

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO *SEEDING* VAGINAL NO PADRÃO DE  
COLONIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE  
NEONATOS CANINOS NASCIDOS POR CESARIANA  
ELETIVA**

Samara Beretta Figueiredo  
Médica Veterinária

**2023**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO SEEDING VAGINAL NO PADRÃO DE  
COLONIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE  
NEONATOS CANINOS NASCIDOS POR CESARIANA  
ELETIVA**

**Discente: Samara Beretta Figueiredo**

**Orientadora: Profa Dra. Maricy Apparicio Ferreira**

**Coorientadora: Profa.Dra. Marita Vedovelli**

**Cardozo**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias –  
Unesp, Câmpus de Jaboticabal,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em  
Medicina Veterinária**

F475e

Figueiredo, Samara Beretta

Efeitos do seeding vaginal no padrão de colonização da microbiota intestinal de neonatos caninos nascidos por cesariana eletiva / Samara Beretta Figueiredo. -- Jaboticabal, 2023

93 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Maricy Apparicio Ferreira

Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Neonatologia. 2. Microbiologia. 3. Microbiota Intestinal. 4. Cães.  
5. Score Apgar. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: EFEITOS DO SEEDING VAGINAL NO PADRÃO DE COLONIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE NEONATOS CANINOS NASCIDOS POR CESARIANA ELETIVA

**AUTORA: SAMARA BERETTA FIGUEIREDO**

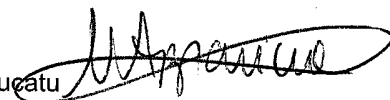
**ORIENTADORA: MARICY APPARÍCIO FERREIRA**

**COORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Medicina Veterinária, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA (Participação Presencial)

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ UNESP Botucatu



Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI (Participação Presencial)

Departamento de Microbiologia e Saúde Animal / Instituto Federal de São Paulo - Matão/SP



Profa. Dra. MARIA LUCIA GOMES LOURENÇO (Participação Presencial)

Departamento de Clínica Veterinária / FMVZ UNESP Botucatu



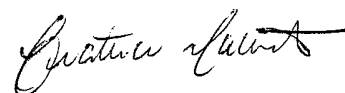
Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO (Participação Presencial)

Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal



Profa. Dra. BEATRICE INGRID MACENTE (Participação Presencial)

Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal



Jaboticabal, 27 de novembro de 2023

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Samara Beretta Figueiredo, nascida em 27 de abril de 1993 na cidade de Taquaritinga- São Paulo.

Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Campus de Jaboticabal no ano de 2016. Realizou Graduação Sanduiche na École Nationale Vétérinaire de Lyon, ENVL, França (2014-2015). Possui Aprimoramento em Cirurgia e Anestesiologia de Pequenos Animais pela Universidade Barão de Mauá (2017). Possui Aprimoramento em Reprodução e Obstetrícia Veterinária junto ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel- Unesp de Jaboticabal. Possui Pós-graduação em Ultrassonografia de Pequenos Animais pela Faculdade de Tecnologia em Saúde (FATESA) - Ribeirão Preto.

*"Peça a Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo"*

Provérbios 16:3

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Deus, que em sua infinita bondade permitiu com que eu desenvolvesse e executasse este projeto, me fortalecendo, guiando meus passos, me consolando e colocando pessoas e recursos no meu trajeto. Eu sei que os caminhos Dele sempre foram maiores que os meus e que se não fosse por Ele, eu não chegaria até aqui. Desde minha graduação, Deus me colocou nos lugares certos, me apresentou pessoas maravilhosas e hoje eu vejo que tudo cooperou para que hoje eu esteja redigindo minha tese de doutorado.

Agradeço também à minha família, que é a base da minha educação, do meu desenvolvimento e que sempre me acompanhou nos meus passos. Agradeço especialmente à minha mãe, Isabel Carolina Beretta, exemplo de pessoa íntegra e lutadora, que acompanhou meus primeiros passos, primeiras palavras e hoje pode acompanhar meu desenvolvimento profissional, sempre me apoiando. Agradeço por ela ter me ensinado desde pequena a andar nos caminhos do Senhor e a enfrentar os desafios da vida. Te amo.

Agradeço ao meu marido, Félix Figueiredo Júnior, por estar do meu lado, nos bons e maus momentos. Agradeço todas as vezes que acordou de madrugada para me ajudar com os neonatos, para descer no Setor de Obstetrícia para fazer ultrassom gestacional, para ir ao laboratório processar amostras. Agradeço pela paciência e consolo nos dias de muito choro, estresse e angústia. Agradeço por me incentivar nos meus projetos e sonhos e não somente incentivar, como participar deles todos! Agradeço pelas inúmeras fotos e registros e por ser uma pessoa organizada e guardar todas elas direitinho, porque se dependesse de mim, não teríamos fotos do projeto! Obrigada meu amor, te amo!

Agradeço à minha orientadora profa. Dra. Maricy Aparicio Ferreira e à minha coorientadora profa. Dra. Marita Vedoveli Cardozo por todos os ensinamentos, apoio, dedicação e muuuita paciência comigo! Vocês são minhas mães acadêmicas e cumpriram esse papel de forma espetacular! Agradeço à

professora Maricy por me incentivar e ser firme comigo todas as vezes que pensei em desistir! Agradeço à professora Marita por me defender tanto, me apoiar, rezar junto comigo pelas coletas! Vocês são pessoas incríveis que eu agradeço muito à Deus por ter colocado no meu caminho! Muito obrigada!

Agradeço à minha amiga e companheira de residência Nayara Camatta que com certeza foi peça-chave na minha vida de pós-graduação. Nayara foi a pessoa que fisicamente esteve mais presente durante todo meu projeto, me ajudou em todos os passos, desde a escolha das fêmeas até a entrega delas de volta para seus tutores. Nayara me ajudou a limpar cocô com muito verme! Haha, Nayara aguentou muitos cheiros e muita bagunça! Nayara colocava a casa em ordem e cuidava dos neonatos para que eu conseguisse descansar um pouco. Nayara cuidou muuuito da Maya para que eu pudesse desenvolver esse projeto! Nayara foi amiga, irmã, companheira, organizadora, faxineira, doula, patologista clínica, cuidadora e muitas outras funções durante o meu projeto! Muito obrigada amiga, eu não conseguiria sem você! Amo você!

Agradeço aos funcionários e funcionárias do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel por toda dedicação e ajuda! Vocês sempre estiveram muito dispostos e atenciosos para me ajudar nas coisas que precisei durante a execução do projeto! Agradeço especialmente à Maria Ângela que sempre teve paciência comigo, sempre me apoiou, me ajudou com as amostras e se tornou uma grande amiga! Agradeço também à Isildinha e a Marina que sempre estiveram de prontidão para me atender na farmácia e sempre arrumava caixas para eu levar os neonatos pra casa! Agradeço ao Fred por ter muita paciência comigo e deixar eu entrar e sair do laboratório com uma certa frequência grande! Haha. Vocês todos foram muito importantes para que esse projeto fosse executado! Muito obrigada!

Agradeço à toda a equipe, aos ICs, aos pós-graduandos, às residentes, às anestesistas. Renatha Araújo, Daniele Armani, Marina Vilela, Anelize Milaré, João, Melissa, Jaque, vocês foram essenciais para que tudo acontecesse! Obrigada por me atenderem de madrugada desesperada para entrar em cesariana! Obrigada por sofrerem junto comigo e por terem paciência e dedicação!

Agradeço também aos tutores/criadores que toparam participar do projeto, em especial ao Marcos Lemos, do canil Marvin Stars. Marcos, muito obrigada por ter tido muita, muita, muita paciência comigo, por ter confiado no meu trabalho e sempre ser muito cooperativo para tudo que precisei.

Agradeço a todos os animais que fizeram parte desse projeto, à todas as mães, de parto normal e de cesariana, que me mostraram a perfeição de Deus em sua criação, nos nascimentos e nos cuidados com seus filhotes; e que no tempinho que passaram comigo, confiaram em mim e me demonstraram amor e carinho. Confesso que chorei a cada despedida, a cada entrega das fêmeas com seus filhotes.

Agradeço também a minha companheirinha de vida, a Maya, meu “poico”, que mesmo ficando triste e com ciúme, compreendeu que a mãe precisava trabalhar e aceitou outros tantos animaizinhos morando no quarto dela durante os experimentos; aceitou que a tia Nayara ia cuidar dela naquele período. Maya é um presente de Deus na minha vida, sempre compreendeu as situações e nunca me deu trabalho para nada. Maya é puro amor na minha vida e sou eternamente grata à Deus por ter me dado ela. Te amo meu Poico!

Agradeço à Seção de Pós-Graduação da Unesp de Jaboticabal pelo apoio e auxílio durante essa jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 88887.550476/2020-00.



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1- Considerações Gerais.....	3
1. Introdução.....	3
2. Objetivos.....	5
2.1.Objetivo Geral.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	6
3. Revisão de literatura .....	6
3.1. Características Gerais da Microbiota Intestinal em cães.....	6
3.2. Características Gerais da Microbiota Intestinal em humanos.....	8
3.3. Influência da Microbiota Intestinal na saúde do hospedeiro.....	9
3.4. Influência da via de nascimento no estabelecimento da microbiota intestinal neonatal e adulta e suas consequências.....	11
3.5. Cães como modelo de pesquisa para estudos em humanos.....	14
3.6. <i>Seeding</i> vaginal.....	15
4. Referências.....	17
CAPÍTULO 2- The importance of the intestinal microbiota in humans and potential of translational research.....	30
1. Abstract.....	31
2. Introduction.....	32
3. General characteristics of the intestinal microbiota in dogs.....	33
4. General Characteristics of the Intestinal Microbiota in Humans.....	35
5. Influence of intestinal microbiota on host health.....	37
6. Influence of mode of delivery on the establishment of neonatal and adult intestinal microbiota and its consequences.....	39
7. Dogs as a research model for human studies.....	43
8. <i>Vaginal Seeding</i> .....	45
9. Conclusion.....	46
10. References.....	46

CAPÍTULO 3- Uso do <i>seeding</i> vaginal como ferramenta para modulação da microbiota intestinal em neonatos caninos nascidos por cesariana eletiva e sua possível aplicação na medicina humana.....		<b>63</b>
1. Introdução.....		<b>64</b>
2. Material e métodos.....		<b>66</b>
2.1. Animais.....		<b>66</b>
2.1.1. Critérios de inclusão.....		<b>67</b>
2.1.2. Critérios de exclusão.....		<b>67</b>
2.1.3 Triagem.....		<b>68</b>
2.2. Manejo e cuidado dos neonatos nascidos de cesariana eletiva.....		<b>69</b>
2.3. Coleta de amostras.....		<b>70</b>
2.4. <i>Seeding</i> vaginal.....		<b>71</b>
2.5. Escore Apgar modificado.....		<b>72</b>
2.6. Avaliação microbiológica.....		<b>73</b>
2.7. Análise estatística.....		<b>74</b>
3. Resultados.....		<b>74</b>
3.1. Avaliação da microbiota materna.....		<b>74</b>
3.2. Avaliação da microbiota neonatal.....		<b>77</b>
4. Discussão.....		<b>80</b>
5. Conclusão.....		<b>84</b>
6. Referências.....		<b>84</b>



## EFEITOS DO *SEEDING* VAGINAL NO PADRÃO DE COLONIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE NEONATOS CANINOS NASCIDOS POR CESARIANA ELETIVA

**RESUMO-** O objetivo deste estudo foi analisar diferenças entre a microbiota intestinal de neonatos caninos nascidos de parto normal com a de nascidos por meio de cesariana eletiva, bem como investigar a influência do *seeding* vaginal sobre a composição da microbiota intestinal daqueles nascidos de cesariana, de modo a propor esta técnica como ferramenta na modulação da microbiota de neonatos nascidos por cesariana eletiva. Foram utilizadas três cadelas adultas gestantes, submetidas à cesariana e outras quatro gestantes, acompanhadas durante o parto normal. Os animais incluídos no experimento possuíam peso corpóreo entre 4 a 15 kg, idade entre 2 a 5 anos. Amostras da boca, vagina, ânus e da região da mama da fêmea submetida a cesariana foram coletadas antes da realização da anestesia epidural (m0), utilizando-se luvas e swabs estéreis e, da mesma forma, foram obtidas amostras da fêmea não submetida à cesariana (parto normal) no momento em que apresentou sinais de pródromo. No estudo dos efeitos do *seeding* vaginal na microbiota dos neonatos, assim que os mesmos foram retirados do útero realizou-se a colheita das amostras da boca e do ânus dos neonatos e, ato contínuo, o *seeding* vaginal, o qual consistiu em esfregar as gazes retiradas da vagina da mãe na boca, face e no corpo dos neonatos. No grupo cesariana, foi realizado o *seeding* em metade dos neonatos (grupo cesariana *seeding*, n=6 neonatos) e na outra metade apenas a colheita das amostras microbiológicas, sem realização do *seeding* (grupo cesariana, n=6 neonatos). Um terceiro grupo (grupo parto normal, n=16 neonatos) foi composto por neonatos nascidos por parto normal, nos quais também foi avaliada a composição da microbiota intestinal. A contagem foi realizada através de plaqueamento em superfície e quantificados os grupos de enterobactérias, *staphylococcus spp.* e *streptococcus spp.*. Os resultados deste projeto mostraram que a relação entre a via de nascimento e o desenvolvimento da microbiota intestinal de neonatos caninos possui certa relevância, porém, outros fatores como o contato dos neonatos com os tetos, boca e ânus da mãe parecem contribuir mais para a colonização inicial da microbiota canina do que o modo de nascimento propriamente dito. O uso do *seeding* vaginal como ferramenta para modulação da microbiota de neonatos nascidos através de cesariana eletiva não foi efetivo no presente estudo.

**Palavras-chave:** cães, disbiose, microbiologia, neonatologia, score Apgar

## **EFFECTS OF VAGINAL SEEDING ON THE COLONIZATION PATTERN OF THE INTESTINAL MICROBIOTA OF CANINE NEONATES BORN BY ELECTIVE C-ESAREAN AREAS**

**ABSTRACT-** The aim of this study was to analyze differences between the intestinal microbiota of canine neonates born of normal delivery with that of born cesarean section, as well as investigating the influence of vaginal seeding on the composition of the intestinal microbiota of those cesarean section, so as to propose vaginal seeding as a tool in modulation of neonatos microbiota born by elective cesarean section. Three pregnant adult dogs were submitted to caesarean section and four other, accompanied during normal delivery. The animals included in the experiment had body weight between 4 and 15 kg, age between 2 to 5 years. Samples of the mouth, vagina, anus and teat were collected before the epidural anesthesia (M0), using sterile gloves and swabs and, likewise, female samples were not subjected to Cesarean section (normal delivery) at the time it presented signs of prodrome. For the study of the effects of vaginal seeding on the neonatos microbiota, as soon as they were removed from the uterus, the samples of the mouth and anus of the neonates were performed and, continuous act, the vaginal seeding, which consisted of rubbing the secretions removed from the mother's vagina in the mouth, face and body of the neonates. In the Caesarean group, seeding was held in half of the neonates (cesarean seeding group, n = 6 neonates) and in the other half only the harvest of microbiological samples, without seeding (cesarean group, n = 6 neonates). A third group (normal delivery group, n = 16 neonates) was composed of neonates born by normal delivery, in which the composition of the intestinal microbiota was also evaluated. Counting was performed by surface platening and the groups of enterobacteria, Staphylococcus and Streptococcus. The results of this project showed that the relationship between the birth pathway and the development of the intestinal microbiota of canine neonates has some relevance, but other factors such as the contact of neonates with the mother's ceilings, mouth and anus seem to contribute more to colonization initial canine microbiota than the birth mode itself. The use of vaginal seeding as a tool for modulation of neonate microbiota born through elective cesarean section was not effective in the present study.

**Keywords:** dogs, dysbiosis, microbiology, neonatology, score Apgar

## **CAPÍTULO 1- Considerações gerais**

### **1. INTRODUÇÃO**

Define-se neonatologia a ciência responsável pelo estudo dos cuidados aos neonatos, aos seus aspectos fisiológicos e às suas afecções neonatais propriamente ditas (Lucio *et al.*, 2009). O período neonatal em cães corresponde às duas primeiras semanas de vida, período no qual ainda se observa elevada taxa de mortalidade (Vannucchi *et al.*, 2012; Vassalo *et al.*, 2015). Fatores predisponentes envolvem erros no manejo e a imaturidade do feto canino ao final da gestação. Causas não-infecciosas incluem hipóxia, prematuridade, hipotermia, hipoglicemia, doenças genéticas, trauma e intoxicações. As causas infecciosas incluem bactérias, vírus e parasitas, sendo as doenças bacterianas as mais importantes (Souza *et al.*, 2017).

Ao nascimento, o sistema gastrointestinal do neonato sofre mudança funcional drástica e assume as funções digestórias previamente realizadas pela placenta, incluindo a absorção de proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais para um crescimento e desenvolvimento adequado (Poffenbarger, 1990a, b).

Após o nascimento, o trato gastrointestinal do recém-nascido é rapidamente colonizado por microrganismos e é altamente instável (Garrigues *et al.*, 2022). Admitiu-se inicialmente que o trato gastrointestinal dos mamíferos era estéril durante a vida fetal intrauterina, ocorrendo a inoculação de microrganismos por contato com a vagina e pele da mãe e ingestão de leite nas primeiras horas após o parto (Dunn *et al.*, 2017). Porém, esta avaliação foi recentemente contestada devido ao surgimento de técnicas moleculares que permitiram a detecção de bactérias na placenta, útero ou líquido amniótico em diferentes mamíferos, com potencial transmissão de bactérias da mãe para o feto no útero. (Alipour *et al.*, 2018; Aagaard *et al.*, 2014; Wassenaar *et al.*, 2014). Todavia, a transferência bacteriana intrauterina ainda permanece um assunto de debate (Garrigues *et al.*, 2022).

Ferreti *et al.* (2018) identificaram cepas em recém-nascidos humanos provenientes da microbiota materna e relataram que algumas dessas cepas são

mais propensas a se adaptar e persistir no intestino do neonato do que estirpes não adquiridas da mãe. Por outro lado, alguns microrganismos permaneceram na microbiota dos neonatos de forma transitória, sugerindo sua origem de locais do corpo materno diferentes da via fecal (dorso da língua, vagina e pele), não colonizando o trato gastrointestinal neonatal. Em contraste, outras espécies fecais mais típicas (por exemplo, *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium breve*) persistem desde o nascimento até pelo menos 4 meses de idade, sugerindo colonização do intestino infantil humano.

A composição inicial de bactérias intestinais pode afetar o desenvolvimento do sistema imunológico pós-natal. Em humanos, acredita-se que a redução da estimulação microbiana durante a infância resulte em maturação tardia do sistema imunológico (Björkstén, 2006; Björkstén *et al.*, 2001). Ademais, tem-se observado que bactérias intestinais específicas podem ajudar a promover a saúde humana, tendo papel na prevenção ou tratamento de certas doenças, tais como falência múltipla de órgãos, câncer de cólon e doenças inflamatórias intestinais (Guarner; Malagelada, 2003).

Nas últimas décadas, vários estudos em humanos têm mostrado que o aumento da incidência de doenças autoimunes, infecciosas e alérgicas em população pediátrica e adulta pode estar intimamente relacionada à disbiose, que é a alteração do desenvolvimento fisiológico da microbiota intestinal. Esta alteração da microbiota intestinal tem sido observada em crianças que nasceram por cesariana e, portanto, que foram privadas do contato com a microbiota vaginal durante a passagem pelo canal do parto.

Na tentativa de corrigir esta disbiose dos recém-nascidos de cesariana, pesquisadores tem promovido a exposição de neonatos aos fluidos vaginais maternos, denominado *seeding* vaginal. As investigações utilizando este procedimento têm apresentado resultados interessantes, mas os estudos em humanos possuem limitações, destacando-se a ausência de repetição de resultados numa mesma cesariana, o que impossibilita a comparação entre dois indivíduos expostos às mesmas condições. No caso da medicina veterinária, até o presente momento não há relatos sobre a possível influência que o *seeding* vaginal teria na colonização bacteriana durante os primeiros dias de vida.

Destarte, ainda há uma falta de conhecimento sobre o desenvolvimento da microbiota intestinal em filhotes caninos e entender essa evolução inicial está

se tornando um aspecto fundamental para melhorar a saúde e o bem-estar dos cães a curto e longo prazo (Garrigues *et al.*, 2022). Devido à crescente evidência de que o microbioma intestinal desempenha um papel importante na saúde de neonatos em diferentes espécies, a identificação de fatores que o influenciam e, por sua vez, a saúde geral em filhotes, é um tópico promissor de pesquisa para diminuir a morbidade e mortalidade na espécie canina. (Garrigues *et al.*, 2022).

Além disso, estudos recentes revelaram que a microbiota intestinal canina é semelhante a microbiota intestinal humana (Coelho *et al.*, 2018). Tal fato, em parte, pode estar associado à domesticação do cão, que desempenhou um papel importante na alteração da microbiota intestinal canina, levando à perda de algumas bactérias intestinais em comparação com às dos lobos não domesticados e o surgimento de novas bactérias gastrointestinais devido a interação com humanos (Coelho *et al.*, 2018).

A semelhança estrutural e funcional do microbioma canino com o humano implica que, como os estudos em humanos são preditivos de resultados em cães, os estudos em cães podem ser preditivos de resultados em humanos. Os estudos com cães fornecem, então, um duplo benefício: diretamente para cães e para seu potencial de generalização para humanos (Coelho *et al.*, 2018). Destarte, os cães podem ser considerados bons modelos experimentais para avaliar os efeitos do *seeding* vaginal, visto que apresentam partos múltiplos e, portanto, ter-se-á vários neonatos advindos da mesma mãe, mantidos sob a mesma alimentação e ambiente, expostos ao mesmo microbioma. Em vista do exposto, este estudo teve como escopo comparar a microbiota intestinal de filhotes nascidos de parto normal e de cesariana, bem como verificar o possível efeito do *seeding* vaginal em ninhadas nascidas de cesariana.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Investigar se a via de nascimento influencia a composição da microbiota intestinal de neonatos caninos e se há influência do seeding vaginal sobre o microbioma de neonatos nascidos de cesariana eletiva.

### 2.2. Objetivos específicos

a) Avaliar comparativamente a microbiota de neonatos nascidos de cesariana eletiva com e sem a realização de *seeding* vaginal, de modo a se verificar se ele, de fato, modifica a microbiota intestinal de neonatos.

b) Identificar a composição da microbiota de neonatos nascidos por via vaginal, assim como comparar com a de nascidos por cesariana eletiva.

c) Quantificar as bactérias presentes na boca, vagina, pele (mama) e ânus das fêmeas caninas submetidas a cesariana eletiva, daquelas em trabalho de parto normal, bem como da boca e ânus do recém-nascido, e das fezes nos primeiros 15 dias pós nascimento.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Características Gerais da Microbiota Intestinal em cães

A microbiota intestinal canina é constituída por uma população microbiana complexa que está potencialmente relacionada ao metabolismo, atividade imunológica e aparecimento de doenças gastrointestinais. Estudos iniciais revelam que a microbiota intestinal canina é dinâmica e as populações bacterianas presentes nos segmentos intestinais adjacentes são semelhantes, com predominância de gêneros anaeróbios. Destarte, com o uso da análise metagenômica, observou-se que os conteúdos de nutrientes na dieta podem modular as populações bacterianas e os metabólitos no intestino canino.

Pesquisas posteriores revelaram correlações significativas entre fatores dietéticos e microbiomas do intestino canino. Ademais, as doenças gastrointestinais caninas estão intimamente relacionadas com a disbiose da microbiota intestinal e distúrbios metabólicos (Huang *et al.*,2020).

A composição da microbiota intestinal evolui rapidamente durante o desenvolvimento da vida canina e o intestino é colonizado progressivamente por algumas bactérias cruciais, principalmente anaeróbias, antes que o filhote atinja a idade adulta. Essas comunidades bacterianas são de suma importância para a saúde do hospedeiro e quaisquer distúrbios em sua composição podem levar a alterações em estados metabólicos, podendo culminar com diarreia aguda ou doença inflamatória intestinal (Garrigues *et al.*, 2022).

Após o nascimento, o trato gastrointestinal do recém-nascido é rapidamente colonizado por microrganismos e é altamente instável. Nos primeiros dois dias de vida, o trato gastrointestinal é dominado por Firmicutes, representando cerca de 60% das comunidades bacterianas (Guard *et al.*, 2017). Entretanto, a baixa abundância microbiana e a diversidade da microbiota nessa fase da vida facilitam a potencial colonização por bactérias externas (Perez-Munoz *et al.*, 2017).

Nas espécies animais, a presença de oxigênio no trato gastrointestinal durante os primeiros dias de vida promove a colonização de anaeróbios obrigatórios e facultativos (Sanidad e Zeng, 2020). A maioria das Proteobacterias e Bacteroides se enquadram nessas categorias e demonstraram estar entre os primeiros membros colonizadores no intestino neonatal. O consumo de oxigênio e diminuição do potencial redox (que é positivo no nascimento) desempenham um papel fundamental na preparação do intestino para maior colonização de anaeróbios estritos, posteriormente necessários para a função intestinal saudável (Moon *et al.*, 2018; Shin *et al.*,2015; Pereira *et al.*, 2020). Rapidamente, a proporção de bactérias aerotolerantes diminui no intestino do filhote. Destarte, a capacidade dessas bactérias de digerir oligossacarídeos do leite e produzir lactato sugere que o aumento em abundância no intestino do filhote não esteja relacionado apenas à homeostase do oxigênio, mas também à ingestão de leite pelo filhote durante o período neonatal (Garrigues *et al.*, 2022).

Observa-se então que as mudanças importantes nas populações bacterianas do trato gastrointestinal dos filhotes acontecem durante as primeiras

semanas de vida, antes mesmo de o filhote começar a ingerir alimentos sólidos. Essas mudanças microbianas e, portanto, as propriedades biológicas do microbioma são induzidas principalmente por eventos metabólicos neonatais, como o consumo progressivo de oxigênio no intestino ou a capacidade crescente do intestino de absorver nutrientes, produzir ácidos biliares e desenvolver funções imunológicas (Buddington, 2003).

De acordo com Gethings-Behncke e colaboradores (2020), Proteobacteria e Firmicutes foram os filos mais dominantes na maioria das amostras retais coletadas nos dias 1 e 8 pós-parto, ratificando o papel desses filos como os colonizadores precoces mais abundantes do microbioma intestinal em neonatos caninos. A importância do Enterococcus no microbioma retal inicial de filhotes saudáveis ainda é incerta. Embora o Enterococcus faecium seja considerado um probiótico benéfico em cães (Subramanian *et al.*, 2015), também foi relatado seu aumento em quadros de diarreia e foi associado à hipocobalaminemia em animais saudáveis (Shin *et al.*, 2015; Dunn *et al.*, 2017).

Segundo Beller e colaboradores (2021), em cães neonatos nascidos por via vaginal, a composição da população microbiana meconial assemelha-se à sua contraparte vaginal materna, enquanto em neonatos nascidos por cesariana, assemelha-se à composição bacteriana materna vaginal e oral.

Embora muitos estudos se concentrem na microbiota de crianças, ainda há uma falta de conhecimento sobre o desenvolvimento da microbiota intestinal em filhotes caninos. Entender essa evolução inicial está se tornando um aspecto fundamental para melhorar a saúde e o bem-estar dos cães a curto e longo prazo (Garrigues *et al.*, 2022).

### **3.2. Características Gerais da Microbiota Intestinal em Humanos**

A colonização intestinal inicial em recém-nascidos humanos tem início com a exposição à microbiota vaginal e fecal materna, e é fundamental para o desenvolvimento e função intestinal normal (Insoft *et al.*, 1996; McCracken e Lorenz, 2001). Alterações gestacionais associadas ao microbioma e seus efeitos em recém-nascidos humanos foram extensivamente investigados devido às suas possíveis implicações nos estados de saúde e doença, tanto no início da vida quanto posteriormente (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016; Vuillermin *et al.*, 2017;

Nuriel-Ohayon *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2020). Estado de saúde inadequado da mãe, nascimento por cesariana, qualidade do leite, uso de antibióticos e parto prematuro são fatores associados ao desenvolvimento anormal do microbioma neonatal e estão potencialmente ligados a várias doenças, como por exemplo, asma, atopia e obesidade (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016; Arrieta *et al.*, 2014; Turjeman *et al.*, 2021).

Em humanos, o parto vaginal leva a uma população microbiana intestinal neonatal dominada pelo canal de parto materno e constituintes microbianos fecais (por exemplo, *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*), enquanto a cesariana resulta em população microbiana neonatal dominada por constituintes microbianos da pele materna (por exemplo, *Staphylococcus spp.*) (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016). Enquanto a microbiota intestinal adulta é dominada por membros dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, a microbiota intestinal neonatal é inicialmente representada por microrganismos de Proteobacteria e Actinobacteria, tornando-se mais diversificada posteriormente com o surgimento de Firmicutes e Bacteroidetes (Spor *et al.*, 2011; Ottman *et al.*, 2012).

Como gênero bacteriano dominante na microbiota de bebês amamentados pelo leite materno temos o gênero *Bifidobacterium spp.* (Turroni *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2007). Porém, estudos recentes também mostraram uma alta ocorrência de enterobactérias nessa população infantil. Observou-se que as Proteobactérias (principalmente Enterobacteriaceae) dominam a microbiota intestinal infantil durante as primeiras semanas, sendo as bifidobactérias a segunda maior população microbiana, as quais aumentam ao longo do tempo concomitante à diminuição das enterobactérias (Arboleya *et al.*, 2014). Esses primeiros momentos de comunicação microbiota-hospedeiro constituem eventos-chave que sustentam a maturação adequada do hospedeiro humano, com subsequente estabelecimento e manutenção da homeostase da microbiota hospedeira durante o início da vida, eventos que podem ter consequências imediatas e de longo prazo para a saúde (Milani *et al.*, 2017).

### **3.3. Influência da Microbiota Intestinal na saúde do hospedeiro**

Estudos recentes em mamíferos destacam a microbiota como ferramenta fundamental nos processos vitais do hospedeiro, estando envolvida nos

processos de requisitos de energia, metabolismo, atividade imunológica e desenvolvimento neurocomportamental. A interação entre a microbiota intestinal, seu hospedeiro e outras células somáticas regula funções como a digestão, o metabolismo do hospedeiro, síntese de vitaminas (vit. K e complexo B), biotransformação de ácidos biliares, correta maturação das células gastrointestinais e defesa contra bactérias patogênicas (Steiner; Ruaux, 2008).

Nos últimos anos o microbioma intestinal tem sido considerado equivalente a um novo órgão, fundamental para a sobrevivência do hospedeiro (Baquero; Nombela, 2012). De fato, a microbiota do trato gastrointestinal é uma estrutura altamente complexa composta por trilhões de microrganismos, dependendo da espécie. Por exemplo, existem cerca de 10<sup>10</sup> bactérias em apenas 1 ml de rúmen de vaca (Matthews *et al.*, 2018), enquanto existem cerca de 10<sup>13</sup> microrganismos no total no intestino de onívoros, como os humanos e carnívoros, como os cães, os quais são majoritariamente bactérias, embora também haja vírus e fungos (Gill *et al.*, 2006; Suchodolski, 2011). Esses microrganismos compartilham um vínculo profundo com seu hospedeiro, oferecendo propriedades metabólicas que o organismo sozinho não poderia realizar, como assimilação de nutrientes e desenvolvimento do sistema imune.

A composição da microbiota gastrointestinal pode ser afetada por muitos fatores, como idade, nutrição e ambiente (Hasan; Yang, 2019; Tilocca *et al.*, 2017). Algumas das mudanças induzidas por esses fatores serão seguidas por efeitos benéficos na saúde intestinal do hospedeiro, mas outras podem levar a mudanças do equilíbrio microbiano (eubiose) para o desequilíbrio (disbiose) e, conseqüentemente, distúrbios gastrointestinais ou mesmo doenças metabólicas sistêmicas ou autoimunes (Tilocca *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2015; Chakraborti, 2015; Nishino *et al.*, 2018; Moffa *et al.*, 2019). Um estado de disbiose é encontrado em uma ampla gama de doenças, como doença inflamatória intestinal (DII), obesidade, alergia, diabetes e autismo (Mondo *et al.*, 2019). Um ecossistema microbiano equilibrado é crucial para a saúde e homeostase do hospedeiro (Guard *et al.*, 2017). Além disso, durante o período neonatal e de desenvolvimento do indivíduo, o microbioma intestinal é ainda mais sensível a potenciais disruptores do que durante a idade adulta, e as mudanças na composição da microbiota que ocorrem durante este período podem induzir distúrbios de saúde de forma mais tardia (Han *et al.*, 2018).

Um grande exemplo da importância da microbiota intestinal na saúde do hospedeiro é a existência de uma rede de comunicação bidirecional entre a microbiota intestinal e o cérebro em humanos, que inclui sistemas/vias neurais, endócrinas, metabólicas e imunológicas, conhecida como eixo intestino-cérebro (Heijtz *et al.*, 2011; Ogbonnaya *et al.*, 2015; Lynch;Pedersen, 2016; Fung *et al.*, 2017). Estudos recentes têm investigado o envolvimento da microbiota intestinal na contribuição para o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) por exemplo, neurogênese, maturação da microglia e mielinização (Erny *et al.*, 2015; Hoban *et al.*, 2016) e funções,por exemplo, cognição, humor e comportamento,como sociabilidade e ansiedade (Heijtz *et al.*, 2011; Clarke *et al.*, 2013). Além disso, foi demonstrado que a microbiota intestinal desempenha papéis-chave na patogênese e progressão de vários distúrbios neurodegenerativos,por exemplo, doenças de Parkinson e Alzheimer, esquizofrenia, transtorno do espectro do autismo e esclerose múltipla(Martinez *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019; Iannone *et al.*, 2019; Rinninella *et al.*, 2019; Xue *et al.*, 2020).

Devido à crescente evidência de que o microbioma intestinal desempenha um papel importante na saúde de neonatos em diferentes espécies, a identificação de fatores que o influenciam e, por sua vez, a saúde geral em filhotes, é um tópico promissor de pesquisa para diminuir a morbidade e mortalidade na espécie canina. (Garrigues *et al.*, 2022).

### **3.4. Influência da via de nascimento no estabelecimento da microbiota intestinal neonatal e adulta e suas consequências**

Há muitos fatores que impulsionam a microbiota intestinal, entre eles, a idade tem um dos maiores impactos na composição microbiana (You e Kim, 2021). O desenvolvimento do microbioma intestinal começa logo no nascimento e tem evolução em sua composição juntamente com os diferentes estágios da vida do hospedeiro. Na medicina humana, foi relatado que a maioria das cepas bacterianas intestinais permanecem estáveis por décadas (Faith *et al.*, 2013). Este fato torna a colonização precoce uma etapa crucial para o recém-nascido, pois as primeiras bactérias estabelecidas possivelmente moldarão as funções do

intestino do hospedeiro durante a maior parte de sua vida (Subramanian *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2015).

Inicialmente, muitos estudos consideraram que o trato gastrointestinal dos mamíferos é estéril durante a vida fetal intrauterina, ocorrendo a inoculação de microrganismos por contato com a vagina e pele da mãe e ingestão de leite nas primeiras horas após o parto (Dunn *et al.*, 2017). Conhecido como o “paradigma do útero estéril”, esta avaliação foi recentemente contestada devido ao surgimento de técnicas moleculares que permitiram a detecção de bactérias na placenta, útero ou líquido amniótico em diferentes mamíferos, suscitando a ideia de que há transmissão de bactérias da mãe para o feto ainda no ambiente uterino (Aagaard *et al.*, 2014; Wassenaar; Panigrahi, 2014; Alipour *et al.*, 2018).

Em estudo realizado por Zakošek e colaboradores (2020) explorou-se a possibilidade de colonização bacteriana intrauterina do feto canino por meio da análise da composição da microbiota em amostras de mecônio e placenta, detectando-se a presença de bactérias em 86,5% das amostras de mecônio e 57% das amostras de placenta, coletadas imediatamente após o nascimento. Em cães, assim como em humanos, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Neisseria zoodegmatis*, respectivamente dos filos Firmicutes e Proteobacteria, foram as bactérias mais comumente isoladas (Dong *et al.*, 2018; He *et al.*, 2020). Destarte, *Staphylococcus* parece ser um dos gêneros mais comuns na microbiota do endométrio das mães, enquanto o *Streptococcus spp.* está mais presente na vagina, corroborando que a microbiota do mecônio dos filhotes nascidos de parto vaginal se assemelha parcialmente à da vagina da mãe e sustentando a hipótese de transferência transplacentária de microrganismos (Lyman *et al.*, 2019). De fato, a presença de microbiota, mais frequentemente *Acinetobacter spp.*, *Staphylococci* e *Bacillus spp.*, no líquido amniótico e no mecônio foi observada em filhotes nascidos por cesariana (Rota *et al.*, 2021).

Apesar desses estudos, o fato de terem obtido resultados com baixa concentração de bactérias e as técnicas baseadas em cultura poderem falhar na identificação da maioria dos organismos, adicionado ao fato da contaminação ambiental não poder ser totalmente descartada ao coletar amostras de recém-nascidos no nascimento (Gunay *et al.*, 2010; Perez-Munoz *et al.*, 2017), a transferência bacteriana intrauterina ainda permanece um assunto de debate.

Após o nascimento, o primeiro passo na modulação da microbiota intestinal do filhote vem da transferência vertical da mãe. Por exemplo, cadelas prenhes compartilham Bifidobacteria de seu trato intestinal com seus filhotes (Milani *et al.*, 2017). Em porcas, os agentes microbianos maternos (do leite, pele, vagina, fezes) contribuem para cerca de 90% das bactérias do intestino delgado de recém-nascidos com menos de 35 dias de idade (Liu *et al.*, 2019). Essas descobertas sustentam que a transmissão vertical da mãe para a prole desempenha um papel decisivo na formação da composição inicial e da diversidade da microbiota do recém-nascido.

Estudos recentes sobre a microbiota infantil em humanos sugeriram que a transferência de bactérias da mãe para o bebê é altamente dependente do tipo de nascimento, com bebês nascidos por cesariana apresentando alteração da microbiota e, como consequência, maior risco de problemas de saúde (Dominguez-Bello, *et al.*, 2016; Mortensen *et al.*, 2021). Achados semelhantes foram observados em estudos caninos com menor diversidade bacteriana no mecônio de filhotes nascidos por cesariana em comparação com os nascidos por via vaginal (Zakošek *et al.*, 2020; Kajdic *et al.*, 2021). Além disso, o mecônio de filhotes após o parto vaginal é colonizado por espécies de Staphylococcus quase imediatamente após o parto (Saijonmaa-Koulumies e Lloyd, 2002), sendo esta espécie de bactéria comum na microbiota vaginal da mãe (Zakošek *et al.*, 2020). Na medicina humana, foi observada menor diversidade e colonização precoce de bactérias oportunistas em crianças nascidas por cesariana, o que acaba impactando a saúde do recém-nascido durante o período neonatal (Dewey *et al.*, 2003; Flaherman, *et al.*, 2015). Em cães, foi demonstrado que filhotes nascidos de parto vaginal ganharam peso significativamente mais rápido do que os nascidos por cesariana. Destarte, os filhotes com colonização bacteriana detectada no mecônio, ganharam significativamente mais peso no terceiro e quarto dias de vida (Garrigues *et al.*, 2022).

Outro estudo em humanos cita que bebês nascidos de parto vaginal entram em contato com a microbiota vaginal e fecal materna, o que resulta na colonização do intestino neonatal por microrganismos associados à vagina, como Lactobacillus e Prevotella (Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Biasucci *et al.*, 2010). Em contraste, os bebês nascidos por cesariana não são diretamente expostos aos microrganismos maternos e, portanto, são mais propensos a

serem colonizados por microrganismos ambientais da pele materna, da equipe do hospital ou do ambiente hospitalar (Biasucci *et al.*, 2010; Bokulich *et al.*, 2016; Rodriguez *et al.*, 2015; Backhed *et al.*, 2015). Essas diferenças entre a microbiota de bebês nascidos de parto normal e cesariana diminuem gradualmente, embora os bebês nascidos de cesariana mantenham uma microbiota mais heterogênea até os 12 meses de vida comparado aos nascidos de parto normal (Backhed *et al.*, 2015, Martin *et al.*, 2016). Ademais, reportam-se diferenças persistentes na microbiota intestinal entre crianças nascidas por cesariana e parto normal a partir dos 7 anos (Salminen *et al.*, 2004; Penders *et al.*, 2006; Neu; Rushing, 2011).

As diferenças observadas na microbiota entre bebês nascidos por parto vaginal e por cesariana têm sido associadas ao efeito protetor do parto natural, principalmente porque foi sugerido que a cesariana tem implicações para a saúde a longo prazo. De fato, tem sido reportado uma redução notável nos níveis de várias citocinas em bebês nascidos por cesariana (Malamitsi-Puchner *et al.*, 2005; Jakobsson *et al.*, 2014), bem como a associação desta com risco aumentado de distúrbios imunológicos, tais como asma (Thavagnanam *et al.*, 2008), alergia (Bager *et al.*, 2008) e diabetes tipo 1 (Cardwell *et al.*, 2008), e maior incidência de obesidade (Pei *et al.*, 2014). Assim, a descoberta de que o tipo de parto afeta o estado de saúde ao longo da vida adulta e os efeitos na composição da microbiota intestinal diminuem após os primeiros anos de vida, destaca a relevância da microbiota intestinal inicial na maturação e desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro (Milani *et al.*, 2017).

### **3.5. Cães como modelo de pesquisa para estudos em humanos**

Estudos recentes revelaram que a microbiota intestinal canina é semelhante a microbiota intestinal humana (Coelho *et al.*, 2018). Tal fato, em parte, pode estar associado à domesticação do cão, que desempenhou um papel importante na alteração da microbiota intestinal canina, levando à perda de algumas bactérias intestinais em comparação com às de lobos não domesticados e o surgimento de novas bactérias gastrointestinais devido a interação com humanos (Coelho *et al.*, 2018).

A seleção natural, impulsionada por pressões ambientais convergentes, pode ter desempenhado um papel importante na modulação de um conjunto

semelhante de genes entre os genomas de humanos e caninos (Coelho *et al.*, 2018). Um grupo de genes relacionados à digestão e metabolismo em ambas as espécies aparenta ter sofrido seleção positiva durante a domesticação. Várias seleções positivas em ambas as espécies determinam evolução paralela. Outra conclusão interessante é que a seleção positiva atuou em genes envolvidos em processos neurológicos tanto em humanos quanto em caninos (Coelho *et al.*, 2018). Os genes envolvidos nos processos neurológicos caninos se sobrepõem extensivamente com esses genes em humanos (Wang *et al.*, 2013). Além disso, Tal e colaboradores (2021) relataram semelhanças nos fenótipos da composição retal disbiótica em cães e humanos, o que pode sugerir uma fisiopatologia compartilhada entre doenças neonatais humanas e caninas que estão associadas à disbiose precoce.

No trabalho de Coelho e colaboradores (2018) foi construído um catálogo de genes do microbioma intestinal canino, no qual se observou que este é predominantemente composto por cinco filos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria e Fusobacteria, com os dois primeiros contribuindo com mais da metade dos genes detectados. Destarte, os autores supracitados concluíram que a distribuição em nível de filo genético no intestino do cão é mais semelhante à do intestino humano, embora observemos uma proporção maior de genes de Fusobacteria.

A semelhança estrutural e funcional do microbioma canino com o humano implica que, como os estudos em humanos são preditivos de resultados em cães, os estudos em cães podem ser preditivos de resultados em humanos. Os estudos com cães fornecem, então, um duplo benefício: diretamente para cães e para seu potencial de generalização para humanos (Coelho *et al.*, 2018). Um exemplo são estudos que podem fornecer abordagens potenciais no uso de modelos caninos para investigar doenças neurológicas (Huang *et al.*, 2020). Portanto, o estudo dos microrganismos intestinais caninos permite esclarecer alterações nas bactérias intestinais caninas em diferentes condições, simular doenças humanas em modelos caninos e realizar estudos aprofundados sobre as interações entre bactérias intestinais e doenças (Huang *et al.*, 2020).

### **3.6. Seeding vaginal**

O termo *seeding* vaginal corresponde à técnica de inoculação de gaze ou swab com fluidos vaginais maternos para transferência de parte da microbiota vaginal para boca, nariz ou pele de um neonato nascido por cesariana (Mueller *et al.*, 2014; Molloy, 2015). Como o aumento na frequência de asma, doença atópica e distúrbios imunológicos reflete o aumento na taxa de cesariana, o uso do *seeding* vaginal tem como objetivo permitir a colonização adequada do intestino fetal e, portanto, reduzir o risco subsequente dessas doenças (Mueller *et al.*, 2014). Após divulgação de potenciais benefícios do *seeding* vaginal, tornou-se cada vez mais comum que as pacientes discutissem os possíveis benefícios de realizá-lo com seus obstetras ou outros prestadores de cuidados obstétricos (Cunnington *et al.*, 2016).

No entanto, existem poucos estudos publicados testando o *seeding* vaginal em mulheres (Butler *et al.*, 2021). Dominguez Bello e colaboradores. (2016), publicaram um estudo piloto muito pequeno mostrando que os microbiomas da pele, cavidade oral e anal de quatro bebês nascidos por cesariana e que haviam recebido o *seeding* vaginal, eram mais semelhantes aos de sete neonatos nascidos de parto normal do que os de sete bebês nascidos por cesariana sem o uso do *seeding*. Embora esse relato descreva um aparente efeito positivo do *seeding* vaginal, nenhuma amostra de fezes foi coletada e, portanto, ainda não está claro qual efeito a sementeira teve na microbiota intestinal desses bebês (Butler *et al.*, 2021).

No estudo de Song e colaboradores (2021), o *seeding* vaginal pode estar associado ao desenvolvimento de uma microbiota no início do primeiro ano de vida que se alinha mais intimamente com bebês nascidos por parto vaginal do que com àqueles nascidos por cesariana. No entanto, permanecem questões como o benefício dessa diferença, e a relação causal do *seeding* vaginal com as diferenças subsequentes da microbiota, que devem ser abordadas antes de incentivar o uso como uma prática de rotina nas cesarianas.

É certo que a otimização do microbioma pode fornecer uma estratégia terapêutica para prevenir doenças neonatais associadas à disbiose característica entre as espécies, acarretando implicações globais de saúde única. Nesse quesito, o uso do *seeding* vaginal pode ser uma ferramenta promissora, embora ainda sejam necessários estudos que esclareçam seu real efeito.

#### 4. REFERÊNCIAS

Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. **Sci Transl Med.** 6:237ra65 (2014). doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.

Alipour MJ, Jalanka J, Pessa-Morikawa T, Kokkonen T, Satokari R, Hynönen U, *et al.* The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. **Sci Rep.** 8:10437 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-28733-y.

Arboleya S, Sanchez B, Milani C, Duranti S, Solis G, Fernandez N, de los Reyes-Gavilan CG, Ventura M, Margolles A, Gueimonde M. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. **J Pediatr.** 166:538-544 (2015). doi: 10.1016/j.jpeds.2014.09.041.

Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Front Immunol.** 5:427 (2014). doi: 10.3389/fimmu.2014.00427.

Backhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H, Khan MT, Zhang J, Li J, Xiao L, Al-Aama J, Zhang D, Lee YS, Kotowska D, Colding C, Tremaroli V, Yin Y, Bergman S, Xu X, Madsen L, Kristiansen K, Dahlgren J, Wang J. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell Host Microbe.** 17:690–703 (2015). doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.

Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. **Clin Exp Allergy**. 38: 634–642 (2008). doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.02939.x.

Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. **Clin Microbiol Infect**. 18(Suppl. 4):2–4 (2012). doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03916

Beller L, Deboutte W, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Valles-Colomer M, *et al*. Successional stages in infant gut microbiota maturation. **mBio**. (2021) 12:e0185721. doi: 10.1128/mBio.01857-21

Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. **Early Hum Dev**. 86(Suppl 1):S13–S15 (2010). doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004.

Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, Lieber AD, Wu F, Perez-Perez GI, Chen Y, Schweizer W, Zheng X, Contreras M, Dominguez-Bello MG, Blaser MJ. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. **Sci Transl Med**. 8:343ra82 (2016). doi: 10.1126/scitranslmed.aad7121.

Buddington RK. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. **Am J Vet Res**. (2003) 64:646-651. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.646

Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinek O, Svensson J, Goldacre MJ, Parslow RC, Pozzilli P, Brigis G, Stoyanov D, Urbonaite B, Sipetic S, Schober E, Ionescu-Tirgoviste C, Devoti G, de Beaufort CE, Buschard K, Patterson CC. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. **Diabetologia**. 51: 726–735 (2008). doi: 10.1007/s00125-008-0941-z.

Chakraborti CK. New-found link between microbiota and obesity. **World J Gastrointest Pathophysiol**. 6:110-9 (2015). doi: 10.4291/wjgp.v6.i4.110.]

Chastant-Maillard S, Guillemot C, Feugier A, Mariani C, Grellet A, Mila H. Reproductive performance and pre-weaning mortality: preliminary analysis of 27,221 purebred female dogs and 204,537 puppies in France. **Reprod Domest Anim** 52:158-162 (2017).

Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. **Mol Psychiatry**. 18:666-673 (2013). doi: 10.1038/mp.2012.77.

Dewey KG, Nommsen-Rivers LA, Heinig MJ, Cohen RJ. Risk factors for suboptimal infant breastfeeding behavior, delayed onset of lactation, and excess neonatal weight loss. **Pediatrics**. 112:607–19 (2003). doi: 10.1542/peds.112.3.607.

Dong T, Chen T, White RAI, Wang X, Hu W, Liang Y, *et al*. Meconium microbiome associates with the development of neonatal jaundice. **Clin Transl Gastroenterol**. 9:e182 (2018). doi: 10.1038/s41424-018-0048-x.

Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, *et al*. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. **Nat Med**. 22:250–253 (2016). doi: 10.1038/nm.4039.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proc Natl Acad Sci USA**. 107:11971–11975 (2010). doi: 10.1073/pnas.1002601107.

Dunn AB, Jordan S, Baker BJ, Carlson NS. The maternal infant microbiome: considerations for labor and birth. **MCN Am J Matern Child Nurs**. 42:318–325 (2017). doi: 10.1097/NMC.0000000000000373.

Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mhlahoi T, Jakobshagen K, Buch T, *et al.* Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. **Nat Neurosci.** 18:965-977 (2015). doi: 10.1038/nn.4030.

Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, *et al.* The long-term stability of the human gut microbiota. **Science.** 341:1237439 (2013). doi: 10.1126/science.1237439.

Flaherman VJ, Schaefer EW, Kuzniewicz MW, Li SX, Walsh EM, Paul IM. Early weight loss nomograms for exclusively breastfed newborns. **Pediatrics.** 135:e16–23 (2015). doi: 10.1542/peds.2014-1532.

Fouhy F, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C, Cotter PD. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. **Gut Microbes.** 3:203–220 (2012). doi: 10.4161/gmic.20169.

Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nat Neurosci.** 20:145-155 (2017). doi: 10.1038/nn.4476.

Garrigues Q, *et al.* Composition and evolution of the gut microbiota of growing puppies is impacted by their birth weight. **Scientific Reports**, v.9 (2022). doi:10.21203/rs.3.rs-2604924/v1.

Gethings-Behncke C, Coleman HG, Jordao HWT, Longley DB, Crawford N, Murray LJ, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* in the colorectum and its association with cancer risk and survival: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** (2020) 29:539-548. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-1295

Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**. 312:1355-9 (2006). doi: 10.1126/science.1124234.

Grundy, S. A. Clinically Relevant Physiology of the Neonate. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 36(3), 443–459 (2006). doi:10.1016/j.cvsm.2005.12.002.

Guard BC, Mila H, Steiner JM, Mariani C, Suchodolski JS, Chastant-Maillard S. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. **PLoS ONE**. (2017) 12:e017571.

Gunay U, Onat K, Gunay A, Ulgen M. Vaginal, cervical and uterine bacterial flora at the different stages of the reproductive cycle in ovariohysterectomized bitches. **J Anim Vet Adv**. 9:478–81 (2010). doi: 10.3923/javaa.2010.478.481.

Hasan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. **PeerJ**. 7:e7502 (2019). doi: 10.7717/peerj.7502.

Han GG, Lee J-Y, Jin G-D, Park J, Choi YH, Kang S-K, *et al.* Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. **Sci Rep**. 8:6012 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-24508-7.

He Q, Kwok L-Y, Xi X, Zhong Z, Ma T, Xu H, *et al.* The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal and vaginal microbiota. **Gut Microbes**. 12:1794266 (2020). doi: 10.1080/19490976.2020.1794266.

Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forssberg H, Pettersson S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proc Natl Acad Sci USA**. 108:3047-3052 (2011). doi: 10.1073/pnas.1010529108.

Hoban AE, Stilling RM, Ryan FJ, Shanahan F, Dinan TG, Claesson MJ, Clarke G, Cryan JF. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. **Transl Psychiatry**. 6:e774 (2016). doi: 10.1038/tp.2016.42.

Huang, Zongyu; Pan, Zhiyuan; Yang, Ruifu; Bi, Yujing; Xiong, Xiaohui. The canine gastrointestinal microbiota: early studies and research frontiers. **Gut Microbes**, 1–20 (2020). doi:10.1080/19490976.2019.1704142.

Iannone LF, Preda A, Blottière HM, Clarke G, Albani D, Belcastro V, Carotenuto M, Cattaneo A, Citraro R, Ferraris C, *et al.* Microbiota-gut brain axis involvement in neuropsychiatric disorders. **Expert Rev Neurother**. 19:1037-1050 (2019). doi: 10.1080/14737175.2019.1658346.

Indrebø A, Trangerud C, Moe L. Canine neonatal mortality in four large breeds. **Acta Vet Scand** 49:1-5 (2007).

Insoft RM, Sanderson IR, Walker WA. Desenvolvimento da função imunológica no intestino e seu papel nas doenças neonatais. **Pediatr. Clin. Norte Am.** 43, 551-571 (1996).

Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, Bjorksten B, Engstrand L, Andersson AF. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonization, and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. **Gut**. 63: 559–566 (2014). doi: 10.1136/gutjnl-2012-303249.

Kajdic L, Plavec T, Zdovc I, Kalin A, Zakošek Pipan M. Impact of type of parturition on colostrum microbiota composition and puppy survival. **Animals**. 11:1897 (2021). doi: 10.3390/ani11071897.

Kim E-T, Lee S-J, Kim T-Y, Lee H-G, Atikur RM, Gu B-H, *et al.* Dynamic changes in fecal microbial communities of neonatal dairy calves by aging and diarrhea. **Animals**. 11:1113 (2021). doi: 10.3390/ani11041113.

Konde AM, Gitau GK, Kiptoon J, Gakuya D. Puppy morbidity and mortality among breeding kennels in Nairobi, Kenya. *J. J. Vet. Sci. Res.* 1(4):1-7 (2015).

Lourenço MLG. Cuidados com neonatos e filhotes. [**Tratado de Medicina Interna de Caes e Gatos**]. 1st ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015.

Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med.* 375:2369-2379 (2016). doi: 10.1056/NEJMra1600266.

Lyman CC, Holyoak GR, Meinkoth K, Wieneke X, Chillemi KA, DeSilva U. Canine endometrial and vaginal microbiomes reveal distinct and complex ecosystems. **PLoS ONE.** 14:e0210157 (2019). doi: 10.1371/journal.pone.0210157.

Malamitsi-Puchner A, Protonotariou E, Boutsikou T, Makrakis E, Sarandakou A, Creatsas G. The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. **Early Hum Dev.** 81: 387–392 (2005). doi: 10.1016/j.earlhumdev.2004.10.017.

Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. **Gut Microbes.** 10:115-32 (2018). doi: 10.1080/19490976.2018.1505176.

Martin R, Makino H, Cetinyurek Yavuz A, Ben-Amor K, Roelofs M, Ishikawa E, Kubota H, Swinkels S, Sakai T, Oishi K, Kushiro A, Knol J. Early-life events, including mode of delivery and type of feeding. **Early Hum Dev.** 92: 97–105 (2016). doi: 10.1016/j.earlhumdev.2016.01.007.

Martinez KB, Leone V, Chang EB. Microbial metabolites in health and disease: Navigating the unknown in search of function. **J Biol Chem.** 292:8553-8559 (2017). doi: 10.1074/jbc.R116.763041.

McCracken VJ, Lorenz RG. O ecossistema gastrointestinal: uma aliança precária entre epitélio, imunidade e microbiota. **Célula. Microbiol.** 3, 1-11 (2001).

Mila H, Grellet A, Delebarre M, Mariani C, Feugier A, Chastant-Maillard S. Monitoring of the newborn dog and prediction of neonatal mortality. **Prev Vet Med** 143:11-20 (2015).

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arboleya Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiol Mol Biol Rev.** 81(4): e00036-17 (2017). doi: 10.1128/MMBR.00036-17.

Meloni T, Martino PA, Grieco V, Pisu MC, Banco B, Rota A, Veronesi MC. A survey on bacterial involvement in neonatal mortality in dogs. **Vet Ital** 50:293-299 (2014).

Moon CD, Young W, Maclean PH, Cookson AL, Bermingham EN. Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. **Microbiol Open.** (2018) 7:e00677. doi: 10.1002/mbo3.677.

Moffa S, Mezza T, Cefalo CMA, Cinti F, Impronta F, Sorice GP, *et al.* The interplay between immune system and microbiota in diabetes. **Mediators Inflamm.** e9367404 (2019). doi: 10.1155/2019/9367404.

Mondo *et al.* Microbiota na Saúde de Cães e Gatos. **Open Vet J.** 9(3):253-258 (2019).

Mortensen MS, Rasmussen MA, Stokholm J, Brejnrod AD, Balle C, Thorsen J, *et al.* Modeling transfer of vaginal microbiota from mother to infant in early life. **eLife.** 10:e57051 (2021). doi: 10.7554/eLife.57051.

Münnich A, Küchenmeister U. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: cornerstones of practical approach. **Reprod Domest Anim** 2014;49:64-74.

Murgas Torrazza R, Neu J. O microbioma intestinal em desenvolvimento e sua relação com a saúde e a doença no recém-nascido. **J. Perinatol.** 31, S29-S34 (2011).

Neu J, Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. **Clin Perinatol.** 38: 321–331 (2011). doi: 10.1016/j.clp.2011.03.008.

Nishino K, Nishida A, Inoue R, Kawada Y, Ohno M, Sakai S, *et al.* Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. **J Gastroenterol.** 53:95-106 (2018). doi: 10.1007/s00535-017-1384-4.

Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Alterações microbianas durante a gravidez, nascimento e infância. **Front Microbiol.** 7: 1031 (2016). doi: 10.3389/fmicb.2016.01031.

Nuriel-Ohayon M, *et al.* A progesterona aumenta a abundância relativa de bifidobactérias durante o final da gravidez. **Cell Rep.** 27: 730–736.e733 (2019). doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.052.

Ogbonnaya ES, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF, O’Leary OF. Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome. **Biol Psychiatry.** 78:e7-e9 (2015). doi: 10.1016/j.biopsych.2015.01.010.

Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? **Front Cell Infect Microbiol.** 2:104 (2012). doi: 10.3389/fcimb.2012.00104.

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biol.** 5:e177 (2007). doi: 10.1371/journal.pbio.0050177.

Pei Z, Heinrich J, Fuertes E, Flexeder C, Hoffmann B, Lehmann I, Schaaf B, von Berg A, Koletzko S; Influences of Lifestyle-Related Factors on the Immune System and the Development of Allergies in Childhood plus Air Pollution and Genetics (LISApplus) Study Group. Cesarean delivery and risk of childhood obesity. **J Pediatr.** 164: 1068–1073.e2 (2014). doi: 10.1016/j.jpeds.2013.12.044.

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics.** 118: 511–521 (2006). doi: 10.1542/peds.2005-2824.

Pereira AM, Pinna C, Biagi G, Stefanelli C, Maia MRG, Matos E, *et al.* Supplemental selenium source on gut health: insights on fecal microbiome and fermentation products of growing puppies. **FEMS Microbiol Ecol.** (2020) 96:fiaa212. doi: 10.1093/femsec/fiaa212.

Perez-Munoz M, Arrieta M-C, Ramer-Tait A, Walter J. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. **Microbiome.** 5:48 (2017). doi: 10.1186/s40168-017-0268-4.

Pitlik SD, Koren O. Como os holobiontes adoecem em direção a um esquema unificador de doenças. **Microbiome.** 5:64 (2017).

Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggianno GAD, Gasbarrini A, Mele MC. What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms.** 7:14 (2019). doi: 10.3390/microorganisms7010014.

Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbad A, Jenmalm MC, Marchesi JR, Collado MC. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microb Ecol Health Dis.** 26:26050 (2015).

Rota A, Del Carro A, Bertero A, Del Carro A, Starvaggi Cucuzza A, Banchi P, *et al.* Does bacteria colonization of canine newborns start in the uterus? **Animals.** 11:1415 (2021). doi: 10.3390/ani11051415.

Saijonmaa-Koulumies LE, Lloyd DH. Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. **Vet Dermatol.** 13:123–30 (2002). doi: 10.1046/j.1365-3164.2002.00290.x.

Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven-year-old children. **Gut.** 53: 1388–1389 (2004). doi: 10.1136/gut.2004.041640.

Sanidad KZ, Zeng MY. Neonatal gut microbiome and immunity. **Curr Opin Microbiol.** (2020) 56:30-37. doi: 10.1016/j.mib.2020.05.011.

Shao Y, Forster SC, Tsaliki E, Vervier K, Strang A, Simpson N, Kumar N, Stares MD, Rodger A, Brocklehurst P, Field N, Lawley TD. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. **Nature** 2019;574:117-121.

Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends Biotechnol.** (2015) 33:496-503. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011.

Song SJ, Wang J, Martino C, Jiang L, Thompson WK, Shenhav L, McDonald D, Marotz C, Harris PR, Hernandez CD, *et al.* Naturalization of the microbiota developmental trajectory of Cesarean-born neonates after vaginal *seeding*. **Med** 2, 951-964 (2021).

Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. **Nat Rev Microbiol.** 9:279-290 (2011). doi: 10.1038/nrmicro2540.

Subramanian S, Blanton LV, Frese SA, Charbonneau M, Mills DA, Gordon JI. Cultivating healthy growth and nutrition through the gut microbiota. **Cell.** (2015) 161:36-48. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.013.

Suchodolski JS. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 41:261-72 (2011). doi: 10.1016/j.cvsm.2010.12.006.

Sun J, Xu J, Ling Y, Wang F, Gong T, Yang C, Ye S, Ye K, Wei D, Song Z, *et al.* Fecal microbiota transplantation alleviated Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP/PS1 transgenic mice. **Transl Psychiatry.** 9:189 (2019). doi: 10.1038/s41398-019-0522-7.

Tilocca B, Burbach K, Heyer CME, Hoelzle LE, Mosenthin R, Stefanski V, *et al.* Dietary changes in nutritional studies shape the structural and functional composition of the pigs' fecal microbiome—from days to weeks. **Microbiome.** 5:144 (2017). doi: 10.1186/s40168-017-0362-7.

Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, Shields MD, Cardwell CR. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. **Clin Exp Allergy.** 38: 629–633 (2008). doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02780.x.

Torres J, *et al.* Bebês nascidos de mães com DII apresentam microbioma intestinal alterado que transfere anormalidades do sistema imunológico adaptativo para camundongos livres de germes. **Gut.** 69: 42–51 (2020). doi: 10.1136/gutjnl-2018-317855.

Turjeman S, Collado MC, Koren O. The gut microbiome in pregnancy and pregnancy complications. **Curr Opin Endocr Metab Res.** <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2021.03.004> (2021).

Turrone F, Peano C, Pass DA, Foroni E, Severgnini M, Claesson MJ, Kerr C, Hourihane J, Murray D, Fuligni F, Gueimonde M, Margolles A, De Bellis G, O'Toole PW, van Sinderen D, Marchesi JR, Ventura M. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. **PLoS One**. 7:e36957 (2012). doi: 10.1371/journal.pone.0036957.

Vuillermin PJ, *et al*. O microbioma materno durante a gravidez e a doença alérgica na prole. **Semin Immunopathol**. 39: 669–675 (2017). doi: 10.1007/s00281-017-0644-4.

Wang GD, Zhai W, Yang HC, Fan RX, Cao X, Zhong L, Wang L, Liu F, Wu H, Cheng L-G, *et al*. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. **Nat Commun**. 4: 1860 (2013). doi: 10.1038/ncomms2814.

Wassenaar TM, Panigrahi P. Is a foetus developing in a sterile environment? **Lett Appl Microbiol**. 59:572–579 (2014). doi: 10.1111/lam.12334.

Xue LJ, Yang XZ, Tong Q, Shen P, Ma SJ, Wu SN, Zheng ZL, Wang HG. Fecal microbiota transplantation therapy for Parkinson's disease: A preliminary study. **Medicine**. 99:e22035 (2020). doi: 10.1097/MD.00000000000022035.

You I, Kim MJ. Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: breed, age, and body condition score. **Animals**. 11:2432 (2021). doi: 10.3390/ani11082432.

Zachariassen LF, Krych L, Rasmussen SH, Nielsen DS, Kot W, Holm TL, Hansen AK, Hansen CHF. Cesarean section induces microbiota-regulated immune disturbances in C57BL/6 mice. **J Immunol** 2019;202(1):142-150.

Zakošek Pipan M, Kajdic L, Kalin A, Plavec T, Zdovc I. Do newborn puppies have their own microbiota at birth? Influence of type of birth on newborn puppy

microbiota. **Theriogenology.** 152:18–28 (2020). doi:  
10.1016/j.theriogenology.2020.04.014.

## **Capítulo 2- The importance of the intestinal microbiota in humans and dogs in the neonatal period**

### **Running title: Gut microbiota in humans and dogs: an overview**

Samara Beretta<sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-6002-6232>), Maricy Apparicio<sup>2\*</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-8360-0471>), Gilson Hélio Toniollo<sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-7666-8440>), Marita Vedovelli Cardozo<sup>3</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-3972-0198>)

<sup>1</sup>School of Agricultural and Veterinarian Sciences (FCAV), Department of Pathology, Reproduction and One Health, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal – SP, Brazil.

<sup>2</sup>School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, São Paulo State University (UNESP), Botucatu-SP, Brazil.

<sup>3</sup>Minas Gerais State University (UEMG), Department of Biomedical Sciences and Health, Laboratory of Physiology of Microorganisms, Passos-MG, Brazil.

\*Corresponding author: [maricy.apparicio@unesp.br](mailto:maricy.apparicio@unesp.br), Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Correa, s/n – Botucatu/SP - CEP 18618-681.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial support: SB received scholarship grant from CAPES (grant# 88887.550476/2020-00).

Author contributions: SB and MA- Conceptualization. SB, MA, GHT and MVC-Writing original draft, review & editing.

## **Abstract**

The neonatal period represents a critical stage for the establishment and development of the gut microbiota, which profoundly influences the future health trajectory of individuals. This review examines the importance of intestinal microbiota in humans and dogs, aiming to elucidate the distinct characteristics and variations in the composition between these two species. In humans, the intestinal microbiota contributes to several crucial physiological processes, including digestion, nutrient absorption, immune system development, and modulation of host metabolism. Dysbiosis, an imbalance or disruption of the gut microbial community, has been linked to various disorders, such as inflammatory bowel disease, obesity, and even neurological conditions. Furthermore, recent research has unveiled the profound influence of the gut-brain axis, emphasizing the bidirectional communication between the gut microbiota and the central nervous system, impacting cognitive function and mental health. Similarly, alterations in the canine intestinal microbiota have been associated with gastrointestinal disorders, including chronic enteropathy, such as inflammatory bowel disease, food allergies, and ulcerative histiocytic colitis. However, our understanding of the intricacies and functional significance of the intestinal microbiota in dogs remains limited. Understanding the complex dynamics of the intestinal microbiota in both humans and dogs is crucial for devising effective strategies to promote health and manage disease. Moreover, exploring the similarities and differences in the gut microbial composition between these two species can facilitate translational research, potentially leading to innovative therapeutic interventions and strategies to enhance the well-being of both humans and dogs.

**Keywords:** gut microbiome, dysbiosis, gut-brain axis, vaginal *seeding*.

**Received:** May 29, 2023.    **Accepted:** September 01, 2023.

## Introduction

The neonatal period in dogs corresponds to the first two to four weeks of life (Grundy, 2006; Vannucchi *et al.*, 2012; Mila *et al.*, 2015; Vassalo *et al.*, 2015). It is a challenging period (Konde *et al.*, 2015; Chastant-Maillard *et al.*, 2017) characterized by high rates of morbidity (Konde *et al.*, 2015) and mortality. The main causes of death include stillbirth, maternal and environmental factors, as well as infections (Indrebø *et al.*, 2007; Lourenço, 2015). Infectious diseases, particularly those caused by bacteria, are the second most common cause of death during this period (Meloni *et al.*, 2014; Münnich and Küchenmeister, 2014).

The mammalian intestinal tract harbors numerous microbial populations and plays crucial roles in host health, such as providing nutritional substrates, modulating the immune system, and aiding in defense against intestinal pathogens (Spor *et al.*, 2011; Pitlik and Koren, 2017). Studies indicate that early intestinal colonization in human newborns starts with exposure to maternal vaginal and fecal microbiota, which is essential for normal intestinal development and function (Insoft *et al.*, 1996; McCracken and Lorenz, 2001; Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Murgas Torrazza and Neu, 2011). Moreover, the mode of delivery, whether cesarean or vaginal, may influence the incidence of neonatal sepsis. Cesarean section has been shown to affect the intestinal microbiota and neonatal immunity in both humans and mice, thereby impacting the risk of bacterial infection (Shao *et al.*, 2019; Zachariassen *et al.*, 2019). In dogs, differences have been observed in the microbiota of puppies born vaginally versus those delivered by cesarean section, with higher rates of growth and weight gain in the former (Zakosek-Pipan *et al.*, 2020).

Alterations in gut microbiota have been associated with various gastrointestinal and systemic diseases, highlighting the potential utility of studying intestinal microbiota in diagnostic procedures and therapies (Garrigues *et al.*, 2022).

While there is extensive research on the intestinal microbiota in humans, our understanding of the development of intestinal microbiota in puppies is limited. Gaining insight into the early evolution of the canine microbiota is crucial for improving the short- and long-term health and well-being of dogs. Therefore, comprehending how dogs can serve as experimental models for human studies is highly relevant, as it would facilitate the design and execution of new studies that provide dual benefits for both canine and human health.

The objective of this work is to review the literature regarding the influence of the intestinal microbiota on neonatal and pediatric development in both humans and dogs, and to explore the various research possibilities involving dogs as an experimental model for applications in human medicine.

### **General characteristics of the intestinal microbiota in dogs**

The canine intestinal microbiota is comprised of a complex microbial population that potentially influences metabolism, immune activity, and the onset of gastrointestinal diseases. Initial studies have revealed that the canine intestinal microbiota is dynamic, with similar bacterial populations present in adjacent intestinal segments, primarily consisting of anaerobic genera. Metagenomic analysis has shown that the dietary nutrient content can modulate bacterial populations and metabolites in the canine intestine. Further research has demonstrated significant correlations between dietary factors and canine gut microbiomes. Additionally, canine gastrointestinal diseases are closely associated with dysbiosis of the intestinal microbiota and metabolic disorders (Huang *et al.*, 2020).

The composition of the intestinal microbiota evolves rapidly during the development of a dog's life, with the intestine being progressively colonized by crucial bacteria, mainly anaerobic, before reaching adulthood. These bacterial communities are of paramount importance for the host's health, and any disturbances in their composition can lead to changes in metabolic states, potentially resulting in gastrointestinal disorders (Garrigues *et al.*, 2022).

After birth, the gastrointestinal tract of newborn dogs is rapidly colonized by microorganisms and is highly unstable. In the first two days of life, Firmicutes dominate the gastrointestinal tract, representing approximately 60% of bacterial communities (Guard *et al.*, 2017). However, the low microbial abundance and diversity at this stage facilitate potential colonization by external bacteria (Perez-Munoz *et al.*, 2017).

In animal species, the presence of oxygen in the gastrointestinal tract during the first days of life promotes the colonization of obligate and facultative anaerobes (Sanidad and Zeng, 2020). Most Proteobacteria and Bacteroides fall into these categories and have been shown to be among the first colonizers of the neonatal gut. Oxygen consumption and a decrease in redox potential (which is positive at birth) play a key role in preparing the gut for the subsequent colonization of strict anaerobes, which are necessary for healthy gut function (Moon *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2020). Over time, the proportion of aerotolerant bacteria decreases in the puppy's gut. The increase in abundance of these bacteria in the puppy's gut is not only related to oxygen homeostasis but also to the ingestion of milk during the neonatal period, as these bacteria can digest milk oligosaccharides and produce lactate (Garrigues *et al.*, 2022).

Significant changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of puppies occur during the first weeks of life, even before they start consuming solid food. These microbial changes, and consequently the biological properties of the microbiome, are

mainly induced by neonatal metabolic events such as progressive oxygen consumption in the intestine or the increasing capacity of the intestine to absorb nutrients, produce bile acids, and develop immune functions (Buddington, 2003).

According to Gethings-Behncke *et al.* (2020), Proteobacteria and Firmicutes were the most dominant phyla in most rectal samples collected on days 1 and 8 postpartum, confirming their role as the most abundant early colonizers of the intestinal microbiome in canine neonates. The significance of *Enterococcus* in the early rectal microbiome of healthy puppies is still uncertain. While *Enterococcus faecium* is considered a beneficial probiotic in dogs (Subramanian *et al.*, 2015), its increase can lead to changes such as diarrhea and hypcobalaminemia (Shin *et al.*, 2015; Dunn *et al.*, 2017).

According to Beller *et al.* (2021), in neonates born vaginally, the composition of the meconium microbial population resembles that of the maternal vaginal microbiota, while in neonates born by C-section, it resembles the bacterial composition of the maternal vagina and oral cavity.

Although many studies focus on the microbiota of children, there is still a lack of knowledge about the development of the intestinal microbiota in puppies. Understanding this initial evolution is becoming a fundamental aspect in improving the short and long-term health and well-being of dogs (Garrigues *et al.*, 2022).

### **General Characteristics of the Intestinal Microbiota in Humans**

Early colonization of the human intestine in newborns begins with exposure to maternal vaginal and fecal microbiota, which is crucial for normal intestinal development and function (Insoft *et al.*, 1996; McCracken and Lorenz, 2001). The impact of microbiome-associated changes during pregnancy on newborns has been extensively studied due to their potential implications for health and disease, both early in life and later on (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016; Vuillermin *et al.*, 2017; Nuriel-Ohayon *et al.*, 2019;

Torres *et al.*, 2020). Factors such as inadequate maternal health, cesarean birth, milk quality, antibiotic use, and premature birth have been associated with abnormal development of the neonatal microbiome and potentially linked to various diseases like asthma, atopy, and obesity (Arrieta *et al.*, 2014; Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016; Turjeman *et al.*, 2021).

In humans, vaginal delivery leads to a neonatal intestinal microbial population that is dominated by the microbial constituents of the maternal birth canal and feces (e.g., *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.), while cesarean section results in a neonatal microbial population dominated by the microbial constituents of the maternal skin (e.g., *Staphylococcus* spp.) (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016). While the adult gut microbiota is mainly composed of bacteria from the Firmicutes and Bacteroidetes phyla, the neonatal gut microbiota initially consists of microorganisms from the Proteobacteria and Actinobacteria phyla, which later become more diverse with the emergence of Firmicutes and Bacteroidetes (Spor *et al.*, 2011; Ottman *et al.*, 2012) (table 1).

The predominant bacterial genus in the microbiota of breastfed infants is *Bifidobacterium* (Palmer *et al.*, 2007; Turrone *et al.*, 2012). However, recent studies have also shown a high occurrence of Enterobacteria in this population. During the first few weeks, Proteobacteria, mainly Enterobacteriaceae, dominate the infant intestinal microbiota, while Bifidobacteria constitute the second most abundant microbial population, which increases over time along with a decrease in Enterobacteria (Arboleya *et al.*, 2015). These early interactions between the microbiota and the host are critical events that support the proper maturation of the human host, leading to the establishment and maintenance of host-microbiota homeostasis during early life, with immediate and long-term implications for health (Milani *et al.*, 2017).

## **Influence of intestinal microbiota on host health**

In recent mammal studies, the microbiota has been recognized as a crucial factor in various vital processes of the host, including energy requirements, metabolism, immune activity, and neurobehavioral development. The interaction between the intestinal microbiota, the host, and other somatic cells regulates functions such as digestion, host metabolism, synthesis of vitamins (such as K and B complex), bile acid transformation, proper maturation of gastrointestinal cells, and defense against pathogenic bacteria (Steiner and Ruaux, 2008).

In recent years, the intestinal microbiome has been considered as an organ essential for the host's survival (Baquero and Nombela, 2012). The gastrointestinal tract's microbiota is a highly complex structure comprising trillions of microorganisms, depending on the species. For example, there are approximately  $10^{10}$  bacteria in just 1 ml of cow rumen (Matthews *et al.*, 2018), while omnivores like humans and carnivores like dogs have around  $10^{13}$  microorganisms in their guts, predominantly bacteria, but also including viruses and fungi (Gill *et al.*, 2006; Suchodolski, 2011). These microorganisms have a profound symbiotic relationship with their host, providing metabolic capabilities that the host organism alone could not achieve, such as nutrient assimilation and development of the immune system.

The composition of the gastrointestinal microbiota can be influenced by various factors such as age, nutrition, and environment (Tilocca *et al.*, 2017; Hasan and Yang, 2019). Some changes induced by these factors can have beneficial effects on the host's intestinal health, while others may disrupt the microbial balance (eubiosis) and lead to imbalance (dysbiosis), consequently causing gastrointestinal disturbances or even systemic, metabolic, or autoimmune diseases (Chakraborti, 2015; Tilocca *et al.*, 2017; Nishino *et al.*, 2018; Moffa *et al.*, 2019). Dysbiosis is found in a wide range of diseases,

including inflammatory bowel disease (IBD), obesity, allergy, diabetes, and autism (Mondo *et al.*, 2019). A balanced microbial ecosystem is crucial for the host's health and homeostasis (Guard *et al.*, 2017). Furthermore, during the neonatal and developmental periods, the gut microbiome is even more sensitive to potential disruptors compared to adulthood, and changes in microbiota composition during this period may lead to health disturbances later in life (Han *et al.*, 2018).

One notable example of the gut microbiota's importance in host health is the existence of a bidirectional communication network between the gut microbiota and the human brain, known as the gut-brain axis. This network involves neural, endocrine, metabolic, and immunological systems/pathways (Heijtz *et al.*, 2011; Ogbonnaya *et al.*, 2015; Lynch and Pedersen, 2016; Fung *et al.*, 2017). Recent studies have investigated how the gut microbiota contributes to central nervous system (CNS) development, including neurogenesis, microglial maturation, and myelination (Erny *et al.*, 2015; Hoban *et al.*, 2016), as well as functions such as cognition, mood, and behavior, including sociability and anxiety (Heijtz *et al.*, 2011; Clarke *et al.*, 2013). Furthermore, the gut microbiota has been shown to play important roles in the pathogenesis and progression of various neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, schizophrenia, autism spectrum disorder, and multiple sclerosis (Martinez *et al.*, 2017; Iannone *et al.*, 2019; Rinninella *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2019; Xue *et al.*, 2020). Therefore, it appears that the establishment of the intestinal microbiota exerts a crucial influence on the well-being of neonates across various species, impacting vital processes and neurobehavioral development (Steiner and Riaux, 2008). Consequently, investigating the factors that shape this microbial community emerges as promising research area with the potential to mitigate morbidity and mortality in dogs (Garrigues *et al.*, 2022).

## **Influence of mode of delivery on the establishment of neonatal and adult intestinal microbiota and its consequences**

Many factors influence the gut microbiota, with age having a significant impact on microbial composition (You and Kim, 2021). The development of the intestinal microbiome begins at birth and undergoes changes in composition throughout the different stages of the host's life. In human medicine, it has been observed that most intestinal bacterial strains remain stable for decades (Faith *et al.*, 2013). This emphasizes the critical role of early colonization in newborns, as the initial bacteria establish a foundation that can shape the host's gut functions for a significant portion of its life (Shin *et al.*, 2015; Subramanian *et al.*, 2015). Similarly, Del Carro *et al.* (2022) in their study on canine puppies from birth to the first 60 days of life, observed a progressive reduction in the diversity of isolated bacteria over time, particularly during weaning, when the intestinal microbiota started to resemble that of a young adult condition. Consequently, they emphasized that each mother possesses a unique microbiota profile that significantly influences the composition of the litter's intestinal microbiota, highlighting the importance of early colonization from the maternal side.

Traditionally, it was believed that the gastrointestinal tract of mammals is sterile during intrauterine fetal life, and the inoculation of microorganisms occurs through contact with the mother's vagina and skin, as well as the ingestion of milk in the first hours after birth (Dunn *et al.*, 2017). This understanding, known as the "sterile uterus paradigm," has been challenged with the emergence of molecular techniques that enable the detection of bacteria in the placenta, uterus, or amniotic fluid in various mammals. This suggests the transmission of bacteria from mother to fetus within the uterine environment (Aagaard *et al.*, 2014; Wassenaar and Panigrahi, 2014; Alipour *et al.*, 2018).

A study conducted by Zakošek *et al.* (2020) explored the possibility of intrauterine bacterial colonization in canine fetuses by analyzing the composition of the microbiota in meconium and placenta samples. Bacteria were detected in 86.5% of the meconium samples and 57% of the placenta samples collected immediately after birth. Similar to humans, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., and *Neisseria zoodegmatis*, belonging to the Firmicutes and Proteobacteria phyla, were the most commonly isolated bacteria in dogs (Dong *et al.*, 2018; He *et al.*, 2020). These findings suggest that *Staphylococcus* is prevalent in the dam's endometrial microbiota, while *Streptococcus* is more abundant in the vagina. This supports the hypothesis of transplacental transfer of microorganisms, indicating that the meconium of puppies born vaginally partially resembles the microbiota of the dam's vagina (Lyman *et al.*, 2019). In puppies delivered via cesarean section, the presence of microbiota, primarily *Acinetobacter* spp., *Staphylococci*, and *Bacillus* spp., has been observed in the amniotic fluid and meconium (Rota *et al.*, 2021).

However, it is important to consider that these studies reported low bacterial concentrations using culture-based techniques, which may fail to identify the majority of organisms. Additionally, environmental contamination cannot be completely ruled out when collecting samples from newborns at birth (Gunay *et al.*, 2010; Perez-Munoz *et al.*, 2017).

Conversely, Banchi *et al.* (2023) sought to investigate the maternal-fetal microbiota in dogs and cats, employing both culture-dependent and culture-independent methods to explore the possibility of in utero colonization. To ensure the reliability of their findings, they rigorously implemented aseptic measures, exclusively including elective cesarean sections performed prior to the onset of the first stage of labor when the cervix remained closed. Moreover, they extended their analysis to include samples from the surgical tray to evaluate potential environmental contamination. The outcomes of this

research indicated that bacterial biomass is exceedingly low in healthy full-term canine and feline pregnancies, with evidence pointing to contamination from the mother's skin as the likely origin of the detected bacteria. However, confirming the presence of viable bacteria in most cases proved challenging, thereby supporting the prevailing "sterile uterus paradigm." Similarly, Del Carro *et al* (2022) also observed a low frequency of isolation of enteric bacteria in the meconium of canine neonates. Despite these results, the topic of intrauterine bacterial transfer remains contentious, prompting the call for future investigations to employ more stringent protocols in verifying and controlling for contamination while also providing insights into bacterial viability (Banchi *et al.*, 2023).

Following birth, the mother's vertical transfer becomes the first influential factor in modulating the puppy's intestinal microbiota. Pregnant dogs, for instance, transmit Bifidobacteria from their intestinal tract to their offspring (Milani *et al.*, 2017). In sows, maternal microbial agents from milk, skin, vagina, and feces contribute to approximately 90% of the bacteria in the small intestine of newborns less than 35 days old (Liu *et al.*, 2019). These findings highlight the crucial role of vertical transmission from mother to offspring in shaping the initial composition and diversity of the newborn's microbiota.

Recent studies in human infants have suggested that the transfer of bacteria from mother to baby is highly dependent on the type of birth, with babies born via cesarean section showing altered microbiota and a higher risk of health problems (Dominguez-Bello *et al.*, 2016; Mortensen *et al.*, 2021). Similar findings have been observed in canine studies, where the meconium of puppies delivered by cesarean section had lower bacterial diversity compared to those born vaginally (Zakošek *et al.*, 2020; Kajdic *et al.*, 2021). Furthermore, Staphylococcus species quickly colonize the meconium of puppies born vaginally, similar to their presence in the mother's vaginal microbiota (Zakošek *et al.*, 2020). In human medicine, reduced diversity and early colonization of opportunistic

bacteria have been observed in children born via cesarean section, impacting their health during the neonatal period (Dewey *et al.*, 2003; Flaherman *et al.*, 2015). Similarly, puppies born vaginally have been shown to gain weight significantly faster than those born via cesarean section, and the presence of bacterial colonization detected in the meconium correlated with increased weight gain on the third and fourth days of life (Garrigues *et al.*, 2022).

In human studies, babies born vaginally come into contact with maternal vaginal and fecal microbiota, resulting in colonization of the neonatal gut by vaginally associated microorganisms such as *Lactobacillus* and *Prevotella* (Biasucci *et al.*, 2010; Dominguez-Bello *et al.*, 2010). In contrast, babies delivered via cesarean section are not directly exposed to maternal microorganisms and are more likely to be colonized by environmental microorganisms from the mother's skin, hospital staff, or the hospital environment (Biasucci *et al.*, 2010; Bokulich *et al.*, 2016; Backhed *et al.*, 2015; Rodriguez *et al.*, 2015). Although the differences in microbiota between babies born vaginally and by cesarean section gradually decrease over time, babies delivered via cesarean section tend to maintain a more heterogeneous microbiota up to 12 months of age compared to those born vaginally (Backhed *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016). Furthermore, persistent differences in the intestinal microbiota between children born via cesarean section and vaginal delivery have been reported at 7 years of age (Salminen *et al.*, 2004; Penders *et al.*, 2006; Neu and Rushing, 2011).

The observed differences in microbiota between babies born vaginally and by cesarean section have been associated with the protective effect of the natural route, as cesarean section has been linked to long-term health implications. Studies have reported a significant reduction in cytokine levels in babies delivered via cesarean section (Malamitsi-Puchner *et al.*, 2005; Jakobsson *et al.*, 2014), as well as an increased risk of

immunological disorders such as asthma (Thavagnanam *et al.*, 2008), allergies (Bager *et al.*, 2008), type 1 diabetes (Cardwell *et al.*, 2008), and a higher incidence of obesity (Pei *et al.*, 2014). These findings highlight the importance of the initial intestinal microbiota in the maturation and development of the host's immune system, emphasizing the impact of the delivery route on the individual's health throughout adulthood, even though the effects on microbiota composition decrease after the early years of life (Milani *et al.*, 2017).

### **Dogs as a research model for human studies**

Recent studies have shown that the canine intestinal microbiota is similar to that of humans (Coelho *et al.*, 2018). This similarity may be attributed, in part, to the domestication of dogs, which has led to changes in their intestinal microbiota compared to non-domesticated wolves. The interaction between dogs and humans has resulted in the loss of certain intestinal bacteria and the emergence of new gastrointestinal bacteria (Coelho *et al.*, 2018) (Fig 1).

Domesticated canines have acquired five bacterial taxa that are also present in the human intestinal microbiota. Additionally, the intestinal microbiota of domesticated canines exhibits greater species diversity when compared to non-domesticated canines. These observations suggest that the canine intestinal microbiota has evolved alongside its host due to cohabitation with humans (Huang *et al.*, 2020). Moreover, canines demonstrate the ability to adapt and develop resilience against dietary changes, a trait also observed in the human intestinal microbiota (Lozupone *et al.*, 2012).

Interestingly, the canine intestinal microbiome globally shows a higher taxonomic and functional overlap with the human intestinal microbiome. Since microbial strains in the intestine are host-specific, this resemblance cannot be solely explained by direct

transmission between dogs and humans. Instead, it appears to be a consequence of shared physiology and lifestyle (Coelho *et al.*, 2018).

Natural selection, influenced by similar environmental pressures, may have played a significant role in shaping a shared set of genes between humans and dogs (Coelho *et al.*, 2018). During the process of domestication, genes related to digestion, metabolism, and neurological processes in both species underwent positive selection (Wang *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2018). These findings suggest a parallel evolution and genetic overlap between humans and dogs in these aspects.

Furthermore, similarities have been observed in the phenotypes of dysbiotic rectal composition in dogs and humans, indicating a potential shared pathophysiology between neonatal diseases in both species associated with early dysbiosis (Tal *et al.*, 2021). Studies have constructed a catalog of genes in the canine intestinal microbiome, revealing that it is predominantly composed of five phyla: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, and Fusobacteria. The distribution of genetic phyla in the dog intestine is more similar to that of the human intestine, although a higher proportion of Fusobacteria genes is observed (Coelho *et al.*, 2018).

The structural and functional similarity between the canine and human microbiomes suggests that studies conducted in dogs may provide valuable insights into human outcomes. Dogs can serve as models for investigating various diseases, including neurological disorders (Huang *et al.*, 2020). By studying canine intestinal microorganisms, researchers can better understand changes in the canine gut bacteria under different conditions, simulate human diseases using canine models, and explore the intricate interactions between intestinal bacteria and diseases (Huang *et al.*, 2020).

## **Vaginal Seeding**

Vaginal *seeding* refers to a technique in which maternal vaginal fluids are used to inoculate a gauze or swab, transferring a portion of the vaginal microbiota to the mouth, nose, or skin of a newborn delivered by cesarean section (Mueller *et al.*, 2015). The aim of vaginal *seeding* is to facilitate the colonization of the infant's gut with beneficial bacteria and reduce the subsequent risk of asthma, atopic disease, and immunological disorders associated with cesarean section births (Mueller *et al.*, 2015).

While there has been increasing interest in vaginal *seeding*, only a few published studies have examined its use in humans (Butler *et al.*, 2021). One small pilot study by Dominguez Bello *et al.* (2016) found that the microbiomes of babies born via cesarean section who received vaginal *seeding* were more similar to those born vaginally in terms of their skin, oral cavity, and anal cavity microbiota. However, since no stool samples were collected, the effect of *seeding* on the intestinal microbiota remains unclear (Butler *et al.*, 2021).

Another study by Song *et al.* (2021) suggested that vaginal *seeding* may be associated with the development of an infant's microbiota during the first year of life, resembling that of vaginally delivered babies more closely than those born via cesarean section. However, further research is needed to determine the potential benefits of this difference and establish a causal relationship between vaginal *seeding* and subsequent microbiota differences before endorsing it as a routine practice in cesarean sections.

Optimizing the microbiome holds promise as a therapeutic strategy to prevent neonatal diseases associated with dysbiosis, which has significant implications for global health. Vaginal *seeding* may be a valuable tool in this regard, but further studies are required to fully understand its effects.

## **Conclusion**

Studying the canine intestinal microbiota offers valuable insights into the intricate interactions between the microorganisms and hosts, shedding light on disease development, progression, and treatment responses. This understanding of the profound impact of the intestinal microbiota on individual health opens up new avenues for translational medicine, enriching healthcare not only for humans but also for domestic animals. Dog, as a research model, hold great promise in bridging the gap between human and animal studies, facilitating the advancement of knowledge and therapeutic approaches in the context of the microbiome. As we unravel the shared complexities of the canine and human microbiotas, we gain a deeper understanding of the fundamental mechanisms that govern health and disease across species, fostering the development of targeted interventions and personalized treatments. Thus, harnessing the potential of canine models in microbiota research paves the way for improved well-being and healthcare outcomes, benefiting both human and canine population alike.

## **References**

- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014;6:237ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.
- Alipour MJ, Jalanka J, Pessa-Morikawa T, Kokkonen T, Satokari R, Hynönen U, Iivanainen A, Niku M. The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Sci Rep.* 2018;8:10437. doi: 10.1038/s41598-018-28733-y.
- Arboleya S, Sanchez B, Milani C, Duranti S, Solis G, Fernandez N, de los Reyes-Gavilan CG, Ventura M, Margolles A, Gueimonde M. Intestinal microbiota development in

preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr.* 2015;166:538-544. doi: 10.1016/j.jpeds.2014.09.041.

Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol.* 2014;5:427. doi: 10.3389/fimmu.2014.00427.

Backhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H, Khan MT, Zhang J, Li J, Xiao L, Al-Aama J, Zhang D, Lee YS, Kotowska D, Colding C, Tremaroli V, Yin Y, Bergman S, Xu X, Madsen L, Kristiansen K, Dahlgren J, Wang J. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe.* 2015;17:690-703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.

Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy.* 2008;38:634–642. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.02939.x.

Banchi P, Colitti B, Del Carro A, Corrà M, Bertero A, Ala U, Del Carro A, Van Soom A, Bertolotti L, Rota A. Challenging the Hypothesis of in Utero Microbiota Acquisition in Healthy Canine and Feline Pregnancies at Term: Preliminary Data. *Vet Sci.* 2023;10:331. doi: 10.3390/vetsci10050331.

Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(Suppl. 4):2–4. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03916.

Beller L, Deboutte W, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Valles-Colomer M, Rymenans L, Jansen D, Espen LV, Papadaki MI, Shi C, Yinda CK, Zeller M, Faust K, Ranst MV, Raes J, Matthijnssens J. Successional stages in infant gut microbiota maturation. *mBio.* 2021;12:e0185721. doi: 10.1128/mBio.01857-21.

Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev.* 2010;86(Suppl 1):S13–S15. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004.

Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, Lieber AD, Wu F, Perez-Perez GI, Chen Y, Schweizer W, Zheng X, Contreras M, Dominguez-Bello MG, Blaser MJ. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med.* 2016;8:343ra82. doi: 10.1126/scitranslmed.aad7121.

Buddington RK. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. *Am J Vet Res.* 2003;64:646-651. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.646.

Butler EM, Reynolds AJ, Derraik JGB, Wilson BC, Cutfield WS, Grigg CP. The views of pregnant women in New Zealand on vaginal *seeding*: a mixed-methods study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2021; 21:49. doi: 10.1186/s12884-020-03500-y

Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinek O, Svensson J, Goldacre MJ, Parslow RC, Pozzilli P, Brigis G, Stoyanov D, Urbonaite B, Sipetic S, Schober E, Ionescu-Tirgoviste C, Devoti G, de Beaufort CE, Buschard K, Patterson CC. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia.* 2008;51:726–735. doi: 10.1007/s00125-008-0941-z.

Chakraborti CK. New-found link between microbiota and obesity. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2015;6:110-9. doi: 10.4291/wjgp.v6.i4.110.

Chastant-Maillard S, Guillemot C, Feugier A, Mariani C, Grellet A, Mila H. Reproductive performance and pre-weaning mortality: preliminary analysis of 27,221 purebred female dogs and 204,537 puppies in France. *Reprod Domest Anim.* 2017;52:158-162. doi: 10.1111/rda.12845.

Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal

serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry*. 2013;18:666-673. doi: 10.1038/mp.2012.77.

Coelho LP, Kultima JR, Costea PI, Fournier C, Pan Y, Czarnecki-Maulden G, Hayward MR, Forslund SK, Schmidt TSB, Descombes P, Jackson JR, Li Q, Bork P. Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. *Microbiome*. 2018;6:1-11. doi: 10.1186/s40168-018-0450-3.

Del Carro A, Corrò M, Bertero A, Colitti B, Banchi P, Bertolotti L, Rota A. The evolution of dam-litter microbial flora from birth to 60 days of age. *BMC Vet Res*. 2022;18:95. doi:10.1186/s12917-022-03199-3.

Dewey KG, Nommsen-Rivers LA, Heinig MJ, Cohen RJ. Risk factors for suboptimal infant breastfeeding behavior, delayed onset of lactation, and excess neonatal weight loss. *Pediatrics*. 2003;112:607–19. doi: 10.1542/peds.112.3.607.

Dong T, Chen T, White RAI, Wang X, Hu W, Liang Y, Zhang Y, Lu C, Chen M, Aase H, Xia Y. Meconium microbiome associates with the development of neonatal jaundice. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018;9:e182. doi: 10.1038/s41424-018-0048-x.

Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, Bokulich NA, Song SJ, Hoashi M, Rivera-Vinas JI, Mendez K, Knight R, Clemente JC. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med*. 2016;22:250–253. doi: 10.1038/nm.4039.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:11971–11975. doi: 10.1073/pnas.1002601107.

Dunn AB, Jordan S, Baker BJ, Carlson NS. The maternal infant microbiome: considerations for labor and birth. *MCN Am J Matern Child Nurs.* 2017;42:318–325. doi: 10.1097/NMC.0000000000000373.

Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mhlahkoiiv T, Jakobshagen K, Buch T, Schwierzeck V, Utermohlen O, Chun E, Garret WS, McCoy KD, Diefenbach A, Staeheli P, Stecher B, Amit I, Prinz M. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci.* 2015;18:965-977. doi: 10.1038/nn.4030.

Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, Clemente JC, Knight R, Heath AC, Leibel RL, Rosenbaum M, Gordon JI. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science.* 2013;341:1237439. doi: 10.1126/science.1237439.

Flaherman VJ, Schaefer EW, Kuzniewicz MW, Li SX, Walsh EM, Paul IM. Early weight loss nomograms for exclusively breastfed newborns. *Pediatrics.* 2015;135:e16–23. doi: 10.1542/peds.2014-1532.

Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci.* 2017;20:145-155. doi: 10.1038/nn.4476.

Garrigues Q, Apper E, Rodiles A, Rovere N, Chastant S, Mila H. Composition and evolution of the gut microbiota of growing puppies is impacted by their birth weight. *Scientific Reports.* 2022;9. doi: 10.21203/rs.3.rs-2604924/v1.

Gethings-Behncke C, Coleman HG, Jordao HWT, Longley DB, Crawford N, Murray LJ, Kunzmann AT. *Fusobacterium nucleatum* in the colorectum and its association with cancer risk and survival: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020;29:539-548. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-1295.

Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CMF, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312:1355-9. doi: 10.1126/science.1124234.

Grundy SA. Clinically Relevant Physiology of the Neonate. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2006;36(3):443–459. doi:10.1016/j.cvsm.2005.12.002.

Guard BC, Mila H, Steiner JM, Mariani C, Suchodolski JS, Chastant-Maillard S. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLoS ONE*. 2017;12:e017571. doi: 10.1371/journal.pone.0175718.

Gunay U, Onat K, Gunay A, Ulgen M. Vaginal, cervical and uterine bacterial flora at the different stages of the reproductive cycle in ovariohysterectomized bitches. *J Anim Vet Adv*. 2010;9:478–81. doi: 10.3923/javaa.2010.478.481.

Hasan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*. 2019;7:e7502. doi: 10.7717/peerj.7502.

Han GG, Lee J-Y, Jin G-D, Park J, Choi YH, Kang S-K, Chae BJ, Kim EB, Choi YJ. Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Sci Rep*. 2018; 8:6012 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-24508-7.

He Q, Kwok L-Y, Xi X, Zhong Z, Ma T, Xu H, Meng H, Zhao F, Zhang H. The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal and vaginal microbiota. *Gut Microbes*. 2020;12:1794266. doi: 10.1080/19490976.2020.1794266.

Hejtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forsberg H, Pettersson S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:3047-3052. doi: 10.1073/pnas.1010529108.

Hoban AE, Stilling RM, Ryan FJ, Shanahan F, Dinan TG, Claesson MJ, Clarke G, Cryan JF. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Transl Psychiatry*. 2016;6:e774. doi: 10.1038/tp.2016.42.

Huang Z, Pan Z, Tang R, Bi Y, Xiong X. The canine gastrointestinal microbiota: early studies and research frontiers. *Gut Microbes*. 2020;11(4):635-654. doi: 10.1080/19490976.2019.1704142.

Iannone LF, Preda A, Blottière HM, Clarke G, Albani D, Belcastro V, Carotenuto M, Cattaneo A, Citraro R, Ferraris C, Ronchi F, Luongo G, Santocchi E, Guiducci L, Baldelli P, Iannetti P, Pedersen S, Petretto A, Provasi S, Selmer K, Spalice A, Tagliabue A, Verrotti A, Segata N, Zimmermann J, Minetti C, Mainardi P, Giordano C, Sisodiya S, Zara F, Russo E, Striano P. Microbiota-gut brain axis involvement in neuropsychiatric disorders. *Expert Rev Neurother*. 2019;19:1037-1050. doi: 10.1080/14737175.2019.1658346.

Indrebø A, Trangerud C, Moe L. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Vet Scand*. 2007;49:1-5. doi: 10.1186/1751-0147-49-S1-S2

Insoft RM, Sanderson IR, Walker WA. Development of immune function in the intestine and its role in neonatal diseases. *Pediatr Clin North Am*. 1996;43:551-571. doi: 10.1016/s0031-3955(05)70420-x.

Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, Bjorksten B, Engstrand L, Andersson AF. Decreased gut microbiota diversity, delayed *Bacteroidetes* colonization, and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*. 2014;63:559–566. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303249.

Kajdic L, Plavec T, Zdovc I, Kalin A, Zakošek Pipan M. Impact of type of parturition on colostrum microbiota composition and puppy survival. *Animals*. 2021;11:1897. doi: 10.3390/ani11071897.

Konde AM, Gitau GK, Kiptoon J, Gakuya D. Puppy morbidity and mortality among breeding kennels in Nairobi, Kenya. *J. J. Vet. Sci. Res.* 2015;1(4):1-7.

Liu J, Meng Z, Liu X, Zhang XH. Microbial assembly, interaction, functioning, activity and diversification: a review derived from community compositional data. *Mar Life Sci Technol.* 2019;1:112-128. doi: 10.1007/s42995-019-00004-3.

Lourenço MLG. Cuidados com neonatos e filhotes. In: Jericó MM, Neto JPA, Kogika MM, editores. *Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos*. Ed. Roca, Rio de Janeiro, v.1., 2015, p.364-406. Portuguese.

Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 2012;489:220–230. doi:10.1038/nature11550.

Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med.* 2016;375:2369-2379. doi: 10.1056/NEJMra1600266.

Lyman CC, Holyoak GR, Meinkoth K, Wieneke X, Chillemi KA, DeSilva U. Canine endometrial and vaginal microbiomes reveal distinct and complex ecosystems. *PLoS ONE.* 2019;14:e0210157. doi: 10.1371/journal.pone.0210157.

Malamitsi-Puchner A, Protonotariou E, Boutsikou T, Makrakis E, Sarandakou A, Creatsas G. The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early Hum Dev.* 2005;81:387–392. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2004.10.017.

Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O’Toole PW, Cotter PD. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes.* 2018;10:115-32. doi: 10.1080/19490976.2018.1505176.

Martin R, Makino H, Cetinyurek Yavuz A, Ben-Amor K, Roelofs M, Ishikawa E, Kubota H, Swinkels S, Sakai T, Oishi K, Kushiro A, Knol J. Early-life events, including mode of delivery and type of feeding. *Early Hum Dev.* 2016;92:97–105. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2016.01.007.

Martinez KB, Leone V, Chang EB. Microbial metabolites in health and disease: Navigating the unknown in search of function. *J Biol Chem.* 2017;292:8553-8559. doi: 10.1074/jbc.R116.763041.

McCracken VJ, Lorenz RG. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol.* 2001;3(1):1-11. doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00090.x.

Mila H, Grellet A, Delebarre M, Mariani C, Feugier A, Chastant-Maillard S. Monitoring of the newborn dog and prediction of neonatal mortality. *Prev Vet Med.* 2015;143:11-20. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.05.005.

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arboleya Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(4):e00036-17. doi: 10.1128/MMBR.00036-17.

Meloni T, Martino PA, Grieco V, Pisu MC, Banco B, Rota A, Veronesi MC. A survey on bacterial involvement in neonatal mortality in dogs. *Vet Ital.* 2014;50:293-299. doi: 10.12834/VetIt.45.2244.2.

Moon CD, Young W, Maclean PH, Cookson AL, Bermingham EN. Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiol Open.* 2018;7:e00677. doi: 10.1002/mbo3.677

Moffa S, Mezza T, Cefalo CMA, Cinti F, Impronta F, Sorice GP, Santoro A, Giuseppe GD, Pontecorvi A, Giaccari A. The interplay between immune system and microbiota in diabetes. *Mediators Inflamm.* 2019;e9367404. doi: 10.1155/2019/9367404.

Mondo E, Marliani G, Accorsi PA, Cocchi M, Leone AD. Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open Vet J.* 2019;9(3):253-258. doi: 10.4314/ovj.v9i3.10.

Mortensen MS, Rasmussen MA, Stokholm J, Brejnrod AD, Balle C, Thorsen J, Krogfelt KA, Bisgaard H, Sorensen SJ. Modeling transfer of vaginal microbiota from mother to infant in early life. *eLife.* 2021;10:e57051. doi: 10.7554/eLife.57051.

Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends in Molecular Medicine.* 2015;21(2):109-117. doi: 10.1016/j.molmed.2014.12.002.

Münnich A, Küchenmeister U. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: cornerstones of practical approach. *Reprod Domest Anim.* 2014;49:64-74. doi: 10.1111/rda.12329

Murgas Torrazza R, Neu J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J. Perinatol.* 2011;31:S29-S34. doi: 10.1038/jp.2010.172.

Neu J, Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clin Perinatol.* 2011;38:321–331. doi: 10.1016/j.clp.2011.03.008.

Nishino K, Nishida A, Inoue R, Kawada Y, Ohno M, Sakai S, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Kawahara M, Naito Y, Andoh A. Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2018;53:95-106. doi: 10.1007/s00535-017-1384-4.

Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Microbial changes during pregnancy, birth and infancy. *Front Microbiol.* 2016;7:1031. doi: 10.3389/fmicb.2016.01031.

Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Ziv O, Belogolovski A, Barsheshet Y, Bloch N, Uzan A, Lahav R, Peretz A, Frishman S, Hod M, Hadar E, Louzoun Y, Avni O, Koren O. Progesterone increases Bifidobacterium relative abundance during late pregnancy. *Cell Rep.* 2019;27:730–736.e733. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.052.

Ogbonnaya ES, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF, O’Leary OF. Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome. *Biol Psychiatry.* 2015;78:e7-e9. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.01.010.

Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:104. doi: 10.3389/fcimb.2012.00104.

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007;5:e177. doi: 10.1371/journal.pbio.0050177.

Pei Z, Heinrich J, Fuertes E, Flexeder C, Hoffmann B, Lehmann I, Schaaf B, von Berg A, Koletzko S. Influences of Lifestyle-Related Factors on the Immune System and the Development of Allergies in Childhood plus Air Pollution and Genetics (LISApplus) Study Group. Cesarean delivery and risk of childhood obesity. *J Pediatr.* 2014;164:1068–1073.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.12.044.

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006;118:511–521. doi: 10.1542/peds.2005-2824.

Pereira AM, Pinna C, Biagi G, Stefanelli C, Maia MRG, Matos E, Segundo MA, Fonseca AJM, Cabrita ARJ. Supplemental selenium source on gut health: insights on fecal microbiome and fermentation products of growing puppies. *FEMS Microbiol Ecol.* 2020;96:fiaa212. doi: 10.1093/femsec/fiaa212.

Perez-Munoz M, Arrieta M-C, Ramer-Tait A, Walter J. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 2017;5:48. doi: 10.1186/s40168-017-0268-4.

Pitlik SD, Koren O. How holobionts get Sick-toward a unifying scheme of disease. *Microbioma*. 2017;5:64. doi: 10.1186/s40168-017-0281-7.

Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019;7:14. doi: 10.3390/microorganisms7010014.

Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbad A, Jenmalm MC, Marchesi JR, Collado MC. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26050. doi: 10.3402/mehd.v26.26050.

Rota A, Del Carro A, Bertero A, Del Carro A, Starvaggi Cucuzza A, Banchi P, Corrà M. Does bacteria colonization of canine newborns start in the uterus? *Animals*. 2021;11:1415. doi: 10.3390/ani11051415.

Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven-year-old children. *Gut*. 2004;53:1388–1389. doi: 10.1136/gut.2004.041640.

Sanidad KZ, Zeng MY. Neonatal gut microbiome and immunity. *Curr Opin Microbiol*. 2020;56:30-37. doi: 10.1016/j.mib.2020.05.011.

Shao Y, Forster SC, Tsaliki E, Vervier K, Strang A, Simpson N, Kumar N, Stares MD, Rodger A, Brocklehurst P, Field N, Lawley TD. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature*. 2019;574:117-121. doi: 10.1038/s41586-019-1560-1

Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33:496-503. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011.

Song SJ, Wang J, Martino C, Jiang L, Thompson WK, Shenhav L, McDonald D, Marotz C, Harris PR, Hernandez CD, Henderson N, Ackley E, Nardella D, Gillihan C, Montacuti V, Schweizer W, Jay M, Combelick J, Sun H, Garcia-Mantrana I, Dominguez-Bello MG. Naturalization of the microbiota developmental trajectory of Cesarean-born neonates after vaginal *seeding*. *Med.* 2021;2:951-964. doi: 10.1016/j.medj.2021.05.003

Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:279-290. doi: 10.1038/nrmicro2540.

Steiner JM, Ruaux CG. Laboratory tests for the diagnosis of intestinal disorders. In: *Small animal gastroenterol.* 12th ed. Hanover, Germany: Schluetersche; 2008. p. 50-55.

Subramanian S, Blanton LV, Frese SA, Charbonneau M, Mills DA, Gordon JI. Cultivating healthy growth and nutrition through the gut microbiota. *Cell.* 2015;161:36-48. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.013.

Suchodolski JS. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41:261-72. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.12.006.

Sun J, Xu J, Ling Y, Wang F, Gong T, Yang C, Ye S, Ye K, Wei D, Song Z, Chen D. Fecal microbiota transplantation alleviated Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP/PS1 transgenic mice. *Transl Psychiatry.* 2019;9:189. doi: 10.1038/s41398-019-0522-7.

Tal S, Tikhonov E, Aroch I, Hefetz L, Turjeman S, Koren O, Kuzi S. Developmental intestinal microbiome alterations in canine fading puppy syndrome: a prospective observational study. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021;7(1):52. doi: 10.1038/s41522-021-00222-7.

Tilocca B, Burbach K, Heyer CME, Hoelzle LE, Mosenthin R, Stefanski V, Camarinha-Silva A, Seifert J. Dietary changes in nutritional studies shape the structural and functional composition of the pigs' fecal microbiome—from days to weeks. *Microbiome*. 2017;5:144. doi: 10.1186/s40168-017-0362-7.

Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, Shields MD, Cardwell CR. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:629–633. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02780.x.

Torres J, Hu J, Seki A, Eisele C, Nair N, Huang R, Tarassishin L, Jharap B, Cote-Daigneault J, Mao Q, Mogno I, Britton GJ, Uzzan M, Chen CL, Kornbluth A, George J, Legnani P, Maser E, Loudon H, Stone J, Dubinsky M, Faith JJ, Clemente JC, Mehandru S, Colombel JF, Peter I. Infants born to mothers with IBD present with altered gut microbiome that transfers abnormalities of the adaptative immune system to germ-free mice. *Gut*. 2020;69:42–51. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317855.

Turjeman S, Collado MC, Koren O. The gut microbiome in pregnancy and pregnancy complications. *Curr Opin Endocr Metab Res*. 2021;18:133-138. doi: 10.1016/j.coemr.2021.03.004.

Turrioni F, Peano C, Pass DA, Foroni E, Severgnini M, Claesson MJ, Kerr C, Hourihane J, Murray D, Fuligni F, Gueimonde M, Margolles A, De Bellis G, O'Toole PW, van Sinderen D, Marchesi JR, Ventura M. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One*. 2012;7:e36957. doi: 10.1371/journal.pone.0036957.

Vannucchi CI, Silva LCG, Lúcio CF, Regazzi FM, Veiga GAL, Angrimani DSR. Prenatal and neonatal adaptations with a focus on the respiratory system. *Reprod Dom Anim*. 2012;47:177-181. doi: 10.1111/rda.12078.

Vassalo FG, Simões CRB, Sudano MJ, Prestes N, Lopes MD, Chiacchio SB, Lourenço MLG. Topics in the routine assessment of newborn puppy viability. *Top Companion Anim Med.* 2015;30:16-21. doi:10.1053/j.tcam.2015.02.003

Vuillermin PJ, Macia L, Nanan R, Tang MLK, Collier F, Brix S. The maternal microbiome during pregnancy and allergic disease in offspring. *Semin Immunopathol.* 2017;39:669-675. doi: 10.1007/s00281-017-0644-4.

Wang GD, Zhai W, Yang HC, Fan RX, Cao X, Zhong L, Wang L, Liu F, Wu H, Cheng L-G, Poyarkov AD, Poyarkov Jr NA, Tang SS, Zhao WM, Gao Y, Lv XM, Irwin DM, Savolainen P, Wu CI, Zhang YP. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nat Commun.* 2013;4:1860. doi: 10.1038/ncomms2814.

Wassenaar TM, Panigrahi P. Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett Appl Microbiol.* 2014;59:572-579. doi: 10.1111/lam.12334.

Xue LJ, Yang XZ, Tong Q, Shen P, Ma SJ, Wu SN, Zheng ZL, Wang HG. Fecal microbiota transplantation therapy for Parkinson's disease: A preliminary study. *Medicine.* 2020;99:e22035. doi: 10.1097/MD.00000000000022035.

You I, Kim MJ. Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: breed, age, and body condition score. *Animals.* 2021;11:2432. doi: 10.3390/ani11082432.

Zachariassen LF, Krych L, Rasmussen SH, Nielsen DS, Kot W, Holm TL, Hansen AK, Hansen CHF. Cesarean section induces microbiota-regulated immune disturbances in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2019;202(1):142-150. doi: 10.4049/jimmunol.1800666.

Zakošek Pipan M, Kajdic L, Kalin A, Plavec T, Zdovc I. Do newborn puppies have their own microbiota at birth? Influence of type of birth on newborn puppy microbiota. *Theriogenology.* 2020;152:18-28. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.04.014.

Table 1. Representation of the main bacterial phyla isolated from humans and dogs.

PHYLA	LOCATION	PRESENCE (+), DOMINANCE (++), ABSENCE (0)	
		HUMAN	DOG
Firmicutes	Adult intestinal microbiota	+	++
	Newborn	+	++
Bacteroidetes	Adult intestinal microbiota	++	++
	Newborn	0	0
Proteobacteria	Adult intestinal microbiota	+	+
	Newborn	+	+
Actinobacteria	Adult intestinal microbiota	+	+
	Newborn	++	+
Fusobacteria	Adult intestinal microbiota	+	+
	Newborn	0	0

Reference: Coelho *et al.* 2018; Gethings-Behncke *et al.*, 2020; Ottman *et al.*, 2012; Spor *et al.*, 2011

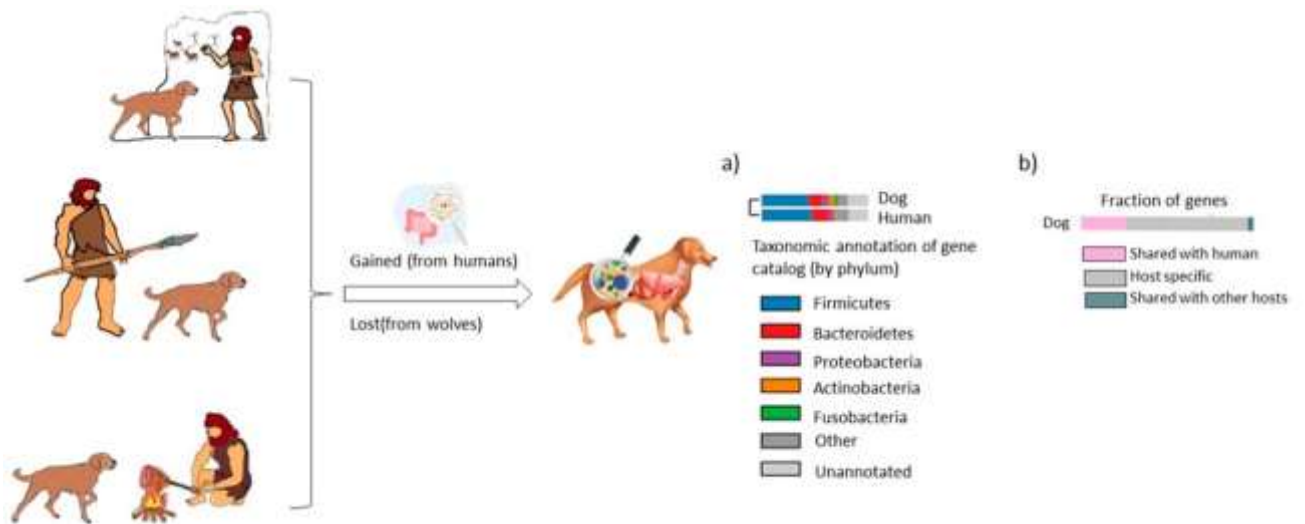


Fig 1. Canine domestication has influenced the composition of the intestinal microbiota.

The domestic dog has undergone a loss of specific intestinal bacteria compared to their non-domesticated wolf counterparts, while the close interaction with humans has introduced new gastrointestinal bacteria in dogs. a) Comparison of phylum distribution of genes in the intestinal gene catalogs of domesticated dogs and non-domesticated wolves (b) Representative image showing the proportion of genes shared between the

canine intestinal microbiota and the gene catalog of the human intestinal microbiota.

(Modified from Coelho *et al.*, 2018).

### **Capítulo 3- Uso do *seeding vaginal* como ferramenta para modulação da microbiota intestinal em neonatos caninos nascidos por cesariana eletiva e sua possível aplicação na medicina humana.**

**RESUMO-** O objetivo deste estudo foi analisar diferenças entre a microbiota intestinal de neonatos caninos nascidos de parto normal com a de nascidos por meio de cesariana eletiva, bem como investigar a influência do *seeding vaginal* sobre a composição da microbiota intestinal daqueles nascidos de cesariana, de modo a propor o *seeding vaginal* como ferramenta na modulação da microbiota de neonatos nascidos por cesariana eletiva. Foram utilizadas três cadelas adultas gestantes, da raça buldogue francês, submetidas à cesariana e outras quatro gestantes, acompanhadas durante o parto normal, três da raça shih tzu e uma sem raça definida (SRD). Os animais incluídos no experimento possuíam peso corpóreo entre 4 a 15 kg, idade entre 2 a 5 anos. Amostras da boca, vagina, ânus e da região da mama da fêmea submetida a cesariana foram coletadas antes da realização da anestesia epidural, utilizando-se luvas e swabs estéreis e, da mesma forma, foram obtidas amostras da fêmea não submetida à cesariana (parto normal) no momento em que apresentou sinais de pródromo. Para o estudo dos efeitos do *seeding vaginal* na microbiota dos neonatos, assim que os mesmos foram retirados do útero realizou-se a colheita das amostras da boca e do ânus dos neonatos e, ato contínuo, o *seeding vaginal*, o qual consistiu em esfregar as gazes retiradas da vagina da mãe na boca, face e no corpo dos neonatos. No grupo cesariana, foi realizado o *seeding* em metade dos neonatos (Grupo cesariana *seeding*,  $n=6$  neonatos) e na outra metade apenas a colheita das amostras microbiológicas, sem realização do *seeding* (Grupo cesariana,  $n=6$  neonatos). Um terceiro grupo (Grupo parto normal,  $n=16$  neonatos) foi composto por neonatos nascidos por parto normal, nos quais também foi avaliada a composição da microbiota intestinal. A contagem foi realizada através de plaqueamento em superfície e quantificados os grupos de enterobactérias, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.*. Os resultados desta pesquisa mostraram que apesar da transmissão vertical da mãe para prole desempenhar um papel importante no desenvolvimento inicial da microbiota intestinal canina, a via de nascimento não pareceu ser o principal causador das diferenças estabelecidas em neonatos nascidos por parto normal e naqueles nascidos por meio de cesariana eletiva. Além disso, o uso do *seeding vaginal* como ferramenta para modulação da microbiota de neonatos nascidos através de cesariana eletiva não foi efetivo nas condições desta pesquisa. Estudos envolvendo o eixo intestino-cérebro poderão ser relevantes para compreender o envolvimento endócrino e hormonal no desenvolvimento inicial da microbiota intestinal canina de neonatos nascidos por meio de parto normal e cesariana eletiva.

**Palavras-chave:** Cães, Disbiose, Microbiologia, Neonatologia, Score Apgar.

## 1. INTRODUÇÃO

Define-se neonatologia a ciência responsável pelo estudo dos cuidados aos neonatos, aos seus aspectos fisiológicos e às suas afecções neonatais propriamente ditas (Lucio *et al.*, 2009). O período neonatal em cães corresponde às duas primeiras semanas de vida, período no qual ainda se observa elevada taxa de mortalidade (Vannucchi *et al.*, 2012; Vassalo *et al.*, 2015). Fatores predisponentes envolvem erros no manejo e a imaturidade do feto canino ao final da gestação. Causas não-infecciosas incluem hipóxia, prematuridade, hipotermia, hipoglicemia, doenças genéticas, trauma e intoxicações. As causas infecciosas incluem bactérias, vírus e parasitas, sendo as doenças bacterianas as mais importantes (Souza *et al.*, 2017).

Ao nascimento, o sistema gastrointestinal do neonato sofre mudança funcional drástica e assume as funções digestórias, as quais eram previamente realizadas pela placenta, incluindo a absorção de proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais para um crescimento e desenvolvimento adequado (Poffenbarger, 1990a, b).

Após o nascimento, o trato gastrointestinal do recém-nascido é rapidamente colonizado por microrganismos e é altamente instável (Garrigues *et al.*, 2022). Admitiu-se inicialmente que o trato gastrointestinal dos mamíferos era estéril durante a vida fetal intrauterina, ocorrendo a inoculação de microrganismos por contato com a vagina e pele da mãe e ingestão de leite nas primeiras horas após o parto (Dunn *et al.*, 2017). Porém, esta avaliação foi recentemente contestada devido ao surgimento de técnicas moleculares que permitiram a detecção de bactérias na placenta, útero ou líquido amniótico em diferentes mamíferos, com potencial transmissão de bactérias da mãe para o feto no útero (Alipour *et al.*, 2018; Aagaard *et al.*, 2014; Wassenaar *et al.*, 2014). Todavia, a transferência bacteriana intrauterina ainda permanece um assunto de debate (Garrigues *et al.*, 2022).

Ferreti e colaboradores (2018) identificaram cepas em recém-nascidos humanos provenientes da microbiota materna e relataram que algumas dessas cepas são mais propensas a se adaptar e persistir no intestino do neonato do que estirpes não adquiridas da mãe. Por outro lado, alguns microrganismos permaneceram na microbiota dos neonatos de forma transitória, sugerindo sua

origem de locais do corpo materno diferentes da via fecal (dorso da língua, vagina e pele), não colonizando o trato gastrointestinal neonatal. Em contraste, outras espécies fecais mais típicas (por exemplo, *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium breve*) persistem desde o nascimento até pelo menos 4 meses de idade, sugerindo colonização do intestino infantil humano.

A composição inicial de bactérias intestinais pode afetar o desenvolvimento do sistema imunológico pós-natal. Em humanos, acredita-se que a redução da estimulação microbiana durante a infância resulte em maturação tardia do sistema imunológico (Björkstén, 2006; Björkstén *et al.*, 2001). Ademais, tem-se observado que bactérias intestinais específicas podem ajudar a promover a saúde humana, tendo papel na prevenção ou tratamento de certas doenças, tais como falência múltipla de órgãos, câncer de cólon e doenças inflamatórias intestinais (Guarner e Malagelada, 2003).

Nas últimas décadas, vários estudos em humanos têm mostrado que o aumento da incidência de doenças autoimunes, infecciosas e alérgicas em população pediátrica e adulta pode estar intimamente relacionada à disbiose, que é a alteração do desenvolvimento fisiológico da microbiota intestinal. Esta alteração da microbiota intestinal tem sido observada em crianças que nasceram por cesariana e, portanto, que foram privadas do contato com a microbiota vaginal durante a passagem pelo canal do parto.

Na tentativa de corrigir esta disbiose dos recém-nascidos de cesariana, pesquisadores tem promovido a exposição de neonatos aos fluidos vaginais maternos, denominado *seeding* vaginal. As investigações utilizando este procedimento têm apresentado resultados interessantes, mas os estudos em humanos possuem limitações, destacando-se a ausência de repetição de resultados numa mesma cesariana, o que impossibilita a comparação entre dois indivíduos expostos às mesmas condições. No caso da medicina veterinária, até o presente momento não há relatos sobre a possível influência que o *seeding* vaginal teria na colonização bacteriana durante os primeiros dias de vida.

Assim sendo, ainda há uma falta de conhecimento sobre o desenvolvimento da microbiota intestinal em filhotes caninos e entender essa evolução inicial está se tornando um aspecto fundamental para melhorar a saúde e o bem-estar dos cães a curto e longo prazo (Garrigues *et al.*, 2022). Devido à

crescente evidência de que o microbioma intestinal desempenha um papel importante na saúde de neonatos em diferentes espécies, a identificação de fatores que o influenciam e, por sua vez, a saúde geral em filhotes, é um tópico promissor de pesquisa para diminuir a morbidade e mortalidade na espécie canina (Garrigues *et al.*, 2022).

Além disso, estudos recentes revelaram que a microbiota intestinal canina é semelhante a microbiota intestinal humana (Coelho *et al.*, 2018). Tal fato, em parte, pode estar associado à domesticação do cão, que desempenhou um papel importante na alteração da microbiota intestinal canina, levando à perda de algumas bactérias intestinais em comparação com às dos lobos não domesticados e o surgimento de novas bactérias gastrointestinais devido a interação com humanos (Coelho *et al.*, 2018).

A semelhança estrutural e funcional do microbioma canino com o humano implica que, como os estudos em humanos são preditivos de resultados em cães, os estudos em cães podem ser preditivos de resultados em humanos. Os estudos com cães fornecem, então, um duplo benefício: diretamente para cães e para seu potencial de generalização para humanos (Coelho *et al.*, 2018). Destarte, os cães podem ser considerados bons modelos experimentais para avaliar os efeitos do *seeding* vaginal, visto que apresentam partos múltiplos e, portanto, ter-se-á vários neonatos advindos da mesma mãe, mantidos sob a mesma alimentação e ambiente e portanto, expostos ao mesmo microbioma. Em vista do exposto, este estudo teve como escopo comparar a microbiota intestinal de filhotes nascidos de parto normal e de cesariana, bem como verificar o possível efeito do *seeding* vaginal em ninhadas nascidas de cesariana

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal – SP, protocolo nº 5005/20.

De início, foram selecionadas 33 cadelas gestantes, dos quais metade delas seriam submetidas às cesarianas eletivas para compor o grupo cesariana

e grupo cesariana *seeding* e a outra metade seria acompanhada durante o parto normal para compor o grupo parto normal. Porém, devido aos critérios de inclusão e exclusão que foram realizados de forma rigorosa para que não houvesse qualquer tipo de influência no desenvolvimento da microbiota neonatal inicial, apenas sete cadelas permaneceram no estudo. Os motivos pelos quais essas cadelas não permaneceram no estudo, assim como suas raças, idade e número de filhotes estão representados na tabela 1.

Portanto, amostras foram colhidas de sete cadelas adultas gestantes, sendo três fêmeas buldogues francêss submetidas à cesariana eletiva e quatro acompanhadas no momento do parto normal, das quais três eram da raça shih tzu e uma sem raça definida (SRD), com peso corpóreo entre 4 a 15 kg e idade entre 2 a 5 anos. Os animais eram provenientes da rotina clínica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” e passaram por triagem no Setor de Obstetrícia e Reprodução Animal (SORA) – UNESP/Jaboticabal. Os tutores concordaram com todos os procedimentos adotados por meio de assinatura de um “Termo de consentimento livre”.

**Tabela 1-** Animais que não permaneceram no estudo

Raça	Idade (anos)	Número de filhotes	Motivo por não ter permanecido no estudo
American Bully	3	4	Presença de um natimorto
Buldogue francês	2	7	Falta de refrigeração das amostras (queda de energia)
Buldogue francês	2	3	1 natimorto, 1 com má formação, 1 veio à obito pós-parto
Buldogue francês	3	4	3 neonatos com fenda palatina
Buldogue francês	3	5	óbito da mãe após procedimento cirúrgico
Buldogue francês	4	6	Filhotes com onfalocele e fenda palatina
Buldogue inglês	2	4	Uso de antibiótico devido à mastite
Buldogue inglês	2	5	Uso de antibiótico devido à mastite
Buldogue inglês	3	9	Uso de antibiótico na fêmea e sucedâneo nos neonatos
Buldogue inglês	3	10	Uso de antibiótico devido à mastite
Pinscher	1	4	Parto distócico
Pinscher	5	2	Parto distócico
Pug	2	6	Filhotes com hidrocefalia
Pug	2	4	Presença de um natimorto
Shih tzu	2	1	Feto único
Shih tzu	3	4	Distocia/ Presença de natimorto
Shih tzu	3	5	2 natimortos
Shih tzu	4	4	Distocia/ Presença de natimorto
Shih tzu	4	1	Distocia
Spitz alemão	2	2	Número insuficiente de neonatos

SRD	3	6	Presença de feto macerado
Buldogue inglês	3	4	Aborto
Buldogue inglês	3	3	Número insuficiente de neonatos
Buldogue francês	2	4	Distocia
Buldogue francês	2	6	Todos vieram à óbito-sepse neonatal
SRD	4	10	Distocia

Tabela 1-

### 2.1.1. Critérios de inclusão

Em relação às fêmeas caninas, somente aquelas com quatro ou mais fetos identificados pelo exame ultrassonográfico realizado aos 30 dias e ao exame radiográfico aos 55 dias de gestação, foram incluídas no estudo. Somente animais que não apresentaram alterações no hemograma ou dosagem bioquímica (creatinina e ureia) permaneceram no estudo. Somente fêmeas submetidas a cesariana eletiva compuseram os grupos cesarianas.

Os neonatos incluídos no estudo ingeriram obrigatoriamente o colostro materno, respeitando-se o período da janela imunológica de absorção de imunoglobulinas de 4 a 6 horas após o nascimento e todos oriundos da mesma ninhada foram alimentados de forma natural (aleitamento materno) e mantidos no mesmo ambiente, de forma a se reduzir o impacto da variável “ambiente” na composição da microbiota intestinal. Todas as fêmeas, tanto as submetidas à cesariana como as que foram acompanhadas durante o parto normal permaneceram no mesmo local a partir do dia 55 após a primeira monta/inseminação artificial e permaneceram até o dia 15 após os nascimentos dos filhotes. Dessa forma, os animais foram submetidos às mesmas condições ambientais e sanitárias.

### 2.1.2. Critérios de exclusão

Fêmeas que apresentaram qualquer alteração durante a gestação, ou nas quais foram identificadas alterações fetais no exame ultrassonográfico pré-natal, foram excluídas do estudo. Da mesma forma, as que apresentaram parto distócico (no grupo parto normal) ou qualquer complicação no trans ou pós-

operatório das cesarianas (grupos cesariana e grupo cesariana *seeding*) também foram excluídas, assim como aquelas que receberam antibiótico pós-coito ou em qualquer fase da gestação.

Em relação aos neonatos, aqueles que apresentaram score Apgar menor que cinco não foram incluídos no estudo. Outrossim, neonatos que apresentaram malformações ou defeitos como fenda palatina, gastrosquise, anasarca, atresias, fistulas, dentre outras, também. Durante o período de coleta de amostras, qualquer neonato que apresentou afecção e alteração de desenvolvimento foi excluído, bem como sua mãe e irmãos de ninhada.

No caso de neonatos nascidos de cesariana eletiva, aqueles que apresentaram hipóxia ao nascimento, não foram incluídos no estudo, pois a hipóxia neonatal é um fator de risco para o desenvolvimento de infecções neonatais precoces.

### **2.1.3 Triagem**

Para a determinação do momento correto de realização da cesariana eletiva garantindo a maturidade completa dos filhotes, foi considerado a associação dos seguintes fatores:

Tempo de gestação (58 a 63 dias após a primeira cobertura ou data das inseminações artificiais, com resultado da dosagem sérica de progesterona).

Avaliações ultrassonográficas: aferição do diâmetro biparietal para estimativa de idade gestacional, conforme descrito por Luvoni e Beccaglia(2006); redução de líquido amniótico, presença de peristaltismo e redução da frequência cardíaca fetal (Siena;Milani, 2021).

Redução da temperatura retal da mãe: temperatura retal foi aferida a cada 6 horas, a partir do 56º dia após a cobertura e, quando houve redução de aproximadamente 1°C-2°C, o início do parto foi estimado em 24 horas. Adicionalmente foram avaliados o exame físico e laboratorial que consistiu na mensuração da frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (*f*), pressão arterial sistólica (PAS), temperatura retal, hemograma e perfil bioquímico respectivamente.

Dosagem sérica das concentrações de progesterona (Luvoni;Beccaglia, 2006).

Realizou-se acompanhamento ultrassonográfico gestacional nos dias 30 e 55 após a primeira monta ou inseminação artificial realizadas com acompanhamento das concentrações séricas de progesterona. Oexame radiográfico para contagem do número de fetos foi realizado no 55º dia. Tais procedimentos foram realizados em todas as fêmeas, independentemente do modo de nascimento dos neonatos (parto normal ou cesariana eletiva).

## **2.2. Manejo e cuidado dos neonatos nascidos de cesariana eletiva**

Após exame clínico geral e específico do aparelho genital, avaliação ultrassonográfica e constatação da viabilidade fetal, as parturientes com indicação de cesariana eletiva foram encaminhadas para a anestesia e procedimento cirúrgico.

Durante o procedimento cirúrgico, a placenta foi retirada do útero com o cordão intacto juntamente com os filhotes, não se realizando o clampeamento umbilical (Pereira *et al.*, 2020). Em seguida, os fetos foram submetidos à assistência neonatal – A equipe consistiu em quatro a cinco pessoas, com experiência e habilidades em cuidados neonatais; além disso, um máximo de três neonatos ressuscitados por cada membro. Imediatamente após exteriorização do neonato, a ressuscitação neonatal foi realizada de acordo com o protocolo ABCDE de ressuscitação cardiopulmonar (Davidson, 2014), que consistiu em: limpeza das vias aéreas (A) por sucção cuidadosa com um aspirador nasal, realização de estimulação tátil contínua e firme do tórax para estimular a respiração (B). Uma vez que os neonatos começaram a respirar regularmente, a função cardíaca (C) foi estimulada naqueles pacientes em que a frequência cardíaca esteja baixa (<80 batimentos por minuto) com a utilização de epinefrina 0,2 mg/kg sublingual. Porém, neonatos com score Apgar abaixo de 5 e que necessitaram desse tipo de intervenção não foram incluídos no estudo.

Após a reanimação neonatal, os filhotes foram alocados em uma incubadora a 35-37°C.

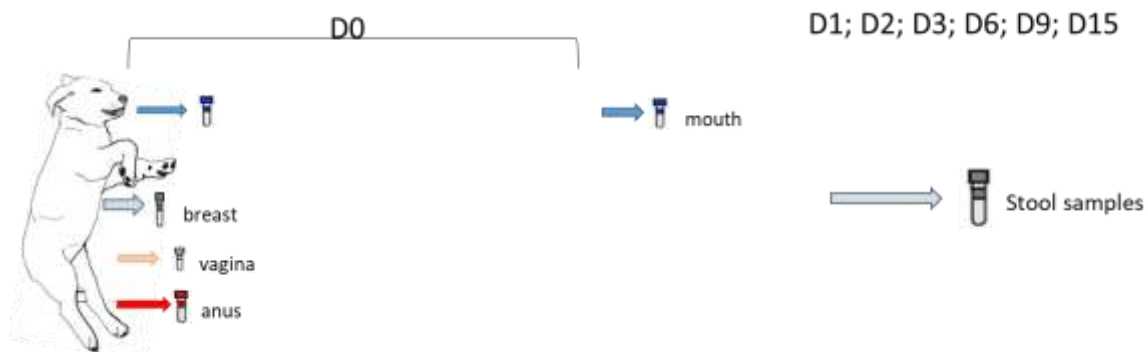
### **2.3. Coleta de amostras**

Amostras da boca, vagina, ânus e da região da mama das fêmeas submetidas a cesariana eletiva foram coletadas antes da realização da anestesia epidural, utilizando-se luvas e swabs estéreis. Nas cadelas acompanhadas no momento do parto normal, as mesmas regiões descritas acima foram utilizadas para obtenção das amostras, as quais foram coletadas no momento em que os animais apresentaram sinais característicos de pródromo (redução da temperatura corporal, inquietação, movimento de cavar, andar em círculos).

Amostras da boca e do ânus dos neonatos foram coletadas por meio de swabs estéreis logo após ruptura da membrana amniótica, sendo coletadas pelo próprio cirurgião e seu auxiliar. Ato contínuo, foram passados para seus respectivos receptores, os quais estavam portando compressas e luvas estéreis. Os neonatos foram enumerados e identificados conforme a ordem de nascimento, sendo que as amostras foram colhidas dos dois primeiros e dos dois últimos filhotes, totalizando 12 filhotes. Amostras de fezes dos neonatos foram coletadas nos três primeiros dias pós nascimento e, posteriormente, a cada 3 dias, nos primeiros 15 dias de vida.

No caso dos neonatos nascidos por via vaginal, amostras da boca e ânus foram coletadas por meio de swabs estéreis após ruptura da membrana amniótica pela fêmea canina. A coleta foi realizada pelo receptor que estava portando luvas e compressas estéreis. Os neonatos foram enumerados e identificados conforme a ordem de nascimento, sendo que as amostras foram colhidas dos dois primeiros e dos dois últimos filhotes de cada ninhada, totalizando 16 filhotes. Amostras de fezes dos neonatos foram colhidas nos três primeiros dias pós nascimento e, posteriormente, a cada 3 dias, nos primeiros 15 dias de vida.

As etapas de colheita das amostras, bem como a parte do corpo onde o material foi colhido está ilustrado na Figura 1.

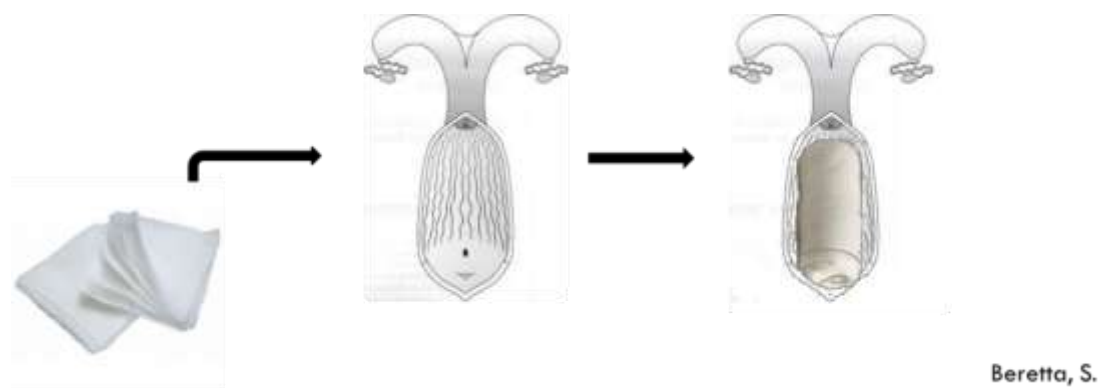


**Figura 1-** Esquemática dos momentos relacionados às coletas de amostras da cadela e neonatos. “D0” corresponde ao momento das coletas durante a cesariana eletiva ou parto normal; “D1” corresponde ao momento das coletas realizadas no primeiro dia; “D2” corresponde ao momento das coletas realizadas no segundo dia; “D3” corresponde ao momento das coletas realizadas no terceiro dia; “D6” corresponde ao momento das coletas realizadas no sexto dia; e, assim por diante, até o dia 15 (coletas realizadas de 3 em 3 dias após o terceiro dia).

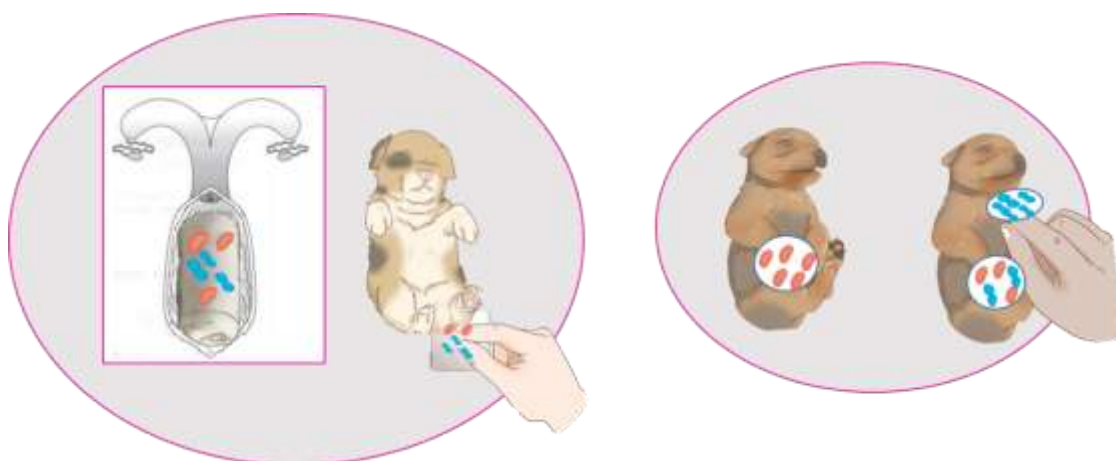
Para realização dos esfregaços, realizou-se movimentos circulares da ponta do swab estéril em contato com a superfície desejada e, em seguida, o swab foi colocado em frasco estéril contendo caldo peptona 0,1% e enviados para contagem bacteriana.

#### 2.4. **Seeding vaginal**

O procedimento de colheita do material para a transferência da microbiota vaginal consistiu na introdução e permanência de gazes estéreis (pelo menos uma gaze para cada neonato em que foi realizado o *seeding*) na vagina das parturientes durante o preparo para a cesariana (aproximadamente 40 minutos) como ilustrado na Figura 2. Assim que os neonatos foram retirados do útero realizou-se a colheita das amostras, manobra de ressuscitação neonatal e, ato contínuo, o *seeding* vaginal, o qual consistiu em esfregar as gazes retiradas da vagina da mãe na boca, face e no corpo dos neonatos. Assim, realizou-se o *seeding* em metade dos neonatos (Grupo cesariana *seeding*) e nos demais apenas a colheita das amostras microbiológicas (Grupo cesariana).



**Figura 2-** Esquematização do preparo do material para posterior realização do *seeding* vaginal. A imagem representa o modo como foram introduzidas e permaneceram as gazes estéreis na vagina das parturientes durante o preparo para a cesariana (aproximadamente 40 minutos).



**Figura 3-** Ilustração do procedimento de sementeira vaginal. Painel esquerdo- gaze estéril mantida na vagina materna antes da cesariana e ato de esfregar gaze colonizada por micróbios vaginais no recém-nascido. Painel direito- esquema representando o objetivo do *seeding* vaginal de proporcionar uma colonização da microbiota intestinal neonatal inicial semelhante ao de neonatos nascidos através da via vaginal.

### 2.5. Score Apgar modificado

As seguintes variáveis neonatais foram avaliadas: frequência cardíaca (FC) com auxílio de estetoscópio, vocalização (por meio do choro do neonato), irritabilidade reflexa (por uma suave compressão manual da ponta do membro). A motilidade foi determinada com o neonato na posição de supinação, observando movimentos ativos e respostas aos movimentos passivos dos

membros. A coloração da mucosa foi avaliada pela visualização da mucosa oral. Cada parâmetro recebeu uma pontuação de 0 a 2 de acordo com a Tabela 1. A interpretação da pontuação foi obtida após a somatória dos scores, conforme consta na Tabela 2. O score Apgar foi avaliado nos momentos E0: imediatamente após a ressuscitação cardiopulmonar; E5: 5 minutos após.

**Tabela 2.** Modelo de score Apgar proposto por Veronesi *et al.* (2009).

<b>Parâmetros</b>	<b>score 1</b>	<b>score 2</b>	<b>score 3</b>
<b>Frequência cardíaca</b>	Ausente	<180bpm	180 a 250bpm
<b>Frequência respiratória</b>	Ausente	<15mpm	>15mpm
<b>Tônus muscular</b>	Flacidez	Alguma flexão	Movimentação ativa
<b>Irritabilidade reflexa</b>	Ausente	Vocalização	Vocalização alta
<b>Coloração da mucosa</b>	Cianótica	Pálido	Rósea
<b>Total</b>	0	5	10

**Tabela 3.** Avaliação da vitalidade dos neonatos (Veronesi *et al.*, 2009)

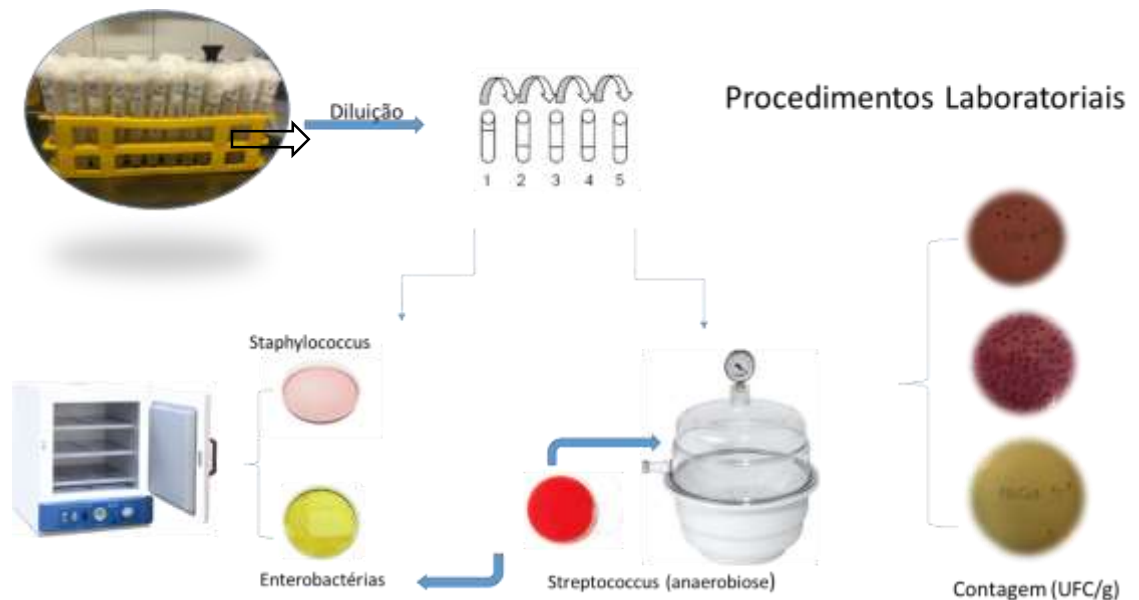
<b>Pontuação</b>	<b>0-3</b>	<b>Vitalidade Fraca</b>
<b>Pontuação</b>	<b>4-6</b>	<b>Vitalidade Moderada</b>
<b>Pontuação</b>	<b>7-10</b>	<b>Vitalidade Normal</b>

## 2.6. Avaliação microbiológica

A quantificação foi realizada através da técnica de plaqueamento em superfície. Cada amostra foi diluída em até 8 vezes em caldo peptona na proporção 1:10, e a partir de cada diluição, foi utilizado 0,1 mL como inóculo em placas com ágar MacConkey, para contagem de enterobactérias; ágar Sal Manitol, para *Staphylococcus* spp. e em ágar Sangue Azida, para *Streptococcus* spp. O inóculo foi homogeneizado com auxílio de alça de Drigalski e então, as

placas foram incubadas em estufas a 37°C por 24h, em aerobiose (enterobactérias e *Staphylococcus spp.*) e anaerobiose (*Streptococcus spp.*). Após esse período, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e, em seguida, realizado o cálculo para correção dos fatores de diluição e área (Figura 4).

Para a contagem de Unidades Formadoras de Colônia, cada colônia (Figura 5) foi contada e ao número total de colônias foi acrescido zeros correspondentes à diluição contável e um zero correspondente à contagem em superfície. Por exemplo, se a placa selecionada para contagem foi incubada com amostras diluídas em apenas 1 vez, foi colocado o número de colônias (exemplo 14 colônias), acrescido de 1 zero e mais um zero referente à contagem em superfície, totalizando  $1,4 \times 10^3$  UFC/g fezes.



**Figura 4-** Esquematização dos procedimentos realizados em laboratório para diluição, incubação e quantificação de Enterobactérias, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*



**Figura 5.** Placa com ágar Sal Manitol contendo colônias de *Staphylococcus spp.* (pontos rosas, como o indicado pela seta preta), em uma diluição de  $10^{-1}$ .

## 2.7. Análise estatística

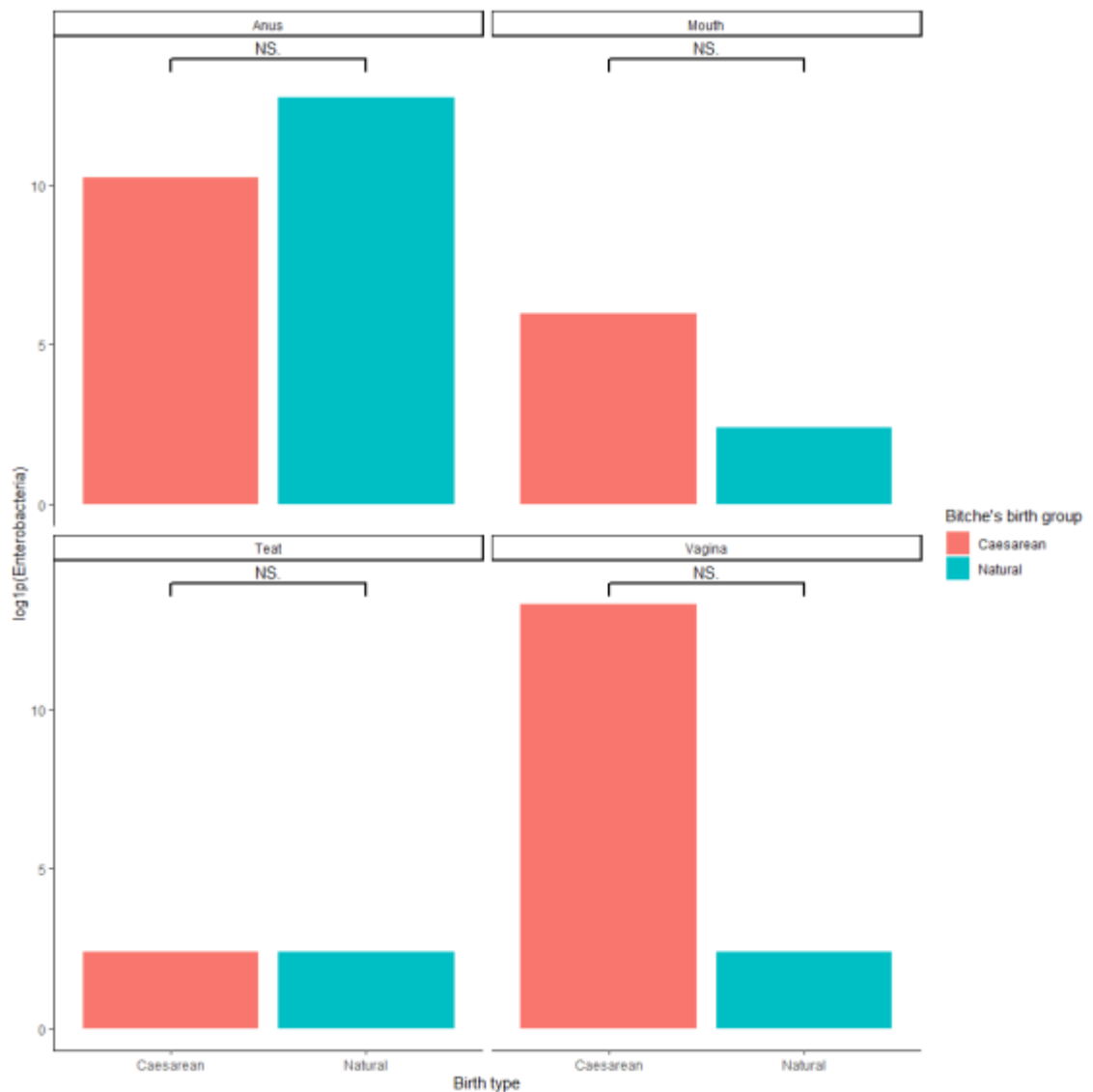
As contagens microbiológicas foram transformadas em escala logarítmicas e avaliadas quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Levene. Em seguida, os resultados foram submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis, seguidos pela avaliação de comparação post-hoc pelo Pair Wise Wilcox Test. A significância estatística foi considerada quando o p-valor foi inferior a 5% ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS

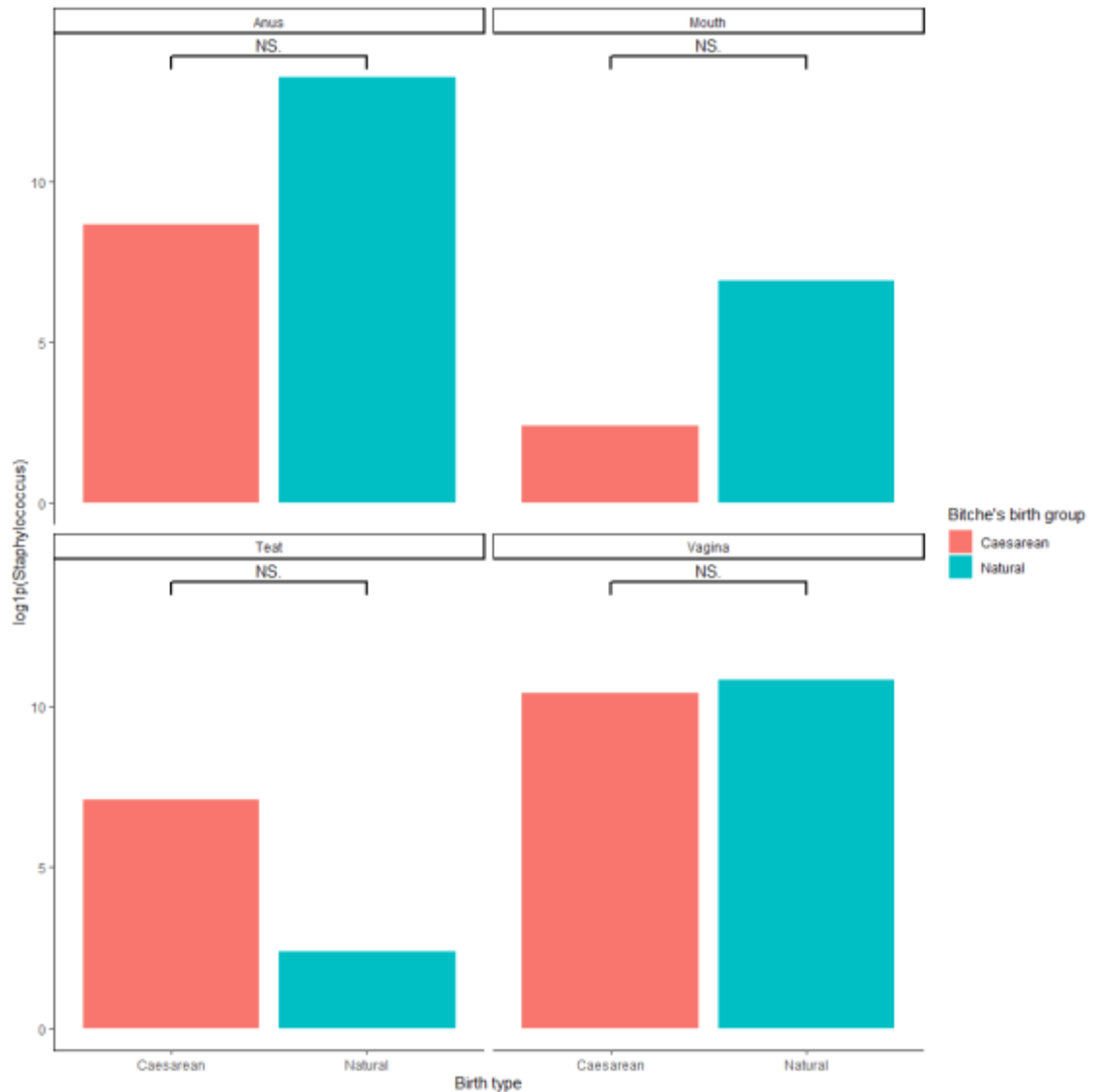
### 3.1. Avaliação da microbiota materna

Observamos que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Pair Wise Wilcox na contagem de Enterobactérias entre as cadelas dos dois grupos (parto normal e cesariana), porém, houve maior aumento populacional desses microrganismos na vagina de cadelas do grupo cesariana ( $6.80 \pm 5.36$  UFC/ml) em relação ao grupo parto normal ( $2.39 \pm 0.00$  UFC/ml). Ainda, foram observadas populações elevadas no ânus das cadelas de ambos os grupos ( $6.63 \pm 3.25$  UFC/ml no grupo cesariana e  $8.72 \pm 4.43$  UFC/ml no grupo parto

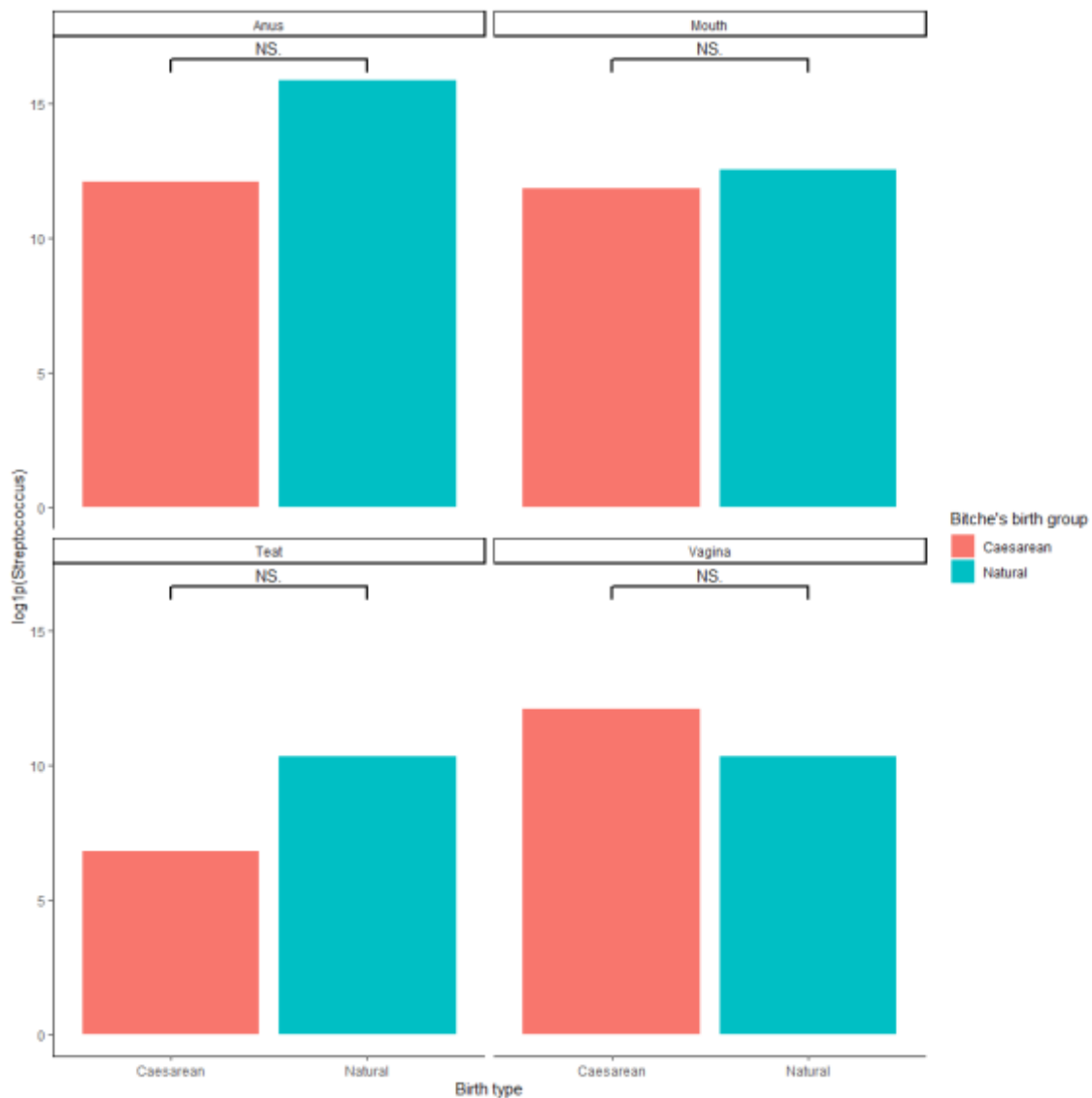
normal), sendo a região da mama, o local que apresentou menor população de Enterobactérias ( $1.79 \pm 1.19$  UFC/ml- Grupo cesariana;  $2.39 \pm 0.00$  UFC/ml- Grupo parto normal) (Figura 4). As populações de *Staphylococcus spp.* se comportaram relativamente da mesma forma, com elevadas populações em ânus e vagina. Entretanto, houve maior crescimento populacional observada em boca e tetos, sendo mais altas em cadelas de parto natural ( $4.08 \pm 2.15$  UFC/ml) e cesariana ( $4.12 \pm 2.23$  UFC/ml), respectivamente (Figura 5). Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos avaliados ( $p < 0,05$ ), de forma geral, *Streptococcus spp.* foram os microrganismos com as maiores populações, sendo observada menor variação de crescimento entre os grupos cesariana e parto normal (Figura 6).



**Figura 4.** Representação gráfica da população de Enterobactérias (UFC/mL) encontradas em ânus, boca, região de mamas e vagina de cadelas dos grupos parto normal e parto cesariana. NS: não houve diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Wilcox.



**Figura 5.** Representação gráfica da população de *Staphylococcus spp.* (UFC/mL) encontradas em ânus, boca, região de mamas e vagina de cadelas dos grupos parto normal e parto cesariana. NS: não houve diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Wilcox.

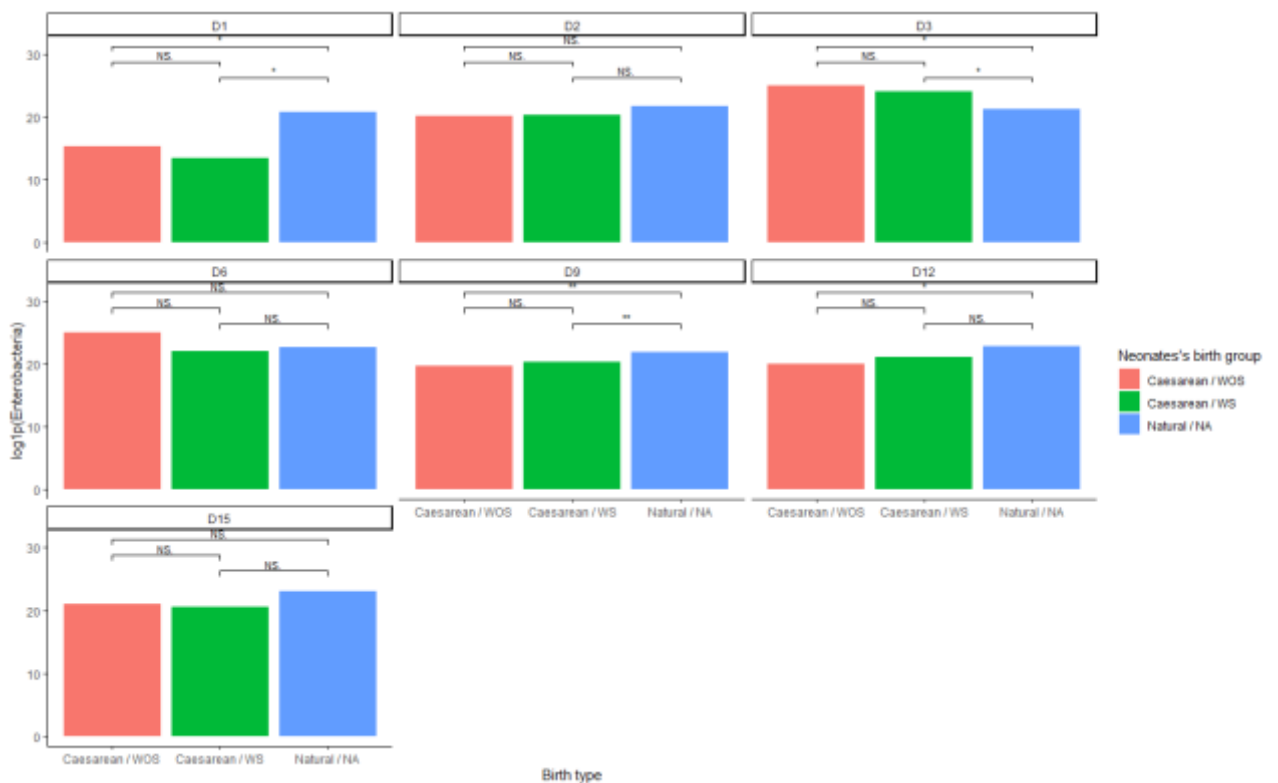


**Figura 6.** Representação gráfica da população de *Streptococcus spp.* (UFC/mL) encontradas em ânus, boca, região de mamas e vagina de cadelas dos grupos parto normal e parto cesariana. NS: não houve diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Wilcox.

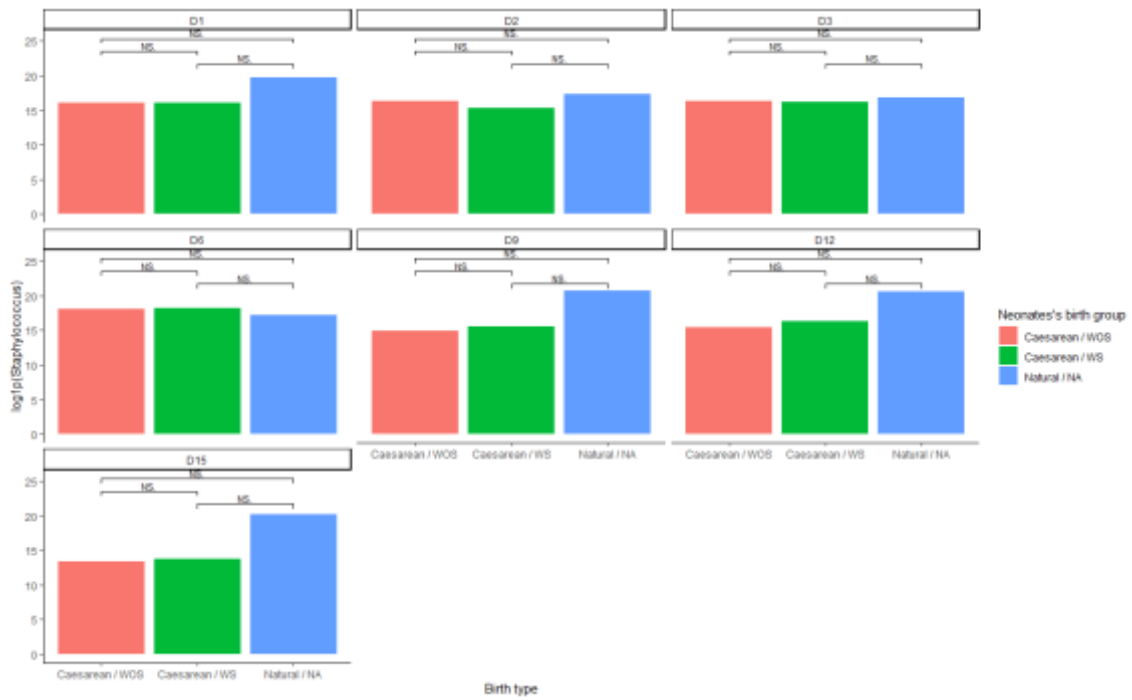
### 3.2. Avaliação da microbiota neonatal

De forma geral, as populações de microrganismos se apresentaram baixas no dia 0 (D0), com aumento expressivo no dia 1 pós-parto (D1). Entretanto, foi observado que as populações bacterianas se mantiveram altas até o dia 15 pós-parto (D15) em ambos os grupos (cesariana, cesariana com *seeding* e parto normal). Estatisticamente, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Pair Wise Wilcox na população de Enterobactérias entre

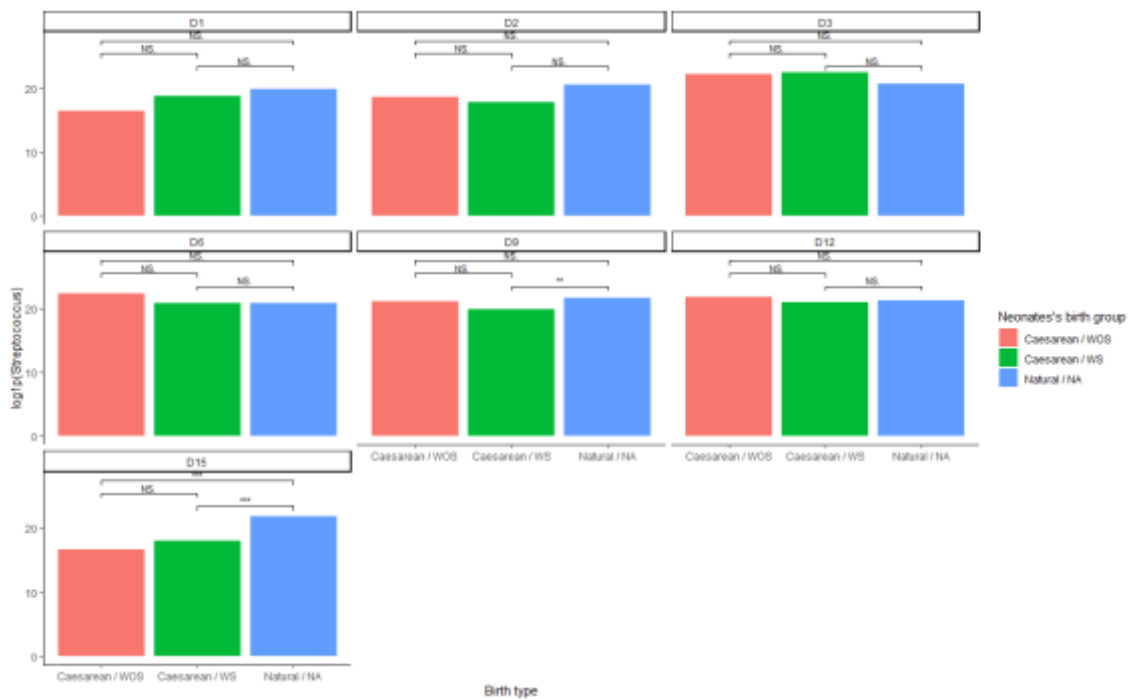
os grupos Cesariana com *Seeding* e Cesariana, porém, esta foi significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Cesariana e Parto Normal (Figura 7). Já as populações de *Staphylococcus* não apresentaram diferenças ( $p < 0,05$ ) entre nenhum dos grupos (Figura 8). De forma geral, as populações de *Streptococcus spp.* comportaram-se da mesma forma, sem apresentar diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os grupos nas primeiras avaliações, mas apresentando diferença significativa nos dias 9 e 15 pós-parto entre os grupos Cesariana e Parto Normal (Figura 9).



**Figura 7.** Representação gráfica da população de Enterobactérias nos dias 1,2,3,6,9,12 e 15 pós-parto nos grupos cesariana (Caesarean/WOS), cesariana com *seeding* (Caesarean/WS) e parto normal (Natural/NA). NS: não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Wilcoxon entre os grupos; Asterisco (\*): houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Wilcoxon entre os grupos.



**Figura 8.** Representação gráfica da população de *Staphylococcus spp.* nos dias 1,2,3,6,9,12 e 15 pós-parto nos grupos cesariana (Caesarean/WOS), cesariana com *seeding* (Caesarean/WS) e parto normal (Natural/NA). NS: não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Wilcox entre os grupos.



**Figura 9.** Representação gráfica da população de *Streptococcus spp.* nos dias 1,2,3,6,9,12 e 15 pós-parto nos grupos cesariana (Caesarean/WOS), cesariana com *seeding* (Caesarean/WS) e parto normal (Natural/NA). NS: não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Wilcox entre os grupos.

diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Wilcoxon entre os grupos; Asterisco (\*): houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Wilcoxon entre os grupos.

#### 4. DISCUSSÃO

Estudos mostram que o desenvolvimento do microbioma intestinal começa logo no nascimento e tem evolução em sua composição juntamente com os diferentes estágios da vida do hospedeiro. Faith e colaboradores (2013) em estudo, na medicina humana, relataram que a maioria das cepas bacterianas intestinais permanecem estáveis por décadas, mostrando que a colonização precoce é uma etapa crucial para o recém-nascido (Subramanian *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2015). Na medicina veterinária, estudos sobre o desenvolvimento da microbiota intestinal em neonatos são escassos. O primeiro estudo realizado com colheitas nos primeiros dias de vida de neonatos foi realizado por Garrigues e colaboradores (2023), com amostras colhidas apenas nos dias 0, 2 e 7 após o nascimento por parto normal, não sendo avaliada a microbiota intestinal de neonatos nascidos por cesariana. Em nosso estudo, foi avaliado o desenvolvimento da microbiota intestinal tanto de neonatos nascidos por meio de parto normal como por cesariana eletiva em todo o período neonatal (dias 1,2,3,6,9,12 e 15 após nascimento), sendo o primeiro trabalho a comparar o desenvolvimento da microbiota intestinal de neonatos nascidos por cesariana eletiva e parto normal na espécie canina.

A composição da microbiota gastrointestinal pode ser afetada por muitos fatores, como idade, nutrição e ambiente (Tilocca *et al.*, 2017; Hasan e Yang, 2019;). No presente estudo, os neonatos ingeriram obrigatoriamente o colostro materno e foram alimentados de forma natural (aleitamento materno). Além disso, todas as fêmeas, tanto as submetidas à cesariana como as que foram acompanhadas durante o parto normal permaneceram no mesmo local a partir do dia 55 após a primeira monta/inseminação artificial e permaneceram até o dia 15 após nascimentos dos filhotes. Dessa forma, os animais foram submetidos às mesmas condições ambientais e sanitárias, de forma a se reduzir o impacto da variável “ambiente” e “nutrição” na composição da microbiota intestinal dos mesmos. Sabe-se também que o uso de medicamentos como antibióticos tanto pela mãe como pelos neonatos pode interferir no desenvolvimento da microbiota

intestinal inicial do neonato (Penders *et al.*, 2006) e, portanto, em nosso estudo, não foram incluídos animais que tiveram contato com algum tipo de medicação.

Segundo Sanidad e Zeng (2020), nas espécies animais, a presença de oxigênio no trato gastrointestinal durante os primeiros dias de vida promove a colonização de anaeróbios obrigatórios e facultativos. O consumo de oxigênio e diminuição do potencial redox (que é positivo no nascimento) desempenham um papel fundamental na preparação do intestino para maior colonização de anaeróbios estritos, posteriormente necessários para a função intestinal saudável (Shin *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2020). Porém, em nosso estudo, de forma geral, as populações de microrganismos se apresentaram baixas no dia 0 (D0), com aumento expressivo no dia 1 pós-parto (D1), tanto dos microrganismos aeróbios (Enterobactérias e *Staphylococcus spp.*) como de microrganismos anaeróbios facultativos (*Streptococcus spp.*). Garrigues e colaboradores (2022), sugeriram que o aumento em abundância de bactérias no intestino do filhote não esteja relacionado apenas à homeostase do oxigênio, mas também à ingestão de leite pelo filhote no período neonatal, o que pode explicar este aumento expressivo no D1, e manutenção alta dessas populações até o dia 15 pós-parto (D15) em todos os grupos (cesariana, cesariana com *seeding* e parto normal).

Segundo Beller e colaboradores (2021), em cães neonatos nascidos por via vaginal, a composição da população microbiana meconial assemelha-se à sua contraparte vaginal materna, enquanto em neonatos nascidos por cesariana, assemelha-se à composição bacteriana materna vaginal e oral. Milani e colaboradores (2017) afirmaram que após o nascimento, o primeiro passo na modulação da microbiota intestinal do filhote vem da transferência vertical da mãe, como por exemplo, cadelas prenhes compartilham Bifidobactéria de seu trato intestinal com seus filhotes. Em porcas, os agentes microbianos maternos (do leite, pele, vagina, fezes) contribuem para cerca de 90% das bactérias do intestino delgado de recém-nascidos com menos de 35 dias de idade (Liu *et al.*, 2019). No presente estudo, apesar de não haver diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na contagem de Enterobactérias entre as cadelas dos dois grupos (parto normal e cesariana), houve maior aumento populacional desses microrganismos na vagina de cadelas do grupo cesariana ( $6.80 \pm 5.36$  UFC/ml) em relação ao grupo de cadelas submetidas ao parto normal ( $2.39 \pm 0.00$

UFC/ml). Ainda, foram observadas elevadas contagens nas amostras provenientes do ânus das cadelas de ambos os grupos, sendo a região da mama, o local que apresentou menor contagem de Enterobactérias. A colonização de Enterobactérias parece provir, em sua maior parte, do ânus e vagina materna, sendo que nos dias 1 e 9 pós-parto houve diferença significativa entre os grupos cesariana (com e sem *seeding*) e parto normal, com maior crescimento no grupo parto normal. Uma vez que nas cadelas houve maior crescimento de Enterobactérias na vagina do grupo cesariana e menor crescimento na vagina do grupo parto normal, estima-se que a predominância de colonização desse grupo bacteriano parece provir do ânus da fêmea canina. Da mesma forma, observou-se maior população de *Staphylococcus spp.* em ânus e vagina dos grupos avaliados, com maior crescimento nas amostras provenientes da boca das cadelas de parto normal e em tetos nas cadelas de cesariana. Como não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos cesariana e parto normal, observa-se que a lambedura e passagem de bactérias provinda dos tetos maternos teve menor importância na colonização bacteriana dos filhotes do que o ânus e vagina materna. Desse modo, nosso estudo se contrapõe aos estudos anteriores, sugerindo que a colonização bacteriana intestinal dos neonatos se assemelha predominantemente à composição bacteriana materna vaginal e fecal, independentemente da via de parto. Porém, não se exclui o fato de que a transmissão vertical da mãe para a prole desempenha um papel decisivo na formação da composição inicial e da diversidade da microbiota do recém-nascido, sendo necessários mais estudos para entender o real causador das diferenças no desenvolvimento na microbiota intestinal de neonatos caninos nascidos por cesariana e por parto normal.

Estudos recentes sobre a microbiota infantil em humanos sugeriram que a transferência de bactérias da mãe para o bebê é altamente dependente do tipo de nascimento, com bebês nascidos por cesariana apresentando alteração da microbiota e, como consequência, maior risco de problemas de saúde (Dominguez-Bello, *et al.*, 2016; Mortensen *et al.*, 2021). Achados semelhantes foram observados em estudos caninos os quais reportaram menor diversidade bacteriana no mecônio de filhotes nascidos por cesariana em comparação com os nascidos por via vaginal (Zakošek *et al.*, 2020; Kajdic *et al.*, 2021). Em nosso estudo, também se observou diferenças significativas no crescimento

populacional de Enterobactérias nos dias 1, 3, 9 e 12 pós-parto e de *Streptococcus* nos dias 9 e 15 pós-parto, sendo maior em neonatos nascidos por parto normal do que por cesariana eletiva. Porém, estatisticamente, não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Cesariana *seeding* e Cesariana na população de bactérias (Enterobactérias, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.*), mostrando que o uso do *seeding* vaginal não foi capaz de modular positivamente a microbiota neonatal dos neonatos avaliados no presente estudo, o que sugere, mais uma vez, que a via de passagem durante o parto pode não interferir significativamente na colonização inicial da microbiota intestinal neonatal, estando outros fatores envolvidos nas diferenças de desencadeamento dessa colonização no parto normal e cesariana. Ainda, nosso estudo corrobora com o estudo de Liu e colaboradores (2023) em humanos, que concluiu que o *seeding* vaginal não tem impactos significativos na microbiota intestinal durante os primeiros 2 anos de vida de bebês nascidos por meio de cesariana.

Uma sugestão é de que fatores hormonais envolvidos no desencadeamento do parto normal que não ocorrem na cesariana eletiva (uma vez em que o trabalho de parto não é sinalizado) podem estar envolvidos nas diferenças de colonização bacteriana observadas entre neonatos nascidos de parto normal e cesariana eletiva. Já se conhece a existência de uma rede de comunicação bidirecional entre a microbiota intestinal e o cérebro em humanos, que inclui sistemas/vias neurais, endócrinas, metabólicas e imunológicas, conhecida como eixo intestino-cérebro (Heijtz *et al.*, 2011; Ogbonnaya *et al.*, 2015; Lynch e Pedersen, 2016; Fung *et al.*, 2017). Endocrinologicamente, a gestação em cadelas é amparada por diferentes mecanismos de ação hormonal, controlados por meio do eixo hipotálamo-hipófise-ovários. A liberação e o equilíbrio participativo entre diferentes hormônios, incluindo a progesterona, prolactina, relaxina e estrógeno garantem a manutenção e a progressão da prenhez. Já o desencadeamento do parto ocorre pela ação conjunta da progesterona e do estrógeno, bem como da ocitocina (Taverne *et al.* 1979; Mitchell *et al.*, 1997). Na cesariana eletiva, principalmente em humanos em que se estipula uma data para o procedimento anterior ao desencadeamento do parto, muitos dos mecanismos endócrinos não são ativados. Portanto, sugere-se novos estudos relacionados ao eixo intestino-cérebro que possam estar

envolvidos nas diferenças de desenvolvimento da microbiota intestinal de neonatos nascidos por cesariana eletiva, tanto em humanos, como em animais.

## 5. CONCLUSÕES

O presente estudo é o primeiro na espécie canina a comparar o desenvolvimento inicial da microbiota intestinal de neonatos caninos nascidos de cesariana com aqueles de parto normal.

Os principais achados mostram que apesar da transmissão vertical da mãe para prole desempenhar um papel importante no desenvolvimento inicial da microbiota intestinal canina, a via de nascimento não parece ser o principal causador das diferenças estabelecidas entre neonatos nascidos por parto normal e por cesariana. Ademais, o uso do *seeding* vaginal não se mostrou eficiente para modular o desenvolvimento da microbiota intestinal inicial de neonatos nascidos por cesariana eletiva.

Estudos futuros devem ser considerados para entender melhor os principais causadores das diferenças no desenvolvimento da microbiota intestinal de cães nascidos por cesariana eletiva e de parto normal. O estudo do eixo intestino-cérebro poderá ser útil para estabelecer as questões endócrinas e hormonais que podem estar envolvidas na definição da composição da microbiota intestinal neonatal nos diferentes tipos de parto (natural e cesariana).

## 6. REFERÊNCIAS

Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 6:237ra65 (2014). doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.

Alipour MJ, Jalanka J, Pessa-Morikawa T, Kokkonen T, Satokari R, Hynönen U, *et al.* The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Sci Rep.* 8:10437 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-28733-y.

Beller L, Deboutte W, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Valles-Colomer M, *et al.* Successional stages in infant gut microbiota maturation. *mBio*. (2021) 12:e0185721. doi: 10.1128/mBio.01857-21

Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., & Mikelsaar, M. . Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, 516–520. (2001). doi: 10.1067/mai.2001.118130.

Björkstén, B. The gut microbiota: A complex ecosystem. *Clin. Exp. Allergy*, v. 36, p. 1215-1217, 2006. doi: 10.1111/j.1365-2222.2006.02579.x

Coelho, L.P., Kultima, J.R., Costea, P.I., *et al.* Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. *Microbiome*, v. 6, p. 1-11, 2018. doi: 10.1186/s40168-018-0450-3.

Davidson, A.P. (2014). Neonatal resuscitation: improving the outcome. *Vet Clin Small Anim*, v. 44, p. 191-204.

Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, *et al.* Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med*. 22:250–253 (2016). doi: 10.1038/nm.4039.

Dunn AB, Jordan S, Baker BJ, Carlson NS. The maternal infant microbiome: considerations for labor and birth. *MCN Am J Matern Child Nurs*. 42:318–325 (2017). doi: 10.1097/NMC.0000000000000373.

Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, *et al.* The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*. 341:1237439 (2013). doi: 10.1126/science.1237439.

Ferretti, P., Pasolli, E., Tett, A., Asnicar, F., Gorfer, V., Fedi, S., *et al.* (2018). Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell Host Microbe*, v. 24, p. 133-145.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.06.005.

Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci*. 20:145-155 (2017). doi: 10.1038/nn.4476.

Garrigues Q, *et al.* Composition and evolution of the gut microbiota of growing puppies is impacted by their birth weight. *Scientific Reports*, v.9 (2022). [doi:10.21203/rs.3.rs-2604924/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2604924/v1)

Guarner, F., & Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, v. 361, p. 512-519. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0.

Garrigues, Q., Apper, E., Rodiles, A., *et al.* (2023). Composition and evolution of the gut microbiota of growing puppies is impacted by their birth weight. PREPRINT (Version 1) disponível em Research Square. doi: 10.21203/rs.3.rs-2604924/v1.

Hasan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*. 7:e7502 (2019). doi: 10.7717/peerj.7502.

Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forssberg H, Pettersson S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:3047-3052 (2011). doi: 10.1073/pnas.1010529108.

Kajdic L, Plavec T, Zdovc I, Kalin A, Zakošek Pipan M. Impact of type of parturition on colostrum microbiota composition and puppy survival. *Animals*. 11:1897 (2021). doi: 10.3390/ani11071897.

Lucio, C.F., Silva, L.C.G., Rodrigues, J.A., Veiga, G.A.L., & Vannucchi, C.I. (2009). Acid-base changes in canine neonates following normal birth or dystocia. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, p. 208-210.

Luvoni, G.C., & Beccaglia, M. (2006). The prediction of parturition date in canine pregnancy. *Reprod Domest Anim*, v. 41, p. 27-32.

Liu, J., Meng, Z., Liu, X., *et al.* (2019). Microbial assembly, interaction, functioning, activity and diversification: a review derived from community compositional data. *Mar Life Sci Technol*, v. 1, p. 112-128. doi: 10.1007/s42995-019-00004-3.

Liu, Y., Li, H.T., Zhou, S.J., Zhou, H.H., Xiong, Y., Yang, J., Zhou, Y.B., Chen, D.J., & Liu, J.M. (2023). Effects of vaginal seeding on gut microbiota, body mass index, and allergy risks in Cesarean-delivered infants: a randomized clinical trial. *Am J Obstet Gynecol MFM*, v. 5, artigo 100793. doi: 10.1016/j.ajogmf.2022.100793.

Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 375:2369-2379 (2016). doi: 10.1056/NEJMra1600266.

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arboleya Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health

Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev.* 81(4): e00036-17 (2017). doi: 10.1128/MMBR.00036-17.

Mitchell, B.F., Fang, X., & Wong, S. (1997). Metabolism of oxytocin in rat uterus and placenta in late gestation. *Biol Reprod*, v. 57, p. 807-812.

Moon CD, Young W, Maclean PH, Cookson AL, Bermingham EN. Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiol Open.* (2018) 7:e00677. doi: 10.1002/mbo3.677

Mortensen MS, Rasmussen MA, Stokholm J, Brejnrod AD, Balle C, Thorsen J, *et al.* Modeling transfer of vaginal microbiota from mother to infant in early life. *eLife.* 10:e57051 (2021). doi: 10.7554/eLife.57051.

Ogbonnaya ES, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF, O'Leary OF. Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome. *Biol Psychiatry.* 78:e7-e9 (2015). doi: 10.1016/j.biopsych.2015.01.010.

Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F.F., Snijders, B., Kummeling, I., *et al.* (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, v. 118, n. 2, p. 511-521.

Pereira AM, Pinna C, Biagi G, Stefanelli C, Maia MRG, Matos E, *et al.* Supplemental selenium source on gut health: insights on fecal microbiome and fermentation products of growing puppies. *FEMS Microbiol Ecol.* (2020) 96:fiaa212. doi: 10.1093/femsec/fiaa212

Poffenbarger, E.M.; Ralston, S.L.; Chandler, M.L.; Olson, P.N (1900). Canine neonatology. Part 1. Physiologic differences between puppies and adults.

Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 12(11): 1601-1609.

Sanidad KZ, Zeng MY. Neonatal gut microbiome and immunity. *Curr Opin Microbiol.* (2020) 56:30-37. doi: 10.1016/j.mib.2020.05.011

Siena, G., & Milani, C. (2021). Usefulness of Maternal and Fetal Parameters for the Prediction of Parturition Date in Dogs. *Animals (Basel)*, v. 11, n. 3, artigo 878. doi: 10.3390/ani11030878.

Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* (2015) 33:496-503. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011

Souza, T.D., Mol, J.P., Paixão, T.A., & Santos, R.L. (2017). Mortalidade fetal e neonatal canina: etiologia e diagnóstico. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 41, n. 2, p. 639-649, abr./jun. 2017. Disponível em: [www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br).

Subramanian S, Blanton LV, Frese SA, Charbonneau M, Mills DA, Gordon JI. Cultivating healthy growth and nutrition through the gut microbiota. *Cell.* (2015) 161:36-48. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.013

Taverne, M.A., Naaktgeboren, C., Elsaesser, F., Forsling, M.L., van der Weyden, G.C., Ellendorff, F., & Smidt, D. (1979). Myometrial electrical activity and plasma concentrations of progesterone, oestrogens and oxytocin during late pregnancy and parturition in the miniature pig. *Biol Reprod*, v. 21, p. 1125-1134.

Tilocca B, Burbach K, Heyer CME, Hoelzle LE, Mosenthin R, Stefanski V, *et al.* Dietary changes in nutritional studies shape the structural and functional

composition of the pigs' fecal microbiome—from days to weeks. *Microbiome*. 5:144 (2017). doi: 10.1186/s40168-017-0362-7.

Wassenaar TM, Panigrahi P. Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett Appl Microbiol*. 59:572–579 (2014). doi: 10.1111/lam.12334.

Vannucchi, C.I., Silva, L.C.G., Lúcio, C.F., Regazzi, F.M., Veiga, G.A.L., & Angrimani, D.S.R. (2012). Prenatal and neonatal adaptations with a focus on the respiratory system. *Reprod Dom Anim*, v. 47, p. 177-181.

Vassalo, F.G., Simões, C.R.B., Sudano, M.J., Prestes, N., Lopes, M.D., Chiacchio, S.B., & Lourenço, M.L.G. (2015). Topics in the routine assessment of newborn puppy viability. *Top Companion Anim Med*, v. 30, p. 16-21.

Veronesi, M.C., Panzani, S., Faustini, M., & Rota, A. (2009). An apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis. *Theriogenology*, v. 72, p. 401-407.

Zakošek Pipan M, Kajdic L, Kalin A, Plavec T, Zdovc I. Do newborn puppies have their own microbiota at birth? Influence of type of birth on newborn puppy microbiota. *Theriogenology*. 152:18–28 (2020). doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.04.01