (2021), observaram que cães saudáveis independentemente da conformação facial, tendem a manter uma microbiota nasal robusta e uniformemente dominada pelo gênero *Moraxella*, os nossos achados revelam que o agravamento da síndrome (grau III) provavelmente descaracterizam e impõe uma dinâmica ecológica mais instável ao trato respiratório

cranial, na qual a perda da dominância de táxons leva a desestabilizar a microbiota.

Confirmando essa desestabilização, a diversidade beta (Figura 2B) demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), segregando as comunidades bacterianas de acordo com a gravidade da síndrome. Enquanto estudos em cães saudáveis (incluindo 26% de braquicefálicos), como o de Vangrinsven *et al.* (2021), descreveram uma microbiota nasal robusta e dominada por *Moraxella*, os achados (Figura 2 e 3) indicam que a progressão da SOAB nos pugs rompe e altera essa microbiota. A transição do grau I para o grau III é marcada por uma disbiose evidente, caracterizada pela queda abrupta na proporção de *Moraxella*. Portanto, a dificuldade respiratória e as alterações pressóricas da síndrome não apenas prejudicam a mecânica ventilatória, mas alteram a estrutura global da comunidade microbiana, descaracterizando a identidade taxonômica típica do nicho nasal canino.

As variações observadas podem ser atribuídas às diferenças individuais relacionadas ao grau da SOAB. A turbulência do fluxo de ar e a inflamação crônica na mucosa nasal provavelmente alteram a riqueza e a equidade bacteriana de forma inconsistente entre os indivíduos, enquanto a orofaringe preserva uma microbiota mais uniforme. Tal discrepância é decorrente do esforço inspiratório característico dos cães braquicefálicos, o qual gera resistência massiva ao fluxo aéreo, facilitando o carreamento de detritos e bactérias orofaríngeas em direção ao trato respiratório cranial, de acordo com De Carvalho *et al.*, (2022).

Ao analisar a abundância relativa no nicho nasal (Figura 3), evidenciou-se uma alteração clara associada à gravidade da SOAB. Enquanto a microbiota nasal de pugs levemente afetados (grau I) é amplamente dominado por *Moraxella*, gênero tipicamente predominante nas superfícies das mucosas orais caninas (Ruparell *et al.*, 2020). No presente estudo cães gravemente acometidos (grau III) apresentaram, em oposição, um aumento expressivo do gênero *Conchiformibius*. Embora este último seja um comensal habitual da cavidade oral em cães saudáveis (Lisjak *et al.*, 2023), sua elevada presença nas narinas dos pacientes severamente afetados indica um fenômeno de translocação bacteriana no sentido orofaringe-nariz. Esse achado sugere que, nos casos de SOAB grave, a barreira microbiológica nasal é rompida, permitindo que táxons orais colonizem o trato respiratório cranial devido às alterações na dinâmica do fluxo aéreo e à pressão inspiratória negativa.

A estreita relação observada entre *Porphyromonas* e *Conchiformibius* como os gêneros de maior prevalência na microbiota oral em cães dolicocefálicos (Lisjak *et al.*, 2023; Ruparell *et al.*, 2020) corrobora a hipótese de que a microbiota nasal nestes pacientes gravemente afetados reflete a translocação da microbiota oral. Uma vez que cães da raça pug apresentam anomalias como alterações no palato mole e a eversão dos sacos laríngeos, é provável que essa mecânica respiratória alterada facilite o carreamento de bactérias orais em direção ao trato respiratório cranial. Esse processo estabelece o gênero *Conchiformibius* como um componente central da microbiota nasal nos casos graves (Figura 3), descaracterizando a identidade taxonômica original desse nicho, que em condições normais seria dominado por *Moraxella* (Vangrinsven *et al.*, 2021). O que fica evidenciado no nosso estudo, quando observamos o aumento da proporção de *Conchiformibius* e *Porphyromonas* na microbiota nasal de cães grau III em relação aos classificados como grau I.

Apesar da proximidade anatômica, a análise da beta-diversidade (Figura 1) demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a microbiota nasal e orofaríngea nos cães analisados. A magnitude dessa variação ($R^2 = 13,1\%$) corrobora o fato de que a orofaringe não atua meramente como um canal de passagem, mas como um microambiente ecológico único. Enquanto a microbiota nasal funciona como uma barreira inicial com alta prevalência de *Moraxella*, gênero amplamente reconhecido como predominante nas mucosas do trato respiratório cranial saudável (Ruparell *et al.*, 2020).

A distinção estatística observada entre os nichos (Figura 1) sugere que variações na umidade, temperatura e pressão parcial de oxigênio na área orofaríngea selecionam uma comunidade bacteriana distinta da nasal. Padrão semelhante de segregação de nichos foi descrito por Lemon *et al.* (2010), em humanos comparando as narinas e a orofaringe, demonstrando que, embora sejam anatomicamente contíguos, esses locais abrigam comunidades bacterianas marcadamente diferentes devido às pressões seletivas ambientais específicas de cada sítio. No presente estudo, essa diferenciação é evidenciada pela dominância de *Moraxella* nas narinas (Figura 4C), em contraste com a orofaringe, onde prevalecem gêneros como *Conchiformibius* e *Porphyromonas* (Figura 6).

Essas variações sustentam-se na fisiopatologia da SOAB, na qual a resistência ao fluxo aéreo gera uma pressão luminal negativa excessiva e inflamação crônica. De acordo com Castro Moraes *et al.* (2025), a síndrome extrapola as alterações primárias de narinas estenóticas, afetando profundamente a integridade do ambiente laringotraqueal através de inflamação e edema. Tal discrepância é decorrente do esforço inspiratório, o qual facilita o carreamento de detritos orofaríngeos de acordo com De Carvalho *et al.* (2022). Além disso, o encurtamento do crânio altera a dinâmica de filtração e aquecimento do ar (Vangrinsven *et al.*, 2021). A fisiopatologia da SOAB transcende o trato respiratório, exercendo um impacto sistêmico que inclui alterações gastrintestinais clinicamente relevantes. De acordo com Bottero *et al.* (2025), a obstrução das vias aéreas craniais impõe um esforço inspiratório exacerbado, resultando em pressões intratorácicas negativas extremas. Este gradiente de pressão favorece o refluxo retrógrado do conteúdo gastresofágico em direção à região cranial, expondo a mucosa orofaríngea a componentes gástricos e enzimas digestivas. Esta interação persistente com o conteúdo gástrico compromete a homeostase local e induz modificações nesta região. Portanto, a diferenciação entre os nichos nasal e orofaríngeo observada neste estudo reforça que a progressão da SOAB induz alterações ambientais locais que moldam microbiomas específicos dos hospedeiros. Na medicina humana, estudos em pacientes portadores de AOS, condição análoga à SOAB devido ao colapso dinâmico das vias aéreas, sugere que o estresse mecânico e a inflamação crônica da mucosa são determinantes na modulação do microbioma local (Mitze *et al.*, 2022).

Um dos principais desafios na interpretação dos achados é a acentuada escassez de literatura científica indexada referente à microbiota do trato respiratório cranial canino, sobretudo em raças de conformação braquicefálica. Historicamente, as investigações concentraram-se em caracterizar o microbioma nasal, estabelecendo perfis de cães saudáveis e enfermos com conformações dolicocefálicas ou mesocefálicas (Tress *et al.*, 2017). Essa tendência negligencia aos demais componentes desse trato, considerado erroneamente uma zona de trânsito. No entanto, os resultados experimentais desta pesquisa demonstram que a orofaringe possui uma dinâmica ecológica própria, que deve ser caracterizada de forma

independente para a plena compreensão da complexidade do microbioma respiratório em pacientes braquicefálicos.

Finalmente, é relevante destacar a ausência de diferenças significativas na diversidade da microbiota orofaríngea entre pugs levemente afetados (Grau I) e gravemente acometidos (Grau III). Esse achado pode ser explicado pela conformação esquelética extrema da raça, que apresenta o menor índice de focinho e maior redução craniofacial entre os braquicéfalos (Ekenstedt; Crosse; Risselada, 2020; Liu *et al.*, 2025). Essa compactação anatômica resulta em uma sobreposição permanente entre as cavidades nasal e oral, expondo a orofaringe a um estresse mecânico e inflamatório crônico desde os estágios iniciais da síndrome.

Somado a isso, as alterações estruturais no esôfago cervical e a pressão intratorácica negativa predispoem esses cães ao refluxo gastroesofágico crônico (Santos *et al.*, 2025). A presença frequente de conteúdo gástrico na orofaringe pode alterar o pH local e manter um estado de inflamação contínua da mucosa, favorecendo a persistência de um microbioma adaptado a condições adversas em ambos os grupos clínicos. Diferente da microbiota nasal canina saudável, que é tipicamente dominado por *Moraxella* (Ruparell *et al.*, 2020), a orofaringe do pug parece atuar como um ponto de convergência bacteriana precoce. Portanto, a gravidade clínica da SOAB pode não ser o fator primário de mudança nesse nicho, uma vez que a própria anatomia da raça e as comorbidades digestivas já estabelecem um perfil de disbiose basal independente do grau da síndrome.

As limitações inerentes a este estudo derivam da natureza observacional e clínica da pesquisa com pacientes de propriedade privada, o que restringe o controle rigoroso sobre variáveis extrínsecas, como a padronização da dieta, o ambiente de criação e o manejo sanitário individual. Adicionalmente, a ausência de indivíduos classificados como grau 0 reflete a dificuldade fenotípica de encontrar controles em uma raça com conformação craniofacial tão extrema. No entanto, tais fatos não invalidam os achados; pelo contrário, essas limitações conferem maior validade externa e aplicabilidade clínica ao nosso estudo.

8. CONCLUSÃO

A caracterização e comparação da microbiota do trato respiratório cranial de cães da raça pug, por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e análise taxonômico, demonstraram na cavidade nasal, que a gravidade da síndrome gera disbiose nos pacientes severamente afetados (grau III), promovendo desestabilização na diversidade beta ($p < 0,05$) e a perda da identidade taxonômica característica desse sítio anatômico pela redução drástica do gênero *Moraxella* e o aumento de comensais orais como *Conchiformibius* e *Porphyromonas*; esse cenário sugere o fenômeno de translocação bacteriana oronasal estimulado pela pressão inspiratória negativa crônica e pelo encurtamento craniofacial extremo.

A região orofaríngea mostrou uma estabilidade ecológica, sem apresentar diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na diversidade ou na composição global entre os graus I e III, o que indica que a conformação anatômica extrema e a exposição crônica e constante ao refluxo gastroesofágico estabelecem disbiose basal precoce e permanente, o que resulta na descaracterizando do nicho antes da progressão clínica da síndrome. Dessa forma, enquanto a microbiota nasal funciona como um biomarcador dinâmico da evolução da SOAB, a comparação final com a literatura de raças mesocéfalas saudáveis, caracterizadas por diferentes táxons bacterianos, reforça o fato de que o estresse mecânico crônico altera a homeostase microbiológica própria dos pugs.

9. REFERÊNCIAS

ANDREWS, Amy L. M. M. *et al.* A Review of Clinical Outcomes, Owner Understanding and Satisfaction following Medial Canthoplasty in Brachycephalic Dogs in a UK Referral Setting (2016–2021). **Animals**, v. 13, n. 12, p. 2032, 19 jun. 2023.

BERNAERTS, Frédérique *et al.* Description of original endoscopic findings and respiratory functional assessment using barometric whole-body plethysmography in dogs suffering from brachycephalic airway obstruction syndrome. **Veterinary Journal**, v. 183, n. 1, p. 95–102, jan. 2010.

BILHALVA, Maurício. Síndrome braquicefálica em cães: Revisão. **Pubvet**, v. 14, n. 10, 13 out. 2020.

BOTTERO, Enrico *et al.* Clinical Evaluation and Systematic Classification of Endoscopic Gastrointestinal Findings in 176 French Bulldogs with Brachycephalic Airway Obstructive Syndrome. **Animals**, v. 15, n. 14, 1 jul. 2025.

CALLAHAN, Benjamin J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 29 jun. 2016.

CASTRO MORAES, Paola *et al.* Brachycephalic obstructive airway syndrome (BOAS): far beyond stenotic nares and elongated soft palate. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 9–21, 30 jun. 2025.

DAVIS, Nicole M. *et al.* Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. **Microbiome**, v. 6, n. 1, 17 dez. 2018.

DE CARVALHO, Isabelle Campos *et al.* Brachycephalic Syndrome in Dogs - Endoscopic Findings in the Airways. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 50, 2022.

DE CÓRDOBA-ANSÓN, Patricia Fernández *et al.* **The Respiratory Tract Microbiome and Human Health. Microbial Biotechnology** John Wiley and Sons Ltd, , 1 maio 2025.

EKENSTEDT, K. J.; CROSSE, K. R.; RISSELADA, M. **Canine Brachycephaly: Anatomy, Pathology, Genetics and Welfare. Journal of Comparative Pathology** W.B. Saunders Ltd, , 1 abr. 2020.

FABRIS, I. A. *et al.* Clinical evaluation of brachycephalic syndrome by means of submaximum exercise test and its correlations with the severity of nostril stenosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 77, n. 6, 2025.

JENKINS, Eileen K.; DECHANT, Mallory T.; PERRY, Erin B. **When the nose doesn't know: Canine olfactory function associated with health, management, and**

potential links to microbiota. **Frontiers in Veterinary Science** Frontiers Media S.A., , 29 mar. 2018.

JIANG, He *et al.* Nasal microbiota dysbiosis and functional alterations in children with adenoid hypertrophy: potential biomarkers and post-surgical microbial recovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 109, n. 1, 1 dez. 2025.

LAFLAMME, D. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. **Canine Practice, Santa Barbara**, v. 22, n. 3, p. 10–15, mar. 1997.

LEMON, Katherine P. *et al.* Comparative analyses of the Bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. **mBio**, v. 1, n. 3, jul. 2010.

LISJAK, Anja *et al.* A Comparison of the Oral Microbiota in Healthy Dogs and Dogs with Oral Tumors. **Animals**, v. 13, n. 23, 1 dez. 2023.

LIU, Nai Chieh *et al.* Characterisation of brachycephalic obstructive airway syndrome in French bulldogs using whole-body barometric plethysmography. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 16 jun. 2015.

LIU, Nai Chieh *et al.* Conformational risk factors of brachycephalic obstructive airway syndrome (BOAS) in pugs, French bulldogs, and bulldogs. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2017.

LIU, Nai Chieh *et al.* Breed-specific anatomical risk factors of brachycephalic obstructive airway syndrome: A comprehensive computed tomographic study from nares to cervical trachea. **Veterinary Journal**, v. 314, 1 dez. 2025.

MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 22 abr. 2013.

MENDES JUNIOR, Aguinaldo Francisco *et al.* Aspectos anatômicos e clínicos da síndrome braquicefálica: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e269101321221, 11 out. 2021.

MITZE, Stefanie *et al.* **Brachycephalic obstructive airway syndrome: much more than a surgical problem.** **Veterinary Quarterly** Taylor and Francis Ltd., , 2022.

O'NEILL, Dan G. *et al.* Epidemiological associations between brachycephaly and upper respiratory tract disorders in dogs attending veterinary practices in England. **Canine Genetics and Epidemiology**, v. 2, n. 1, dez. 2015.

PLANELLAS, Marta *et al.* **Evaluation of C-reactive protein, Haptoglobin and cardiac troponin 1 levels in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/152>>.

PONCET, Cyrill *et al.* Prevalence of gastrointestinal tract lesions in 73 brachycephalic dogs with upper respiratory syndrome. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, p. 1–7, jun. 2005.

QUAST, Christian *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, 1 jan. 2013.

RIGGS, Julia *et al.* 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**, v. 48, n. 4, p. 488–496, 1 maio 2019.

RUPARELL, Avika *et al.* The canine oral microbiome: Variation in bacterial populations across different niches. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, 28 fev. 2020.

SANTOS, T. I. *et al.* Anatomical differences of the cervical esophagus in brachycephalic dogs. **Morphologie**, v. 109, n. 366, 1 set. 2025.

SASADA, R. *et al.* FIGARO: An efficient and objective tool for optimizing microbiome rRNA gene trimming parameters. **Journal of biomolecular techniques: JBT**, v. 31, 2020.

TRESS, Barbara *et al.* Bacterial microbiome of the nose of healthy dogs and dogs with nasal disease. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 1 maio 2017.

VANGRINSVEN, Emilie *et al.* Variations in facial conformation are associated with differences in nasal microbiota in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, 1 dez. 2021.

VANGRINSVEN, Emilie *et al.* Assessment of the nasal microbiota in dogs with fungal rhinitis before and after cure and in dogs with chronic idiopathic rhinitis. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.

WU, Benjamin G. *et al.* 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**, v. 199, n. 1, p. 99–109, 1 jan. 2019.

XUE, Xin *et al.* Gut microbiota changes in healthy individuals, obstructive sleep apnea patients, and patients treated using continuous positive airway pressure: a whole-genome metagenomic analysis. **Sleep and Breathing**, v. 29, n. 1, 1 mar. 2025.

YU, Xia *et al.* Moraxella occupied the largest proportion in the nasal microbiome in healthy children, which potential protect them from COVID-19. **Microbial Pathogenesis**, v. 170, 1 set. 2022.