



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANNE KEMMER SOUZA CANDOTTI

**MICROBIOTA VAGINAL AVALIADA POR
SEQUENCIAMENTO DE DNA DE NOVA GERAÇÃO E
ASPECTOS REPRODUTIVOS DE VACAS LEITEIRAS**

Londrina
2021

ANNE KEMMER SOUZA CANDOTTI

**MICROBIOTA VAGINAL AVALIADA POR
SEQUENCIAMENTO DE DNA DE NOVA GERAÇÃO E
ASPECTOS REPRODUTIVOS DE VACAS LEITEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C219m Candotti, Anne Kemmer Souza.
Microbiota vaginal avaliada por sequenciamento de DNA de nova geração e aspectos reprodutivos de vacas leiteiras / Anne Kemmer Souza Candotti. - Londrina, 2021.
110 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Bovinos - Doenças - Tese. 2. Bovinos - Reprodução - Tese. 3. Microbiota vaginal - Tese. 4. Vacas leiteiras - Tese. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

ANNE KEMMER SOUZA CANDOTTI

**MICROBIOTA VAGINAL AVALIADA POR
SEQUENCIAMENTO DE DNA DE NOVA GERAÇÃO E
ASPECTOS REPRODUTIVOS DE VACAS LEITEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes
Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Márcio C. Costa
Universidade de Montreal – UdeM

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Prof^a. Dr^a. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Amanda Fonseca Zangirolamo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de junho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a minha gratidão eterna e diária é pela presença de Deus na minha vida, a qual se renova a cada manhã, e transborda graça e misericórdia. Me sinto grandemente abençoada por Deus por conseguir concluir mais essa etapa profissional, repleta de lições. Em cada momento de desânimo, incertezas e dificuldades, ELE estava próximo para me amparar!

Agradeço,

Ao meu querido marido, Luís Otávio Candotti, não só pelo companheirismo e por seguir junto comigo no projeto da família, mas também por me apoiar tão intensamente na finalização do doutorado, sendo minha força e motivação nos momentos certos, sendo meu confidente e amigo, além de um excelente pai, seja nas horas de tensão ou nos momentos de diversão. Com certeza parte do que conquistei nesses quatro anos devo a você meu amor, e apenas um agradecimento não é suficiente para refletir o sentimento do meu coração.

As duas figurinhas que conquistaram um dos lugares mais importante da minha vida, Catarina e Giovana Candotti, minhas filhas. Ambas vieram fazer parte da minha história exatamente nessa fase de doutorado e se tornaram os dois “trabalhos” inéditos mais importantes da minha vida. Elas também me ensinaram o real significado da palavra leveza, pois no meio de infinitas interrupções, nos momentos mais críticos da tese, havia sempre um sorriso, um olhar e a compreensão pela minha ausência. Definitivamente dois corações que batem fora do meu peito e só vieram para agregar a uma fase tão relevante da minha vida!

Imensamente a minha família e rede de apoio, em especial aos meus pais José de Souza Neto e Rosmeiry Kemmer Souza, a minha sogra Geraldina Bezerra e a minha cunhada Roseni Antunes Vieira, que me constrangeram com tanta dedicação ao cuidar das minhas filhas durante os meus momentos de ausência, promovendo carinho, atenção e amor que elas precisavam. Vocês não mediram esforços para me apoiar, sofreram e lutaram ao meu lado em cada momento. Obrigada por se importarem tanto comigo e com a finalização deste trabalho. Também agradeço ao meu irmão Rudolfo Kemmer Souza, que com o seu jeito fraterno se faz sempre presente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda, primeiramente pela humanidade elevada e pela proposta de vida de cuidar daqueles que estão próximos a você. Agora em 2021 estamos fazendo 10 anos de história. Você foi o primeiro a acreditar em mim ao me aprovar como sua orientada de iniciação científica depois de um concorrido processo, não preciso nem falar o quanto você influenciou o meu interesse pela área acadêmica e o quanto me sinto realizada trabalhando com reprodução animal. Mais do que um orientador, você se tornou um amigo e conselheiro. Eu e o Luís seremos eternamente gratos por todo incentivo e apoio quanto a construção da nossa família. Somado a isso, agradeço a confiança no meu trabalho e por acreditar que eu iria conseguir equilibrar todas as coisas. Suas

constantes orientações e seus ensinamentos foram essenciais neste processo.

As minhas amigas mais chegadas, como irmãs, Anna Pívaro, Ana Flávia Maniaes, Carla Lodi, Carol Freire, Daniele Costelini, Michelle Coelho e Elisa Weiss, por serem minhas companheiras de oração e se importarem comigo, participando de cada detalhe da minha vida, seja nos desafios ou nas conquistas. Também as minhas amigas que nasceram no mestrado e continuaram por toda vida Larissa Bergamo, Nathália Covre e Camila Bortoliero, minha gratidão por serem presentes nesses anos e me suportarem com muita cumplicidade e parceria.

Aos amigos da família REPROA, que sempre com disposição me auxiliaram nas mais variadas atividades desde tirar dúvidas quanto a estatística, transportar botijão de nitrogênio até baixar artigos, minha gratidão a Ana Clara Souza, Eduardo Rossignolo, Tamires Sanches, Suellen Gonzalez, Denis Bonato, Fabio Moraes e professor Fábio Morotti.

A minha amiga e idealizadora deste projeto, Amanda Zangirolamo, não só pelas constantes discussões e correções, mas também por compartilhar comigo suas experiências de vida. Sou grata por todo incentivo e confiança no meu trabalho.

Ao professor Márcio Costa, primeiramente por apostar neste projeto e ser nosso colaborador direto, auxiliando nas análises e interpretações do sequenciamento de nova geração. Sou grata por sua serenidade e paciência ao dividir comigo todo o seu conhecimento e esclarecer cada dúvida que apareceu (e ainda aparece) neste processo.

Ao Ricardo Guella Droher, meus mais sinceros agradecimentos, pela colaboração nesta pesquisa ao coletar, com tanta disposição, os *swabs* vaginais das fêmeas residentes na propriedade em que trabalha.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado participar da qualificação (Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer, Profa. Dra. Amanda Fonseca Zangirolamo e Dra. Francieli Gesleine Capote Bonato) por partilharem seu conhecimento e pela paciência em aprimorar um texto ainda em desenvolvimento, e defesa (Prof. Dr. Márcio Costa, Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti, Profa. Dra. Elis Lorenzetti e Profa. Dra. Amanda Fonseca Zangirolamo) por também estarem dispostos a refinar este texto com seu conhecimento e experiência. A participação de cada um de vocês terá grande importância para o nosso trabalho!

Ao INCT pela concessão da bolsa e pela oportunidade de estar inserida em um projeto tão relevante no âmbito nacional. Também agradeço ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal, especialmente a Helenice Kieski, pela dedicação ao programa, e pelo auxílio nas horas de dificuldades burocráticas.

Por fim, estendo esse agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte da minha trajetória na pós-graduação.

“Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas. A ele, pois, a glória eternamente. Amém!”

Romanos 11:36

CANDOTTI, Anne Kemmer Souza. **Microbiota vaginal avaliada por sequenciamento de DNA de nova geração e aspectos reprodutivos de vacas leiteiras**. 2021. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A microbiota vaginal tem demonstrado relevância no âmbito da reprodução de bovinos pois alterações em sua composição podem influenciar a fertilidade. A tecnologia de sequenciamento de nova geração (SNG), Illumina, tem sido utilizada como padrão, contudo, para uma maior precisão nas análises, a tecnologia de leituras longas, PacBio, vem sendo utilizada para melhorar a sensibilidade e especificidade do perfil taxonômico, além de reduzir o risco de falsos positivos. Com o objetivo de caracterizar a microbiota vaginal de vacas leiteiras por SNG e relacionar com aspectos reprodutivos, dois estudos foram desenvolvidos. Em ambos, após o SNG, foi analisado a abundância relativa das bactérias, e calculado os índices de Alfa e Beta diversidade. O primeiro estudo identificou a microbiota vaginal de vacas da raça holandês preto e branco (HPB; $n = 13$) por meio do sequenciamento de leituras longas de DNA (PacBio *sequencing*) e comparou os dados com a técnica convencional de leituras curtas (Illumina *sequencing*). Este é um dos primeiros estudos a buscar leituras em nível de espécie nas bactérias do ambiente vaginal de vacas. Por meio da plataforma PacBio foram obtidas 366.509 leituras e 631.586 leituras pela Illumina. Foi possível a identificação de 27 *versus* 28 filós e 677 *versus* 662 gêneros, no sequenciamento por PacBio e Illumina, respectivamente. Ainda, foram identificadas 677 espécies pelo PacBio. A alfa diversidade demonstrou uma forte correlação ($r = 0,758$), de maneira significativa ($p = 0,003$), entre o número de espécies (PacBio) e gêneros (Illumina) considerando as diferentes técnicas. O segundo estudo teve como objetivo investigar a microbiota vaginal em vacas gestantes e não gestantes por meio da plataforma de sequenciamento PacBio. Para esse estudo foram colhidos *swabs* vaginais de vacas leiteiras ($n = 13$), das quais 5 ficaram gestantes (GE) e 8 permaneceram não gestantes (NG) após a inseminação artificial realizada posterior à identificação de cio natural nessas fêmeas. Foram obtidas 366.509 leituras bacterianas, sendo agrupadas em 27 filós e 677 gêneros. Os filós mais abundantes em todas as amostras avaliadas foram *Firmicutes* (58%) e *Bacteroidetes* (32%). Na análise de beta diversidade foi observado diferença comparando as comunidades bacterianas dos grupos GE ($p = 0,004$) e NG ($p = 0,011$). Além disso, houve um agrupamento evidente das vacas que permaneceram não gestantes, demonstrando que suas comunidades bacterianas são mais semelhantes quando comparado com aquelas presentes em vacas gestantes.

Palavras-chave: bactérias; HPB; SNG; PacBio; illumina.

CANDOTTI, Anne Kemmer Souza. **Vaginal microbiota evaluated by next generation DNA sequencing and reproductive aspects of dairy cows.** 2021. 110 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The vaginal microbiota has been shown to be relevant in the field of bovine reproduction, as changes in its composition can influence fertility. The next generation sequencing technology (NGS), Illumina, has been used as a standard, however, for greater accuracy in the analysis, the long-read technology, PacBio, has been used to improve the sensitivity and specificity of the taxonomic profile, in addition to reduce the risk of false positives. To characterize the vaginal microbiota of dairy cows by NGS and relate it to reproductive aspects, two studies were developed. In both, after NGS, the relative abundance of bacteria was analyzed, and the Alpha and Beta diversity indices were calculated. The first study identified the vaginal microbiota of black and white Dutch cows (HPB; $n = 13$) by sequencing long DNA reads (PacBio sequencing) and compared the data with the conventional technique of short readings (Illumina sequencing). This is one of the first studies to look for species-level readings on bacteria in the vaginal environment of cows. Through the PacBio platform, 366,509 readings and 631,586 readings were obtained by Illumina. It was possible to identify 27 versus 28 phyla and 677 versus 662 genera, in sequencing by PacBio and Illumina, respectively. Furthermore, 677 species were identified by PacBio. Alpha diversity showed a strong correlation ($r = 0.758$), significantly ($p = 0.003$), between the number of species (PacBio) and genera (Illumina) considering the different techniques. The second study aimed to investigate the vaginal microbiota in pregnant and non-pregnant cows using the PacBio sequencing platform. For this study, vaginal swabs were collected from dairy cows ($n = 13$), of which 5 became pregnant (PG) and 8 remained non-pregnant (NP) after artificial insemination performed after the identification of natural heat in these females. 366,509 bacterial readings were obtained, being grouped into 27 phyla and 677 genera. The most abundant phyla in all samples evaluated were Firmicutes (58%) and Bacteroidetes (32%). In the beta diversity analysis, a difference was observed comparing the bacterial communities of the PG ($p = 0.004$) and NP ($p = 0.011$) groups. Furthermore, there was a clear grouping of cows that remained NP, demonstrating that their bacterial communities are more similar when compared to those present in PG cows.

Keywords: bacteria, holstein, NGS, pacbio, illumina.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO A

- Figura 1** – Abundância relativa das 15 espécies de bactérias predominantes na microbiota vaginal de vacas HPB, identificadas pela plataforma PacBio 62
- Figura 2** – Diagrama de Venn representando número de filós únicos e compartilhados entre as tecnologias de SNG PacBio e Illumina..... 65
- Figura 3** – Diagrama de Venn representando número de gêneros únicos e compartilhados entre as tecnologias de SNG PacBio e Illumina..... 66
- Figura 4** – Abundância relativa comparando os cinco filós de bactérias predominantes identificadas na microbiota vaginal vacas HPB, pela plataforma PacBio e Illumina 67
- Figura 5** – Abundância relativa dos 15 gêneros mais predominantes presentes na microbiota vaginal de vacas leiteiras identificadas pela plataforma PacBio 69
- Figura 6** – Abundância relativa dos 15 gêneros mais predominantes presentes na microbiota vaginal de vacas leiteiras identificadas pela plataforma Illumina 70
- Figura 7** – Esquema representando um exemplo de classificação taxonômica comparando dados obtidos pela plataforma PacBio e Illumina..... 78

ARTIGO B

- Figura 1** – Linha do tempo demonstrando a metodologia utilizada 90
- Figura 2** – Comparação dos filós mais abundantes entre vacas leiteiras gestantes e não gestantes presentes na microbiota vaginal 93
- Figura 3** – Comparação dos gêneros mais abundantes entre vacas leiteiras gestantes e não gestantes presentes na microbiota vaginal..... 94
- Figura 4** – PCoA Brady-Curtis comparando a estrutura de cada comunidade presente na vagina de vacas gestantes (azul) e não gestantes (vermelho); ($p=0,004$) 98

Figura 5 – PCoA Jaccard comparando a composição das comunidades bacterianas presente na vagina de vacas gestantes (azul) e não gestantes (vermelho); (p=0,011) 99

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1** – Taxonomia das 15 espécies de bactérias mais abundantes na microbiota vaginal de vacas leiteiras da alta produção identificadas pela plataforma PacBio 63
- Tabela 2** – Comparação das médias dos cinco filos mais abundantes encontrados na vagina de vacas leiteiras pelas plataformas PacBio e Illumina..... 68
- Tabela 3** – Porcentagem de táxons não classificados pelas plataformas PacBio e Illumina..... 71
- Tabela 4** – Índice de alfa diversidade calculado por animal para a metodologia do PacBio 72
- Tabela 5** – Índice de alfa diversidade calculado por animal para a metodologia do Illumina 73
- Tabela 6** – Correlação e valor de p ($\leq 0,005$) dos índices de alfa diversidade presentes na microbiota vaginal de vacas leiteiras comparando as técnicas de sequenciamento PacBio e Illumina..... 73
- Tabela 7** – Médias, Desvio Padrão e p-valor ($\leq 0,005$; teste igualdade de variância) dos índices de alfa diversidade presentes na microbiota vaginal de vacas leiteiras comparando as técnicas de sequenciamento PacBio e Illumina 74

ARTIGO B

- Tabela 1** – Comparação da abundância relativa dos filos presentes na microbiota vaginal de vacas leiteiras gestantes e não gestantes..... 95
- Tabela 2** – Índice de alfa diversidade presente na microbiota vaginal de vacas leiteiras que ficaram gestantes ou permaneceram não gestantes após a inseminação artificial..... 96
- Tabela 3** – Média \pm Desvio Padrão do índice de alfa diversidade presente na microbiota vaginal de vacas leiteiras que ficaram gestantes ou permaneceram não gestantes após a inseminação artificial 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCOM	Análise de Composições de Microbiomas
ASV	Variantes de Sequência de <i>Amplicon</i>
CBT	Carga Bacteriana Total
CCS	Leituras de Consenso Circular (Técnica do PacBio)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais Institucional
DADA2	<i>Divisive Amplicon Denoising Algorithm</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
GE	Grupo vacas Gestantes
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HPB	Vacas da raça Holandês Preto e Branco
IATF	Inseminação Artificial Em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NG	Grupo de vacas Não Gestantes
OTU	Unidades Taxonômicas Operacionais
PacBio	<i>Pacific Biosciences</i>
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
REPROA	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico Ribossômico
SNG	Sequenciamento de Nova Geração
UEL	Universidade Estadual de Londrina
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
VB	Vaginose Bacteriana

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	COMPREENDENDO A MICROBIOTA	17
2.2	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO E ESTUDO DO MICROBIOMA.....	18
2.3	IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA	23
2.4	MICROBIOTA VAGINAL DE BOVINOS	26
2.4.1	Microbiota Normal	26
2.4.2	Microbiota e Hormônios	29
2.4.3	Microbiota e Distúrbios Reprodutivos.....	30
	REFERÊNCIAS.....	34
3	HIPÓTESE	51
4	OBJETIVOS	52
4.1	OBJETIVO GERAL.....	52
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
5	ARTIGO A – INVESTIGAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL DE VACAS LEITEIRAS COM IDENTIFICAÇÃO EM NÍVEL DE ESPÉCIE E COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DE LEITURAS CURTAS (Illumina) E LONGAS (PacBio)	53
	RESUMO	53
	ABSTRACT.....	54
	INTRODUÇÃO.....	55
	MATERIAL E MÉTODOS	56
	Declaração Comitê de Ética	56
	Animais	57
	Manejo reprodutivo.....	57
	Colheita de amostras e extração do DNA	57
	Amplificação de DNA por PCR.....	58

	Sequenciamento de Nova Geração	58
	Bioinformática.....	59
	Análise Estatística	60
	RESULTADOS	61
	DISCUSSÃO.....	74
	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	79
6	ARTIGO B – COMPARAR A MICROBIOTA VAGINAL DE VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO QUE SE TORNARAM GESTANTES OU NÃO, APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, PARA ESTABELECEM POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ENTRE COMUNIDADES BACTERIANAS E O STATUS GESTACIONAL	85
	RESUMO	85
	ABSTRACT.....	86
	INTRODUÇÃO	87
	MATERIAL E MÉTODOS	88
	Animais e Colheita de amostras.....	89
	Processamento do DNA.....	91
	Sequenciamento de Nova Geração e Bioinformática	91
	Análise Estatística	92
	RESULTADOS	92
	DISCUSSÃO.....	100
	CONCLUSÃO.....	103
	REFERÊNCIAS.....	104
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	109
	ANEXOS	110
	ANEXO A – Certificado Emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL).....	110

1 1 INTRODUÇÃO

2 A pecuária leiteira representa uma das atividades mais tradicionais do
3 agronegócio nacional e internacional, apresentando importância no cenário
4 socioeconômico. A cadeia produtiva do leite no Brasil é responsável por movimentar
5 mais de R\$ 80 bilhões por ano (RENTERO, 2020), além de englobar uma função
6 social ao gerar milhares de empregos diretos e indiretos. Segundo o IBGE, em 2018
7 foram produzidos 33,8 bilhões de litros de leite no Brasil e por este produto ser um
8 dos alimentos mais completos, foi registrado o crescimento de 139% na produção
9 brasileira entre 1990 e 2019.

10 O leite é considerado um dos produtos mais importantes da dieta humana e
11 está presente na alimentação de aproximadamente 80% da população. Além disso, o
12 leite é um dos 13 itens que compõem a cesta básica brasileira, beneficiando 91,6%
13 dos lares (SIQUEIRA e RAMALHO, 2020).

14 Apesar do significativo crescimento na produção leiteira, o mercado consumidor
15 está cada vez mais exigente. As plataformas de tendências de mercado (*Innova
16 Consumer Survey*) afirmam que seis de cada 10 consumidores no mundo buscam
17 alimentos e bebidas cuja finalidade é aumentar a imunidade, visto que a preocupação
18 com a saúde se intensificou na pandemia da Covid 19. O fortalecimento do sistema
19 imunológico e a perda de peso são cada vez mais determinantes na hora do
20 consumidor escolher produtos lácteos (SIQUEIRA, 2020). Ademais, a busca por
21 informações quanto a segurança alimentar e rastreabilidade de todas as etapas da
22 cadeia de produção do leite são corriqueiras (NEIVA, 2021).

23 Neste sentido, os produtores enfrentam o desafio de trabalhar para atender a
24 demanda de produção, bem como, suprir as exigências de qualidade impostas pelo
25 consumidor e conciliar com as reivindicações por bem-estar animal e sustentabilidade
26 ambiental. Além de todos os aspectos citados anteriormente, a prevenção de doenças
27 em bovinos é essencial para melhorar a produtividade do rebanho, pois os distúrbios
28 reprodutivos podem levar a repetição de cio, retenção de placenta, metrite e
29 endometrite, acarretando importantes perdas econômicas no sistema de produção de
30 gado leiteiro incluindo o aumento da taxa de mortalidade do rebanho (NADER-
31 MACÍAS et al., 2008).

32

33

1 O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) projeta que o
2 mundo deve aumentar a produção de alimentos para atender à crescente demanda
3 até 2026/2027. Atualmente o Brasil assume o papel de quarto maior produtor
4 comercial de leite, e ainda tem a capacidade de expandir em 41% a produção neste
5 período (USDA, 2017). Contudo apesar da cadeia produtiva do leite ter passado por
6 importantes transformações nas últimas décadas, a alta produção no Brasil ainda é
7 reflexo da grande quantidade de animais em ordenha e não determinada pela
8 produtividade do rebanho.

9 Para que o Brasil aumente a produção de leite por animal, há uma expectativa
10 de tornar as matrizes cada vez mais eficientes. À vista disso, o desempenho
11 reprodutivo é essencial para a produção do leite, uma vez que, para bovinos, cada
12 ciclo de lactação começa a partir da prenhez. Assim, é necessário a incorporação de
13 técnicas reprodutivas que permitam potencializar os recursos existentes, ou seja,
14 criar mecanismos para aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho.

15 Neste contexto, a microbiota vaginal tem demonstrado relevância no âmbito da
16 reprodução de bovinos pois alterações em sua composição podem influenciar a
17 fertilidade (GREEN; ZAREK; CATHERINO, 2015). Os microrganismos são capazes
18 de colonizar quase todos os componentes do corpo em uma relação simbiótica,
19 composta principalmente por populações bacterianas específicas de acordo com
20 ambiente, idade, sexo, alimentação, escore de condição corporal e fase do ciclo estral
21 (MOR et al., 2015). Quando ocorre o desequilíbrio dessas comunidades, infertilidade,
22 infecções, alterações funcionais e outros transtornos debilitantes podem ser
23 desencadeados (BICALHO et al., 2017).

24 Embora vários distúrbios reprodutivos comuns em animais envolvam infecção
25 bacteriana, a caracterização da microbiota vaginal saudável de bovinos ainda está em
26 processo de estudo. É importante considerar que o rastreamento das comunidades
27 bacterianas específicas permite a identificação de perfis de doenças que podem ser
28 utilizados como biomarcadores ou ferramentas de diagnóstico para previsão e
29 prevenção de doenças influenciadas pelo desequilíbrio dessas comunidades
30 (PUTIGNANI et al., 2016).

31 Mesmo quando os mecanismos das doenças parecem incompreendidos os
32 microrganismos têm sido vistos como um importante fator de influência e/ou causa.
33 Desta forma, a compreensão da microbiota vaginal é benéfica principalmente para a
34 saúde reprodutiva de matrizes que vem apresentando problemas com causas

1 desconhecidas, em especial a subfertilidade e a infertilidade que não é facilmente
2 quantificada (HAFEZ, 2013). Assim, o desafio atual é garantir a manutenção de
3 comunidades bacterianas benéficas para potencializar a reprodução e controlar as
4 interações dinâmicas entre todos os fatores envolvidos, sejam internos ou externos
5 ao animal.

6 As técnicas de sequenciamento de nova geração (SNG) têm sido utilizadas
7 para a identificação e caracterização de uma microbiota mais diversificada.
8 Tecnologias de curtas leituras do gene 16S rRNA, como o Illumina, e longas leituras
9 do gene, como o PacBio estão cada vez mais acessíveis, possibilitando um
10 entendimento mais profundo quanto as funções e interação de novos microrganismos
11 com o animal e o ambiente.

12 As informações de comunidades bacterianas do trato vaginal de bovinos pelo
13 SNG ainda são pouco exploradas e para compreender melhor o potencial microbiano
14 na reprodução animal, primeiro é necessário conhecer as características das bactérias
15 que estão presentes nas fêmeas híginas e férteis. Ao identificar a comunidade
16 bacteriana relevante para a fertilidade, se torna possível melhorar a reprodução de
17 vacas com dificuldade em se reproduzir, assim como prevenir e tratar distúrbios
18 reprodutivos mesmo antes do aparecimento de sinais clínicos.

19 A modulação do ecossistema microbiano vaginal além de reduzir os
20 indicadores de infecção no trato genital (GENÍS et al., 2017), pode otimizar a eficiência
21 reprodutiva e se tornar cada vez mais essencial para a lucratividade econômica e
22 sustentabilidade do rebanho leiteiro. Portanto, compreender o papel dela sinaliza uma
23 perspectiva de aumento na produção de leite a partir do mesmo número de animais.

24 Este estudo tem como objetivo caracterizar a microbiota vaginal de vacas
25 leiteiras por SNG comparando as técnicas PacBio e Illumina, bem como investigar em
26 nível de espécie a microbiota vaginal de fêmeas que se tornaram ou não gestantes
27 após IA.

1 2 REVISÃO DE LITERATURA

2 2.1 COMPREENDENDO A MICROBIOTA

3 O conjunto de microrganismos que compõe um ecossistema é denominado
4 microbiota, enquanto os microrganismos, seus metabólitos e o seu material genético
5 associado a um ambiente específico podem ser definidos como microbioma. Ambos
6 apresentam uma característica dinâmica, mutável e adaptável (MORGAN;
7 HUTTENHOWER, 2012; WEINSTOCK, 2012; HADRICH, 2018). E embora a
8 microbiota seja predominantemente representada por bactérias, ela é também
9 composta por protozoários, vírus e fungos.

10 Os microrganismos, em específico as bactérias, precisam se manter em
11 equilíbrio com o hospedeiro e as demais populações, favorecendo a simbiose
12 (RODRIGUES et al., 2015). Bactérias comensais tem como função manter a
13 integridade da mucosa e controlar a proliferação de microrganismos patogênicos, seja
14 pela competição por território e alimento, quanto pela produção de enzimas tóxicas a
15 esses patógenos (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012).

16 Uma pequena mudança na composição da comunidade bacteriana pode
17 desencadear o desequilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro, quando há a
18 proliferação desproporcional de agentes patogênicos, tal evento pode ser chamado
19 de disbiose (FECTEAU et al., 2016). De modo geral, fatores como o uso de
20 antibióticos, enfermidades, ambiente e alimentação, podem influenciar na dinâmica da
21 população bacteriana e, conseqüentemente, no funcionamento do microbioma.

22 Estudos sugerem que o corpo humano possui 10 vezes mais microrganismos
23 do que células em sua composição, ou seja, enquanto o genoma humano é composto
24 por 20 mil genes, ao reunir todos os genes presentes em seu microbioma há cerca de
25 2 a 20 milhões destes, indicando uma rica microbiota (SAVAGE, 1977). A
26 determinação do perfil do da microbiota se inicia ao nascimento, logo no primeiro
27 contato do neonato com a microbiota vaginal materna (DOMINGUEZ-BELLO et al.,
28 2010). E embora esta se distribua por todas as áreas do organismo, a maior parte da
29 colonização ocorre no trato gastrointestinal, abrigando mais de 100 trilhões de
30 bactérias (AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY, 2013).

1 Assim, a identificação da microbiota e a influência que esta exerce sobre a
2 fisiologia humana e animal são objetos de pesquisa há muitos anos, sendo que
3 inicialmente o reconhecimento das bactérias era realizado somente por meio do
4 cultivo. Contudo, esta técnica permite o crescimento de aproximadamente apenas 1%
5 das bactérias existentes e subestimam a diversidade da microbiota analisada
6 (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2011).

7 Para superar esta limitação, um recurso tecnológico passou a ser utilizado
8 como uma ferramenta promissora para compreender o microbioma de uma forma
9 mais profunda. Atualmente, por meio do SNG é possível identificar e quantificar os
10 microrganismos de forma precisa e rápida, bem como, avaliar as dinâmicas
11 bacterianas e suas interações com o ambiente (CONSORTIUM, 2012).

12 2.2 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO E ESTUDO DO MICROBIOMA

13 No SNG a análise é realizada pela determinação da sequência de DNA ou RNA
14 sendo capaz de processar grandes quantidades de dados pelo desenvolvimento de
15 *softwares* especializados, na área da bioinformática. Somado a isso, essa tecnologia
16 levou a um aumento no número e diversidade de genes e genomas sequenciados
17 (GOODWIN et al., 2016; MARTÍNEZ-PORCHAS et al., 2016), adquirindo fundamental
18 importância para aquelas espécies que ainda não foram descritas (ECKBURG, 2005).

19 Várias plataformas, como Roche GS20, Roche 454, Nanopore, Applied
20 Biosystems Ion Torrent, Illumina e PacBio, entre outras, foram desenvolvidas e
21 aprimoradas durante a última década (MARTÍNEZ-PORCHAS et al., 2016). Ademais,
22 o gene 16S rRNA é utilizado em sequenciamento bacteriano porque é altamente
23 conservado e dispõe de uma maior quantidade de pares de bases, além de estar
24 presente em todas as bactérias. Logo, este gene permite realizar a diferenciação em
25 escalas taxonômicas com as regiões variáveis ou hiper variáveis (V1 a V9; WOESE;
26 OLSEN, 1993; JOHNSON et al., 2019), assim como, estimar a quantidade de cada
27 bactéria e acompanhar as alterações das mesmas (MORGAN; HUTTENHOWER,
28 2012).

29 Desta forma, cada região ou até primer favorece certos tipos de bactérias,
30 estudos mostram que para estimar com maior confiabilidade a riqueza e a diversidade
31 da amostra, as regiões V4 a V6 são mais recomendadas para a identificação
32 filogenética bacteriana, permitindo também uma melhor resolução nas sequências

1 avaliadas para reconhecer espécies que estão em menor abundância (CAPORASO
2 et al., 2012; YANG; WANG; QIAN, 2016).

3 Neste contexto, a tecnologia Illumina tem sido a mais utilizada em todo mundo
4 por obter alta confiabilidade, sendo responsável por gerar mais de 90% dos dados de
5 sequenciamento conhecidos (ILLUMINA, 2017). Esta tecnologia minimiza o tempo e o
6 custo do sequenciamento por realizar leituras curtas do genoma (75-250 pares de bases
7 por vez) considerando apenas porções menores e específicas do gene 16S rRNA. O
8 Illumina permite alta acurácia na avaliação daquela porção do gene, além de também
9 oferecer suporte a bibliotecas de leitura única e emparelhadas (MORGAN;
10 HUTTENHOWER, 2012; LAMONT 2015; ILLUMINA, 2017). Sua metodologia permite
11 a identificação de bases únicas à medida que são introduzidas nas fitas de DNA, por
12 meio de sequenciamento por síntese e terminadores de corante fluorescentes
13 reversíveis (ILLUMINA, 2012; BURK e DARLING, 2016; HEATHER e CHAIN, 2016).

14 Por outro lado, as plataformas de SNG que utilizam sequências de leituras curtas
15 tem baixa sensibilidade e especificidade taxonômica comparada a tecnologias que
16 sequenciam o comprimento total do DNA. Ou seja, o sequenciamento de amplicon curto
17 é incapaz de fornecer identificação precisa em nível de gênero ou espécie (MARTINEZ-
18 PORCHAS et al., 2016). Apesar do uso de leituras curtas ainda ser a estratégia mais
19 viável economicamente, as plataformas de SNG destinadas à geração de comprimentos
20 de leitura longas tem contribuído para o estudo da diversidade microbiana de uma
21 perspectiva mais significativa (HE et al., 2020). Desta forma, é de extrema relevância
22 avaliar a concordância entre os resultados do sequenciamento de curta e longa leitura e
23 a quantidade de informações que são subestimadas ao utilizar sequências curtas em
24 vez do gene 16S rRNA completo (MARTÍNEZ-PORCHAS et al., 2016; QUAN et al.,
25 2019; OBERLE et al., 2021).

26 A plataforma PacBio é uma tecnologia que produz leituras longas e, portanto, de
27 alta fidelidade de genes 16S rRNA completos (15000pb), melhorando a sensibilidade e
28 especificidade do perfil taxonômico, além de reduzir o risco de falsos positivos em
29 leituras classificadas de forma errada (LI et al., 2018; HE et al., 2020). Somado a isso, o
30 sequenciamento de leitura longa foi potencialmente favorável na redução do risco de
31 contaminação para perfis metagenômicos de amostras de baixa biomassa microbiana.
32 Para corroborar com o avanço do SNG é importante otimizar a comparabilidade de
33 todos os dados, principalmente em nível de espécie, e desenvolver procedimentos
34 operacionais com parâmetros específicos para amostras comensais ou patogênicas

1 usando os metadados com a padronização de abordagens experimentais e
2 computacionais.

3 Em suma, ao comparar sequenciamentos com leituras de genoma curta ou longa,
4 a primeira tem uma maior cobertura de leitura pelo DNA estar fragmentado, sendo mais
5 eficiente na produção de *amplicons*, além dos dados serem gerados mais facilmente,
6 por outro lado a segunda, fornece informações taxonômicas superiores e mais precisas
7 (HE et al., 2020). De qualquer forma, ambas metodologias de SNG dependem da
8 bioinformática e da biblioteca de dados personalizada para auxiliar na análise e
9 interpretação dos dados obtidos (KULSKI, 2016).

10 O entendimento das informações sobre as comunidades bacterianas
11 identificadas pelo SNG apresenta alta complexidade e variabilidade, sendo que a falta
12 de padrões e protocolos para a comparação de resultados em nível global um fator
13 limitante. Em cada fase do processo, desde o ambiente laboratorial até os kits de
14 extração e amplificação de DNA, pode haver importantes alterações nos resultados
15 da análise de microbioma, especialmente em amostras de baixa biomassa (GOFFAU
16 et al., 2018).

17 A limitação de muitas técnicas de sequenciamento é que estas não chegam ao
18 nível de espécie, sendo impraticável comparar com exatidão o genoma identificado
19 por ter inserções de base do DNA erradas durante o processo, além de não contar
20 com uma boa resolução (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012). Outro obstáculo em
21 grande parte dos SNG é o alto custo por amostra e a necessidade de profissionais
22 com treinamento especializado para analisar os dados (KULSKI, 2016). Por isso,
23 pode-se observar que ainda há inúmeros microrganismos que são desconhecidos ou
24 que não possuem mapeamento genético (ZIEMER, 2014).

25 Outro desafio encontrado em estudos com SNG, é a incapacidade de os
26 bancos de dados utilizados reconhecerem o material genético identificado, seja pela
27 desatualização das bibliotecas ou pela dificuldade na detecção da cepa pela distância
28 que os novos genes têm das espécies já conhecidas (WEINGART et al. 2009). A
29 precisão da identificação das espécies usando o banco de dados também requer que
30 eles contenham as taxonomias corretas.

31 O registro de bactérias existentes em um banco de dado é de domínio público
32 e pode não ser atualizado conforme a nomenclatura é refinada ao longo do tempo, de
33 modo que espécies intimamente relacionadas, descritas em momentos diferentes
34 podem, às vezes, receber taxonomias diferentes com base nas melhores práticas na

1 publicação (COLSTON et al., 2014; GRAF et al., 2021). Ou seja, os genomas
2 identificados de forma única podem estar duplicados por serem registrados com
3 nomes ou números de acesso diferentes, subestimando o número de bactérias
4 presentes na amostra.

5 Para reduzir as limitações de mapeamento, as sequências analisadas, podem
6 ser comparadas não apenas aos genomas de referência, mas também entre si para
7 determinar e verificar se a amostra contém novos táxons que são diferentes dos
8 encontrados em outras amostras (GRAF et al., 2021). *Softwares*, como o DADA2
9 (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm*) tem sido desenvolvidos para corrigir os
10 possíveis erros de leitura e reconhecer cepas com genes exclusivos. Ele também
11 aprimora o estudo de comunidades microbianas, permitindo que os pesquisadores
12 reconstruam com precisão as comunidades sequenciadas em uma resolução mais
13 alta (CALLAHAN et al., 2019).

14 Desta forma, um importante fator que não pode ser ignorado é que a
15 identificação de genes na amostra não infere que os microrganismos são parte
16 consistente da microbiota, pois eles podem não estar mais viáveis ou só ter deixado
17 o seu material genético na amostra analisada, mas não estar mais presente (COSTA
18 e WESSE, 2019). Além disso, o fato da maioria das espécies ter abundância relativa
19 baixa, não significa que tem uma influência menor sobre o organismo do hospedeiro.
20 Já foi relatado que comunidades bacterianas intestinais pouco abundantes continuam
21 um conjunto de genes cuja expressão realizava processos metabólicos importantes
22 para o sistema microbiano geral, como potencial ação de desencadear atividades de
23 comunidades mais dominantes (BENJAMINO et al., 2018). Ou seja, táxons com baixa
24 abundância ou raros podem desempenhar um papel importante na microbiota vaginal
25 de vacas leiteiras quanto a reprodução, mesmo que permaneçam desconhecidos.

26 Depois do sequenciamento é necessário realizar a organização dos dados, a
27 partir da remoção e correção dos possíveis erros de leitura realizados pela
28 bioinformática, seguido pelo agrupamento em Unidades Taxonômicas Operacionais
29 (OTUs) dos genes que possuem sequências com mais de 97% de semelhança
30 (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012; MYSARA et al., 2017; EDGAR, 2017; COSTA e
31 WESSE, 2019; TORTELLI et al., 2021). Para a identificação taxonômica, é utilizado o
32 método baseado em comparação, a qual são verificados as OTUs com informações
33 de banco de dados globais que possuem o registro dos genomas de referência.

1 A taxonomia é o processo pelo qual os microrganismos são classificados
2 hierarquicamente segundo suas características, nos diferentes níveis taxonômicos:
3 Domínio, Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie. E quando essa
4 classificação não é específica pode ser utilizado o termo táxon. A população
5 bacteriana refere-se a todos os indivíduos pertencentes ao mesmo táxon,
6 conseqüentemente, duas ou mais populações presentes no mesmo ambiente
7 compõem uma comunidade (COSTA e WESSE, 2019).

8 Ademais, a microbiota pode ser avaliada quanto a alfa e beta diversidade,
9 sendo que a primeira se refere à diversidade dentro de uma comunidade, enquanto a
10 segunda trata-se da diversidade entre as comunidades. A alfa diversidade, realizada
11 por cálculos matemáticos, considera a presença ou ausência das bactérias,
12 verificando de forma qualitativa a amostra. Logo, pode ser descrita pelos índices de
13 riqueza, igualdade e diversidade (KOZICH et al., 2013).

14 A riqueza de uma população é dada pelo número de espécies que ela possui,
15 já a igualdade é avaliada pela abundância de semelhança nas diferentes espécies
16 dentro da população, logo a diversidade é uma estimativa da riqueza e a igualdade de
17 diferentes espécies de uma população bacteriana. Assim, podemos dizer que quando
18 há muitas espécies com semelhança entre elas a comunidade em questão apresenta
19 alta diversidade (WEINSTOCK, 2012; COSTA e WESSE, 2019).

20 Por outro lado, a beta diversidade é mais específica que a alfa diversidade, visto
21 que ela considera quais microrganismos aumentam ou diminuem dentro das
22 comunidades, sendo portanto uma avaliação quantitativa (MORGAN;
23 HUTTENHOWER, 2012, 2014). Esta análise se faz importante porque duas amostras
24 que apresentam riquezas semelhantes podem ter diferentes composições. Ao verificar
25 a similaridade entre as comunidades conforme o número de espécies e a presença
26 ou ausência das populações bacterianas, temos uma análise de composição para
27 determinar a abundância relativa de cada microrganismo na amostra (LOZUPONE e
28 KNIGHT, 2009).

29 Neste trabalho foram utilizados dois índices para avaliar a composição da
30 comunidade bacteriana, o índice de Jaccard, mais frequentemente utilizado, e o índice
31 de Bray-Curtis. O primeiro leva em consideração qual bactéria está presente,
32 enquanto o segundo avalia a quantidade da mesma na comunidade e ambos são
33 demonstrados por meio de gráficos (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2006). Neste

1 contexto, muitos estudos estão sendo elaborados com o intuito de conhecer
2 detalhadamente a dinâmica da comunidade bacteriana de vacas leiteiras híbridas e
3 suas inter-relações com os fatores externos como fase do ciclo estral, ambiente e
4 alimentação (WANG et al., 2016;2018; BICALHO et al., 2017; GALVÃO et al., 2018;
5 MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2019; QUEREDA et al., 2020; QUADROS et al.,
6 2020).

7 2.3 IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA

8 O microbioma tem se mostrado fundamental para a saúde de todo o corpo, seja
9 animal ou humano. É cada vez mais conhecido que ele pode alterar o estado de saúde
10 do indivíduo ou estar relacionado a uma série de doenças, incluindo as reprodutivas.
11 Mesmo quando os mecanismos das doenças parecem incompreendidos os
12 microrganismos têm sido vistos como um importante fator de influência e/ou causa.

13 Por exemplo, no microbioma vaginal humano a predominância de *Lactobacillus*
14 é sinal de saúde reprodutiva, este gênero e seus principais metabólitos permitem a
15 homeostase vaginal da mulher ao manter o ambiente ácido (pH <4,5) com o objetivo
16 de protegê-lo da infecção por patógenos (DONATI et al., 2010; RAVEL et al., 2011;
17 O'HALAN et al., 2013).

18 É por meio da produção de ácido lático que os *Lactobacillus* diminuem o pH do
19 ambiente vaginal e protegem a vagina contra invasões e infecções por patógenos
20 oportunistas. Além disso, muitas dessas bactérias também produzem peróxido de
21 hidrogênio, bacteriocinas, glicogênio e glicerol que asseguram essa proteção e sua
22 sobrevivência e habitação no trato reprodutivo (SINGER et al., 2019). Ademais,
23 estudos mostram que o *Lactobacillus* vaginal podem apresentar correlação positiva
24 com a taxa de gravidez (FU et al., 2020) e estão com abundância reduzida em
25 mulheres que apresentam repetidas falhas de engravidar (SINGER et al., 2019).

26 Romero e colaboradores (2014) caracterizaram a estrutura da comunidade
27 microbiana presente na vagina de mulheres grávidas e constataram que ao longo da
28 gestação há dominância de *Lactobacillus spp.*, sugerindo que esta bactéria está
29 relacionada a estabilidade da microbiota nesta fase e prevenção de infecções
30 ascendentes que estão ligadas ao parto prematuro. Ainda, outro estudo demonstrou
31 que a menor abundância de *Lactobacillus* em mulheres grávidas está associada a
32 abortos tardios ou nascimentos prematuros (FREITAS et al., 2018).

1 Em relação a eficiência dos tratamentos de fecundação *in vitro* em mulheres,
2 uma meta-análise apontou que as pacientes que apresentaram microbiota vaginal
3 anormal tiveram aproximadamente 1,4 vezes menos probabilidade de engravidar após
4 o procedimento, quando comparadas às mulheres com microbiota normal,
5 evidenciando uma forte correlação da microbiota vaginal desequilibrada com a
6 gravidez precoce ou falha da fecundação *in vitro* (SINGER et al., 2019).

7 Em humanos, a anormalidade da microbiota é caracterizada pelo aumento da
8 diversidade bacteriana e pode estar associado a uma disbiose, como a vaginose
9 bacteriana (VB). Este é o distúrbio vaginal mais comum e afeta de 10 a 50% das
10 mulheres em todo o mundo (SOBEL, 2000; KOUMANS et al., 2007; VERSTRAELEN
11 et al., 2009; LI et al., 2012), somado a isso, cerca de 20% das mulheres grávidas
12 apresentam diagnóstico positivo para VB (SINGER et al., 2019).

13 A VB ocorre pela interrupção do equilíbrio vaginal e o crescimento excessivo
14 de uma bactéria anaeróbica tipicamente não-*Lactobacillus* e patogênica. Em uma
15 população de aproximadamente 1200 mulheres, um estudo relacionou essa patologia
16 bacteriana com a fertilidade e observou a maior prevalência da doença em mulheres
17 com infertilidade (45,5%), comparada a mulheres férteis (15,4%) (SALAH et al., 2013).
18 A VB também pode aumentar em até duas vezes o risco de aborto espontâneo e parto
19 prematuro em mulheres grávidas quando comparado àquelas com microbiota vaginal
20 saudável (LEITICHH et al., 2007; DIGIULIO et al., 2015; KINDINGER et al., 2016;
21 SINGER et al., 2019).

22 Ainda, na ginecologia a VB está cada vez mais associada a resultados
23 adversos, como inflamação pélvica, sepse pós-aborto, infecções vaginais pós-
24 hysterectomia e aquisição de doenças sexualmente transmissíveis como gonorreia,
25 clamidiose, tricomoníase e aids (EASTMENT e MCCLELLAND, 2018; KITAYA et al.,
26 2019). Dada a importância potencial dos *Lactobacillus* vaginais na redução dos riscos
27 de distúrbios reprodutivos um fato interessante é que em outras espécies (bovinos,
28 ovinos e primatas não humanos), os *Lactobacillus* são encontrados em pequenas
29 quantidades e não assumem tamanha relevância quanto em humanos (RAVEL et al.,
30 2011; SWARTZ et al., 2014; YILDIRIM et al., 2014).

31 Outro assunto de extrema relevância nesta área é como o microbioma materno
32 tem forte influência no desenvolvimento do sistema imunológico do neonato (DEBLEY
33 et al., 2005; CARDWELL et al., 2008; LIZUMI et al., 2017). Estudos demonstram que
34 há diferença na microbiota inicial de recém-nascidos com parto vaginal e parto

1 cesárea e que esta exerce um impacto a saúde futura do mesmo (DOMINGUEZ-
2 BELLO et al., 2010). Os bebês de parto vaginal são naturalmente expostos a
3 microbiota presente na vagina da mãe durante o parto (predomínio de *Lactobacillus*),
4 reduzindo a capacidade de colonização dos patógenos. Já bebês nascidos por
5 cesariana tem uma microbiota cutânea mais semelhante à pele da mãe
6 (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*), que é transmitida pela
7 equipe do hospital com que o bebê teve contato e pode justificar aumento da
8 suscetibilidade a bactérias patogênicas (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010).

9 Baseado nesta informação, há uma indicação de que a primeira colonização
10 natural de bactérias em todo o corpo do neonato ocorre de forma vertical (ARRIETA
11 et al., 2014). Após o nascimento, o indivíduo adquire pelo ambiente e pelo convívio
12 com pessoas o microbioma secundário, sendo este ainda fortemente influenciado pelo
13 primário, a qual controlará a composição de bactérias futuras (DOMINGUEZ-BELLO
14 et al., 2011).

15 Um estudo demonstrou que aos dois meses de idade, o número de OTUs
16 mantidas em bebês nascidos de parto normal foi maior quando comparado aos bebês
17 nascidos por cesariana (STEWART et al., 2017). Contudo, independentemente do
18 modo de transmissão, a colonização da microbiota do neonato é homogênea em todos
19 os habitats do corpo. Sendo assim, grande é a importância de ocorrer a colonização
20 de comunidades bacterianas que impactam positivamente o desenvolvimento
21 neonatal (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010).

22 Neste sentido, visto que o período de aquisição da microbiota coincide com o
23 desenvolvimento do sistema imunológico de uma criança, as bactérias transmitidas
24 ao bebê no início da vida são determinantes para proporcionar uma resposta imune
25 adequada (ZEISSIG et al., 2014; AGACE e MCCOY, 2017). Foi demonstrado que
26 mesmo pequenas mudanças ambientais são capazes de modular a composição do
27 microbioma pulmonar no início da vida, enquanto os adultos mostram maior resiliência
28 às variações ambientais (KOSTRIC et al., 2018).

29 Além disso, outros estudos sugerem que as alterações no estágio de
30 desenvolvimento inicial da microbiota intestinal em bebês podem influenciar o
31 processo de maturação do sistema imunológico e predispor à doença celíaca
32 (OLIVARES et al., 2018). Então, após o primeiro ano de vida o microbioma atinge uma
33 estrutura de comunidade estável que é mais resistente a perturbações.

34 Muito tem sido descrito sobre as comunidades bacterianas intestinais e suas

1 interações com humanos, animais e a saúde no geral (HADRICH, 2018; FLANDROY
2 et al., 2018). Visto que a disbiose ou as alterações no microbioma podem aumentar a
3 permeabilidade intestinal, inflamação e formação de autoanticorpos (SEITZ et al.,
4 2019).

5 Problemas de imunidade (KIM e SHIN, 2018), doenças autoimunes
6 (imunomediadas) (KARLSSON et al., 2014), doenças neurodegenerativas (HARACH
7 et al., 2017), doenças respiratórias associadas a alergias e asma (CAIT et al., 2019,
8 CARR et al., 2019; PERDIJK e MARSLAND 2019; STEPHEN-VICTOR e CHATILA,
9 2019), além da obesidade e diabetes (TURNBAUGH et al., 2006; YASSOUR et al.,
10 2016; ILHAN et al., 2017; VALDES et al., 2018; DREYER e LIEB, 2018),
11 principalmente em humanos, tem sido relatados como resposta ao desequilíbrio da
12 microbiota intestinal. Ainda, a diversidade reduzida do microbioma intestinal pode
13 estar associada a sintomas depressivos, ansiedade e transtorno alimentar (SEITZ et
14 al., 2019).

15 Em bovinos, investigações no sentido de aprimorar a eficiência alimentar a
16 partir da manipulação da microbiota intestinal (BIDDLE et al., 2013; MAO et al., 2015;),
17 e inibir doenças respiratórias bovinas (DRB) têm sido desenvolvidas (MAUNSELL et
18 al., 2011; JOHNSTON et al., 2017). Estas por sua vez, podem influenciar diretamente
19 o conhecimento existente sobre a microbiota vaginal, pois autores demonstram que
20 há uma clara relação entre a microbiota intestinal e a composição de bactérias da
21 vagina (QUADROS et al., 2020).

22 2.4 MICROBIOTA VAGINAL DE BOVINOS

23 2.4.1 Microbiota Normal

24

25 As bactérias presentes na vagina da fêmea interagem continuamente com as
26 células locais levando a uma relação simbiótica. Com o intuito de prevenir a
27 proliferação de microrganismos patogênicos em condições naturais, a vagina bovina
28 é composta por uma mistura dinâmica de bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas
29 e anaeróbias (OTERO et al. 2000). Geralmente, as comunidades bacterianas
30 estudadas são altamente heterogêneas entre os animais, e embora *Lactobacillus spp.*,
31 seja descrito como o gênero mais abundante na microbiota vaginal humana, em
32 bovinos essa bactéria é mais escassa e a sua função é exercida por outros gêneros

1 (SWARTZ et al., 2014).

2 Neste contexto, uma relação mutualística entre o hospedeiro e os
3 microrganismos que habitam a vagina estabelece a primeira linha de defesa contra
4 colonização patogênica na mucosa vaginal (SMITH e RAVEL, 2016; SRINIVASAN et
5 al., 2021). Uma das barreiras imunológicas é a formação de um biofilme por parte das
6 bactérias associada ao muco vaginal que tem a função de aumentar a sobrevivência
7 do microrganismo envolvido e, conseqüentemente, auxiliar na manutenção do
8 ambiente microbiano durante as fases do ciclo estral e a gestação (SWARTZ et al.
9 2014). Além disso, essas bactérias produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e
10 ácidos orgânicos para inibir a infecção pelos principais patógenos durante a fase
11 folicular do ciclo estral (EVA et al., 2014).

12 Quando saudável, a comunidade possui estabilidade, contudo, pode ser
13 influenciada ou afetada por inúmeros fatores tais como ambiente, alimentação, idade,
14 fase do ciclo estral, gestação, manejo, genótipo do animal e resposta imunológica
15 (TURNBAUGH et al. 2006, HUTTENHOWER et al., 2012; LAGUARDIA-
16 NASCIMENTO et al., 2015). Tem sido observado que a variação racial e a área
17 geográfica onde os animais habitam são importantes, pois fazem com que estes
18 apresentem diferenças relevantes na microbiota vaginal dominante (LAMONT et al.
19 2011).

20 Embora a estrutura das comunidades possa diferir entre as populações
21 bacterianas é possível que a saúde vaginal se mantenha, desde que a função benéfica
22 delas continue. Em bovinos, o conhecimento da composição da microbiota vaginal até
23 poucos anos atrás era limitado, uma vez que só havia estudos descritivos qualitativos
24 usando técnicas dependentes de cultura (LAMONT et al. 2011).

25 Os microrganismos mais comumente isolados da vagina de vacas e
26 identificados por cultura foram *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* e
27 *Streptococcus spp.* (AMIN et al., 1996; OTERO et al., 1999; OTERO et al., 2000;
28 ZAMBRANO-NAVA et al., 2011). Contudo, resultados utilizando esta técnica já
29 demonstraram não ser precisos o suficiente para refletir a diversidade microbiana real
30 das amostras.

31 Assim, após o desenvolvimento do SNG, informações inéditas com relação ao
32 perfil das comunidades bacterianas relacionadas à saúde e as doenças reprodutivas
33 foram evidenciadas. Swartz e colaboradores (2014) foram os primeiros a realizarem o
34 sequenciamento do gene RNA ribossômico 16S (rRNA) independente de cultura da

1 microbiota vaginal de vacas e ovelhas. A partir deste estudo, foi observado que havia
2 uma maior diversidade de bactérias no ecossistema vaginal do que o conhecido e foi
3 ressaltada a importância dos microrganismos mais abundantes dentro de cada
4 comunidade.

5 Somado a isso, com a tecnologia do SNG, se tornou possível comparar a
6 microbiota vaginal dessas espécies com as comunidades de outras espécies, como
7 por exemplo humanos, primatas não humanos e pandas (YILDIRIM et al., 2014; YANG
8 et al., 2017; CHEN et al., 2018). Então, foi observado que a microbiota do sistema
9 reprodutivo de bovinos apresenta maior diversidade em comparação com a microbiota
10 vaginal humana (QUEREDA et al., 2020).

11 Apesar da maioria dos dados sobre o microbioma vaginal publicados até o
12 momento serem derivados de mulheres, pesquisas promissoras têm sido feitas com
13 bovinos. Ainda não foi definida uma microbiota padrão, pois sabe-se que esta é
14 influenciada por vários fatores, contudo estudos atuais demonstram que os filos
15 bacterianos mais frequentemente detectados na vagina de bovinos leiteiros são
16 *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2015;
17 NESENGANI et al., 2017; SRINIVASAN et al., 2021).

18 Quereda e colaboradores (2020) observaram que em vacas leiteiras os filos
19 *Tenericutes* (35,6%), *Firmicutes* (25,2%), e *Bacteroidetes* (14,9%) representaram
20 mais de 75% da microbiota vaginal total e os outros filos abundantes como
21 *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Epsilonbacteraeota* e *Patescibacteria*,
22 juntos aos citados acima representaram mais de 96% de bactérias. Ainda neste
23 estudo, *Ureaplasma*, *Histophilus*, *f_Corynebacteriaceae*, *Porphyromonas*,
24 *Mycoplasma*, *Ruminococcaceae* UCG-005, foram os gêneros ou famílias mais
25 abundantes.

26 É importante considerar que as bactérias descritas como abundantes em vacas
27 híidas, como por exemplo *Bacteroides* (28,3%) e *Enterobacteriaceae* (17,8%),
28 podem ter sua abundância relativa alterada em distúrbios reprodutivos (35,8% e
29 18,6%, respectivamente) (RODRIGUES et al., 2015). Assim, se faz necessário
30 entender a flutuação da microbiota vaginal conforme a influência do *status* sanitário e
31 *status* reprodutivo do animal.

32
33
34

1 2.4.2 Microbiota e Hormônios

2

3 A flutuação da população bacteriana vaginal é dependente dos hormônios
4 esteroides circulantes (SRINIVASAN et al., 2021), e a abundância bacteriana vaginal
5 de vacas e ovelhas difere de acordo com o estágio do ciclo estral (OTERO et al., 1999;
6 MANES et al., 2018). As fêmeas bovinas tendem a apresentar uma microbiota
7 bacteriana menos abundante no período do ciclo que é caracterizado pela liberação
8 de progesterona, e o mesmo ocorrendo durante a gestação e após o parto. Com o
9 retorno ao ciclo estral normal, a população microbiana vaginal tende a voltar ao
10 equilíbrio devido ao aumento da população bacteriana (LAGUARDIA-NASCIMENTO
11 et al., 2015).

12 Foi observado que o aumento do filo *Firmicutes* na vagina se deve
13 principalmente a uma diminuição da concentração de progesterona. Em contraste, a
14 abundância relativa do filo *Proteobacteria* foi associada ao aumento deste mesmo
15 hormônio (AULT et al., 2019ab). Adicionalmente, a relação da progesterona com a
16 abundância de bactérias também explica o porquê durante o protocolo de
17 sincronização, que é realizado antes da inseminação artificial em tempo fixo (IATF),
18 há uma diminuição da diversidade bacteriana dentro do útero (AULT et al., 2019a).

19 Por outro lado, há indícios de que o estrógeno diminui a virulência bacteriana e
20 aumenta as taxas de crescimento de bactérias comensais na comunidade, além de
21 estar altamente correlacionado com a alta diversidade bacteriana (LAGUARDIA-
22 NASCIMENTO et al., 2015). Apesar do baixo nível de abundância de *Lactobacillus*
23 *spp.* ao longo do ciclo estral, este foi encontrado em maior quantidade na fase folicular
24 (estro) comparada à fase lútea (diestro) de fêmeas bovinas (QUEREDA et al., 2020).
25 Estes dados corroboram com os estudos em humanos a qual foi relatado que o gênero
26 *Lactobacillus* aumenta sob a influência do estrógeno e ajuda a melhorar a concepção
27 em mulheres (RODRIGUEZ et al. 2011). Neste contexto, foi constatado que vacas
28 primíparas apresentam menor diversidade bacteriana quando comparadas às
29 múltiparas, devido ao tempo de exposição da vagina a bactérias e ao trauma
30 decorrente da passagem do bezerro durante o parto nas múltiparas (HAFEZ, 2003;
31 OLSON et al., 1986).

32 Em mulheres foi descrito que o microbioma vaginal permanece mais estável
33 durante a gravidez (SPEAR et al., 2014; ROMERO et al., 2014) pelo fato de haver um
34 amadurecimento no epitélio vaginal devido ao aumento dos níveis de estrógeno

1 circulante, produzido pela placenta, e estabelecimento de um acúmulo de glicogênio
2 (BOSKEY et al., 2001). Por sua vez, o glicogênio é decomposto pelo hospedeiro α -
3 amilase no epitélio vaginal para produzir produtos que apoiam a colonização de
4 *Lactobacillus spp.*, gênero este bem presente em mulheres grávidas.

5 No trato vaginal de vacas gestantes saudáveis foram identificados em maior
6 predominância os gêneros *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*,
7 *Weissella spp.*, *Enterobacteriaceae*, *E. coli* e bacilos (WANG et al., 2013). Na espécie
8 bovina, o microbioma vaginal de fêmeas gestantes tem sido descrito como diferente
9 daquelas não prenhes, visto que a diversidade da microbiota diminui
10 significativamente durante a fase lútea, uma vez que o trato reprodutivo está se
11 preparando para a gestação (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2015; SRINIVASAN
12 et al., 2021).

13

14 2.4.3 Microbiota e Distúrbios Reprodutivos

15

16 Em vacas, a conformação anatômica do ânus e da vagina faz com que
17 geralmente a vulva seja encontrada coberta de fezes, principalmente em fêmeas que
18 possuem uma vulva horizontal que forma um ângulo maior que 45 graus com o plano
19 vertical. Tal condição, possibilita ainda em fases iniciais da vida a colonização do canal
20 vaginal por microrganismos do sistema digestório (GAUTAM e NAKAO, 2009;
21 LAGUARDIA-NASCIMENTO et al, 2015).

22 Estudos identificaram bactérias pertencentes ao sistema gastrointestinal de
23 bovinos na microbiota vaginal (QUADROS et al., 2020) e há muito se sabe que grande
24 parte dos distúrbios reprodutivos são causados por microrganismos encontrados no
25 material fecal (DOHMEN et al., 1995). Desta forma, o conhecimento das interações
26 entre a microbiota intestinal e o trato reprodutivo é crucial para otimizar a reprodução
27 em vacas leiteiras.

28 A microbiota que predispõe distúrbios reprodutivos pode ser causada pela
29 colonização de microrganismos que não fazem parte da comunidade vaginal normal
30 resultando em crescimento excessivo de uma bactéria patogênica, ou pelo aumento
31 da virulência de um organismo que já é parte constituinte da microbiota vaginal normal.
32 Ou seja, as alterações na composição vaginal não implicam necessariamente em
33 doenças ou resultam em sinais clínicos, mas a patologia ocorre a partir da interação
34 entre a virulência microbiana, a dominância numérica e a resposta imune inata e

1 adaptativa do hospedeiro (SMITH, 1934).

2 Evidências de estudos humanos indicam que a disbiose vaginal aumenta os
3 riscos de distúrbios reprodutivos (SALAH et al., 2013; MOR et al., 2015; EASTMENT
4 e MCCLELLAND, 2018), enquanto a microbiota vaginal saudável aumenta a
5 resistência a qualquer tipo de infecção, uma vez que esta contribui diretamente com
6 o sistema imunológico ao proteger a região contra bactérias patogênicas e auxiliar na
7 regulação dos processos inflamatórios. É importante salientar que se houver uma
8 grande carga bacteriana patogênica na vagina, ela é capaz de contaminar o restante
9 do sistema reprodutor feminino de forma ascendente, podendo inclusive chegar ao
10 ovário e impactar negativamente o desenvolvimento folicular inibindo a resposta da
11 gonadotrofina (FRANASIAK et al., 2016; WANG et al., 2016).

12 Bactérias vaginais que ascendem ao útero podem causar endometrite, visto
13 que estas foram detectadas com maior frequência em animais com endometrite clínica
14 do que em animais sem endometrite (WANG et al., 2016). Neste sentido, a explicação
15 da ocorrência de endometrite pós-parto em quase 90% de vacas (OTERO et al.,
16 2000), é a contaminação do trato reprodutivo por microrganismos encontrados nas
17 fezes das fêmeas bovinas, dada a proximidade do reto com a vagina (WILLIAMS et
18 al., 2005; LEBLANC et al., 2011; LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2015;
19 CLEMMONS et al., 2017). Desta forma, agentes infecciosos identificados na vagina
20 de vacas já foram associados a infertilidade, placentite, aborto, parto prematuro e
21 nascimento de bezerros debilitados (OLSEN e TATUM, 2010; PRITTCARD et al.,
22 2011).

23 Estudos que compararam a microbiota vaginal de vacas saudáveis e vacas com
24 endometrite por SNG observaram que nas fêmeas saudáveis houve dominância por
25 *Lactobacillus sakei subsp.* e *Weissella koreensis*, no entanto, não houve cepas
26 dominantes no grupo com endometrite (WANG et al., 2016). Além disso, filos como
27 *Histophilus* (RODRIGUES et al., 2015), *Ureaplasma* (QUEREDA te al., 2020)
28 *Tenericutes* e *Acidobacteria* (AULT et al., 2019b) foram descritos com maior
29 abundância em vacas que tiveram dificuldade para conceber ou em fêmeas com
30 problemas reprodutivos. Somado a isso, a dominância dos filos *Bacteroidetes* e
31 *Fusobacteria* foram observados na vagina de vacas com metrite (JEON et al., 2015;
32 JEON et al., 2018).

33 Miranda-CasoLuengo e colaboradores (2019), foram os primeiros a comparar
34 o microbioma da vagina com o microbioma uterino dos mesmos bovinos da raça

1 holandês preto e branco (HPB) e apesar da grande diferença, foi verificado que existe
2 uma comunidade em comum nos dois órgãos. Esta similaridade ocorre principalmente
3 no período pós-parto, justificado pela ruptura da compartimentação do sistema
4 reprodutivo durante o nascimento do bezerro resultando na dispersão e mistura da
5 microbiota das duas regiões.

6 O desenvolvimento da endometrite pós-parto está associado a uma
7 diferenciação retardada do microbioma vaginal e uterino no início deste período.
8 Ainda, foi constatado que as comunidades microbianas da vagina e do útero são
9 diferentes entre vacas saudáveis e vacas que desenvolvem endometrite pós-parto. O
10 crescimento bacteriano exagerado no útero após o parto é considerado normal, no
11 entanto as fêmeas que não conseguem controlar estas bactérias dentro de 21 dias
12 apresentam a endometrite (MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2019).

13 Bicalho e colaboradores (2017) investigaram a microbiota vaginal de vacas
14 leiteiras da raça HPB durante o período de transição (-7, 0, 3 e 7 dias do parto) e
15 descreveram, pela técnica de SNG, as diferenças na composição bacteriana e na
16 carga bacteriana total (CBT) relacionadas à doença e fertilidade. A composição da
17 microbiota e o CBT foram associados a fatores de risco peri parturientes conhecidos
18 de doenças uterinas e falha reprodutiva, parto assistido e membranas fetais retidas.
19 Alterações na microbiota vaginal, principalmente após o parto, estão associadas a
20 doenças uterinas em vacas HPB (GALVÃO et al., 2018).

21 Assim como Wang e colaboradores (2016) que avaliaram e caracterizaram a
22 microbiota vaginal de vacas HPB pós-parto saudáveis em relação às vacas pós-parto
23 com endometrite, demonstrando que houve diferença significativa entre a comunidade
24 bacteriana vaginal dos dois grupos. Também sugeriram que a alteração da microbiota
25 vaginal normal pode contribuir para o início da endometrite e que a diversidade
26 bacteriana nessas fêmeas foi significativamente maior do que em vacas saudáveis,
27 uma vez que a estrutura da comunidade microbiana governada por bactérias
28 dominantes foi interrompida e o número de bactérias patogênicas aumentou.

29 Os patógenos mais comuns associados a endometrite são *Escherichia coli*,
30 *Trueperella pyogenes*, *Prevotella melaninogenicus* e *Fusobacterium necrophorum*
31 (WILLIAMS et al., 2007), sendo a *E. coli* a mais prevalente em vacas com metrite
32 durante a primeira semana pós-parto (MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2019). Ainda,
33 bactérias constituintes das famílias *Porphyromonadaceae*, *Fusobacteriaceae* e
34 *Leptotrichiaceae* foram associadas à doença uterina, em um estudo que acompanhou

1 as vacas do parto ao pós-parto, mostrando também que logo na primeira avaliação
2 anterior ao parto, as bactérias sinalizadoras de endometrite já estavam presentes
3 (KNUDSEN et al., 2016).

4 Corroborando com os resultados acima, Wang e colaboradores (2018),
5 descreveram o filo *Firmicutes* como predominante no colo do útero de vacas leiteiras.
6 A diversidade bacteriana cervical diminuiu em vacas com metrite e os gêneros
7 predominantes de bactérias foram *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.

8 Portanto, ao considerar a microbiota do trato genital é possível ampliar a
9 compreensão das falhas reprodutivas, pois uma pequena alteração na composição da
10 comunidade bacteriana pode modificar o equilíbrio de agentes comensais e predispor
11 a uma infecção patogênica (RODRIGUES et al., 2015). Não obstante, outra vertente
12 do estudo da microbiota é identificar as comunidades saudáveis com o intuito de
13 incrementar a eficiência reprodutiva.

REFERÊNCIAS

- 1
2
3 AGACE, W.W.; MCCOY, K.D. Regionalized Development and Maintenance of the
4 Intestinal Adaptive Immune Landscape. *Immunity*, v.46, p.532-548, 2017
5
6 AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY. **Human Microbiome FAQ**, 2013.
7 Disponível online:
8 https://www.asm.org/images/stories/documents/FAQ_Human_Microbiome.pdf
9
10 AMIN, J.D.; ZARIAL, T.; MALGWIR, M. Vaginal aerobic bacterial flora of apparently
11 healthy cattle in various stages of the reproductive cycle in the Sahel region of Nigeria.
12 **Bull Anim Health Prod Afr**, v. 44, p.15–8, 1996.
13
14 ARCHIE, E.A.; THEIS, K.R. Animal behaviour meets microbial ecology. **Anim. Behav.**,
15 v.82, p.425–436, 2011.
16
17 ARRIETA, M.C.; STIEMSMA, L.T.; AMENYOGBE, N.; BROWN, E.M.; FINLAY, B. The
18 intestinal microbiome in early life: health and disease. **Front Immunol**, v. 5, 2014.
19
20 AULT, T.B.; CLEMMONS, B.A.; REESE, S.T.; DANTAS, F.G.; FRANCO, G.A.; SMITH,
21 T.P.L.; et al. Uterine and vaginal bacterial community diversity prior to artificial
22 insemination between pregnant and nonpregnant postpartum cows¹. **J Anim Sci.**,
23 v.97, p.4298–304, 2019b.
24
25 AULT, T.B.; CLEMMONS, B.A.; REESE, S.T.; DANTAS, F.G.; FRANCO, G.A.; SMITH,
26 T.P.L.; et al. Bacterial taxonomic composition of the postpartum cow uterus and vagina
27 prior to artificial insemination. **J Anim Sci.**, v.97, p.4305–4313, 2019a.
28
29 BENJAMINO, J.; LINCOLN, S.; SRIVASTAVA, R.; GRAF, J. Low-abundant bacteria
30 drive compositional changes in the gut microbiota after dietary alteration. **Microbiome**,
31 v.6, p.86, 2018.
32
33 BICALHO, M.L.S.; SANTIN, T.; RODRIGUES, M.X.; MARQUES, C.E.; LIMA, S.F.;
34 BICALHO, R.C. Dynamics of the microbiota found in the vaginas of dairy cows during

- 1 the transition period: Associations with uterine diseases and reproductive outcome.
2 **Journal of Dairy Science**, v.100, n. 4, p.3043-3058, 2017.
- 3
- 4 BIDDLE, A.; STEWART, L.; BLANCHARD, J.; LESCHINE, S. Untangling the Genetic
5 Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiracees and Ruminococcaceae in
6 Diverse Gut Communities. **Diversity**, v.5, p.627-640, 2013.
- 7
- 8 BOSKEY, E.; CONE, R.; WHALEY, K.; MOENCH, T. Origins of vaginal acidity: high d/l
9 lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Hum Reprod**, v.16,
10 p.1809–1813, 2001.
- 11
- 12 BURKE, C.M.; DARLING, A.E. A method for high precision sequencing of near full-
13 length 16S rRNA genes on an Illumina MiSeq. **PeerJ**, v.4, 2016.
- 14
- 15 CAIT, A.; CARDENAS, E.; DIMITRIU, P.A.; AMENYOGBE, N.; DAI, D.; CAIT, J.;
16 SBIHI, H.; STIEMSMA, L.; SUBBARAO, P.; MANDHANE, P.J.; BECKER, A.B.; et al.
17 Reduced genetic potential for butyrate fermentation in the gut microbiome of infants
18 who develop allergic sensitization. **J Allergy Clin Immunol**, v.144, n.6, p.1638-1647,
19 2019.
- 20
- 21 CALLAHAN, B.J.; WONG, J.; HEINER, C.; OH, S.; THERIOT, C.M.; GULATI, A.S.;
22 MCGILL, S.K.; DOUGHERTY, M.K. High-throughput amplicon sequencing of the
23 fulllength 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. **Nucleic Acids Res**, v.47,
24 p.103, 2019.
- 25
- 26 CAPORASO, J.G.; PASZKIEWICZ, K.; FIELD, D.; KNIGHT, R.; GILBERT, J.A. The
27 Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. **ISME Journal**, v.
28 6, n. 6, p. 1089–1093, 2012.
- 29
- 30 CARDWELL, C.R.; STENE, L.C.; JONER, G.; et al. Caesarean section is associated
31 with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of
32 observational studies. **Diabetologia**, v.51, p.726-735, 2008.
- 33
- 34 CARR, T.F.; ALKATIB, R.; KRAFT, M. Microbiome in Mechanisms of Asthma. **Clin**

- 1 **Chest Med**, v.40, p.87–96, 2019.
- 2
- 3 CHEN, D.; LI, C.; FENG, L.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; CHENG, G.; LI, D.; ZHANG, G.;
4 WANG, H.; CHEN, Y.; FENG, M.; WANG, C.; WU, H.; DENG, L.; MING, H.; YANG, X.
5 Analysis of the influence of living environment and age on vaginal fungal microbiome
6 in giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) by high throughput sequencing. **Microbial**
7 **Pathogenesis**, v.115, p. 280–286, 2018.
- 8
- 9 CLEMMONS, B.A.; REESE, S.T.; DANTAS, F.G.; FRANCO, G.A.; SMITH, T.P.L.;
10 ADEYOSOYE, O.I.; et al. Vaginal and uterine bacterial communities in postpartum
11 lactating cows. **Front Microbiol.**, v.8, p.1047, 2017.
- 12
- 13 COLSTON, S.M.; FULLMER, M.S.; BEKA, L.; LAMY, B.; GOGARTEN, J.P.; GRAF, J.
14 Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using
15 *Aeromonas* as a test case. **mBio**, v.5, 2014.
- 16
- 17 CONSORTIUM. A framework for human microbiome research. **Nature**, v. 486, n. 34
18 7402, p. 215–221, 2012.
- 19
- 20 COSTA, M.; WEESE, J.S. Methods and basic concepts for microbiota assessment.
21 **The Veterinary Journal**, v.249, p.10–15, 2019.
- 22
- 23 DEBLEY, J.S.; SMITH, J.M.; REDDING, G.J.; et al. Childhood asthma hospitalization
24 risk after cesarean delivery in former term and premature infants. **Ann Allergy Asthma**
25 **Immunol**, v.94, p.228-233, 2005.
- 26
- 27 DENG, F.; MCCLURE, M.; RORIE, R.; Wang, X.; Chai, J.; Wei, X.; Lai, S.; Zhao, J.
28 The vaginal and fecal microbiomes are related to pregnancy status in beef heifers. **J**
29 **Animal Sci Biotechnol**, v.10, p.92, 2019.
- 30
- 31 DIGIULIO, D.B.; CALLAHAN, B.J.; MCMURDIE, P.J.; COSTELLO, E.K.; LYELL, D.J.;
32 ROBACZEWSKA, A.; et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota
33 during pregnancy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.112, n.35, p.11060–5, 2015.
- 34

- 1 DOHMEN, M.J.W.; LOHUIS, J.A.C.M.; HUSZENICZA, G.; NAGY, P.; GACS, M. The
2 relationship between bacteriological and clinical findings in cows with sub-acute/
3 chronic endometritis. **Theriogenology**, v.43, n.8, p.1379–1388, 1995.
- 4
- 5 DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; BLASER, M.J.; LEY, R.E.; et al. Development of the
6 human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing.
7 **Gastroenterology**, v.140, p. 1713-1719, 2011.
- 8
- 9 DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; COSTELLO, E.K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.;
10 HIDALGO, G.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and
11 structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proc Natl**
12 **Acad Sci U S A**, v.107, p. 11971–11975, 2010.
- 13
- 14 DONATI, L.D.I.; VICO, A.; NUCCI, M.; QUAGLIOZZI, L.; SPAGNUOLO, T.;
15 LABIANCA, A.; et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. **Arch Gynecol**
16 **Obstet**, v. 281, n.4, p.589–600, 2010.
- 17
- 18 DREYER, J.L; LIEBL, A.L. Early colonization of the gut microbiome and its relationship
19 with obesity. **Human Microbiome Journal**, v.10, p.1–5, 2018.
- 20
- 21 EASTMENT, M.C.; MCCLELLAND, R.S. Vaginal microbiota and susceptibility to HIV.
22 **AIDS (London, England)**, v.32, n.6, p.687–698, 2018.
- 23
- 24 ECKBURG, P. B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308,
25 14 n. 5728, p. 1635–1638, 10 jun. 2005.
- 26
- 27 EDGAR, R.C. Accuracy of microbial community diversity estimated by closed- and
28 open-reference OTUs. **PeerJ**, V.5, e3889, 2017.
- 29
- 30 EVA, S.; RADOMRA, N.; SO`NA, G.; IGOR, V.; ANDREA, L. Bovine vaginal lactobacilli
31 and their adherence to mucus in different phases of the estrous cycle. **Afr. J.**
32 **Microbiol. Res.**, v.8, p.3017–3024, 2014.
- 33
- 34 EZENWA, V.O.; GERARDO, N.M.; INOUYE, D.W.; MEDINA, M.; XAVIER, J.B. Animal

- 1 behavior and the microbiome. **Science**, v. 338, p.198–199, 2012.
- 2
- 3 FAIR, T. The Contribution of the Maternal Immune System to the Establishment of
4 Pregnancy in Cattle. **Frontiers in Immunol** **6**, 2015.
- 5
- 6 FECTEAU, M.E.; PITTA, D.W.; VECCHIARELLI, B.; INDUGU, N.; KUMAR, S.;
7 GALLAGHER, S.C.; FYOCK, T.L.; SWEENEY, R.W. Dysbiosis of the fecal microbiota
8 in cattle infected with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. **PLoS ONE**, v.
9 11, n. 8, 2016.
- 10
- 11 FLANDROY, L.; POUTAHIDIS, T.; BERG, G.; CLARKE, G.; DAO, M.C.;
12 DECAESTECKER, E.; et al. The impact of human activities and lifestyles on the
13 interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems. **Sci. Total Environ.**,
14 v.627, p.1018–1038, 2018.
- 15
- 16 FRANASIAK, J.M.; WERNER, M.D.; JUNEAU, C.R.; TAO, X.; LANDIS, J.; ZHAN, Y.;
17 TREFF, N.R.; SCOTT, R.T. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer:
18 next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. **J Assist Reprod Genet**,
19 v.33, p.129 –136, 2016.
- 20
- 21 FREITAS, A.C.; BOCKING, A.; HILL, J.E.; MONEY, D.M.; the VOGUE Research
22 Group. Increased richness and diversity of the vaginal microbiota and spontaneous
23 preterm birth. **Microbiome**, v. 6, p.117, 2018.
- 24
- 25 FU, M.; ZHANG, X.; LIANG, Y.; LIN, S.; QIAN, W.; FAN, S. Alterations in vaginal
26 microbiota and associated metabolome in women with recurrent implantation failure.
27 **mBio**, v.11, n. 3, e03242-19, 2020.
- 28
- 29 GALVÃO, K.N.; HIGGINS, C.H.; ZINICOLA, M.; JEON, S.J.; KORZEC, H.; BICALHO,
30 R.C. Effect of pegbovigrastim administration on the microbiome found in the vagina of
31 cows postpartum. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.4, p.1-13, 2018.
- 32
- 33 GAUTAM, G.; NAKAO, T. Prevalence of urovagina and its effects on reproductive
34 performance in Holstein cows. **Theriogenology**, v.71, n.9, p.1451–1461, 2009.

- 1
2 GENÍS, S.; BACH, À.; ARÍS, A. Effects of intravaginal lactic acid bacteria on bovine
3 endometrium: Implications in uterine health. **Vet Microbiol**, v. 204, p.174–179, 2017
4
- 5 GOODWIN, S.; MCPHERSON, J.D.; MCCOMBIE, W.R. Coming of age: ten years of
6 next-generation sequencing technologies. **Nat.Rev.Genet.**, v.17, p.333–351, 2016.
7
- 8 GRAF, J.; LEDALA, N.; CAIMANO, M.J.; JACKSON, E.; GRATALO, D.; FASULO, D.;
9 DRISCOLL, M.D.; COLEMAN, S.; MATSON, A.P. High-resolution differentiation of
10 enteric bacteria in premature infant fecal microbiomes using a novel rRNA amplicon.
11 **mBio**, v.12, e03656-20, 2021.
12
- 13 GREEN, K.A.; ZAREK, S.M.; CATHERINO, W.H. Gynecologic health and disease in
14 relation to the microbiome of the female reproductive tract. **Fertility and Sterility**, v.
15 104, n. 6, p. 1351–1357, 2015.
16
- 17 HADRICH, D. Microbiome Research Is Becoming the Key to Better Understanding
18 Health and Nutrition. **Front. Genet.**, v. 9, Artigo 212, p. 1-10, 2018.
19 HAFEZ, E.S.E. Pregnancy, pre-physiology natale delivery. In: **Animal reproduction**.
20 **7. Manole**, São Paulo, p. 217–240, 2003.
21
- 22 HARACH, T.; MARUNGRUANG, N.; DUTHILLEUL, N.; CHEATHAM, V.; MC COY,
23 K.D.; FRISONI, G.; et al. Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic
24 mice in the absence of gut microbiota. **Sci. Rep.**, v.7, 41802, 2017.
25
- 26 HE, Q.; KWOK, L.; XI, X.; ZHONG, Z.; MA, T.; XU, H.; MENG, H.; ZHAO, F.; ZHANG,
27 H. The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota
28 than the maternal fecal and vaginal microbiota. **Gut Microbes**, v.12, n.1, 1794266,
29 2020.
30
- 31 HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing
32 DNA. **Genomics**, v.107, n.1, p.1–8, 2016.
33
- 34 HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R.; ABUBUCKER, S.; BADGER, J.H.;

- 1 CHINWALLA, A.T.; et al. Structure, function and diversity of the healthy human
2 microbiome. **Nature**, v.486, p. 207–214, 2012.
- 3
- 4 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018.
- 5
- 6 ILHAN, Z.E.; DIBASE, J.K.; ISERN, N.G.; HOYT, D.W.; MARCUS, A.K.; KANG, D.W.,
7 et al. Distinctive microbiomes and metabolites linked with weight loss after gastric
8 bypass, but not gastric banding. **ISME J.**, v.11, p.2047–2058, 2017.
- 9
- 10 ILLUMINA. An Overview of Publications Featuring Illumina®. **Illumina**, 2012.
- 11
- 12 ILLUMINA. Microbes and Metagenomics in Human Health. **Illumina**, 2017.
- 13
- 14 JEON, S.J.; LIMA, F.S.; VIEIRA-NETO, A.; MACHADO, V.S.; LIMA, S.F.; BICALHO,
15 R.C.; SANTOS, J.E.P; GALVÃO, K.N. Shift of uterine microbiota associated with
16 antibiotic treatment and cure of metritis in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v.214,
17 p.132–139, 2018.
- 18
- 19 JEON, S.J.; VIEIRA-NETO, A.; GOBIKRUSHANTH, M.; DAETZ, R.; MINGOTI, R.D.;
20 PARIZE, A.C.B.; DE FREITAS, S. L.; DA COSTA, A.N.L.; BICALHO, R.C.; LIMA, S.;
21 CASEY JEONG, K.; GALVÃO, K.N. Uterine microbiota progression from calving until
22 establishment of metritis in dairy cows. **Applied and Environmental Microbiology**, v.
23 81, n. 18, p. 6324–6332, 2015.
- 24
- 25 JOHNSON, J.S.; SPAKOWICZ, D.J.; HONG, B.Y.; PETERSEN, L.M.; DEMKOWICZ,
26 P.; CHEN, L.; LEOPOLD, S.R.; HANSON, B.M.; AGRESTA, H.O.; GERSTEIN, M.;
27 SODERGREN, E.; WEINSTOCK, G.M. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for
28 species and strain-level microbiome analysis. **Nature communications**, v.10, p.5029,
29 2019.
- 30
- 31 JOHNSTON, D.; EARLEY, B.; CORMICAN, P.; MURRAY, G.; KENNY, D.A.;
32 WATERS, S.M.; MCGEE, M.; KELLY, A.K.; MCCABLE, M.S. Illumina MiSeq 16S
33 amplicon sequence analysis of bovine respiratory disease associated bacteria in lung
34 and mediastinal lymph node tissue. **BMC Vet Res**, v.13, 2017.

- 1
2 KARLSSON, E.K.; KWIATKOWSKI, D.P.; SABETI, P.C. Natural selection and
3 infectious disease in human populations. **Nat. Rev. Genet.**, v.15, p.379–393, 2014.
4
- 5 KIM, Y.K.; SHIN, C. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Neuropsychiatric Disorders:
6 Pathophysiological Mechanisms and Novel Treatments. **Current**
7 **neuropharmacology**, v.16, n.5, p.559–573, 2018.
8
- 9 KINDINGER, L.; MACINTYRE, D.; LEE, Y.; TEOH, T.G.; BENNETT, P. Identification
10 of vaginal microbial communities associated with specific etiologies of preterm birth.
11 **Reprod Sci**, v. 23, n.1, p.59A–60A, 2016.
12
- 13 KITAYA, K.; NAGAI, Y.; ARAI, W.; SAKURABA, Y.; ISHIKAWA, T. Characterization of
14 Microbiota in Endometrial Fluid and Vaginal Secretions in Infertile Women with
15 Repeated Implantation Failure. **Mediators of inflammation**: 4893437, 2019.
16
- 17 KNUDSEN, L.R.V.; KARSTRUP, C.C.; PEDERSEN, H.G.; ANGEN, O.; AGERHOLM,
18 J.S.; RASMUSSEN, E.L.; et al. An investigation of the microbiota in uterine flush
19 samples and endometrial biopsies from dairy cows during the first 7 weeks postpartum.
20 **Theriogenology**, v.86, p.642–650, 2016.
21
- 22 KOSTRIC, M.; MILGER, K.; KRAUSS-ETSCHMANN, S.; ENGEL, M.;
23 VESTERGAARD, G.; SCHLOTTER, M.; et al. Development of a stable lung microbiome
24 in healthy neonatal mice. **Microb. Ecol.**, v.75, p.529–542, 2018.
25
- 26 KOUMANS, E.H.; STERNBERG, M.; BRUCE, C.; MCQUILLAN, G.; KENDRICK, J.;
27 SUTTON, M.; MARKOWITZ, L.E. The Prevalence of Bacterial Vaginosis in the United
28 States, 2001-2004; Associations With Symptoms, Sexual Behaviors, and Reproductive
29 Health. **Sex Transm Dis**, v.34, p.864–869, 2007.
30
- 31 KOZICH, J.J.; WESTCOTT, S.L.; BAXTER, N.T.; HIGHLANDER, S.K.; SCHLOSS,
32 P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for
33 analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform.
34 **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.17, p.5112-5120, 2013.

- 1
2 KULSKI, J.K. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and
3 “Omic” Applications, Next Generation Sequencing - Advances, Applications and
4 Challenges, **IntechOpen**, 2016. Disponível em:
5 [https://www.intechopen.com/books/next-generationsequencing-advances-](https://www.intechopen.com/books/next-generationsequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-an-overviewof-the-history-tools-and-omic-applications)
6 [applications-and-challenges/next-generation-sequencing-an-overviewof-the-history-](https://www.intechopen.com/books/next-generationsequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-an-overviewof-the-history-tools-and-omic-applications)
7 [tools-and-omic-applications](https://www.intechopen.com/books/next-generationsequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-an-overviewof-the-history-tools-and-omic-applications)
8
- 9 LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; BRANCO, K.M.G.R.; GASPARINI, M.R.;
10 GIANNATTASIO-FERRAZ, S.; LEITE, L.R.; ARAUJO, F.M.G.; et al. Vaginal
11 Microbiome Characterization of Nellore Cattle Using Metagenomic Analysis. **PLoS**
12 **ONE**, v.10, p.11, 2015.
13
- 14 LAMONT, R.; SOBEL, J.; AKINS, R.; HASSAN, S.; CHAIWORAPONGSA, T.;
15 KUSANOVIC, J.; et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract
16 flora using molecular based techniques. **BJOG**, v.118, p.533–549, 2011.
17
- 18 LAMONT, R.F. The Vaginal Microbiome in Health and Disease. **Encyclopedia of**
19 **Metagenomics**, v.654, 2015.
20
- 21 LEBLANC, S.J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in
22 postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v.76, p.1610–1618, 2011.
23
- 24 LECLAIRE, S.; VAN DONGEN, W.F.; VOCCIA, S.; MERKLING, T.; DUCAMP, C.;
25 HATCH, S.A.; BLANCHARD, P.; DANCHIN, E.; WAGNER, R.H. Preen secretions
26 encode information on MHC similarity in certain sex-dyads in a monogamous seabird.
27 **Sci. Rep.**, v. 4, p. 6920, 2014.
28
- 29 LEITICH, H.; KISS, H. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk
30 factors for adverse pregnancy outcome. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 21,
31 p. 375–90, 2007.
32
- 33 LI, J.; MCCORMICK, J.; BOCKING, A.; REID, G. Importance of vaginal microbe in
34 reproductive health. **Reprod Sci**, v. 19, p. 235–42, 2012.

- 1
2 LI, W.; HOU, Q.; WANG, Y.; MA, H.; LIU, Y.; ZHAO, F.; LI, J.; KWOK, L.; YU, J.; SUN,
3 Z.; SUN, T. Analysis of the Gut Microbial Diversity of Dairy Cows During Peak Lactation
4 by PacBio Single-Molecule Real-Time (SMRT) Sequencing. **Current Microbiology**,
5 v.75, p.1316–1323, 2018.
- 6
7 LIZUMI, T.; BATTAGLIA, T.; RUIZ, V.; PEREZ, G.I.P. Gut Microbiome and Antibiotics.
8 **Archives of Medical Research**, v.48, p.727-734, 2017.
- 9 LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R. Species Divergence and the Measurement of Microbial
10 Diversity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 4, p. 557–578, 2009.
- 11
12 MANES, J.; FIORENTINO, M.A.; MARTINO, S.S.; UNGERFELD, R. Changes in the
13 vaginal microbiota in ewes after insertion of intravaginal sponges at different stages of
14 the oestrous cycle. **Livestock Science**, v. 208, p. 55-59, 2018.
- 15
16 MAO, S.; ZHANG, M.; LIU, J.; ZHU, W. Characterising the bacterial microbiota across
17 the gastrointestinal tracts of dairy cattle: Membership and potential function. **Scientific**
18 **Reports**, v. 5, n. April, p. 1–14, 2015.
- 19
20 MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; VILLALPANDO-CANCHOLA, E.; VARGAS-ALBORES, F.
21 Significant loss of sensitivity and specificity in the taxonomic classification occurs when
22 short 16S rRNA gene sequences are used. **Heliyon**, v.2, n.9, e00170, 2016.
- 23
24 MAUNSELL, F.; WOOLUMS, A.; FRANCOZ, D.; ROSENBUSCH, R.; STEP, D.;
25 WILSON, D.; JANZEN, E.D. Mycoplasma bovis Infections in Cattle. **J Vet Intern Med**,
26 v.25, p.772–783, 2011.
- 27
28 MIRANDA-CASOLUENGO, R.; LU, J.; WILLIAMS, E.J.; MIRANDA-CASOLUENGO,
29 A.A.; CARRINGTON, S.D.; EVANS, A.C.O.; et al. Delayed differentiation of vaginal
30 and uterine microbiomes in dairy cows developing postpartum endometritis. **PLoS**
31 **ONE**, v.14, n.1: e0200974, 2019.
- 32
33 MOR, A.; DRIGGERS, P.H.; SEGARS, J.H. Molecular characterization of the human
34 microbiome from a reproductive perspective. **Fertil Steril.**, v. 104, p.1344–1350, 2015.

- 1
2 MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Meta'omic analytic techniques for studying the
3 intestinal microbiome. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1437- 1448, 2014.
4
5 MORGAN, X.C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis.
6 **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12, 2012.
7
8 MYSARA, M.; NJIMA, M.; LEYS, N.; RAES, J.; MONSIEURS, P. From reads to
9 operational taxonomic units: An ensemble processing pipeline for MiSeq amplicon
10 sequencing data. **GigaScience**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2017.
11
12 NADER-MACÍAS, M.E.F.; OTERO, M.C.; ESPECHE, M.C.; MALDONADO, N.C.
13 Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in
14 dairy cattle. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, p. 1387–1395, 2008.
15
16 NEIVA, R. Saúde e sustentabilidade ganham espaço na escolha por leite e derivados.
17 **Embrapa Gado de Leite** [Online]. Publicado 23.02.21 e disponível em:
18 [https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/59552807/saude-e-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/59552807/saude-e-sustentabilidade-ganham-espaco-na-escolha-por-leite-e-derivados)
19 [sustentabilidade-ganham-espaco-na-escolha-por-leite-e-derivados](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/59552807/saude-e-sustentabilidade-ganham-espaco-na-escolha-por-leite-e-derivados). [Acessado
20 03.03.21], 2021.
21
22 NESENGANI, L.R.; WANG, J.; YANG, Y.; YANG, L.; LU, W. Unravelling vaginal
23 microbial genetic diversity and abundance between Holstein and Fleckvieh cattle. **R.**
24 **S. Chem.**, v.7, p.56137–56143, 2017.
25
26 O'HALAN, D.E.; MOENCH, T.R.; CONE, R.A. Vaginal pH and microbicidal lactic acid
27 When lactobacilli dominate the microbiota. **PLoSOne**, v. 8, e80074, 2013.
28
29 OBERLE, A.; URBAN, L.; FALCH-LEIS, S.; ENNEMOSER, C.; NAGAI, Y.;
30 ASHIKAWA, K.; ULM, P.A.; HENGSTSCHLAGER, M.; FEICHTINGER, M. 16S rRNA
31 long-read nanopore sequencing is feasible and reliable for endometrial microbiome
32 analysis, **Reproductive BioMedicine**, Online, 2021.
33
34 OLIVARES, M.; WALKER, A.W.; CAPILLA, A.; BENÍTEZ-PÁEZ, A.; PALAU, F.;

- 1 PARKHILLET, J. Gut microbiota trajectory in early life may predict development of
2 celiac disease. **Microbiome**, v. 6, p. 36, 2018.
- 3
- 4 OLSEN, S.; TATUM, F. Bovine brucellosis. **Vet Clin: Food Anim Pract**, v.26, n.1,
5 p.15–27, 2010.
- 6
- 7 OLSON, J.D.; BRETZLAFF, K.N.; MORTIMER. The metritis and pyometra complex.
8 In: Morrow, D.A. (Ed.), **Current therapy in Theriogenology**. W. B. Saunders
9 Company, Philadelphia, PA, p. 227–236, 1986.
- 10
- 11 OTERO, C.; RUIZ, C.S.; IBA, R.; WILDE, O.R.; HOLGADO, P.D.R. Lactobacilli and
12 enterococci isolated from the bovine vagina during the estrous cycle. **Anaerobe**, v.5,
13 p. 305–307, 1999.
- 14
- 15 OTERO, C.; SAAVEDRA, L.; RUIZ, C.S.D.; WILDE, O.; HOLGADO, A.; NADER-
16 MACIAS, M. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy
17 cows. **Lett Appl Microbiol**, v. 31, p.251–254, 2000.
- 18 PERDIJK, O.; MARSLAND, B.J. The microbiome: toward preventing allergies and
19 asthma by nutritional intervention. **Current Opinion in Immunology**, v.60, p.10–18,
20 2019.
- 21
- 22 PRITTCARD, G.C.; SMITH, R.P.; ERRINGTON, J.; HENNON, S.; JONES, R.M.;
23 MEARNS, R. Prevalence of *Coxiella burnetii* in livestock abortion material using PCR.
24 **Vet Rec**, v.169, n.15, p.391, 2011.
- 25
- 26 PUTIGNANI, L.; DEL CHIERICO, F.; VERNOCCHI, P.; CICALA, M.; CUCCHIARA, S.;
27 DALLAPICCOLA, B.; et al. Gut microbiota dysbiosis as risk and premorbid factors of
28 IBD and IBS along the childhood-adulthood transition. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.22,
29 p.487–504, 2016.
- 30
- 31 QUADROS, D.L.; ZANELLA, R.; BONDAN, C.; ZANELLA, G.C.; FACIOLI, F.L.; DA
32 SILVA, A.N.; ZANELLA, E.L. Study of vaginal microbiota of Holstein cows submitted
33 to an estrus synchronization protocol with the use of intravaginal progesterone device.
34 **Research in Veterinary Science**, v.131, p. 1–6, 2020.

- 1
2 QUAN, L.; DONG, R.; YANG, W.; CHEN, L.; LANG, J.; LIU, J.; SONG, Y.; MA, S.;
3 YANG, J.; WANG, W.; MENG, B.; TIAN, G. Simultaneous detection and
4 comprehensive analysis of hpv and microbiome status of a cervical liquid-based
5 cytology sample using nanopore minion sequencing. **Scientific reports.**, v.9, 19337,
6 2019.
- 7
8 QUEREDA, J.J.; BARBA, M.; MOCE, M.L.; GOMIS, J.; JIMENEZ-TRIGOS, E.;
9 GARCIA-MUNOZ, A.; GOMEZ-MARTIN, A.; GONZALEZ-TORRES, P.;
10 CARBONETTO, B.; GARCIA-ROSELLO, E. Vaginal microbiota changes during
11 estrous cycle in dairy heifers. **Front. Vet. Sci.**, v.7, p.371, 2020.
- 12
13 RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: Small
14 subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiological Research**,
15 v. 166, n. 2, p. 99–110, 2011.
- 16
17 RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHNEIDER, G.M.; KOENIG, S.S.K.; MCCULLE,
18 S.L.; et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc Natl Acad Sci USA**,
19 v. 108, Suppl1, p. 4680–4687, 2011.
- 20
21 RENTERO, N. Anuário leite 2020. **Empraba Gado de Leite**, p. 5, 2020.
- 22
23 RODRIGUES, N.; KÄSTLE, J.; COUTINHO, T.; AMORIM, A.; CAMPOS, G.; SANTOS,
24 V.; MARQUES, L.M.; TIMENETSKY, J.; DE FARIAS, S.T. Qualitative analysis of the
25 vaginal microbiota of healthy cattle and cattle with genital-tract disease. **Genet. mol.**
26 **res.**, v.14, p. 6518–6528, 2015.
- 27
28 RODRIGUEZ, C.; COFRE, J.V.; SANCHEZ, M.; FERNANDEZ, P.; BOGGIANO, G.;
29 CASTRO, E. Lactobacilli isolated from vaginal vault of dairy and meat cows during
30 progesteronic stage of estrous cycle. **Anaerobe**, v.17, p.15–18, 2011.
- 31
32 ROMERO, R.; HASSAN, S.S.; GAJER, P.; TARCA, A.L.; FADROSH, D.W.; NIKITA,
33 L.; GALUPPI, M.; LAMONT, R.F.; CHAEMSAITHONG, P.; MIRANDA, J.;
34 CHAIWORAPONGSA, T.; RAVE, J.L. The composition and stability of the vaginal

- 1 microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women.
2 **Microbiome**, v.2, 2014.
- 3
- 4 SALAH, R.M.; ALLAM, A.M.; MAGDY, A.M.; MOHAMED, A.S. Bacterial vaginosis and
5 infertility: cause or association? **European journal of obstetrics & gynecology and**
6 **reproductive biology**, v.167, p.59–63, 2013.
- 7
- 8 SAVAGE, D.C. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. **Annual Review of**
9 **Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 107–133, out. 1977.
- 10
- 11 SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a Tool for Operational
12 Taxonomic Unit-Based Comparisons of Microbial Community Memberships and
13 Structures. v. 72, n. 10, p. 6773–6779, 2006.
- 14
- 15 SEITZ, J.; TRINH, S.; HERPERTZ-DAHLMANN, B. The Microbiome and Eating
16 Disorders. **Psychiatr Clin N Am**, v.42, p.93–103, 2019.
- 17
- 18 SINGER, M.; BORG, M.; OUBURG, S.; MORRÉ, S.A. The relation of the vaginal
19 microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment—A
20 meta-analysis. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v.48,
21 p. 223–229, 2019.
- 22
- 23 SIQUEIRA, K.B. Bem-estar animal, sustentabilidade e a relação com o consumidor.
24 **Anuário Leite 2020 - Empraba Gado de Leite**, p. 52-53, 2020.
- 25
- 26 SIQUEIRA, K.B; RAMALHO, B.C.F. Cresce o consumo de lácteos no Brasil. **Anuário**
27 **Leite 2020 - Empraba Gado de Leite**, p. 32-33, 2020.
- 28
- 29 SMITH, T. Parasitism and Disease. **Princeton: Princeton University Press**, 1934.
- 30
- 31 SMITH, S.B.; RAVEL, J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive
32 physiology. **J Physiol.**, v.595, p.451–463, 2016.
- 33
- 34 SOBEL, J.D. Bacterial vaginosis. **Annu Rev Med.**, v.51, p.349–356, 2000.

- 1
2 SPEAR, G.T.; FRENCH, A.L.; GILBERT, D.; ZARIFFARD, M.R.; MIRMONSEF, P.;
3 SULLIVAN, T.H.; SPEAR, W.W.; LANDAY, A.; MICCI, S.; LEE, B.H.; HAMAKER, B.R.
4 Human α -amylase Present in Lower-Genital-Tract Mucosal Fluid Processes Glycogen
5 to Support Vaginal Colonization by Lactobacillus. **J. Infect. Dis.**, v.210, p.1019–1028,
6 2014.
- 7
8 SRINIVASAN, M.; ADNANE, M.; ARCHUNAN, G. Significance of cervico-vaginal
9 microbes in bovine reproduction and pheromone production – A hypothetical review.
10 **Research in Veterinary Science**, v.135, p.66–71, 2021.
- 11
12 STEPHEN-VICTOR, E.; CHATILA, T.A. Regulation of oral immune tolerance by the
13 microbiome in food allergy. **Current Opinion in Immunology**, v.60, p.141–147, 2019.
- 14
15 STEWART, C.J.; EMBLETON, N.D.; CLEMENTS, E.; LUNA, P.N.; SMITH, D.P.;
16 FOFANOVA, T.Y.; NELSON, A.; TAYLOR, G.; ORR, C.H.; PETROSINO, J.F.;
17 BERRINGTON, J. E.; CUMMINGS, S.P. Cesarean or Vaginal Birth Does Not Impact
18 the Longitudinal Development of the Gut Microbiome in a Cohort of Exclusively
19 Preterm Infants. **Front Microbiol**, v. 8, 2017.
- 20
21 SWARTZ, J.D.; LACHMAN, M.; WESTVEER, K.; O'NEILL, T.; GEARY, T.; KOTT,
22 R.W.; BERARDINELLI, J.G.; HATFIELD, P.G.; THOMSON, J.M.; ROBERTS, A.;
23 YEOMAN, C.J. Characterization of the Vaginal Microbiota of Ewes and Cows Reveals
24 a Unique Microbiota with Low Levels of Lactobacilli and Near-Neutral pH. **Front Vet**
25 **Sci.** v.1, p.1-10, 2014.
- 26
27 TORTELLI, B.A.; LEWIS, A.L.; FAY, J.C. The structure and diversity of strain-level
28 variation in vaginal bacteria. **Microbial Genomics**, 2021.
- 29
30 TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.;
31 GORDON, J. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy
32 harvest. **Nature**, v. 444, p. 027–1031, 2006.
- 33

- 1 USDA, USDA Agricultural Projections to 2026. **Long-term Projections Report No.**
2 **OCE-2017-1**. Fev. 2017.
3
- 4 VALDES, A.M.; et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. **BMJ**, v.361,
5 Supp1: k2179, 2018.
6
- 7 VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R.; CLAEYS, G.; BACKER, E.D.; TEMMERMAN,
8 M.; VANECHOUTTE, M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy
9 suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and
10 that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal
11 vaginal microflora. **BMC Microbiology**, v.9, p.116, 2009.
12
- 13 WANG, J.; SUN, C.; LIU, C.; YANG, Y.; LU, W. Comparison of vaginal microbial
14 community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and real-
15 time PCR. **Anaerobe**, v.38, p.1–6, 2016.
16
- 17 WANG, Y.; AMETAJ, B.N.; AMBROSE, D.J.; GANZLE, M.G. Characterisation of the
18 bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocinproducing
19 *Pediococcus acidilactici*, **BMC Microbiol.**, v.13, p.19, 2013.
20
- 21 WANG, Y.; WANG, J.; LI, H.; FU, K.; PANG, B.; YANG, Y.; et al. Characterization of
22 the cervical bacterial community in dairy cows with metritis and during different
23 physiological phases. **Theriogenology**, v.108, p.306–313, 2018.
24
- 25 WEINSTOCK, G.M. Genomic approaches to studying the human microbiota. **Nature**,
26 v. 489, n. 7415, p. 250–256, 2012.
27
- 28 WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; NOAKES, D.E.; ENGLAND, G.C.W.; RYCROFT, A.;
29 DOBSON, H.; et al. The relationship between uterine pathogen growth density and
30 ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v.68, p.549–559, 2007.
31
- 32 WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; PFEIFFER, D.U.; ENGLAND, G.C.W.; NOAKES,
33 D.E.; DOBSON, H.; et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects
34 uterine bacterial infection and the immune response in cattle. **Theriogenology**, v.63,

- 1 p. 102–117, 2005.
- 2
- 3 WOESE, C.R.; OLSEN, G. J. RNA : a key to phylogeny. **FASEB journal**, v. 7, n. 1, 28
- 4 p. 113–123, 1993.
- 5
- 6 YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable 35
- 7 regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n.
- 8 36 1, p. 1–8, 2016.
- 9
- 10 YANG, X.; CHENG, G.; LI, C.; YANG, J.; LI, J.; CHEN, D.; et al. The normal vaginal
- 11 and uterine bacterial microbiome in giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*),
- 12 **Microbiol. Res.**, v.199, p.1–9, 2017.
- 13
- 14 YASSOUR, M.; LIM, M.Y.; YUN, H.S.; TICKLE, T.L.; SUNG, J.; SONG, Y.M.; et al.
- 15 Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes.
- 16 **Genome Med.** v. 8, p. 17, 2016.
- 17
- 18 YILDIRIM, S.; YEOMAN, C.J.; JANGA, S.C.; THOMAS, S.M.; HO, M.; LEIGH, S. R.;
- 19 CONSORTIUM, P.M.; WHITE, B.A., WILSON, B.A., STUMPF, R.M. Primate vaginal
- 20 microbiomes exhibit species specificity without universal lactobacillus dominance. **The**
- 21 **ISME Journal**, v. 8, p. 2431–2444., 2014.
- 22
- 23 ZAMBRANO-NAVA, S.; BOSCAN-OCANDO, J.; NAVA, J. Normal bacterial flora from
- 24 vaginas of Criollo Limonero cows. **Trop Anim Health Prod**, v.43, p.291–294, 2011.
- 25
- 26 ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R.S. Life at the beginning: perturbation of the microbiota
- 27 by antibiotics in early life and its role in health and disease. **Nat Immunol**, v.15, p.307-
- 28 310, 2014.
- 29
- 30 ZIEMER, C.J. Newly cultured bacteria with broad diversity isolated from eightweek
- 31 continuous culture enrichments of cow feces on complex polysaccharides. **Appl.**
- 32 **Environ. Microbiol.**, v.80, n.2, p.574–585, 2014.
- 33

1 **3 HIPÓTESE**

2

3 **ARTIGO A**

4

5 Hipótese: A tecnologia PacBio permite uma análise mais precisa da microbiota
6 vaginal de bovinos leiteiros e apresenta correlação forte com os
7 resultados de sequenciamento do Illumina.

8

9 **ARTIGO B**

10

11 Hipótese: A microbiota vaginal no momento da inseminação artificial difere
12 conforme posterior estado gestacional.

1 4 OBJETIVO

2

3 4.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Identificar e caracterizar a microbiota vaginal de vacas leiteiras por
6 sequenciamento de DNA de nova geração e relacionar com aspectos reprodutivos.

7

8 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

10 ARTIGO A: Caracterizar a microbiota vaginal de vacas leiteiras por meio do
11 sequenciamento de leituras longas de DNA (PacBio sequencing) e comparar os dados
12 com a técnica de leituras curtas (Illumina sequencing).

13 ARTIGO B: Investigar a microbiota vaginal até nível de espécie, de vacas
14 leiteiras de alta produção que se tornaram gestantes ou não após a inseminação
15 artificial, para estabelecer possíveis associações entre comunidades bacterianas e o
16 *status* gestacional.

1 **5 ARTIGO A – INVESTIGAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL DE VACAS**
2 **LEITEIRAS COM IDENTIFICAÇÃO EM NÍVEL DE ESPÉCIE E COMPARAÇÃO**
3 **ENTRE OS MÉTODOS DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DE LEITURAS**
4 **CURTAS (ILLUMINA) E LONGAS (PACBIO)**

5 **RESUMO**

6 O objetivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota vaginal de vacas leiteiras
7 por meio do sequenciamento de leituras longas de DNA (PacBio *sequencing*) e
8 comparar os dados com a técnica de leituras curtas (Illumina *sequencing*). Para isso,
9 foram coletados *swabs* vaginais de vacas da raça Holandês Preto e Branco (HPB, n
10 = 13), fêmeas múltíparas ($5 \pm 1,3$ anos). O sequenciamento de nova geração (SNG)
11 da região V4 do gene 16S rRNA pela plataforma Illumina e PacBio. Os dados da
12 sequência foram processados no software Mothur (Illumina), e pelo software DADA2
13 e SBanalyzer 2.4 (PacBio). As análises estatísticas comparando as médias dos filós
14 encontrados nas diferentes plataformas (PacBio e Illumina) e a correlação entre os
15 índices (Chao, Simpson, Shannon) foram feitas pelo software Minitab 18 ($p \leq 0,05$).
16 Foi possível a obtenção de 366.509 leituras da microbiota vaginal pela plataforma
17 PacBio, obtendo 27 filós, 677 gêneros e 677 espécies identificadas. Cerca de 51% da
18 microbiota vaginal foi representada por cinco espécies, sendo elas a *UCG-*
19 *005_unclassified*, *UCG-010_ge_unclassified*, *Ureaplasma unclassified*,
20 *Rikenellaceae_RC9_gut_group_unclassified* e *Bacteroides_unclassified*. Em
21 contrapartida, pela plataforma Illumina foram identificados 28 filós e 662 gêneros, com
22 631.586 leituras. A heterogeneidade da composição da comunidade entre indivíduos
23 foi confirmada. Ao comparar as médias das duas tecnologias para os principais filós,
24 o único que mostrou grande variação ($p < 0,0001$) foi um conjunto de bactérias sem
25 identificação, sendo estas denominadas '*Bactéria não classificada*', a qual foi
26 observada em maior quantidade no Illumina. Não foi possível comparar diretamente
27 os gêneros sequenciados pelo PacBio com o Illumina uma vez que as bactérias mais
28 abundantes não apresentaram semelhanças. A alfa diversidade demonstrou uma forte
29 correlação ($r = 0,758$) entre o número de espécies e gêneros entre as diferentes
30 técnicas, sendo significativa ($p = 0,003$). Além disso, ao comparar a tecnologia PacBio
31 com Illumina, foi constatado que o sequenciamento de leituras longas do gene 16S
32 rRNA oferece resultados semelhantes e até mais precisos do que as plataformas
33 padrão de sequenciamento de leitura curta.

34
35 **Palavras-Chave:** Bactérias, bovinos HPB, Illumina, PacBio, Vagina.

1 ABSTRACT

2
3 The objective of this work was to characterize the vaginal microbiota
4 of dairy cows by sequencing long DNA reads (PacBio sequencing) and to compare the
5 data with the short reads technique (Illumina sequencing). For this purpose, vaginal
6 swabs were collected from cows of the Holstein Black and White breed (HPB, n = 13),
7 multiparous females (5 ± 1.3 years). Next-generation sequencing (NGS) of the V4
8 region of the 16S rRNA gene by Illumina and PacBio platform. Sequence data were
9 processed in the Mothur software (Illumina), and by the DADA2 and SBAalyzer 2.4
10 software (PacBio). Statistical analyzes comparing the means of the phyla found on
11 different platforms (PacBio and Illumina) and the correlation between the indices
12 (Chao, Simpson, Shannon) were performed using Minitab 18 software ($p \leq 0.05$). It
13 was possible to obtain 366,509 readings of the vaginal microbiota by the PacBio
14 platform, obtaining 27 phyla, 677 genera and 677 identified species. About 51% of the
15 vaginal microbiota was represented by five species, namely *UCG-005_unclassified*,
16 *UCG-010_ge_unclassified*, *Ureaplasma unclassified*,
17 *Rikenellaceae_RC9_gut_group_unclassified* and *Bacteroides_unclassified*. In
18 contrast, the Illumina platform identified 28 phyla and 662 genera, with 631,586
19 readings. The heterogeneity of community composition among individuals was
20 confirmed. When comparing the means of the two technologies for the main phyla, the
21 only one that showed great variation ($p < 0.0001$) was a set of unidentified bacteria,
22 these being called '*Unclassified bacteria*', which were observed in greater quantity in
23 the Illumina. It was not possible to directly compare the genera sequenced by PacBio
24 with Illumina since the most abundant bacteria did not show similarities. Alpha diversity
25 showed a strong correlation ($r = 0.758$) between the number of species and genera
26 between the different techniques, being significant ($p = 0.003$). Furthermore, when
27 comparing PacBio technology with Illumina, it was found that sequencing of 16S rRNA
28 gene long reads offers similar and even more accurate results than standard short read
29 sequencing platforms.

30

31 **Keywords:** Bacteria, Holstein, Illumina, PacBio, Vagina.

1 INTRODUÇÃO

2 A microbiota vaginal tem demonstrado relevância no âmbito da reprodução de
3 bovinos, pois alterações em sua composição podem influenciar a fertilidade (GREEN;
4 ZAREK; CATHERINO, 2015). Embora vários distúrbios reprodutivos comuns em
5 animais envolvam doenças bacterianas, a caracterização da microbiota vaginal
6 saudável de bovinos ainda está em processo de estudo.

7 É importante considerar que o rastreamento das comunidades bacterianas
8 específicas, ao nível de espécie, permite auxiliar na identificação de perfis de doenças
9 que podem ser utilizados como biomarcadores ou ferramentas de diagnóstico para
10 previsão e prevenção de doenças influenciadas por esse desequilíbrio (PUTIGNANI
11 et al., 2016). Ainda, identificar as espécies bacterianas é extremamente relevante, pois
12 o mesmo gênero de bactérias pode conter tanto espécies patogênicas quanto
13 benéficas ao hospedeiro.

14 Na espécie humana, sabe-se que mulheres inférteis possuem uma microbiota
15 diferente de mulheres férteis (MORENO e SIMON, 2019; WEE et al., 2018; YOUNES
16 et al., 2018). Kyono e colaboradores (2018) afirmaram que um alto teor de
17 *Lactobacillus* spp. pode ser capaz de melhorar a taxa de implantação, principalmente
18 em mulheres submetidas a fecundação, e o restabelecimento da eubiose vaginal para
19 potencializar a reprodução (ABASSI et al., 2020).

20 Ainda não foi definido uma microbiota vaginal padrão para bovinos, pois sabe-
21 se que esta é influenciada por vários fatores, contudo alguns estudos demonstram
22 que os filos bacterianos mais frequentemente detectados na vagina de bovinos
23 leiteiros são *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (LAGUARDIA-NASCIMENTO
24 et al., 2015; NESENGANI et al., 2017; SRINIVASAN et al., 2021), assim como os
25 gêneros *Ureaplasma*, *Histophilus*, *Corynebacteriaceae*, *Porphyromonas*, *Mycoplasma*
26 e *Ruminococcaceae* UCG-005 (QUEREDA et al., 2020).

27 O sequenciamento de nova geração (SNG) permite identificar e quantificar os
28 microrganismos de forma precisa e rápida, bem como, avaliar as dinâmicas
29 bacterianas e suas interações com o ambiente (CONSORTIUM, 2012). A análise é
30 realizada pela determinação da sequência de DNA ou RNA sendo capaz de processar
31 grandes quantidades de dados pelo uso de *softwares* especializados, na área da
32 bioinformática. Somado a isso, essa tecnologia levou a um aumento no número e
33 diversidade de genes e genomas sequenciados (GOODWIN et al., 2016; MARTÍNEZ-

1 PORCHAS et al., 2016), adquirindo fundamental importância para aquelas espécies
2 bacterianas que ainda não foram descritas (ECKBURG, 2005).

3 A tecnologia Illumina é responsável por gerar mais de 90% dos dados de
4 sequenciamento conhecidos e tem sido considerada padrão devido à alta
5 confiabilidade (ILLUMINA, 2017). Esta tecnologia minimiza o tempo e o custo do
6 sequenciamento por realizar leituras curtas do genoma (75-250 pares de bases por vez)
7 considerando apenas porções menores e específicas do gene 16S rRNA (regiões
8 hipervariáveis). Por outro lado, as plataformas SNG que utilizam sequências de leituras
9 curtas tem baixa sensibilidade e especificidade taxonômica comparada a tecnologias
10 que sequenciam o comprimento total do gene 16S e são incapazes de fornecer
11 identificação precisa ao nível de gênero ou espécie (MARTINEZ-PORCHAS et al., 2016).

12 As plataformas de SNG de leitura longa tem contribuído para o estudo da
13 diversidade microbiana por uma perspectiva mais profunda (HE et al., 2020) e avaliar a
14 concordância entre os resultados de ambas as tecnologias são de extrema relevância.
15 Mesmo que o uso de leituras curtas ainda seja considerado a estratégia mais viável
16 economicamente é necessária a compreensão da quantidade de informações que
17 podem ser subestimadas ao utilizar esta tecnologia (MARTÍNEZ-PORCHAS et al., 2016;
18 QUAN et al., 2019; OBERLE et al., 2021).

19 A plataforma PacBio (Pacific Biosciences) é uma tecnologia que produz leituras
20 de alta fidelidade de genes 16S rRNA completos (1500 pb), melhorando a sensibilidade
21 e especificidade do perfil taxonômico, além de reduzir o risco de falsos positivos (LI et
22 al., 2018; HE et al., 2020). Somado a isso, o sequenciamento de leitura longa é
23 potencialmente favorável na redução do risco de contaminação para perfis
24 metagenômicos de amostras de baixa biomassa microbiana. Até o presente momento,
25 nenhum estudo caracterizando a microbiota vaginal de vacas leiteiras utilizou a
26 tecnologia PacBio, investigando dessa forma, taxonomia até nível de espécie.

27 Este trabalho tem como objetivo comparar a caracterização da microbiota
28 vaginal de bovinos leiteiros por meio do sequenciamento de leituras longas de DNA
29 (PacBio *sequencing*) e comparar os dados com a técnica de leituras curtas (Illumina
30 *sequencing*).

31

32 MATERIAL E MÉTODOS

33

34 Declaração Comitê de Ética

1 Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais
2 Institucional (CEUA) da Universidade de Londrina (UEL) sob o número de protocolo
3 10878.2019.88, datado de 6 de agosto de 2019.

4 5 **Animais**

6 Para o experimento foram utilizadas vacas da raça Holandês Preto e Branco
7 (HPB; $n=13$), com média de $5 \pm 1,3$ anos, de uma propriedade leiteira ($24^\circ 47' 32''$ Sul,
8 $50^\circ 0' 42''$ Oeste). As vacas selecionadas eram de alta produção leiteira (média diária
9 de $42,2 \pm 10,09$ litros de leite), multíparas, e não foram submetidas a protocolo
10 hormonais para sincronização e indução de ovulação. Os animais apresentavam
11 histórico reprodutivo isento de qualquer anomalia e não foram submetidos à
12 administração de antibióticos. Em relação ao manejo, as vacas eram ordenhadas duas
13 vezes ao dia e submetidas a sistema de semiconfinamento. Os animais ficavam parte
14 do dia em piquetes com pastagem de Azavém (*Lolium multiflorum*) e após cada
15 ordenha recebiam dieta no cocho com base em concentrado comercial (16% proteína
16 bruta) e silagem de milho.

17 18 **Manejo reprodutivo**

19 A detecção do estro foi realizada por meio do colar de monitoramento (Empresa
20 Allflex, Livestock Intelligence™). Esse sistema consiste em um equipamento acoplado
21 a um colar colocado no pescoço do animal que capta os sinais de atividade, ruminação
22 e movimentos respiratórios, enviando os dados automaticamente a um *software*. No
23 dia do estro, as vacas foram inseminadas, seguindo o manejo reprodutivo adotado na
24 fazenda. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a inseminação por meio
25 de ultrassonografia com sonda linear retal 5 MHz (aparelho Kaixin modelo KX5200).
26 As vacas permaneceram durante todo o experimento em conjunto com o restante do
27 rebanho, não sendo adotadas alterações no manejo reprodutivo, sanitário, alimentar
28 e zootécnico.

29 30 **Colheita de amostras e extração do DNA**

31 A amostra vaginal de cada vaca foi coletada por meio de um *swab* estéril,
32 introduzido na porção caudal da vagina. Para evitar qualquer tipo de contaminação,
33 foi realizada a limpeza da região perineal com toalha de papel descartável, embebida
34 em álcool 70%. Utilizando luvas limpas, os lábios vulvares foram abertos e o *swab*

1 introduzido realizando 15 movimentos circulatorios na mucosa vaginal.
2 Posteriormente, com o auxílio de uma tesoura estéril a haste do *swab* foi cortada e a
3 ponta colocada em um microtubo estéril. As amostras foram coletadas em duplicatas
4 e colocadas imediatamente em um botijão de nitrogênio líquido para o transporte até
5 o laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Estadual de
6 Londrina (REPROA) localizado na Universidade Estadual de Londrina – PR (Brazil),
7 onde foi realizada a extração de DNA. Para a extração do DNA foi utilizado kit
8 comercial PowerSoil® (QIAGEN), seguindo as especificações do fabricante, em
9 seguida, armazenadas a -20C até o envio para o sequenciamento.

11 **Amplificação de DNA por PCR**

13 ***Illumina***

14 A região V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada por PCR para o
15 sequenciamento pelo Illumina utilizando o primer iniciador 515F
16 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e reverso 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT).

18 ***PacBio***

19 As sequências do gene 16S rRNA bacteriano de comprimento total foram
20 amplificadas por PCR com os seguintes primers: adaptador (5-
21 GGTTATGCGGTTCACTGC-3), iniciador (5-AGRRTTYGATYHTDGYTYAG-3) e
22 reverso (1492r: 5-TASVGHTACCTTGTTACCGACTT-3). Todos os *barcodes* foram
23 selecionados da lista de 384 *barcodes* recomendados pela *Pacific Biosciences*
24 (PacBio) ([https://www.pacb.com/products-and-services/analytical-
25 software/multiplexing/](https://www.pacb.com/products-and-services/analytical-software/multiplexing/)). Mais informações sobre a metodologia utilizada estão
26 abordadas no GRAF et al. (2021).

28 **Sequenciamento de Nova Geração**

29 O sequenciamento de nova geração (SNG) foi realizado por meio de duas
30 metodologias diferentes, a primeira utilizando leituras curtas (Illumina) e a segunda
31 mais específica utilizando leituras longas (PacBio).

33 ***Illumina***

34 Primeiramente, as 13 amostras foram sequenciadas pela plataforma Illumina

1 MiSeq, usando o kit de reagentes V2 para 500 pares de base (2 x 250 ciclos) no
2 *Genome Québec Innovation Center*, na Universidade de McGill, localizada em
3 Montreal, na província de Quebec, Canadá.

4

5 ***PacBio***

6 Bibliotecas de amplicons foram criadas usando o SMRTbell express template
7 prep kit 2.0 (número de catálogo 100-938-900; PacBio) conforme as instruções do
8 fabricante. A biblioteca foi sequenciada em um sistema Sequel 2 (*Pacific Biosciences*)
9 na Universidade de Delaware, Centro de Genotipagem e Sequenciamento do Instituto
10 de Biotecnologia de Delaware, Newark, DE, Estados Unidos.

11

12 **Bioinformática**

13

14 ***Illumina***

15

16 As análises de bioinformática foram realizadas no *Département de*
17 *biomédecine vétérinaire*, FMV, da Universidade de Montreal. Os dados das
18 sequências foram processados no software Mothur v.1.41.3, (SCHLOSS et al.,2009)
19 seguindo o Procedimento Operacional Padrão (KOZICH et al., 2013). As sequências
20 de baixa qualidade foram excluídas e as leituras de boa qualidade alinhadas com um
21 genoma de referência (QUAST et al., 2013). As leituras com 95% de similaridade
22 foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTU) e classificadas de
23 acordo com o banco de dados *Ribosomal Database Project* (RDP) (COLE et
24 al.,2009).

25 O número total de filos e gêneros observados foi caracterizado pela alfa
26 diversidade pelo índice de Chao (estimador de riqueza, ou seja, número de espécies
27 diferentes), pelo índice de Simpson (indicador de diversidade, ou seja, o número de
28 espécies diferente e a distribuição de cada uma) e pelo índice de Shannon (indicador
29 de igualdade). A beta diversidade para a comparação entre as comunidades, utilizou
30 o índice de Jaccard considerando a composição da comunidade e o índice de Bray-
31 Curtis avaliando a distribuição de cada grupo bacteriano.

32

33 ***PacBio***

34

1 As *reads* selecionadas de cada amostra foram ajustadas por *primer* e filtradas
2 para *reads* de comprimento de 1.500 pb. As sequências dentro desta faixa de
3 comprimento foram então desreplicadas. O software DADA2 (CALLAHAN et al., 2016)
4 foi utilizado para a detecção de erros de sequenciamento e para o agrupamento das
5 leituras em inferência variantes de sequência de amplicon (ASVs). Atribuição
6 taxonômica de leituras. SBAnalyzer 2.4 (*Shoreline Biome*) foi usado para mapear
7 leituras de consenso circular (ccs) para o banco de dados Athena e atribuir
8 identificação taxonômica a todas as leituras (GRAF et al., 2021). O banco de dados
9 Athena é uma parte integrada do pipeline SBAnalyzer que contém sequências 16S-
10 23S contíguas. O banco de dados Athena foi criado a partir de dados genômicos
11 bacterianos baixados do RefSeq em 21 de maio de 2019. Um total de 5.551 genomas
12 de "referência" e "representativos" com 13.634 outros genomas montados nos níveis
13 "completo" e "cromossômico" foram baixados, para um total de 19.185 genomas
14 (GRAF et al., 2021).

15

16 **Análise Estatística**

17

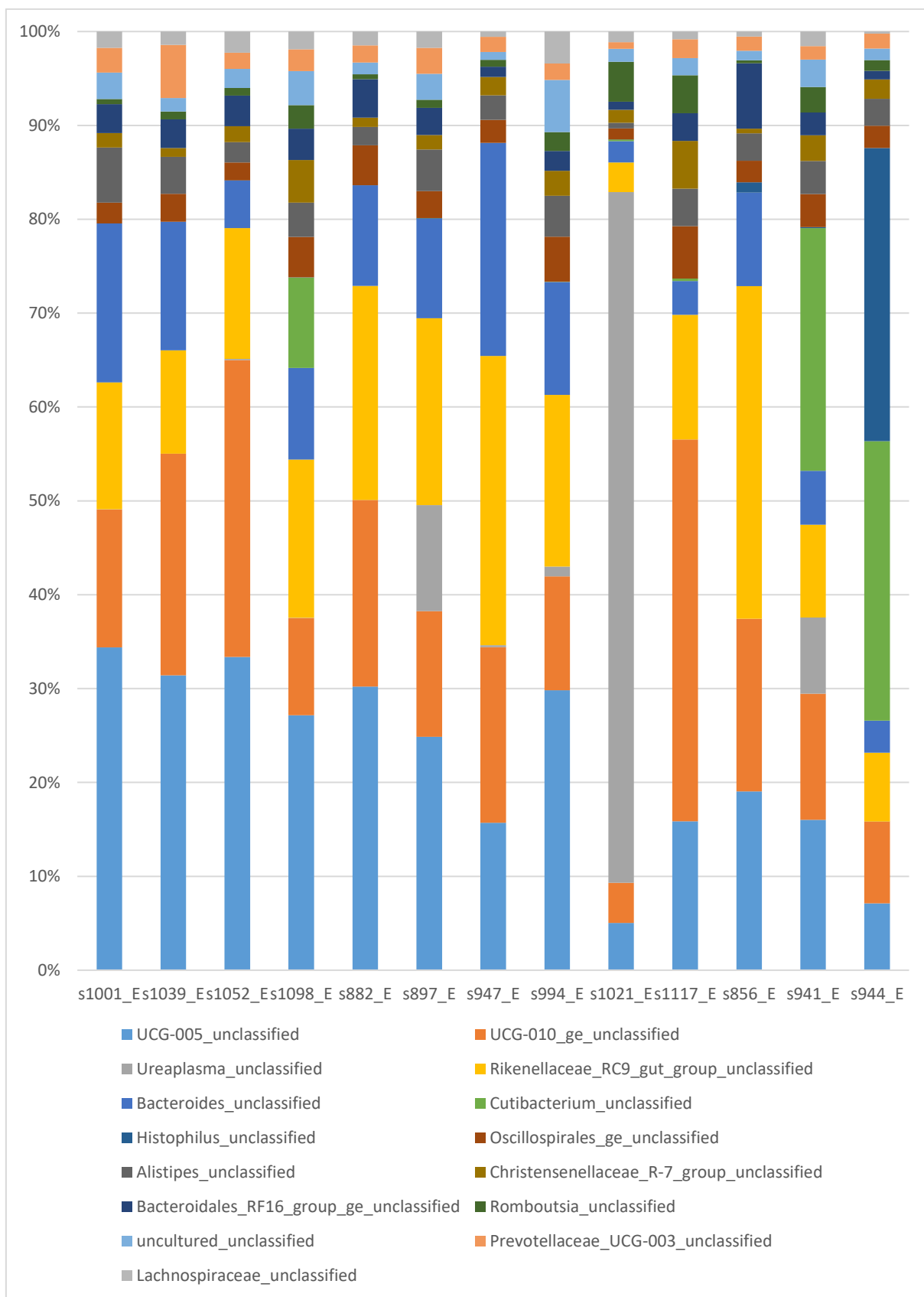
18 As análises estatísticas foram realizadas principalmente pelo software Minitab
19 18. Os dados foram expressos em média \pm DP, a menos que indicado de outra forma.
20 A análise de variância com o teste Tukey com 95% de intervalo de confiança foi usado
21 para comparar as médias dos filamentos encontrados nas diferentes plataformas (PacBio e
22 Illumina). Ainda, foi realizado a correlação entre os índices (Chao, Simpson, Shannon)
23 relacionando as duas metodologias (PacBio, Illumina) pelo teste de Spearman ($p \leq$
24 0,05).

1 RESULTADOS

2

3 Foi realizada, pela plataforma PacBio, a leitura de 366.509 sequências do gene
4 16S rRNA completo obtidas da microbiota vaginal de 13 vacas HPB de alta produção,
5 correspondendo a 27 filos, 677 gêneros e 677 espécies identificados. Um fato
6 considerável é que nenhuma espécie foi classificada pelos bancos de dados, sendo
7 apresentadas com o nome do gênero e o sufixo '*unclassified*'.

8 As 15 espécies de bactérias mais abundantes foram demonstradas na Figura
9 1, assim como a classificação taxonômica das mesmas foi apresentada na Tabela 1.
10 Cerca de 51% da microbiota vaginal foi representada por cinco espécies, sendo elas
11 a *UCG-005_unclassified*, *UCG-010_ge_unclassified*, *Ureaplasma_unclassified*,
12 *Rikenellaceae_RC9_gut_group_unclassified*, *Bacteroides_unclassified*.



1
2 Figura 1- Abundância relativa das 15 espécies de bactérias predominantes na
3 microbiota vaginal de vacas HPB, identificadas pela plataforma PacBio.

1 Tabela 1 – Taxonomia das 15 espécies de bactérias mais abundantes na microbiota vaginal de vacas leiteiras da alta produção
 2 identificadas pela plataforma PacBio.

3

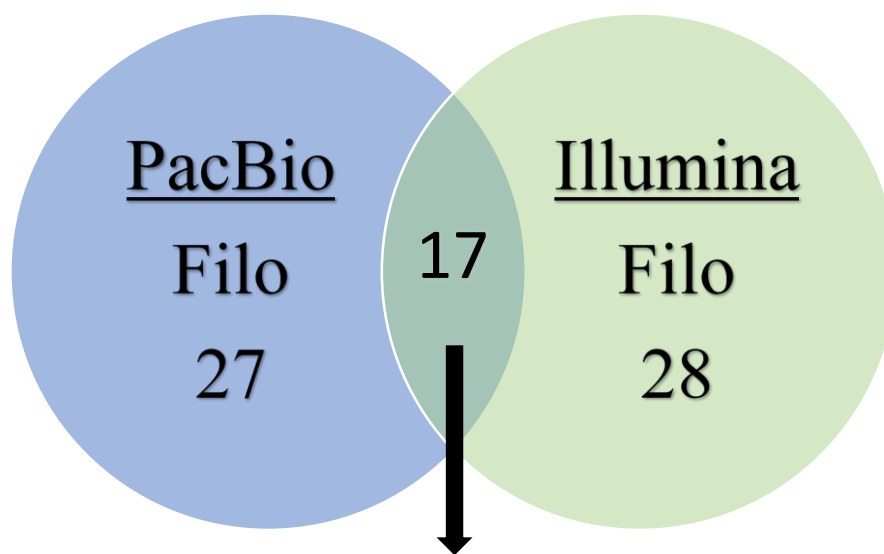
Distribuição	Espécie	Gênero	Família	Filo
1	<i>UCG-005_unclassified</i>	<i>UCG-005</i>	<i>Oscillospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
2	<i>UCG-010_ge_unclassified</i>	<i>UCG-010_ge</i>	<i>UCG-010</i>	<i>Firmicutes</i>
3	<i>Ureaplasma_unclassified</i>	<i>Ureaplasma</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Firmicutes</i>
4	<i>Rikenellaceae_RC9_gut_group_unclassified</i>	<i>Rikenellaceae_RC9_gut_group</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Bacteroidota</i>
5	<i>Bacteroides_unclassified</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidota</i>
6	<i>Cutibacterium_unclassified</i>	<i>Cutibacterium</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Actinobacteriota</i>
7	<i>Histophilus_unclassified</i>	<i>Histophilus</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
8	<i>Oscillospirales_ge_unclassified</i>	<i>Oscillospirales_ge</i>	<i>Oscillospirales_fa</i>	<i>Firmicutes</i>
9	<i>Alistipes_unclassified</i>	<i>Alistipes</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Bacteroidota</i>
10	<i>Christensenellaceae_R-7_group_unclassified</i>	<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	<i>Christensenellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
11	<i>Bacteroidales_RF16_group_ge_unclassified</i>	<i>Bacteroidales_RF16_group_ge</i>	<i>Bacteroidales_RF16_group</i>	<i>Bacteroidota</i>
12	<i>Romboutsia_unclassified</i>	<i>Romboutsia</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
13	<i>uncultured_unclassified</i>	<i>uncultured</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
14	<i>Prevotellaceae_UCG-003_unclassified</i>	<i>Prevotellaceae_UCG-003</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidota</i>
15	<i>Lachnospiraceae_unclassified</i>	<i>Lachnospiraceae_unclassified</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>

4

5

1 Pela plataforma Illumina foram identificados 28 filos e 662 gêneros, analisando
2 a fração V4 do gene 16S rRNA com 631.586 leituras e utilizando uma sub amostragem
3 de 10.415 leituras.

4 A diferença entre as plataformas corresponde principalmente ao comprimento
5 de leitura, a qual o sequenciamento por PacBio realizou leituras longas da totalidade
6 do gene 16S rRNA e o Illumina leituras curtas de uma fração (V4) do gene. Foram
7 observados um total de 17 filos (Figura 2) e 294 gêneros em comum entre as
8 metodologias como demonstrado nos diagramas de Venn (Figura 3). Foi observada
9 similaridade entre os dados encontrados, principalmente a nível de Filo, no qual os
10 cinco mais abundantes foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*,
11 *Proteobacteria* e o filo denominado *Bactérias não classificadas*, as quais não foram
12 identificados os genes dos mesmos nos bancos de dados, todos apresentados na
13 Figura 4. Ao comparar as médias das duas tecnologias para os principais filos, o único
14 que mostrou grande variação ($p < 0,0001$) foi um conjunto de bactérias que não
15 conseguiram ser conhecidas, denominadas *Bactérias não classificadas*, as quais
16 foram observadas em maior quantidade no Illumina (Tabela 2).

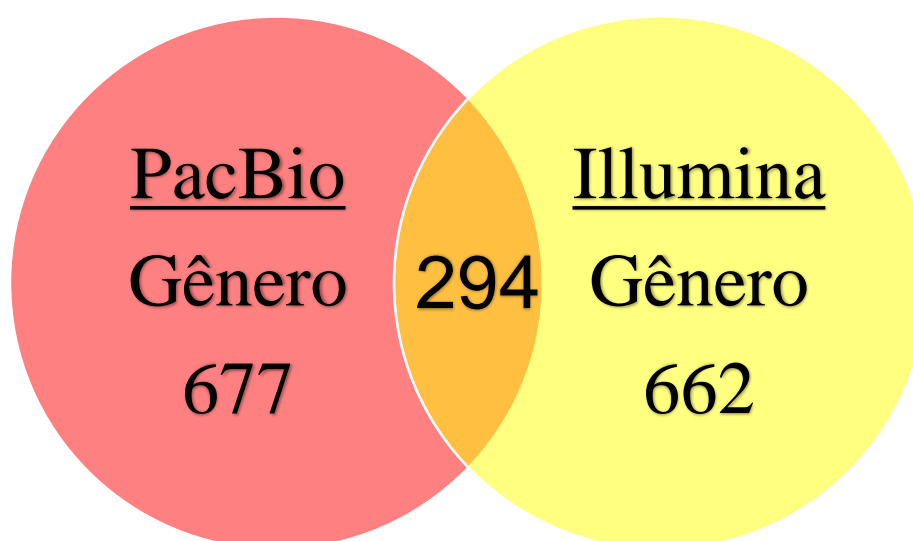


PacBio x Illumina

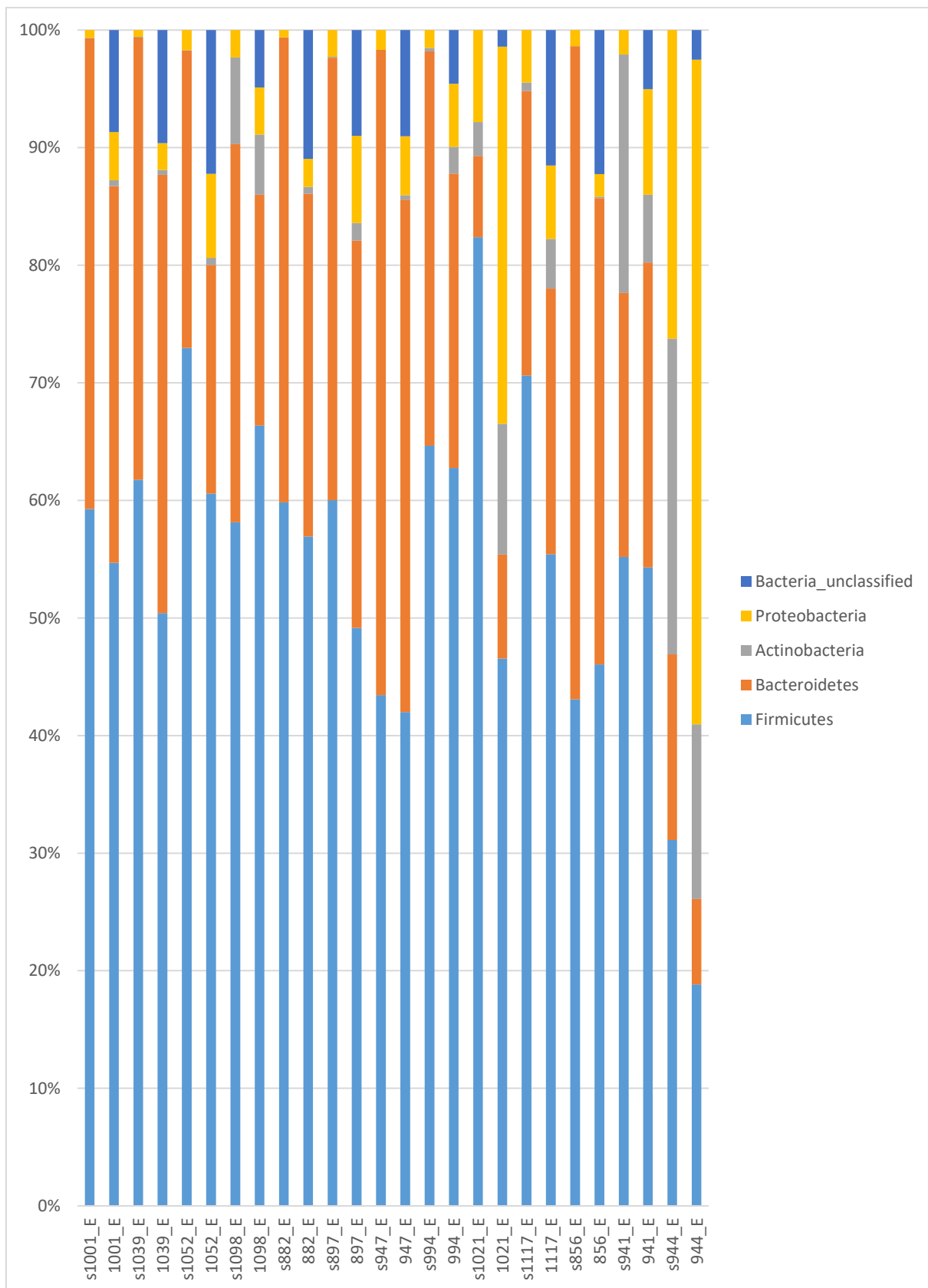
Firmicutes
Bacteroidetes
Actinobacteria
Proteobacteria
Spirochaetes
Verrucomicrobia
Cyanobacteria
Chloroflexi
Fusobacteria
Planctomycetes
Acidobacteria
Gemmatimonadetes
Bacteria_unclassified
Elusimicrobia
Armatimonadetes
Fibrobacteres
Synergistetes

1

2 Figura 2 – Diagrama de Venn representando número de filós únicos e compartilhados
 3 entre as tecnologias de SNG PacBio e Illumina.



- 1
 - 2
 - 3
- Figura 3 – Diagrama de Venn representando número de gêneros únicos e compartilhados entre as tecnologias de SNG PacBio e Illumina.



1
2
3
4

Figura 4 – Abundância relativa comparando os cinco filos de bactérias predominantes identificadas na microbiota vaginal vacas HPB, pela plataforma PacBio e Illumina.

1 Tabela 2- Comparação das médias dos cinco filos mais abundantes encontrados na
 2 vagina de vacas leiteiras pelas plataformas PacBio e Illumina.

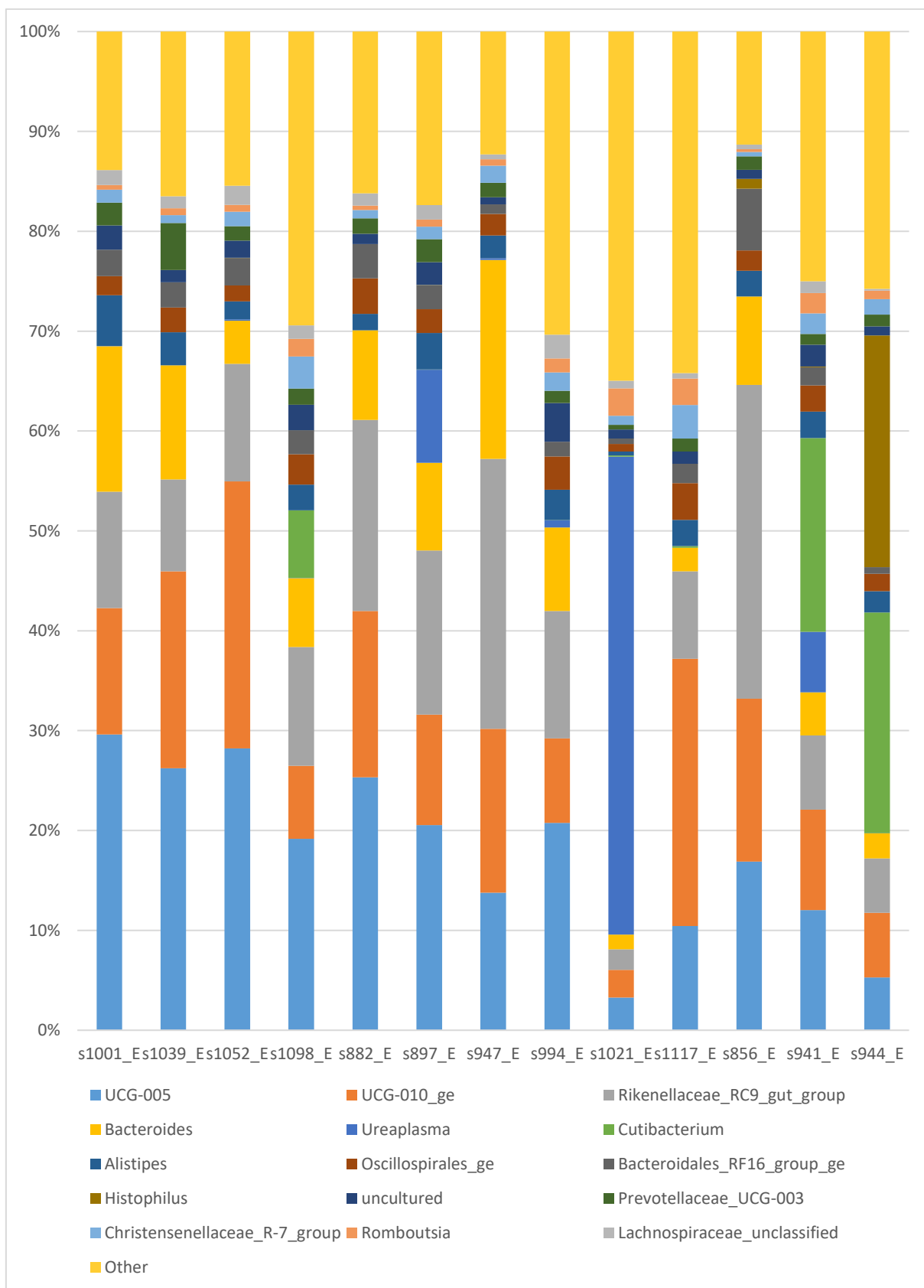
3

Táxon	Média PacBio	Média Illumina	p valor
<i>Firmicutes</i>	58%	50%	0,097
<i>Bacteroidetes</i>	32%	26%	0,196
<i>Actinobacteria</i>	4%	3%	0,706
<i>Proteobacteria</i>	4%	10%	0,177
<i>Bactérias não classificadas</i>	0,01%	8%	0,000

4 Diferença significativa com 95% de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$)

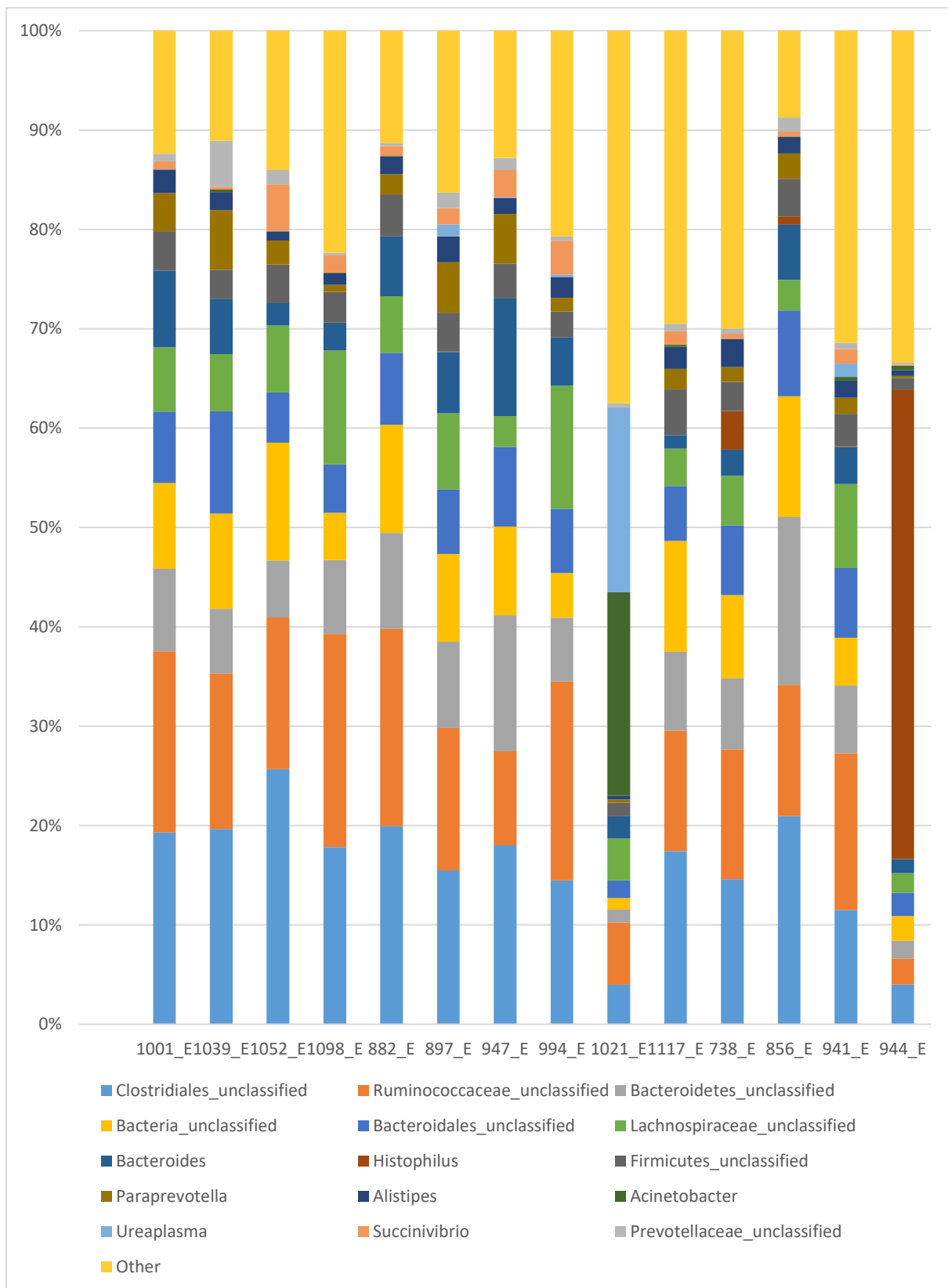
5

6 Não foi possível comparar diretamente os gêneros sequenciados pelo PacBio
 7 (Figura 5) com o Illumina (Figura 6) uma vez que as bactérias mais abundantes
 8 identificadas eram diferentes.



1
2
3
4

Figura 5 – Abundância relativa dos 15 gêneros mais predominantes presentes na microbiota vaginal de vacas leiteiras identificadas pela plataforma PacBio.



1
2
3
4
5

Figura 6 – Abundância relativa dos 15 gêneros mais predominantes presentes na microbiota vaginal de vacas leiteiras identificadas pela plataforma Illumina.

1 Ainda, foi calculada a porcentagem de táxons não classificados em cada
 2 metodologia (Tabela 3), sendo constatada a diferença de 3,8% a mais de filós não
 3 classificados no PacBio e 10,2% a mais de gêneros não classificados no Illumina.

4

5 Tabela 3 – Porcentagem de táxons não classificadas pelas plataformas PacBio e
 6 Illumina

Táxons	PacBio	Illumina
Filo	7,4%	3,6%
Gênero	17,8%	28%
Espécie	100%	-

7

8 A alfa diversidade foi calculada pelos índices de Chao, Simpson e Shannon
 9 para cada uma das metodologias (Tabela 4 – PacBio e Tabela 5 - Illumina). Na
 10 sequência foi realizada a correlação (Tabela 6) entre os índices da alfa diversidade
 11 (Chao, Simpson, Shannon) das duas técnicas (PacBio, Illumina), assim como a
 12 determinação da média e desvio padrão entre elas pelo teste de igualdade de
 13 variância (Tabela 7). Os resultados demonstraram que há uma forte correlação ($r=$
 14 $0,758$) entre o número de espécies e gêneros entre as diferentes técnicas, sendo
 15 significativa ($p=0,003$). Contudo, os demais índices não apresentaram significância,
 16 portanto a correlação não é considerada.

1 Tabela 4 – Índice de alfa diversidade calculado por animal para a metodologia do
 2 PacBio
 3

Animal	Número de espécies	Chao	Simpson	Shannon
1001	776	971,71	1,00	8,53
1021	862	920,65	0,83	5,32
1039	712	874,90	0,99	8,50
1052	778	973,06	1,00	8,59
1098	1152	1257,94	0,99	8,89
1117	1153	1184,20	1,00	9,69
856	759	900,38	1,00	8,60
882	736	1012,50	1,00	8,62
897	819	1072,31	0,99	8,31
941	1137	1208,66	0,93	7,58
944	1013	1065,03	0,89	5,91
947	680	867,21	0,99	8,28
994	1097	1194,06	1,00	9,20

1 Tabela 5 – Índice de alfa diversidade calculado por animal para a metodologia do
 2 Illumina
 3

Animal	Número de gêneros	Chao	Inverso de Simpson	Shannon
1001	95	119,060264	9,528802	2,716953
1021	166	185,346634	10,695559	3,201756
1039	108	145,001194	9,891545	2,731699
1052	89	118,379846	8,210914	2,643996
1098	131	158,74683	9,521771	2,918303
1117	145	164,745433	13,306212	3,283636
856	80	104,901039	8,414748	2,539432
882	91	120,367197	8,662944	2,622906
897	122	163,118413	12,315604	2,954706
941	139	158,30213	15,832739	3,410498
944	147	170,554711	4,189776	2,637484
947	69	79,162487	10,448874	2,71245
994	112	138,252566	10,725196	2,968934

4
 5
 6
 7
 8
 9

Tabela 6 - Correlação e valor de p ($\leq 0,005$) dos índices de alfa diversidade presentes na microbiota vaginal de vacas leiteiras comparando as técnicas de sequenciamento PacBio e Illumina.

	Espécie PacBio x Gênero Illumina	Chao	Simpson	Shannon
r	0,758	0,462	-0,033	-0,038
p valor	0,003	0,112	0,915	0,901

10 Diferença significativa com 95% de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$)
 11

1 Tabela 7 - Médias, Desvio Padrão e p-valor ($\leq 0,05$; teste igualdade de variância) dos
 2 índices de alfa diversidade presentes na microbiota vaginal de vacas leiteiras
 3 comparando as técnicas de sequenciamento PacBio e Illumina.
 4

Metodologia	N Bactérias	Chao	Simpson	Shannon
Pac Bio (Espécie)	898 (183,5)	1038,7 (136,3)	0,9690 (0,0529)	8,157 (1,234)
Illumina (Gênero)	114,84 (29,74)	140,46 (30,38)	10,134 (2,784)	2,8725 (0,2792)
p valor	0,001	0,000	0,000	0,000

5 Diferença significativa com 95% de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$)

6

7 Houve variação significativa nos valores da média e desvio padrão da alfa
 8 diversidade da microbiota vaginal das vacas leiteiras nas diferentes técnicas de
 9 sequenciamento em comparação com valores analisados pelo teste de igualdade de
 10 variância ($p \leq 0,05$).

11

12 DISCUSSÃO

13

14 No presente estudo foi observado concordância entre as duas tecnologias ao
 15 nível de filo, obtendo abundâncias relativas semelhantes, exceto no filo denominado
 16 *Bactérias não classificadas* a qual foi identificada em maior abundância no Illumina
 17 ($p=0,000$). Estes resultados foram reforçados pelo teste estatístico realizado com as
 18 médias nas principais cepas ($p \geq 0,005$) e pela análise da alfa diversidade. Esta última
 19 permitiu de forma inédita demonstrar uma forte correlação ($r= 0,758$) entre o número
 20 de espécies e gêneros observados nas diferentes metodologias, demonstrando que
 21 ambas têm capacidade de reconhecer a diversidade bacteriana da amostra.

22 Contudo, foi observado que o PacBio conseguiu identificar com melhor precisão
 23 as bactérias em níveis taxonômicos mais baixos, como ao nível de gênero, enquanto
 24 o Illumina alcançou bons resultados até ao nível de família, visto que foram
 25 observados mais gêneros não classificados na técnica com leituras curtas. Esta
 26 informação pode ser demonstrada no exemplo dos gêneros *UCG-005* e *UCG-010_ge*,
 27 identificados como os primeiros mais abundantes no PacBio. Eles pertencem à ordem
 28 *Oscillospirales*, a mesma da família *Ruminococcaceae* que no Illumina foi observado
 29 o gênero *Ruminococcaceae_unclassified*, segundo mais abundante (Figura 7).
 30 Semelhantes a esta menção, diversos outros gêneros que foram classificados pela

1 análise do PacBio, não conseguiram ser classificados pelo Illumina.

2 Baseado nessas informações, constatou-se que sequenciamentos com genes
3 completos realmente são capazes de alcançar maior resolução na análise, mesmo
4 concordando em categorias taxonômicas superiores, como família, ordem, classe e
5 filo. Estes dados divergem de outros estudos que compararam sequenciamento de
6 leitura curta (Illumina) com leituras longas (*nanopore*) e afirmaram concordância total
7 entre as técnicas sem mencionar nível taxonômico (OBERLE et al., 2021).

8 Visto que o sequenciamento do gene 16S rRNA completo se faz mais oneroso
9 pela técnica avançada e precisa, levanta-se o questionamento se há alguma vantagem
10 em realizar o PacBio. À medida que o tempo passa, há uma tendência de redução nos
11 custos e na complexidade da técnica, sendo provável que métodos como o PacBio se
12 tornem mais comum nos próximos anos, justificando a necessidade de comparar as
13 técnicas (MARTÍNEZ-PORCHAS et al., 2016; OBERLE et al., 2021). Além disso, há a
14 estratégia de utilizar as duas metodologias de sequenciamento como
15 complementares, pois o baixo custo do Illumina e resultados mais facilmente
16 disponíveis são úteis, por exemplo, para testar a estabilidade de uma comunidade ao
17 longo do tempo ou como um teste de triagem, para então selecionar apenas amostras
18 que necessitem de uma análise mais aprofundada com o PacBio.

19 Ainda, o presente estudo foi um dos primeiros que buscou relatar as espécies
20 bacterianas presentes na microbiota vaginal de vacas HPB com alta produção leiteira.
21 Apesar deste entendimento mais profundo das populações bacterianas ser essencial,
22 não foi possível explorar a fundo esta análise uma vez que as leituras não permitiram
23 ser classificadas em nível de espécie. Este fato pode ter ocorrido pelos genes
24 identificados pertencerem a espécies ainda não conhecidas ou, à incapacidade de os
25 bancos de dados utilizados fornecerem essa informação, principalmente aquelas
26 obtidas de forma mais aprofundada com a tecnologia PacBio.

27 Essas bactérias não classificadas demonstram que seus genes sequenciados já
28 haviam sido encontrados em outros estudos ou tratam-se de cepas que podem diferir
29 em apenas algumas bases, porém ainda não foi realizada a cultura ou o registro das
30 mesmas nos bancos de dados (CALLAHAN et al., 2019; GRAF et al., 2021). É possível
31 conhecer a origem, como por exemplo, família ou até mesmo o gênero, ainda assim
32 não é capaz de se inteirar da sua função. Encontrando o material genético da bactéria
33 não classificada, desperta a necessidade e importância de conhecer este novo táxon.

34 Neste contexto, foi observado heterogeneidade entre as comunidades

1 bacterianas vaginais, provavelmente influenciadas por fatores intrínsecos e
2 extrínsecos ao hospedeiro. Contudo, pouco se sabe a respeito de cepas benéficas ao
3 trato reprodutivo e suas respectivas funções envolvendo a fertilidade.

4 As cinco espécies identificadas de forma mais abundantes entre as treze
5 fêmeas HPB foram *UCG-005_unclassified*, *UCG-010_ge_unclassified*,
6 *Ureaplasma_unclassified*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group_unclassified* e
7 *Bacteroides_unclassified*. A espécie *UCG-005_unclassified*, considerada a mais
8 abundante em toda comunidade bacteriana identificada neste trabalho, pertence ao
9 gênero *UCG-005*, família *Oscillospiraceae*, e portanto, ao filo *Firmicutes*, sendo este
10 último descrito como o mais abundante em bovinos leiteiros em diversos artigos
11 (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al. 2015; NESENGANI et al. 2017; QUEREDA et al
12 2020; SRINIVASAN et al., 2021). O gênero *UCG-005* também foi retratado no artigo
13 de Quereda e colaboradores (2020) como um dos mais abundantes.

14 A espécie *Ureaplasma_unclassified*, pertence ao gênero *Ureaplasma*, que por
15 sua vez já foi descrito no trato reprodutivo de bovinos, seja pelo método de cultura
16 (MULIRA et al., 1992) ou SNG (DÍAZ et al., 2019; QUADROS et al., 2020). Ela é
17 comumente isolada em amostras de mucosa cervicovaginal de fêmeas saudáveis,
18 contudo, tem sido associada a distúrbios reprodutivos em outros estudos (RUHNKE
19 et al., 1978; DÍAZ et al., 2019). Esta também foi relatada em grande abundância na
20 microbiota uterina de vacas que não ficaram gestantes após 200 dias de lactação
21 (MACHADO et al., 2012).

22 A *Ureaplasma_unclassified* foi observada em uma abundância desproporcional
23 na fêmea 1021, sendo esta uma vaca que não era considerada repetidora de cio e
24 não apresentava histórico de doenças reprodutivas, expondo assim a necessidade de
25 mais estudos focados nesse táxon. Ainda, uma explicação a esse respeito seria a
26 necessidade dessa bactéria estar em interação com outros patógenos para ser
27 patogênica, como relatado por Thomas e colaboradores (2002). Eles afirmaram que a
28 *Ureaplasma diversum* em combinação com espécies de *Pasteurella* e / ou *Manheimia*
29 causaram lesões pulmonares em bezerros, resultando na pneumonia. A espécie
30 *Bacteroides_unclassified* tem como gênero *Bacteroides*, mencionadas em outros
31 artigos como bactérias que podem ser utilizadas para prever o potencial reprodutivo
32 de bovinos (FAIR, 2015).

33 Demais estudos que pesquisaram a microbiota vaginal de bovinos, relataram a
34 presença de *Lactobacillus spp.* (SWARTZ et al., 2014; AULT et al., 2019b), mesmo

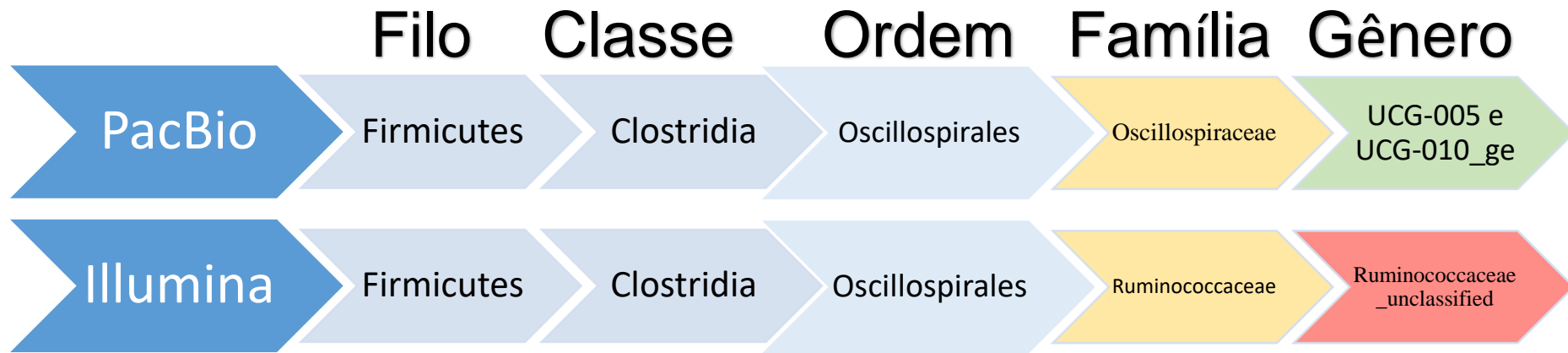
1 que em abundância muito menor do que encontrada em humanos (BASSIS et al.,
2 2017; SIGER et al., 2019; FU et al., 2020). Os achados do presente artigo estão de
3 acordo com essa informação, pois essa bactéria não estava nem entre as 25 primeiras
4 bactérias mais abundantes, demonstrando a real diferença entre a microbiota de
5 bovinos com a de humanos. Todavia, conhecendo com mais profundidade as
6 espécies presentes na microbiota de bovinos, será possível identificar quais as cepas
7 exercem a função protetora e de homeostase vaginal com mesmo objetivo de proteger
8 a região da infecção por patógenos.

9 Este estudo ressalta a importância de identificar quais espécies estão
10 envolvidas com esses gêneros mais abundantes na microbiota de bovinos, para
11 conhecer suas funções e como elas se comportam nas diferentes condições. Todavia,
12 por este ser um trabalho descritivo, não foi possível relacionarmos os táxons
13 identificados a suas funções, sendo necessárias mais pesquisas para este fim.

14

15 **CONCLUSÃO**

16 No presente estudo foi ressaltada a importância de realizar o SNG com mais
17 profundidade, para buscar compreender as funções, interações e flutuações das
18 comunidades bacterianas em nível de espécie na microbiota vaginal de bovinos
19 leiteiros de alta produção. A heterogeneidade da composição da comunidade entre
20 indivíduos foi confirmada, aumentando a necessidade de tamanhos experimentais
21 maiores para os próximos estudos. Além disso, ao comparar a tecnologia PacBio com
22 Illumina, foi constatado que o sequenciamento de leituras longas do gene 16S rRNA
23 oferece resultados semelhantes e até mais precisos do que as plataformas padrão de
24 sequenciamento de leitura curta.



1

Figura 7- Esquema representando um exemplo de classificação taxonômica comparando dados obtidos pela plataforma PacBio e Illumina.

2

3

1 **REFERÊNCIAS**

- 2
- 3 ABBASI, A.; AGHEBATI-MALEKI, A.; AGHEBATI-MALEKI, L.; YOUSEFI, M. Probiotic
4 Intervention as a Potential Therapeutic for Managing Gestational Disorders and
5 Improving Pregnancy Outcomes. **Journal of Reproductive Immunology**, v.143:
6 103244, 2020.
- 7
- 8 AULT, T.B.; CLEMMONS, B.A.; REESE, S.T.; DANTAS, F.G.; FRANCO, G.A.; SMITH,
9 T.P.L.; et al. Uterine and vaginal bacterial community diversity prior to artificial
10 insemination between pregnant and nonpregnant postpartum cows¹. **J Anim Sci.**,
11 v.97, p.4298–304, 2019.
- 12
- 13 BASSIS, C.M.; ALLSWORTH, J.E.; WAHL, H.N.; SACK, D.E.; YOUNG, V.B.; BELL,
14 J.D. Effects of intrauterine contraception on the vaginal microbiota. **Contraception**,
15 v.96, p.189–195, 2017.
- 16
- 17 CALLAHAN, B.J.; MCMURDIE, P.J.; ROSEN, M.J.; HAN, A.W.; JOHNSON, A.J.A.;
18 HOLMES, S.P. DADA 2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon
19 data. *Nature Methods*, v.13, n.7, p.581-587, 2016.
- 20
- 21 CALLAHAN, B.J.; WONG, J.; HEINER, C.; OH, S.; THERIOT, C.M.; GULATI, A.S.;
22 MCGILL, S.K.; DOUGHERTY, M.K. High-throughput amplicon sequencing of the
23 fulllength 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. **Nucleic Acids Res**, v.47,
24 p.103, 2019.
- 25
- 26 CARIATI, F.; D'ARGENIO, V.; TOMAIUOLO, R. The evolving role of genetic tests in
27 reproductive medicine. **Journal of Translational Medicine**, v.17, n.1, p.267, 2019.
- 28
- 29 COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-
30 SYED-MOHIDEED, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE,
31 J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA
32 analysis. **Nucleic Acids Res**, v.37, p.141– 145, 2009.
- 33
- 34 CONSORTIUM. A framework for human microbiome research. **Nature**, v. 486, n. 34

- 1 7402, p. 215–221, 2012.
- 2
- 3 DÍAZ, J.M.; PRIETO, A.; LÓPEZ, G.; DÍAZ, P.; LÓPEZ, C.; QUINTELA, L.À.;
4 MORRONDO, P.; FERNÁNDEZ, G. Association of *Ureaplasma diversum* with
5 reproductive disease in cattle. **N. Z. Vet. J.**, v.67, n.5, p.249–256, 2019.
- 6
- 7 ECKBURG, P. B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308,
8 14 n. 5728, p. 1635–1638, 10 jun. 2005.
- 9
- 10 FAIR, T. The Contribution of the Maternal Immune System to the Establishment of
11 Pregnancy in Cattle. **Frontiers in Immunol** 6, 2015.
- 12
- 13 FEDERHEN, S.; ROSSELLO-MORA, R.; KLENK, H.P.; TINDALL, B.J.;
14 KONSTANTINIDIS, K.T.; WHITMAN, W.B.; BROWN, D.; LABEDA, D.; USSERY, D.;
15 GARRITY, G.M.; COLWELL, R.R.; HASAN, N.; GRAF, J.; PARTE, A.; YARZA, P.;
16 GOLDBERG, B.; SICHTIG, H.; KARSCH-MIZRACHI, I.; CLARK, K.; MCVEIGH, R.;
17 PRUITT, K.D.; TATUSOVA, T.; FALK, R.; TURNER, S.; MADDEN, T.; KITTS, P.;
18 KIMCHI, A.; KLIMKE, W.; AGARWALA, R.; DICUCCIO, M.; OSTELL, J. Meeting
19 report: Gen-Bank microbial genomic taxonomy workshop (12-13 May, 2015). **Stand**
20 **Genomic Sci**, v.11, p.15, 2016.
- 21
- 22 FU, M.; ZHANG, X.; LIANG, Y.; LIN, S.; QIAN, W.; FAN, S. Alterations in vaginal
23 microbiota and associated metabolome in women with recurrent implantation failure.
24 **mBio**, v.11, n. 3, e03242-19, 2020.
- 25
- 26 GOODWIN, S.; MCPHERSON, J.D.; MCCOMBIE, W.R. Coming of age: ten years of
27 next-generation sequencing technologies. **Nat.Rev.Genet.**, v.17, p.333–351, 2016.
- 28
- 29 GRAF, J.; LEDALA, N.; CAIMANO, M.J.; JACKSON, E.; GRATALO, D.; FASULO, D.;
30 DRISCOLL, M.D.; COLEMAN, S.; MATSON, A.P. High-resolution differentiation of
31 enteric bacteria in premature infant fecal microbiomes using a novel rRNA amplicon.
32 **mBio**, v.12, e03656-20, 2021.
- 33
- 34 GREEN, K.A.; ZAREK, S.M.; CATHERINO, W.H. Gynecologic health and disease in

- 1 relation to the microbiome of the female reproductive tract. **Fertility and Sterility**, v.
2 104, n. 6, p. 1351–1357, 2015.
- 3
- 4 HE, Q.; KWOK, L.; XI, X.; ZHONG, Z.; MA, T.; XU, H.; MENG, H.; ZHAO, F.; ZHANG,
5 H. The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota
6 than the maternal fecal and vaginal microbiota. **Gut Microbes**, v.12, n.1, 1794266,
7 2020.
- 8
- 9 ILLUMINA. Microbes and Metagenomics in Human Health. **Illumina**, 2017.
- 10
- 11 KOZICH, J.J.; WESTCOTT, S.L.; BAXTER, N.T.; HIGHLANDER, S.K.; SCHLOSS,
12 P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for
13 analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform.
14 **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.17, p.5112-5120, 2013
- 15
- 16 KYONO, K.; HASHIMOTO, T.; NAGAI, Y.; SAKURABA, Y. Analysis of endometrial
17 microbiota by 16s ribosomal rna gene sequencing among infertile patients: A single-
18 center pilot study. **Reprod Med Biol.**, v.17, p.297-306, 2018.
- 19
- 20 LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; BRANCO, K.M.G.R.; GASPARINI, M.R.;
21 GIANNATTASIO-FERRAZ, S.; LEITE, L.R.; ARAUJO, F.M.G.; et al. Vaginal
22 Microbiome Characterization of Nellore Cattle Using Metagenomic Analysis. **PLoS**
23 **ONE**, v.10, p.11, 2015.
- 24 LI, W.; HOU, Q.; WANG, Y.; MA, H.; LIU, Y.; ZHAO, F.; LI, J.; KWOK, L.; YU, J.; SUN,
25 Z.; SUN, T. Analysis of the Gut Microbial Diversity of Dairy Cows During Peak Lactation
26 by PacBio Single-Molecule Real-Time (SMRT) Sequencing. **Current Microbiology**,
27 v.75, p.1316–1323, 2018.
- 28
- 29 MACHADO, V.S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, M.L.; KNAUER, W.A.; GILBERT, R.;
30 IS, R.C. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using
31 metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. **Vet Microbiol.**, v.159, p.460–
32 469, 2012.
- 33
- 34 MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; VILLALPANDO-CANCHOLA, E.; VARGAS-ALBORES, F.

- 1 Significant loss of sensitivity and specificity in the taxonomic classification occurs when
2 short 16S rRNA gene sequences are used. **Heliyon**, v.2, n.9, e00170, 2016.
- 3
- 4 MORENO, I.; SIMON, C. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility.
5 **Fertil Steril.**, v.110, p.337-343, 2018.
- 6
- 7 MULIRA, G.L.; SAUNDERS, J.R.; BARTH, A.D. Isolation of Ureaplasma diversum and
8 mycoplasmas from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan. **Can Vet J.**,
9 v.33, p.46, 1992.
- 10
- 11 NESENGANI, L.R.; WANG, J.; YANG, Y.; YANG, L.; LU, W. Unravelling vaginal
12 microbial genetic diversity and abundance between Holstein and Fleckvieh cattle. **R.**
13 **S. Chem.**, v.7, p.56137–56143, 2017.
- 14
- 15 OBERLE, A.; URBAN, L.; FALCH-LEIS, S.; ENNEMOSER, C.; NAGAI, Y.;
16 ASHIKAWA, K.; ULM, P.A.; HENGSTSCHLAGER, M.; FEICHTINGER, M. 16S rRNA
17 long-read nanopore sequencing is feasible and reliable for endometrial microbiome
18 analysis, **Reproductive BioMedicine**, Online, 2021.
- 19
- 20 PUTIGNANI, L.; DEL CHIERICO, F.; VERNOCCHI, P.; CICALA, M.; CUCCHIARA, S.;
21 DALLAPICCOLA, B.; et al. Gut microbiota dysbiosis as risk and premorbid factors of
22 IBD and IBS along the childhood-adulthood transition. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.22,
23 p.487–504, 2016.
- 24 QUADROS, D.L.; ZANELLA, R.; BONDAN, C.; ZANELLA, G.C.; FACIOLI, F.L.; DA
25 SILVA, A.N.; ZANELLA, E.L. Study of vaginal microbiota of Holstein cows submitted
26 to an estrus synchronization protocol with the use of intravaginal progesterone device.
27 **Research in Veterinary Science**, v.131, p. 1–6, 2020.
- 28
- 29 QUAN, L.; DONG, R.; YANG, W.; CHEN, L.; LANG, J.; LIU, J.; SONG, Y.; MA, S.;
30 YANG, J.; WANG, W.; MENG, B.; TIAN, G. Simultaneous detection and
31 comprehensive analysis of hpv and microbiome status of a cervical liquid-based
32 cytology sample using nanopore minion sequencing. **Scientific reports.**, v.9, 19337,
33 2019.
- 34

- 1 QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.;
2 PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project:
3 improved data processing and Web-based tools. **Nucleic Acids Res**, v.41, p.590–596,
4 2013.
- 5
6 QUEREDA, J.J.; BARBA, M.; MOCE, M.L.; GOMIS, J.; JIMENEZ-TRIGOS, E.;
7 GARCIA-MUNOZ, A.; GOMEZ-MARTIN, A.; GONZALEZ-TORRES, P.;
8 CARBONETTO, B.; GARCIA-ROSELLO, E. Vaginal microbiota changes during
9 estrous cycle in dairy heifers. **Front. Vet. Sci.**, v.7, p.371, 2020.
- 10
11 RODRIGUES, N.; KÄSTLE, J.; COUTINHO, T.; AMORIM, A.; CAMPOS, G.; SANTOS,
12 V.; MARQUES, L.M.; TIMENETSKY, J.; DE FARIAS, S.T. Qualitative analysis of the
13 vaginal microbiota of healthy cattle and cattle with genital-tract disease. **Genet. mol.**
14 **res.**, v.14, p. 6518–6528, 2015.
- 15
16 RUHNKE, H.L.; DOIG, P.A.; MACKAY, A.L.; GAGON, A.; KIERSTEAD, M. Isolation of
17 Ureaplasma from Bovine Granular Vulvitis. **Can. J. comp. Med.**, v.42, p.151–155,
18 1978.
- 19
20 SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.;
21 HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON,
22 C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F.
23 Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported
24 software for describing and comparing microbial communities. **Appl Environ**
25 **Microbiol**, v.75, p.7537–7541, 2009.
- 26
27 SINGER, M.; BORG, M.; OUBURG, S.; MORRÉ, S.A. The relation of the vaginal
28 microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment—A
29 meta-analysis. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v.48,
30 p. 223–229, 2019.
- 31
32 SRINIVASAN, M.; ADNANE, M.; ARCHUNAN, G. Significance of cervico-vaginal
33 microbes in bovine reproduction and pheromone production – A hypothetical review.
34 **Research in Veterinary Science**, v.135, p.66–71, 2021.

- 1
2 SWARTZ, J.D.; LACHMAN, M.; WESTVEER, K.; O'NEILL, T.; GEARY, T.; KOTT,
3 R.W.; BERARDINELLI, J.G.; HATFIELD, P.G.; THOMSON, J.M.; ROBERTS, A.;
4 YEOMAN, C.J. Characterization of the Vaginal Microbiota of Ewes and Cows Reveals
5 a Unique Microbiota with Low Levels of Lactobacilli and Near-Neutral pH. **Front Vet**
6 **Sci.** v.1, p.1-10, 2014.
- 7
8 THOMAS, A.; DIZIER, I.; TROLIN, A.; MAINIL, J.; LINDEN, A.; BALL, H.; et al. Isolation
9 of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with
10 respiratory disease in Belgium. **Vet Rec.**, v.151, p.472, 2002.
- 11
12 WEE, B.A.; THOMAS, M.; SWEENEY, E.L.; FRENTIU, F.D.; SAMIOS, M.; RAVEL, J.;
13 GAJER, P.; MYERS, G.; TIMMS, P.; ALLAN, J.A.; HUSTON, W.M. A retrospective
14 pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between
15 women with a history of infertility and fertile women. **Australian and New Zealand**
16 **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.58, n.3, p.341-348, 2018.
- 17
18 WEINSTOCK, G.M. Genomic approaches to studying the human microbiota. **Nature**,
19 v. 489, n. 7415, p. 250–256, 2012.
- 20
21 YOUNES, J. A.; LIEVENS, E.; HUMMELEN, R.; VAN DER WESTEN, R.; REID, G.;
22 PETROVA, M.I. Women and their microbes: the unexpected friendship. **Trends in**
23 **microbiology**, v.26, n.1, p.16-32, 2018.

1 **6 ARTIGO B – COMPARAR A MICROBIOTA VAGINAL DE VACAS LEITEIRAS DE**
2 **ALTA PRODUÇÃO QUE SE TORNARAM GESTANTES OU NÃO, APÓS A**
3 **INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, PARA ESTABELEECER POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES**
4 **ENTRE COMUNIDADES BACTERIANAS E O *STATUS* GESTACIONAL**

5 **RESUMO**

6
7 o objetivo deste estudo é comparar a microbiota vaginal de vacas leiteiras de alta
8 produção que se tornaram gestantes ou não após a inseminação artificial para
9 estabelecer associações entre comunidades bacterianas e o desempenho
10 reprodutivo. Foram utilizadas vacas HPB, múltíparas e de alta produção (n = 13). No
11 dia do estro, as vacas foram inseminadas e após 30 dias foi realizado o diagnóstico
12 de gestação. As vacas foram classificadas como gestantes (GE) ou não gestantes
13 (NG). O swab vaginal de cada fêmea foi obtido previamente à inseminação artificial.
14 As amostras foram submetidas à extração do DNA e o sequenciamento realizado pela
15 plataforma PacBio Para selecionar e filtrar as amostras dentro da faixa de 1.500 pb foi
16 utilizado o software DADA2, enquanto o software SBAalyzer 2.4 foi usado para
17 atribuir identificação taxonômica a todas as leituras. As diversidades alfa e a beta
18 foram calculadas e a PCoA foi utilizada para visualizar as semelhanças entre as
19 amostras. A análise de variância comparando a abundâncias relativas e os índices de
20 alfa diversidade foi realizada pelo programa Minitab 18. A comparação da alfa
21 diversidade entre as vacas gestantes e não gestantes foi realizada pelo teste Kruskal-
22 Wallis com 95% de intervalo de confiança e usando uma subamostra de 4300 leituras
23 por amostra. A análise PERMANOVA foi usada para verificar se houve diferença entre
24 grupos (GE *versus* NG). O teste de abundância diferencial foi realizado com o
25 ANCOM. Das 13 vacas selecionadas para o experimento, cinco ficaram gestantes
26 após a inseminação artificial, e oito permaneceram não gestantes. Para a
27 caracterização da microbiota vaginal dessas fêmeas foram utilizadas 366.509 leituras
28 bacterianas pelo SNG PacBio, sendo agrupadas em 27 filos e 677 gêneros. A
29 abundância relativa entre os filos demonstrou a predominância de *Firmicutes* (58%) e
30 de *Bacteroidetes* (32%) em todas as amostras vaginais avaliadas, independente do
31 grupo e não foi observado diferença significativa entre as vacas GE e NG ($p \leq 0,05$).
32 Na alfa diversidade não houve diferença entre os índices de Faith_pd ($p = 0,187$) e
33 número de espécies ($p = 0,825$) entre os grupos. Na beta diversidade os gráficos
34 concordam entre si e quando submetido à PERMANOVA apresentaram diferença (p
35 $= 0,004$; $p = 0,011$ respectivamente) comparando os grupos GE e NG. Além disso, ao
36 avaliar a qualidade e quantidade das bactérias em cada amostra, houve um
37 agrupamento evidente das vacas que permaneceram não gestantes, demonstrando
38 que suas comunidades bacterianas são mais semelhantes do que aquelas presentes
39 em vacas gestantes.

40
41

42 **Palavras-Chave:** Bactérias, Beta diversidade, bovinos HPB, SNG, PacBio.

1 ABSTRACT

2

3 The objective of this study is to compare the vaginal microbiota of high-yielding dairy
4 cows that became pregnant or not after artificial insemination to establish associations
5 between bacterial communities and reproductive performance. High yielding and
6 multiparous HPB cows ($n = 13$) were used. On the day of estrus, the cows were
7 inseminated and after 30 days the diagnosis of pregnancy was performed. Cows were
8 classified as pregnant (PG) or non-pregnant (NP). The vaginal swab of each female
9 was obtained prior to artificial insemination. The samples were submitted to DNA
10 extraction and sequencing performed by the PacBio platform. To select and filter
11 samples within the 1,500 bp range, the DADA2 software was used, while the
12 SBA analyzer 2.4 software was used to assign taxonomic identification to all readings.
13 Alpha and beta diversities were calculated and PCoA was used to visualize the
14 similarities between the samples. The analysis of variance comparing relative
15 abundances and alpha diversity indices was performed using the Minitab 18 program.
16 The comparison of alpha diversity between pregnant and non-pregnant cows was
17 performed using the Kruskal-Wallis test with 95% confidence interval and using a
18 subsample of 4300 readings per sample. PERMANOVA analysis was used to check
19 for differences between groups (PG versus NP). Differential abundance testing was
20 performed with ANCOM. Of the 13 cows selected for the experiment, five became
21 pregnant after artificial insemination, and eight remained non-pregnant. To
22 characterize the vaginal microbiota of these females, 366,509 bacterial readings by
23 the SNG PacBio were used, being grouped into 27 phyla and 677 genera. The relative
24 abundance between the phyla showed the predominance of Firmicutes (58%) and
25 Bacteroidetes (32%) in all vaginal samples evaluated, regardless of the group, and no
26 significant difference was observed between PG and NP cows ($p \leq 0.05$). In alpha
27 diversity there was no difference between the Faith_pd ($p = 0.187$) and number of
28 species ($p = 0.825$) indices between groups. In beta diversity the graphs agree with
29 each other and when submitted to PERMANOVA they showed differences ($p = 0.004$;
30 $p = 0.011$ respectively) comparing the PG and NP groups. Furthermore, when
31 evaluating the quality and quantity of bacteria in each sample, there was a clear
32 grouping of cows that remained non-pregnant, demonstrating that their bacterial
33 communities are more similar than those present in pregnant cows.

34

35 **Keywords:** Bacteria, Beta diversity, bovine Holstein, NGS, PacBio.

1 INTRODUÇÃO

2

3 A correlação entre a microbiota vaginal e a fertilidade tem demonstrado
4 relevância no âmbito da reprodução de bovinos pois alterações na composição de
5 comunidades bacterianas podem levar tanto a distúrbios reprodutivos quanto a
6 potencialização da reprodução (GREEN; ZAREK; CATHERINO, 2015). Com o intuito
7 de prevenir a proliferação de microrganismos patogênicos em condições naturais, a
8 vagina bovina é composta, principalmente, por uma mistura dinâmica de bactérias
9 aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias obrigatórias (OTERO et al. 2000).

10 Quando saudável, a comunidade bacteriana possui estabilidade, contudo, pode
11 ser influenciada ou afetada por inúmeros fatores como ambiente, alimentação, idade,
12 fase do ciclo estral, gestação, manejo, genótipo e resposta imunológica
13 (TURNBAUGH et al. 2006, HUTTENHOWER et al., 2012; LAGUARDIA-
14 NASCIMENTO et al., 2015). Em bovinos, o conhecimento da composição da
15 microbiota vaginal até anos atrás era limitado, uma vez que só havia estudos
16 descritivos qualitativos usando técnicas dependentes de cultura (LAMONT et al.
17 2011). Após o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (SNG),
18 informações inéditas com relação ao perfil das comunidades bacterianas relacionadas
19 à saúde e as doenças reprodutivas foram evidenciadas (WANG et al., 2018;
20 MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2019; QUEREDA et al., 2020).

21 Ademais, estudos mostram que *Lactobacillus* spp. vaginais apresentam
22 correlação positiva com a taxa de gravidez (FU et al., 2020) e sua abundância é
23 reduzida em mulheres que apresentam repetidas falhas de engravidar (SINGER et al.,
24 2019). Em mulheres, foi descrito que o microbioma vaginal permanece mais estável
25 durante a gravidez (SPEAR et al., 2014; ROMERO et al., 2014; ABASSI et al., 2020),
26 pelo fato de haver um amadurecimento no epitélio vaginal devido ao aumento dos
27 níveis de progesterona circulante, produzido pela placenta (BOSKEY et al., 2001).

28 A flutuação da população bacteriana vaginal é dependente dos hormônios
29 esteroides circulantes (SRINIVASAN et al., 2021), desta forma, a fase lútea do ciclo
30 estral que é caracterizada pela liberação de progesterona e após o parto, os animais
31 tendem a apresentar uma microbiota bacteriana menos abundante (LAGUARDIA-
32 NASCIMENTO et al., 2015). Adicionalmente, a relação da progesterona com a
33 abundância de bactérias também explica o porquê durante o protocolo de
34 sincronização, que é realizado anterior a inseminação artificial em tempo fixo (IATF),

1 há uma diminuição da diversidade bacteriana dentro do útero (AULT et al., 2019).

2 Atualmente os estudos com microbiota enfatizam a patogenicidade de
3 bactérias, contudo, ao se compreender com mais profundidade a interação entre o
4 ambiente do hospedeiro e seus microrganismos, é possível identificar estes
5 microrganismos como marcadores biológicos benéficos ao hospedeiro. Assim, o
6 desafio atual é garantir a manutenção de comunidades bacterianas competentes para
7 potencializar a reprodução e controlar as interações dinâmicas entre todos os fatores
8 envolvidos, seja interno ou externo ao animal.

9 Portanto, o objetivo deste estudo foi de comparar a microbiota vaginal de vacas
10 leiteiras de alta produção que se tornaram gestantes ou não após a inseminação
11 artificial para estabelecer associações entre comunidades bacterianas e o
12 desempenho reprodutivo.

13

14 **MATERIAL E MÉTODOS**

15 Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais
16 Institucional (CEUA) da Universidade de Londrina (UEL) sob o número de protocolo
17 10878.2019.88, datado de 6 de agosto de 2019.

18

19 **Animais e Colheita de amostra**

20

21 Foram coletadas amostras de *swab* vaginal de fêmeas bovinas da raça
22 Holandês Preto e Branco (HPB; n=13), de alta produção (média diária de $42,2 \pm 10,09$
23 litros de leite), multíparas, com idade aproximada de $5 \pm 1,3$ anos, de uma propriedade
24 leiteira (24° 47' 32" Sul, 50° 0' 42" Oeste). As vacas permaneceram durante todo o
25 experimento em conjunto com o restante do rebanho, não sendo adotadas alterações
26 no manejo reprodutivo, sanitário, alimentar e zootécnico.

27 Em relação ao manejo, as vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia e
28 submetidas a sistema de semiconfinamento. Os animais ficavam parte do dia em
29 piquetes com pastagem de Azevém (*Lolium multiflorum*) e após cada ordenha
30 recebiam ração no cocho com base em concentrado comercial (16% proteína bruta)
31 e silagem de milho. Os animais apresentavam histórico reprodutivo isento de qualquer
32 anomalia portanto, não foram submetidos à administração de antibióticos.

33 As fêmeas não foram submetidas à protocolos farmacológicos para
34 sincronização e indução de ovulação, enquanto a detecção do estro foi realizada por

1 meio do colar de monitoramento (Empresa Allflex, Livestock Intelligence TM) a qual
2 registra os sinais de atividades de movimentação da fêmea como notas de cio e o
3 melhor horário para inseminar o animal, a qual os dados são enviados
4 automaticamente a um *software* de gestão.

5 No dia do estro, as vacas foram inseminadas, seguindo o manejo reprodutivo
6 adotado na fazenda. O diagnóstico de gestação foi realizado trinta dias após a
7 inseminação por meio de ultrassonografia com sonda linear retal 5 MHz (aparelho
8 Kaixin modelo KX5200). As vacas foram classificadas como gestantes (GE) ou não
9 gestantes (NG). A amostra vaginal de cada vaca foi coletada previamente à
10 inseminação artificial (Figura 1). Para evitar qualquer tipo de contaminação, foi
11 realizada a limpeza da região perineal com toalha de papel descartável, embebida em
12 álcool 70%. Utilizando luvas limpas, os lábios vulvares foram abertos e o *swab*
13 introduzido realizando quinze movimentos circulatorios na mucosa vaginal.
14 Posteriormente, com o auxílio de uma tesoura estéril a haste do *swab* foi cortada e a
15 ponta colocada em um microtubo estéril. As amostras foram coletadas em duplicatas
16 e colocadas imediatamente em um botijão de nitrogênio líquido para o transporte até
17 o laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Estadual de
18 Londrina (REPROA) localizado na Universidade Estadual de Londrina – PR (Brazil),
19 onde foi realizada a extração de DNA.

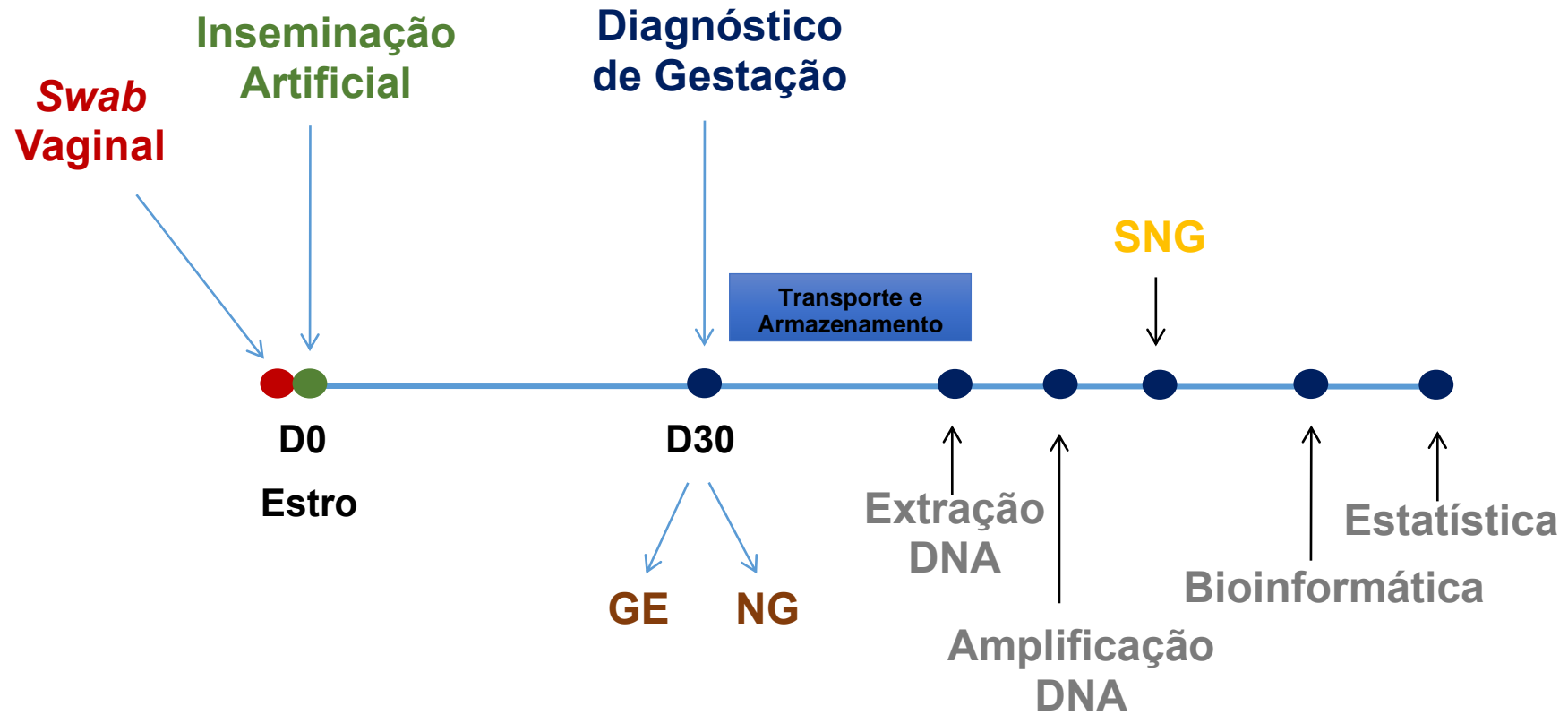


Figura 1 – Linha do tempo demonstrando a metodologia utilizada pelo presente estudo.

1 **Processamento do DNA**

2

3 Para a extração do DNA foi utilizado kit comercial PowerSoil® (QIAGEN),
4 seguindo as especificações do fabricante, em seguida, armazenadas a -20C até o
5 sequenciamento.

6 A amplificação e sequenciamento foram realizadas na Universidade de
7 Delaware, Centro de Genotipagem e Sequenciamento do Instituto de Biotecnologia
8 de Delaware, Newark, DE. As sequências do gene 16S rRNA bacteriano de
9 comprimento total foram amplificadas por PCR com primers iniciais e reversos, e
10 ambos foram sintetizados como uma sequência de 3 partes: adaptador (5-
11 GGTTATGCGGTTCACTGC-3), iniciador (5-AGRRTTYGATYHTDGYTYAG-3) e
12 reverso (1492r: 5-TASVGHTACCTTGTTACCGACTT-3). Todos os *barcodes* foram
13 selecionados da lista de 384 códigos de barras recomendados pela Pacific
14 Biosciences (PacBio) ([https://www.pacb.com/products-and-services/analytical-
15 software/multiplexing/](https://www.pacb.com/products-and-services/analytical-software/multiplexing/)).

16

17 **Sequenciamento de Nova Geração e Bioinformática**

18

19 O gene 16S rRNA completo foi sequenciado em um sistema Sequel 2 (*Pacific*
20 *Biosciences* -PacBio). Um total de 366.509 leituras de consenso circular (ccs) foram
21 produzidas usando as configurações padrão.

22 O software DADA2 (CALLAHAN et al., 2016) foi utilizado para selecionar as
23 leituras de cada amostra e filtrar dentro da faixa de comprimento de 1.500 bp. As
24 sequências dentro desta faixa de comprimento foram então desreplicadas e usadas
25 para construir um modelo de erro para correção de leitura. As faixas de comprimento
26 de leitura foram agrupadas para inferência em variantes de sequência de *amplicons*
27 (ASVs).

28 O software SBanalyzer 2.4 (*Shoreline Biome*) foi usado para mapear leituras
29 ccs para o banco de dados Athena e atribuir identificação taxonômica a todas as
30 leituras. O banco de dados Athena é uma parte integrada do pipeline SBanalyzer que
31 contém sequências do gene 16S rRNA.

32 A alfa diversidade foi caracterizada pelo número total de espécies observadas
33 e pelos índices de Faith_pd e de Shannon, a qual indicaria a riqueza da amostra. A
34 beta diversidade realizou a comparação entre as comunidades, utilizando o índice de

1 Jaccard considerando a composição da comunidade (presença ou ausência de cada
2 espécie) e o índice de Bray-Curtis que considera a distribuição de cada espécie
3 (igualdade). A análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi utilizada para visualizar
4 as semelhanças entre as amostras.

5

6 **Análise Estatística**

7

8 A análise de variância comparando a abundâncias relativas e os índices de alfa
9 diversidade foi realizada pelo programa Minitab 18. Os dados foram expressos em
10 média \pm DP e representados por box plots. A comparação da alfa diversidade entre
11 as vacas gestantes e não gestantes foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis com 95%
12 de intervalo de confiança e usando uma subamostra de 4300 leituras por amostra.

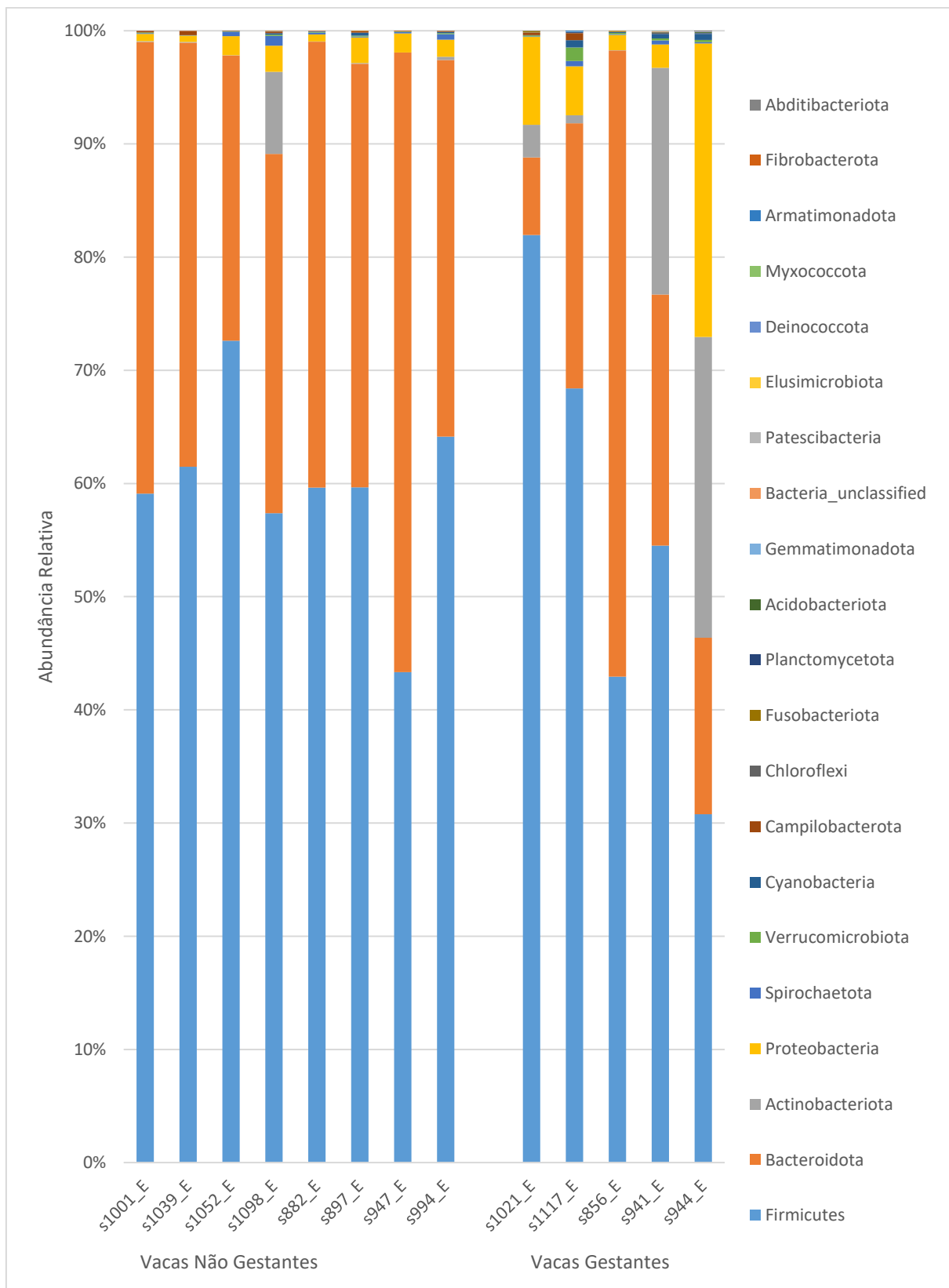
13 A análise PERMANOVA foi usada para verificar se houve diferença entre
14 grupos (GE *versus* NG). O teste de abundância diferencial foi realizado com o ANCOM
15 (Análise de Composições de Microbiomas) que por sua vez buscou identificar
16 marcadores biológicos e associar espécies bacterianas específicas a cada grupo.

17

18 **RESULTADOS**

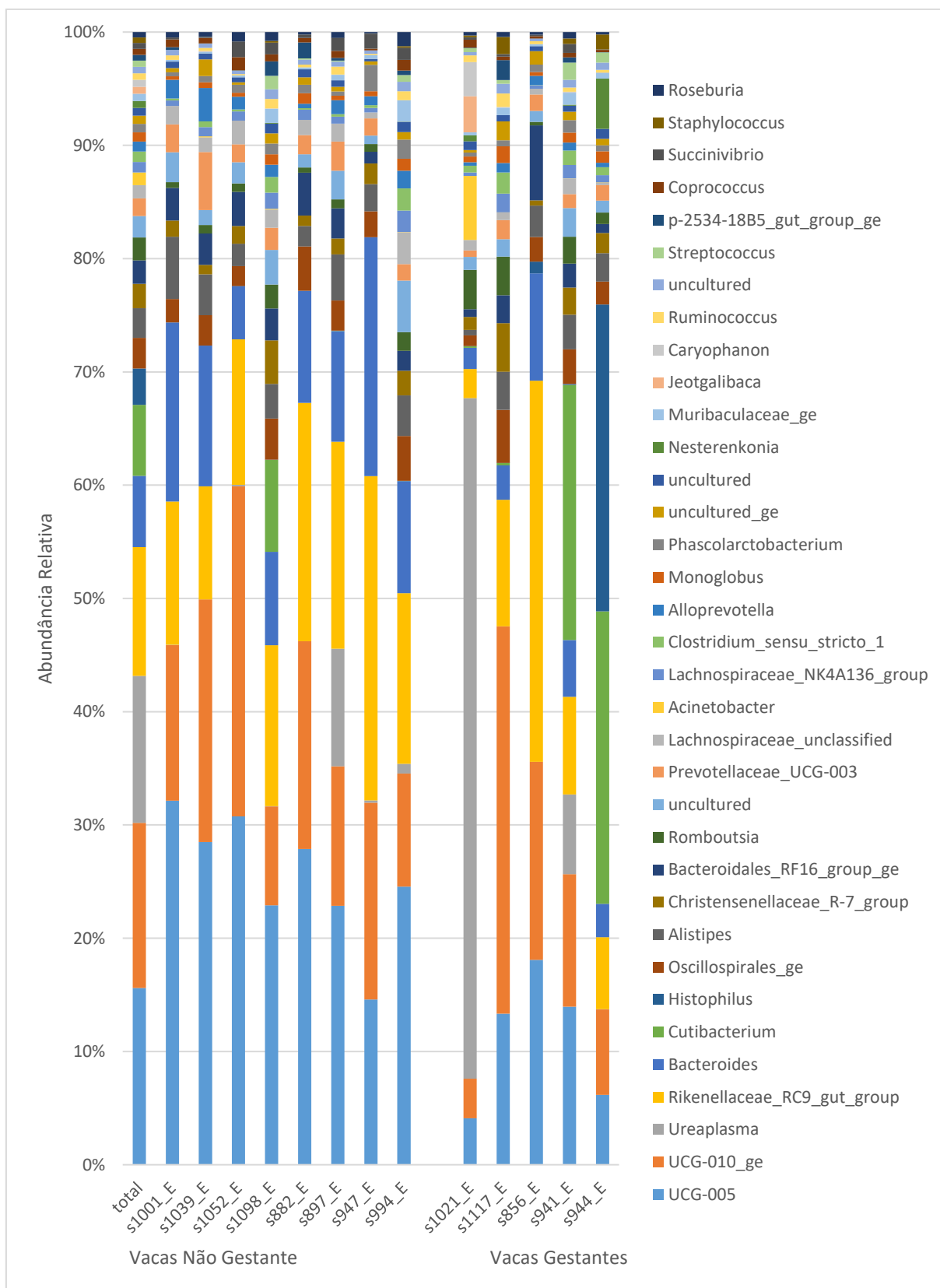
19

20 Das 13 vacas leiteiras de alta produção selecionadas para o experimento, cinco
21 ficaram gestantes após a inseminação artificial, e oito permaneceram não gestantes.
22 Para a caracterização da microbiota vaginal dessas fêmeas foram utilizadas 366.509
23 leituras bacterianas pelo SNG PacBio, sendo agrupadas em 27 filos e 677 gêneros. É
24 possível observar a abundância relativa do filo (Figura 2) e do gênero (Figura 3) das
25 bactérias encontradas na microbiota vaginal das fêmeas comparando os dois grupos
26 (GE x NG).



1
2
3
4
5

Figura 2 – Comparação dos filos mais abundantes entre vacas leiteiras gestantes e não gestantes presentes na microbiota vaginal.



1
2
3
4
5

Figura 3 – Comparação dos gêneros mais abundantes entre vacas leiteiras gestantes e não gestantes presentes na microbiota vaginal.

1 A abundância relativa entre os filos demonstrou a predominância de *Firmicutes*
 2 (58%) e de *Bacteroidetes* (32%) em todas as amostras vaginais avaliadas,
 3 independente do grupo. Cerca de 98,72% da microbiota vaginal de vacas leiteiras
 4 gestantes foi representado pelos filos *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota* e
 5 *Proteobacteria*, enquanto as vacas não gestantes apresentaram 99,44% de
 6 predominância dos mesmos filos, sendo as bactérias restantes responsáveis apenas
 7 por 1,28% e 0,56% nos respectivos grupos (GE e NG; Tabela 1). Não foi observada
 8 diferença significativa entre as vacas GE e NG nos filos mais abundantes ($p \geq 0,05$),
 9 nem mesmo para aquelas fêmeas GE que apresentaram numericamente mais
 10 *Actinobacteriota* e *Proteobacteria* na microbiota vaginal.

11

12 Tabela 1 – Comparação da abundância relativa dos filos presentes na microbiota
 13 vaginal de vacas leiteiras gestantes e não gestantes.

14

Táxon	Vacas gestantes	Vacas não gestantes	Valor de p
<i>Firmicutes</i>	55,71	59,67	0,625
<i>Bacteroidota</i>	24,68	37,39	0,114
<i>Actinobacteriota</i>	10,04	0,97	0,064
<i>Proteobacteria</i>	8,29	1,41	0,076
Outros	1,28	0,56	0,111

15 Diferença significativa com 95% de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$)

16

17

18 Já em nível de gênero, foi observada uma maior variabilidade entre os animais,
 19 como, por exemplo, a alta abundância relativa de *Ureaplasma* (48%) na fêmea 1021,
 20 enquanto outras, como a 941 (19%) e 944 (22%), apresentaram notável quantidade
 21 de *Cutibacterium* comparado a abundância relativa total dos respectivos gêneros
 22 (*Ureaplasma*: 5% e *Cutibacterium*: 4%). Contudo, ao avaliar os grupos GE e NG, não
 23 houve diferença estatística ($p \geq 0,05$), provavelmente pelo pequeno número de
 24 animais estudados e pela grande variabilidade presente entre os animais.

25

26 Os gêneros mais abundantes encontrados na microbiota dessas vacas leiteiras
 foram *UCG-005* (18%), *UCG-010_ge* (14%), *Rikenellaceae_RC9_gut_group* (13%) e
 27 *Bacteroides* (8%), constituindo 53,13% da abundância total.

28

Para a análise de alfa diversidade, foi usada sub amostragem de 4.300 leituras

1 por amostra, e utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Constatou-se que ao comparar a
 2 microbiota vaginal de vacas GE e NG não houve diferença entre os índices de
 3 Faith_pd ($p = 0,187$), número de espécies ($p = 0,825$) e Shannon ($p = 0,305$), que
 4 indica a diversidade da amostra (Tabela 2 e 3).

5

6 Tabela 2- Índice de alfa diversidade presente na microbiota vaginal de vacas leiteiras
 7 que ficaram gestantes ou permaneceram não gestantes após a inseminação artificial.

8

Animais	Resultados	Faith_pd	Características Observadas	Shannon
1001	Não Gestantes	21,80805909	689	8,472015352
897	Não Gestantes	25,06732678	730	8,259683692
947	Não Gestantes	19,73547706	612	8,249184984
994	Não Gestantes	31,56285757	873	9,047765895
1039	Não Gestantes	20,53873176	668	8,460254948
1052	Não Gestantes	22,42041004	695	8,527767706
1098	Não Gestantes	33,66424076	895	8,764155433
882	Não Gestantes	23,28328253	736	8,62702633
1021	Gestantes	30,28548453	553	5,200297151
1117	Gestantes	39,16039333	982	9,512157208
856	Gestantes	21,25379965	691	8,557363951
941	Gestantes	32,30149138	820	7,402656878
944	Gestantes	31,07257701	687	5,756177227

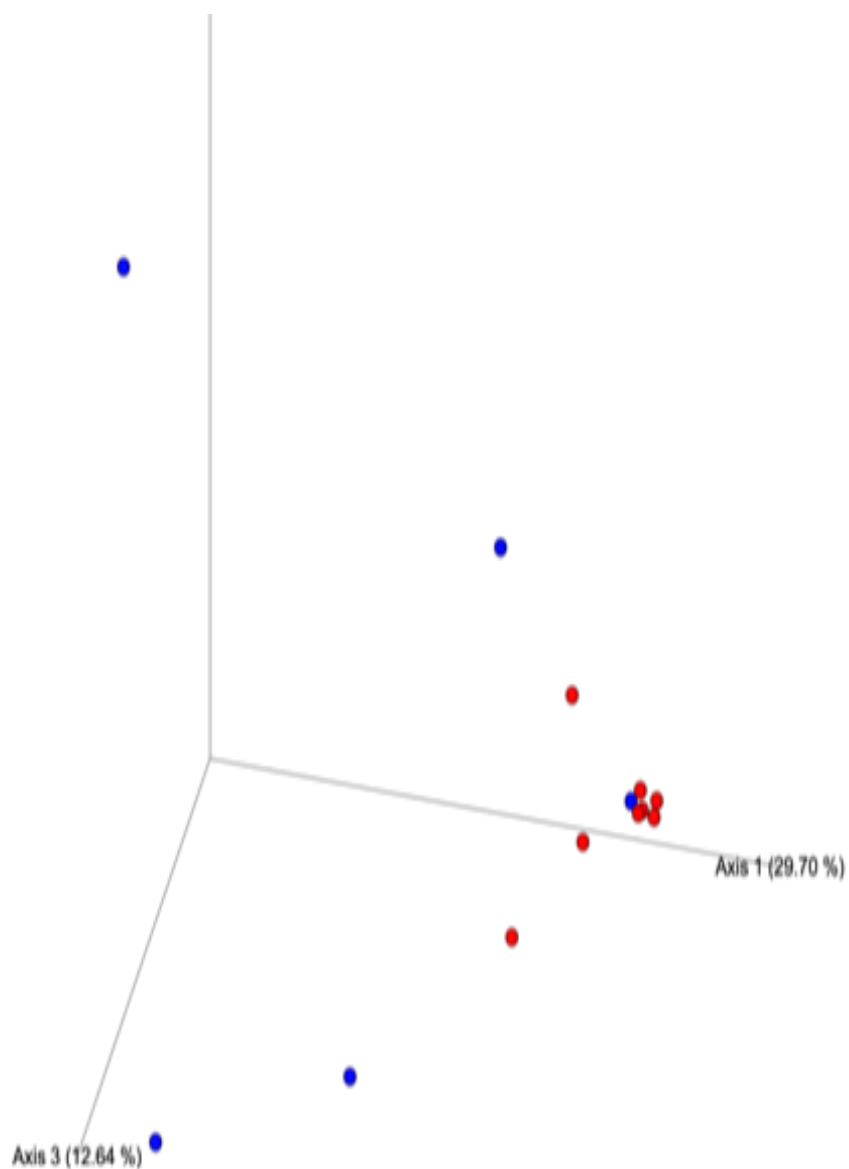
9

1 Tabela 3 – Média \pm Desvio Padrão do índice de alfa diversidade presente na
 2 microbiota vaginal de vacas leiteiras que ficaram gestantes ou permaneceram não
 3 gestantes após a inseminação artificial.
 4

Resultados	Faith_pd	Características Observadas	Shannon
Não Gestantes	24,76 \pm 5,14	737,3 \pm 98,5	8,551 \pm 0,2643
Gestantes	30,81 \pm 6,40	746,6 \pm 162	7,286 \pm 1,822
valor de p	p=0,187	p=0,825	p=0,305

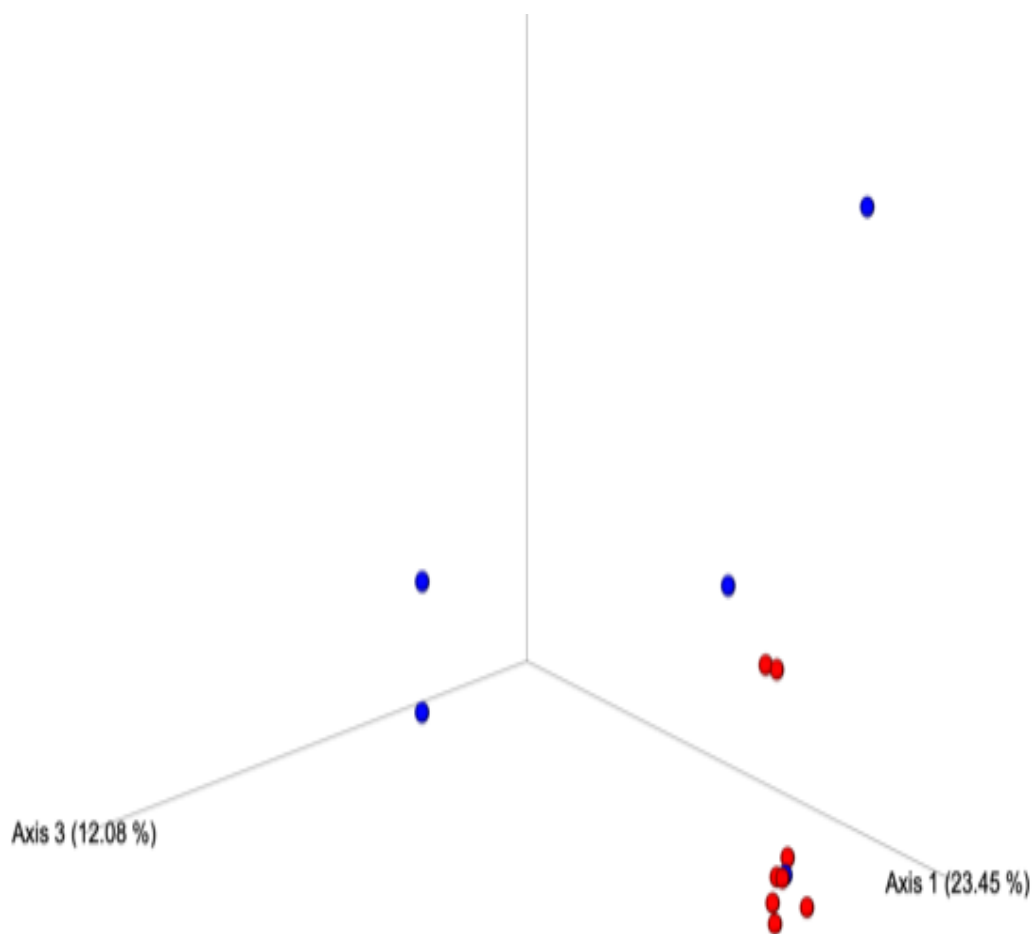
5 Diferença significativa com 95% de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$)
 6

7 A beta diversidade foi demonstrada por meio de dois gráficos de Análise de
 8 Coordenadas Principais (PCoA), o Bray-curtis (Figura 4) que indica a estrutura da
 9 comunidade bacteriana e o Jaccard (Figura 5) a qual indica a diferença na composição
 10 das comunidades bacterianas. Os gráficos concordam entre si e quando submetido à
 11 análise estatística de PERMANOVA apresentaram diferença ($p = 0,004$; $p = 0,011$
 12 respectivamente) comparando os grupos GE e NG.



1
2
3
4
5

Figura 4 –PCoA Brady-Curtis comparando a estrutura de cada comunidade presente na vagina de vacas gestantes (azul) e não gestantes (vermelho); ($p=0,004$). Diferença significativa com 95% de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$).



1

2

3 Figura 5 –PCoA Jaccard comparando a composição das comunidades bacterianas
4 presente na vagina de vacas gestantes (azul) e não gestantes (vermelho); ($p=0,011$).

5 Diferença significativa com 95% de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$).

1 O teste ANCOM foi utilizado para identificar se havia populações específicas
2 associadas à cada grupo (GE e NG), contudo, não foi possível achar nenhuma espécie
3 ou gênero associado estatisticamente aos grupos.

4 **DISCUSSÃO**

6 No conhecimento dos autores é a primeira vez que, a microbiota vaginal de
7 vacas HPB hípidos foram analisadas anterior a inseminação artificial e a gestação,
8 investigando a taxonomia em nível de espécie por meio da plataforma PacBio.

9 A análise de beta diversidade, a qual comparam diferentes comunidades,
10 mostraram concordância entre si ao apresentarem diferença estatística entre os
11 grupos (GE e NG). Estes resultados demonstraram que houve um agrupamento
12 evidente das vacas que permaneceram não gestantes, comprovando a semelhança
13 da microbiota vaginal dessas fêmeas. Este fato pode determinar um novo
14 direcionamento prático para o estudo da microbiota, sendo possível selecionar grupos
15 de fêmeas com problemas reprodutivos precocemente. Desta forma, facilitará o
16 descarte antecipado desses animais, evitando prejuízos para o produtor ou até
17 mesmo realizar um tratamento precoce com a manipulação da microbiota, seja por
18 meio da utilização de probióticos ou de transplante de microbiota.

19 Como foi constatado diferença na beta diversidade entre os grupos de vacas
20 que ficaram gestantes ou não após a inseminação artificial, foi realizado um teste
21 (ANCOM) para buscar associar espécies bacterianas específicas ao grupo das NG,
22 por serem mais semelhantes entre si. Contudo, pela presença do baixo número
23 amostral e de animais outliers, ou seja, semelhança de uma vaca GE ao grupo NG,
24 este táxon não foi encontrado. Para tanto, será preconizado estudos futuros para
25 tentar identificar perfil de bactérias correlacionados aos dois grupos.

26 Além disso, o sequenciamento pela plataforma PacBio, utilizado no presente
27 estudo, possibilitou a análise do gene 16S rRNA total, apresentando alta precisão
28 quanto a identificação dos táxons. Tecnologias de leituras longas têm sido estudadas
29 para conseguir investigar as bactérias e sua interação com o ambiente e hospedeiro
30 com mais profundidade (OBERLE et al., 2021). Esta técnica possibilitou a observação
31 da grande variedade de gêneros dentro e um mesmo animal.

32 Contudo, quando a abundância relativa foi avaliada em um âmbito maior, como
33 em nível de filo, foi constatado uma constância nas comunidades bacterianas dos
34 grupos GE e NG. A não diferença estatística na abundância relativa pode ser

1 justificada pela grande variabilidade entre as vacas de um mesmo grupo. Assim como
2 na análise estatística da alfa diversidade, embora tenha sido possível observar
3 tendências na comparação dos grupos, os índices de diversidade também não foram
4 diferentes. Esses dados sugerem um ambiente dinâmico, com a presença de
5 diferentes comunidades bacterianas que variam com o tempo (DENG et al., 2019;
6 QUEREDA et al., 2020).

7 Os filos *Firmicutes* (58,1%), *Bacteroidota* (32,5%), *Actinobacteriota* (4,4%) e
8 *Proteobacteria* (4%) foram predominantes neste estudo, compreendendo 99% da
9 microbiota vaginal total, e estes dados são compatíveis aos resultados encontrados
10 em outros trabalhos que também avaliaram a microbiota vaginal de bovinos
11 (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al. 2015; NESENGANI et al. 2017; SRINIVASAN et
12 al., 2021). Mesmo os filos não apresentando diferença entre os grupos ($p \geq 0,05$), a
13 *Actinobacteriota* e *Proteobacteria* apresentaram uma tendência ao demonstrar maior
14 abundância nas vacas que ficaram gestantes após a inseminação artificial. Fato este
15 que contrasta com a literatura, a qual a *Actinobacteriota* foi relatada em mulheres com
16 vaginose bacteriana (VB) e ambientes vaginais desequilibrados, prejudiciais ao
17 sucesso da reprodução (OAKLEY et al., 2008).

18 O filo *Proteobacteria*, que tem o *Histophilus* (1,8%) como um dos gêneros, está
19 relacionado a distúrbio reprodutivos e podem existir nas formas patogênicas, podendo
20 resultar em aborto, mastite e vulvovaginite granular (RODRIGUES et al., 2015;
21 JANZEN, 2021). Entretanto os resultados encontrados no presente estudo são
22 divergentes, constatando a presença dessas bactérias em animais que apresentaram
23 gestação após a inseminação artificial, especialmente em uma das vacas avaliadas
24 (944). Porém, Laguardia-Nascimento e colaboradores (2015), ao estudar a microbiota
25 vaginal em vacas nelores, utilizando 4 grupos (novilhas não prenhes, novilhas
26 prenhes, vacas não prenhes e vacas prenhes) também notaram semelhantes
27 variações de *Proteobacteria* em fêmeas prenhas.

28 Deng e colaboradores (2019), também buscaram diferenciar com precisão a
29 microbiota vaginal de novilhas de corte prenhes e apontaram os gêneros *Histophilus*,
30 *Clostridiaceae* e *Campylobacter* como preditor de gestação, sendo o *Histophilus*
31 *somni* o primeiro dentre todos, assim como os dados deste trabalho. Um fato
32 interessante é que durante a gestação há uma tendência de redução da abundância
33 bacteriana em bovinos, devido ao aumento do hormônio progesterona (LAGUARDIA-
34 NASCIMENTO et al., 2015), contudo, esta redução não foi observada no presente

1 artigo.

2 A capacidade de *Lactobacillus spp.* dominar o microbioma vaginal de mulheres
3 ao longo da gestação, pode mostrar uma adaptação para o aumento da aptidão
4 reprodutiva, mantendo a estabilidade da microbiota durante a gravidez e prevenção
5 de infecções ascendentes que estão ligados ao parto prematuro (ROMERO et al.,
6 2001; ROMERO et al., 2014). Dada a importância potencial dos *Lactobacillus* vaginais
7 na redução dos riscos de distúrbios reprodutivos é interessante notar que em bovinos,
8 estes são encontrados em pequenas quantidades, como no presente estudo que foi
9 identificado apenas 0,02% e não assumem tamanha relevância quanto em humanos,
10 o que corrobora com o que é relatado na literatura (RAVEL et al., 2011; SWARTZ et
11 al., 2014).

12 Há uma especulação que a higiene e a dieta podem ser um dos fatores que
13 influenciam a variedade das comunidades bacterianas de bovinos, sendo preocupante
14 o fato de que a alimentação atual fornecida as vacas podem alterar significativamente
15 a microbiota fecal e conseqüentemente a vaginal, diminuindo essa diversidade
16 (BESSEGATO et al., 2017). Estudos em humanos mostram que ter uma baixa
17 diversidade, principalmente de *Lactobacillus spp.*, é fator predisponente a aquisição
18 de doenças (SINGER et al., 2019; KOEDOODER et al., 2019; ABASSI et al., 2020).

19 No presente estudo, as mudanças nas comunidades bacterianas são sutis, sem
20 diferenças marcantes em vacas gestantes e não gestantes, permanecendo
21 relativamente estáveis em vacas não gestantes, exceto o gênero *Ureaplasma*. Este
22 gênero foi encontrado em grande quantidade no trato vaginal de umas das vacas
23 deste estudo (1021; 48%; grupo GE) e ao longo dos trabalhos têm sido consideradas
24 habitante comum do trato genital de bovinos (MULIRA et al., 1992; DÍAZ et al., 2019;
25 QUADROS et al., 2020), mesmo estando descrita como fator de risco para a
26 reprodução de rebanhos por estar presente em sua maioria em fêmeas com falhas
27 reprodutivas (MACHADO et al., 2012; DÍAZ et al., 2019).

28 A partir dos dados aqui apresentados pode-se aumentar a compreensão sobre
29 o tema, para posteriormente revelar biomarcadores microbianos a partir das bactérias
30 benéficas ou predispostas a causar doenças. Outra possível aplicação é a elaboração
31 de testes rápidos de diagnóstico, aprimorando o conhecimento da capacidade
32 reprodutiva da fêmea para melhor eficiência produtiva.

33

34

1 **CONCLUSÃO**

2

3 O presente estudo demonstrou a estrutura da comunidade microbiana vaginal
4 de vacas que ficaram gestantes e que permaneceram não gestantes após a
5 inseminação artificial usando a plataforma PacBio. As fêmeas que não ficaram
6 gestantes após a inseminação artificial apresentaram comunidades bacterianas mais
7 semelhantes que as não gestantes, reforçando a importância de se melhor
8 compreender a relação entre a microbiota vaginal e o hospedeiro, bem como sua
9 influência no desempenho reprodutivo de bovinos.

1 REFERÊNCIAS

- 2 ABBASI, A.; AGHEBATI-MALEKI, A.; AGHEBATI-MALEKI, L.; YOUSEFI, M. Probiotic
3 Intervention as a Potential Therapeutic for Managing Gestational Disorders and
4 Improving Pregnancy Outcomes. **Journal of Reproductive Immunology**, v.143:
5 103244, 2020.
6
- 7 AULT, T.B.; CLEMMONS, B.A.; REESE, S.T.; DANTAS, F.G.; FRANCO, G.A.; SMITH,
8 T.P.L.; et al. Uterine and vaginal bacterial community diversity prior to artificial
9 insemination between pregnant and nonpregnant postpartum cows¹. **J Anim Sci.**,
10 v.97, p.4298–304, 2019.
11
- 12 BESSEGATTO, J.A.; PAULINO, L.R.; LISBÔA, J.A.N.; ALFIERI, A.A.; MONTEMOR,
13 C.H.; MEDEIROS, L.P.; KOBAYASHI, R. K.T.; WEESE, J.S.; COSTA, M.C. Changes
14 in the fecal microbiota of beef cattle caused by change in management and the use of
15 virginiamycin as a growth promoter. **Research in Veterinary Science**, v. 114, p. 355–
16 362, 2017.
17
- 18 BOSKEY, E.; CONE, R.; WHALEY, K.; MOENCH, T. Origins of vaginal acidity: high d/l
19 lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Hum Reprod**, v.16,
20 p.1809–1813, 2001.
21
- 22 CALLAHAN, B.J.; MCMURDIE, P.J.; ROSEN, M.J.; HAN, A.W.; JOHNSON, A.J.A.;
23 HOLMES, S.P. DADA 2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon
24 data. *Nature Methods*, v.13, n.7, p.581-587, 2016.
25
- 26 DENG, F.; MCCLURE, M.; RORIE, R.; Wang, X.; Chai, J.; Wei, X.; Lai, S.; Zhao, J.
27 The vaginal and fecal microbiomes are related to pregnancy status in beef heifers. **J**
28 **Animal Sci Biotechnol**, v.10, p.92, 2019.
29
- 30 DÍAZ, J.M.; PRIETO, A.; LÓPEZ, G.; DÍAZ, P.; LÓPEZ, C.; QUINTELA, L.À.;
31 MORRONDO, P.; FERNÁNDEZ, G. Association of *Ureaplasma diversum* with
32 reproductive disease in cattle. **N. Z. Vet. J.**, v.67, n.5, p.249–256, 2019.
33

- 1 DONATI, L.D.I.; VICO, A.; NUCCI, M.; QUAGLIOZZI, L.; SPAGNUOLO, T.;
2 LABIANCA, A.; et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. **Arch Gynecol**
3 **Obstet**, v. 281, n.4, p.589–600, 2010.
4
- 5 FU, M.; ZHANG, X.; LIANG, Y.; LIN, S.; QIAN, W.; FAN, S. Alterations in vaginal
6 microbiota and associated metabolome in women with recurrent implantation failure.
7 **mBio**, v.11, n. 3, e03242-19, 2020.
8
- 9 GREEN, K.A.; ZAREK, S.M.; CATHERINO, W.H. Gynecologic health and disease in
10 relation to the microbiome of the female reproductive tract. **Fertility and Sterility**, v.
11 104, n. 6, p. 1351–1357, 2015.
- 12 HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R.; ABUBUCKER, S.; BADGER, J.H.;
13 CHINWALLA, A.T.; et al. Structure, function and diversity of the healthy human
14 microbiome. **Nature**, v.486, p. 207–214, 2012.
15
- 16 JANZEN, E.D. Overview of Histophilosis - Generalized Conditions. **Merck Veterinary**
17 **Manual**. Disponível em: [https://www.merckvetmanual.com/generalized-](https://www.merckvetmanual.com/generalized-conditions/histophilosis/overview-of-histophilosis)
18 [conditions/histophilosis/overview-of-histophilosis](https://www.merckvetmanual.com/generalized-conditions/histophilosis/overview-of-histophilosis) [acessado 06 de abril de 2021].
19
- 20 KOEDOODER, R.; SINGER, M.; SCHOENMAKERS, S.; SAVELKOUL, P.H.M.;
21 MORRÉ, S.A.; DE JONGE, J.D.; POORT, L.; CUYPERS, W.J.S.S; BECKERS,
22 N.G.M.; BROEKMANS, F.J.M.; COHLEN, B.J.; DEN HARTOG, J.E.; FLEISCHER, K.;
23 LAMBALK, C.B.; SMEENK, J.M.J.S.; BUDDING, A.E.; LAVEN, J.S.E. The vaginal
24 microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without
25 intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. **Human Reproduction**, v.34,
26 n.6, p. 1042–1054, 2019.
27
- 28 LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; BRANCO, K.M.G.R.; GASPARINI, M.R.;
29 GIANNATTASIO-FERRAZ, S.; LEITE, L.R.; ARAUJO, F.M.G.; et al. Vaginal
30 Microbiome Characterization of Nelore Cattle Using Metagenomic Analysis. **PLoS**
31 **ONE**, v.10, p.11, 2015.
- 32 LAMONT, R.; SOBEL, J.; AKINS, R.; HASSAN, S.; CHAIWORAPONGSA, T.;
33 KUSANOVIC, J.; et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract
34 flora using molecular based techniques. **BJOG**, v.118, p.533–549, 2011.

- 1
2 MACHADO, V.S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, M.L.; KNAUER, W.A.; GILBERT, R.;
3 IS, R.C. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using
4 metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. **Vet Microbiol.**, v.159, p.460–
5 469, 2012.
6
7 MIRANDA-CASOLUENGO, R.; LU, J.; WILLIAMS, E.J.; MIRANDA-CASOLUENGO,
8 A.A.; CARRINGTON, S.D.; EVANS, A.C.O.; et al. Delayed differentiation of vaginal
9 and uterine microbiomes in dairy cows developing postpartum endometritis. **PLoS**
10 **ONE**, v.14, n.1: e0200974, 2019.
11
12 MULIRA, G.L.; SAUNDERS, J.R.; BARTH, A.D. Isolation of *Ureaplasma diversum* and
13 mycoplasmas from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan. **Can Vet J.**,
14 v.33, p.46, 1992.
15
16 NESENGANI, L.R.; WANG, J.; YANG, Y.; YANG, L.; LU, W. Unravelling vaginal
17 microbial genetic diversity and abundance between Holstein and Fleckvieh cattle. **R.**
18 **S. Chem.**, v.7, p.56137–56143, 2017.
19
20 OBERLE, A.; URBAN, L.; FALCH-LEIS, S.; ENNEMOSER, C.; NAGAI, Y.;
21 ASHIKAWA, K.; ULM, P.A.; HENGSTSCHLAGER, M.; FEICHTINGER, M. 16S rRNA
22 long-read nanopore sequencing is feasible and reliable for endometrial microbiome
23 analysis, **Reproductive BioMedicine**, Online, 2021.
24
25 O'HALAN, D.E.; MOENCH, T.R.; CONE, R.A. Vaginal pH and microbicidal lactic acid
26 When lactobacilli dominate the microbiota. **PLoSOne**, v. 8, e80074, 2013.
27
28 OAKLEY, B.B.; FIEDLER, T.L.; MARRAZZO, J.M.; FREDRICKS, D.N. Diversity of
29 Human Vaginal Bacterial Communities and Associations with Clinically Defined
30 Bacterial Vaginosis. **Appl Environ Microbiol**, v.74, n.15, p.4898-4909, 2008.
31
32 OTERO, C.; SAAVEDRA, L.; RUIZ, C.S.D.; WILDE, O.; HOLGADO, A.; NADER-
33 MACIAS, M. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy
34 cows. **Lett Appl Microbiol**, v. 31, p.251–254, 2000.

- 1
2 QUADROS, D.L.; ZANELLA, R.; BONDAN, C.; ZANELLA, G.C.; FACIOLI, F.L.; DA
3 SILVA, A.N.; ZANELLA, E.L. Study of vaginal microbiota of Holstein cows submitted
4 to an estrus synchronization protocol with the use of intravaginal progesterone device.
5 **Research in Veterinary Science**, v.131, p. 1–6, 2020.
6
7 QUEREDA, J.J.; BARBA, M.; MOCE, M.L.; GOMIS, J.; JIMENEZ-TRIGOS, E.;
8 GARCIA-MUNOZ, A.; GOMEZ-MARTIN, A.; GONZALEZ-TORRES, P.;
9 CARBONETTO, B.; GARCIA-ROSELLO, E. Vaginal microbiota changes during
10 estrous cycle in dairy heifers. **Front. Vet. Sci.**, v.7, p.371, 2020.
11
12 RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHNEIDER, G.M.; KOENIG, S.S.K.; MCCULLE,
13 S.L.; et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc Natl Acad Sci USA**,
14 v. 108, Suppl1, p. 4680–4687, 2011.
15
16 RODRIGUES, N.; KÄSTLE, J.; COUTINHO, T.; AMORIM, A.; CAMPOS, G.; SANTOS,
17 V.; MARQUES, L.M.; TIMENETSKY, J.; DE FARIAS, S.T. Qualitative analysis of the
18 vaginal microbiota of healthy cattle and cattle with genital-tract disease. **Genet. mol.**
19 **res.**, v.14, p. 6518–6528, 2015.
20
21 ROMERO, R.; GOMEZ, R.; CHAIWORAPONGSA, T.; CONOSCENTI, G.; KIM, J.C.;
22 KIM, Y.M. The role of infection in preterm labour and delivery. **Paediatr Perinat**
23 **Epidemiol**, v.15, p.41–56, 2001.
24
25 ROMERO, R.; HASSAN, S.S.; GAJER, P.; TARCA, A.L.; FADROSH, D.W.; NIKITA,
26 L.; GALUPPI, M.; LAMONT, R.F.; CHAEMSAITHONG, P.; MIRANDA, J.;
27 CHAIWORAPONGSA, T.; RAVE, J.L. The composition and stability of the vaginal
28 microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women.
29 **Microbiome**, v.2, 2014.
30
31 SINGER, M.; BORG, M.; OUBURG, S.; MORRÉ, S.A. The relation of the vaginal
32 microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment—A
33 meta-analysis. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v.48,
34 p. 223–229, 2019.

- 1
2 SPEAR, G.T.; FRENCH, A.L.; GILBERT, D.; ZARIFFARD, M.R.; MIRMONSEF, P.;
3 SULLIVAN, T.H.; SPEAR, W.W.; LANDAY, A.; MICCI, S.; LEE, B.H.; HAMAKER, B.R.
4 Human α -amylase Present in Lower-Genital-Tract Mucosal Fluid Processes Glycogen
5 to Support Vaginal Colonization by Lactobacillus. **J. Infect. Dis.**, v.210, p.1019–1028,
6 2014.
- 7
8 SRINIVASAN, M.; ADNANE, M.; ARCHUNAN, G. Significance of cervico-vaginal
9 microbes in bovine reproduction and pheromone production – A hypothetical review.
10 **Research in Veterinary Science**, v.135, p.66–71, 2021.
- 11
12 SWARTZ, J.D.; LACHMAN, M.; WESTVEER, K.; O'NEILL, T.; GEARY, T.; KOTT,
13 R.W.; BERARDINELLI, J.G.; HATFIELD, P.G.; THOMSON, J.M.; ROBERTS, A.;
14 YEOMAN, C.J. Characterization of the Vaginal Microbiota of Ewes and Cows Reveals
15 a Unique Microbiota with Low Levels of Lactobacilli and Near-Neutral pH. **Front Vet**
16 **Sci.** v.1, p.1-10, 2014.
- 17
18 TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.;
19 GORDON, J. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy
20 harvest. **Nature**, v. 444, p. 027–1031, 2006.
- 21
22 WANG, Y.; WANG, J.; LI, H.; FU, K.; PANG, B.; YANG, Y.; et al. Characterization of
23 the cervical bacterial community in dairy cows with metritis and during different
24 physiological phases. **Theriogenology**, v.108, p.306–313, 2018.

1 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

2 Até o momento, a pesquisa sobre o microbioma forneceu muitas descobertas
3 básicas e fundamentais para o início da compreensão sobre a interação das bactérias
4 com o hospedeiro e o meio que o cerca. Com o desenvolvimento de tecnologias
5 avançadas para sequenciar o material genético, principalmente em nível de espécie,
6 situações ou diagnósticos que por muito tempo eram inexplicáveis estão passando a
7 ser compreendidos.


8 Para continuar garantindo um avanço em potencial, é necessária uma melhor
9 comparação dos dados, o que exigirá padrões e protocolos mais harmonizados e
10 amplamente aceitos. Tendo em vista que o interesse pelo tema da microbiota se
11 expandiu para diversos grupos de pesquisa e atualmente as bactérias e suas funções
12 vêm sendo estudadas em diferentes especificidades. Neste sentido, o
13 sequenciamento metagenômico permite o rastreamento de populações bacterianas e
14 a sua utilização como ferramentas de diagnóstico preditivo são esperadas no futuro
15 próximo. Pesquisadores acreditam que em alguns anos uma fêmea possa com um
16 simples exame de *swab* vaginal, por meio de um teste rápido, ter seu potencial
17 reprodutivo ou os riscos de desenvolver patologias conhecido, viabilizando medidas
18 preventivas.

19 Somado a isso, a possibilidade de identificar aqueles animais predispostos a
20 distúrbios reprodutivos é interessante para o produtor. Pois, assim será possível retirá-
21 los do rebanho e minimizar as perdas econômicas, mantendo uma seleção mais
22 criteriosa das matrizes leiteiras. A chave para novos estudos é por um lado, modular
23 as comunidades bacterianas estimulando ou introduzindo bactérias benéficas por
24 meio de probióticos e transplante de microbiota, para promover a eficiência
25 reprodutiva, e, por outro lado, identificar aquelas bactérias com predisposição a causar
26 doenças. Ou seja, para se haver um cuidado mais personalizado e eficaz, novas
27 ferramentas como marcadores biológicos para boas reprodutoras ou para animais
28 problemas devem ser gerados.

29 Portanto, especificamente para a reprodução, pesquisas futuras precisam
30 esclarecer completamente o papel de todas as variáveis, as dependências e a
31 interação entre o microbioma, o ambiente, influências hormonais e o hospedeiro.

1
2
3**ANEXO A**

Certificado Emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade 2
Estadual de Londrina (CEUA/UEL).

 UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 93/2019 Londrina, 06 de agosto de 2019.


Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "**Caracterização da microbiota vaginal de vacas leiteiras em diferentes fases do ciclo estral**" protocolo CEUA n° **10878,2019.88** sob a responsabilidade de **Marcelo Marcondes Seneda**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **23/07/2019**.

Este projeto tem por objetivo avaliar os aspectos reprodutivos que possam alterar a microbiota de bovinos leiteiros utilizando o sequenciamento de nova geração. Grau de Invasividade: 1

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	06/08/2019 a 31/07/2021
Espécie/ linhagem/ raça	Bovino/Raça Holandesa e Girolando
N° de animais	80
Peso/ Idade	450-650 kg/ 4-8 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazendas localizadas na região de Castro-Paraná e Rolim de Moura-Rondonia
Amostras a serem coletadas	Secreção vaginal

Cumpramos orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.
Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,


Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Vice- Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a). Marcelo Marcondes Seneda
Responsável pelo projeto
Departamento de Clínicas Veterinárias/CCA
C/C para a Chefia do Depto. de Clínicas Veterinárias/CCA
C/C para a Direção de Centro do CCA

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cal (PR-445), Km 200 - Fone (043) 3371-6000 PARANÁ - Fax 3328-4400 - Caixa Postal 18.011 - CEP 86057-070 - Internet: <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

4