

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Bárbara de Andrade Alves

Desenvolvimento da microbiota nasofaringeana em bezerros Holandês

Belo Horizonte
2025

Bárbara de Andrade Alves

Desenvolvimento da microbiota nasofaringeana em bezerros Holandês

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Rodrigo Melo Meneses

Coorientadores: Antônio Último de Carvalho
Flávia Figueira Aburjaile

Belo Horizonte

2025

A474d Alves, Bárbara de Andrade, 1994-
Desenvolvimento da microbiota nasofaríngea em bezerras Holandês/
Bárbara de Andrade Alves.- 2025.
82 f. il.

Orientador: Rodrigo Melo Meneses
Coorientadores: Antônio Último de Carvalho
Flávia Figueira Aburjaile

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Bibliografia f. 67 a 82.

1. Bovino – Doenças - Teses – 2. Aparelho respiratório – Teses – 3. Ciência Animal – Teses - I. Meneses, Rodrigo Melo_- II. Carvalho, Antônio Último de – III. Aburjaile, Flávia Figueira – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO
BÁRBARA DE ANDRADE ALVES

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **DOUTOR(a)** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Medicina e Cirurgia Veterinárias**. Defesa da tese intitulada: "**Desenvolvimento da microbiota nasofaríngea em bezerros Holandês**".

Aprovado(a) em 29 de dezembro de 2025, pela banca constituída pelos membros:

- Dr.(a). Rodrigo Melo Meneses - Orientador(a) - Presidente
Dr.(a). Antonio Ultimo de Carvalho
Dr.(a). Tiago Facury Moreira
Dr.(a). Rodrigo Otavio Silveira Silva
Dr.(a). Luiz Carlos Fontes Baptista Filho
Dr.(a). João Paulo Andrade



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Melo Meneses, Professor do Magistério Superior**, em 29/12/2025, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Otavio Silveira Silva, Professor do Magistério Superior**, em 29/12/2025, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Paulo Andrade, Usuário Externo**, em 29/12/2025, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Fontes Baptista Filho, Usuário Externo**, em 29/12/2025, às 18:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Ultimo de Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 29/12/2025, às 18:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Facury Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 29/12/2025, às 19:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4835016** e o código CRC **B94C447E**.

Aos meus pais, sempre esteio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a quem confio o rumo da minha vida.

Aos meus pais Marileide e Erivan, e à minha irmã Rayssa, pelo apoio incondicional, confiança e amor. Por meio de seus ensinamentos e dedicação inigualáveis, pude me tornar quem sou. Obrigada por serem a base na qual construí e construo minha vida. Sem vocês, nada disso faria sentido.

Aos professores da Clínica de Ruminantes da UFMG: Elias Facury e Tiago Facury, que contribuíram enormemente para minha formação com seus ensinamentos e exemplos de conduta. Ao professor Antônio Último, quem primeiro nos instigou para esse caminho e ao professor Rodrigo Meneses, que assumiu esse desafio comigo, pelo constante apoio e incentivo e por serem exemplo que carregarei comigo para sempre. Concluo esta etapa com a consciência de meu grande crescimento, não apenas profissional, mas também pessoal.

À professora Flávia Aburjaile, que apostou no nosso projeto. Sem sua parceria, nada disso seria possível. Agradeço toda a atenção e carinho durante todo esse período.

À toda equipe da Clínica de Ruminantes pela ajuda e companheirismo. Aos residentes, que sempre me acolheram e se desdobraram para me ajudar no que podiam. Aos colegas da pós-graduação, que compartilharam experiências e desafios. Aos alunos de graduação, que sempre estiveram a postos para contribuir e participar. Em especial, agradeço aos amigos que levarei para sempre: Gabi, Guilherme, João Pedro, Markus, Enzo, Stela, Isabela, Gisele, Gislaine e Juliano.

Ao professor Bertram Brenig e sua equipe (Eda, Sabrina e Stephen) por me receberam em Göttingen e contribuírem imensamente com a minha formação.

À Escola de Veterinária da UFMG e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por viabilizarem a realização do projeto.

À CAPES e FAPEMIG pelas bolsas e apoio via Programa de Pós-Graduação.

“Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa.”
(Guimarães Rosa)

RESUMO

A compreensão da dinâmica de colonização bacteriana da nasofaringe de bezerros pode trazer respostas importantes em relação a ocorrência de doença respiratória em bovinos e o potencial de manipulação dessa microbiota. Este é o primeiro estudo a analisar essa dinâmica no Brasil. O objetivo do trabalho foi caracterizar a microbiota bacteriana da nasofaringe de bezerros Holandês saudáveis entre 3 e 56 dias de vida. Amostras de *swab* nasofaríngeo foram coletadas de seis bezerros Holandês aos 3, 7, 14, 28, 42 e 56 dias de vida e realizou-se o sequenciamento das regiões V3/V4 do RNA ribossomal 16S. Avaliação clínica foi realizada ao longo do período do estudo para considerar possíveis eventos de saúde que pudessem interferir nas análises metagenômicas. Os filos mais abundantes detectados foram Proteobacteria (89,84%), Actinobacteria (4,93%) e Firmicutes (4,15%). O filo Proteobacteria predominou em todas as amostras, dominância impulsionada principalmente pelos gêneros *Pseudomonas* spp. e *Stenotrophomonas* spp. Ao agrupar os dias de coleta em Período 1 (3, 7 e 14 dias) e Período 2 (28, 42 e 56) dias, observou-se uma diferença significativa na composição da microbiota entre os períodos e uma menor diversidade no Período 2 ($p < 0,05$). A diversidade da microbiota nasofaríngeo de bezerros diminuiu ao longo do tempo, e essa mudança coincide com alterações na dieta e no estado imunológico desses animais, além de coincidir com o momento de início de ocorrência de broncopneumonias nesta espécie, podendo ser um fator que contribuiu para explicar este fato. Os resultados deste estudo, especialmente a mudança ecológica nasofaríngeo que ocorre por volta dos 28 dias de idade, ajudam a elucidar a dinâmica de colonização inicial do trato respiratório superior de bovinos e podem servir de base para estratégias de prevenção da ocorrência de doenças respiratórias em bezerros.

Palavras-chave: nasofaringe; bovinos; trato respiratório; colonização bacteriana.

ABSTRACT

Understanding the dynamics of bacterial colonization of the nasopharynx in calves can provide important answers regarding the occurrence of respiratory disease in cattle and the potential for manipulating this microbiota. To the best of our knowledge, this is the first study to analyze this dynamic in Brazil. The objective of this study was to characterize the bacterial microbiota of the nasopharynx of healthy Holstein calves between 3 and 56 days of age. Nasopharyngeal swab samples were collected from six Holstein calves at 3, 7, 14, 28, 42, and 56 days of age, and sequencing of the V3/V4 regions of 16S ribosomal RNA was performed. Clinical evaluation was performed throughout the study period to account for possible health events that could interfere with the metagenomic analyses. The most abundant phyla detected were Proteobacteria (89.84%), Actinobacteria (4.93%), and Firmicutes (4.15%). The phylum Proteobacteria predominated in all samples, with dominance driven mainly by the genera *Pseudomonas* spp. and *Stenotrophomonas* spp. When grouping the collection days into Period 1 (3, 7, and 14 days) and Period 2 (28, 42, and 56 days), a significant difference was observed in the composition of the microbiota between the periods, with lower diversity in Period 2 ($p < 0.05$). The diversity of the nasopharyngeal microbiota of calves decreases over time, and this change coincides with changes in the diet and immune status of these animals, as well as coinciding with the onset of bronchopneumonia in this species, which may be a factor that helps explain this fact. The findings of this study, especially the nasopharyngeal ecological shift that occurs around 28 days of age, help to elucidate the dynamics of initial colonization of the upper respiratory tract in cattle and may serve as a basis for prevention strategies for the occurrence of respiratory diseases in calves.

Keywords: nasopharynx; cattle; respiratory tract; bacterial colonization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1 – Vacinas contra patógenos do sistema respiratório de bovinos com autorização para comercialização no Brasil.....40
- Figura 1 – Gráfico de barras apresentando a abundância relativa dos 10 filós mais abundantes nas amostras de nasofaringe de bezerros em aleitamento, separadas pelos dias de coleta. Cada barra representa uma amostra individual, enquanto as diferentes cores indicam os distintos filós. As proporções dos filós são apresentadas como porcentagem do total de sequências em cada amostra.....54
- Figura 2 – Gráfico de barras apresentando a abundância relativa das 10 OTUs mais abundantes nas amostras de nasofaringe de bezerros em aleitamento, separadas pelos dias de coleta. Cada barra representa uma amostra individual, enquanto as diferentes cores indicam as distintas OTUs. As proporções das OTUs são apresentadas como porcentagem do total de sequências em cada amostra.....54
- Figura 3 – Box-plot da comparação de abundância relativa dos 10 filós mais abundantes identificados nas amostras de nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento, separados pelos dias de coleta.....55
- Figura 4 – Gráfico de barras da comparação de abundância relativa das 10 OTUs mais abundantes identificados nas amostras de nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento, separados pelos dias de coleta56
- Quadro 2 – Avaliação ad hoc do teste de permutação para homogeneidade de dispersões multivariadas (comparação em pares) das comunidades bacterianas da nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento.....56
- Figura 5 – Representação em PCoA (Principal Coordinates Analysis) das comunidades microbianas da nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento, coletadas nos períodos 1 (03, 07 e 14 dias de idade) e 2 (28, 42 e 56 dias de idade). Cada ponto no gráfico corresponde a uma amostra, colorido de acordo com o período de coleta. As elipses representam a dispersão das amostras em torno da média de cada período, com nível de confiança de 95%. A análise foi baseada na abundância das OTUs, utilizando a métrica de dissimilaridade de Bray-Curtis. A proximidade entre pontos reflete a similaridade nas comunidades microbianas entre as amostras.....57
- Figura 6 – Índices de diversidade (índice de Shannon e índice de Simpson) e riqueza de espécies das comunidades microbianas da nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento, coletadas nos períodos 1 (03, 07 e 14 dias de idade) e 2 (28, 42 e 56 dias de idade). * indica diferença estatística ($p < 0.05$).....57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Aspectos anátomo-fisiológicos do sistema respiratório de bovinos	15
3.1.1. Desenvolvimento e características topográficas do sistema respiratório de bovinos	15
3.1.2. Fisiologia respiratória de bovinos	18
3.1.3. Sistema imune de bezerros	20
3.1.4. Imunidade de mucosas	23
3.2. Microbioma respiratório bovino	27
3.2.1. Colonização microbiana em bovinos	27
3.2.2. Composição da microbiota respiratória bovina	30
3.2.3. Fatores que afetam a colonização e manutenção da microbiota respiratória	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1.1. Local e animais amostrais	49
4.1.2. Avaliação clínica	50
4.1.3. Coleta e processamento de amostras	50
4.1.4. Extração de DNA e sequenciamento genético	51
4.1.5. Análise bioinformática e estatística	51
5. RESULTADOS	52
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO	62
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
9. PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, muitos esforços foram despendidos para a compreensão do Complexo Doença Respiratória Bovina, com foco principal nos agentes etiológicos, no desenvolvimento e produção de vacinas e no tratamento destas enfermidades. Contudo, poucos foram os avanços observados na diminuição da morbidade e mortalidade causadas por este complexo (Smith *et al.*, 2020). Ainda hoje, as doenças respiratórias figuram entre as principais enfermidades que acometem e matam bezerros em sistemas de produção de leite (USDA, 2014) e a compreensão dos fatores de risco envolvidos na ocorrência dessas doenças e o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos diagnósticos acurados e precisos são considerados pontos cruciais para enfrentar as doenças respiratórias em bovinos nas próximas décadas (Smith *et al.*, 2020).

Entretanto, no atual prisma da avaliação da ocorrência de doenças respiratórias em mamíferos, temos que mudanças adaptativas do ecossistema respiratório são determinantes para o desenvolvimento de pneumonias (Dickson *et al.*, 2014). Assim, o conhecimento mais aprofundado da dinâmica da microbiota respiratória durante os estágios de saúde e doença também deve ser considerado um importante pilar para o enfrentamento das pneumonias em bovinos nos próximos anos. Nestes animais, já há alguns anos compreende-se a ocorrência das broncopneumonias bacterianas como uma consequência de desequilíbrios na microbiota do trato respiratório superior, notadamente da nasofaringe. Estas alterações podem decorrer de mudanças ambientais (temperatura, alta amplitude térmica, umidade, presença de agentes irritantes no ar, entre outros fatores), infecções virais primárias e/ou alterações no hospedeiro (desidratação, alterações imunes, entre outras alterações) (Ackermann *et al.*, 2010).

O entendimento da formação da microbiota nasofaringeana de bezerros é, portanto, de extrema importância, pois ela tem um papel chave na resistência à colonização por patógenos respiratórios (Holman *et al.*, 2015; Zeineldin *et al.*, 2017). As principais bactérias implicadas na ocorrência de broncopneumonias em bovinos (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma spp.*) (Griffin *et al.*, 2010) compõem a microbiota nasofaringeana de animais

saudáveis, o que ressalta a importância de um equilíbrio microbiano que impeça sua proliferação descontrolada (Allen *et al.*, 1991; Ackermann *et al.*, 2010).

Assim, se faz necessário conhecer a microbiota (comunidade microbiana) que habita o trato respiratório de bovinos, bem como o microbioma (inclui a microbiota, elementos microbianos estruturais, metabólitos microbianos, elementos estruturais externos [condições do ambiente que aloja a microbiota]) (Berg *et al.*, 2020) respiratório de bovinos. Mais do que isso, o entendimento da formação da microbiota respiratória e da influência da microbiota materna, do ambiente e das práticas de manejo nesse processo pode nos ajudar a entender melhor o processo de estabelecimento das infecções respiratórias e o impacto dos fatores de risco associados a elas em bezerros.

Ainda não é claro o período de formação da microbiota nasofaringeana de bezerros até sua estabilização, mas sabe-se que as comunidades microbianas que colonizam os diversos sistemas dos bovinos sofrem influência ambiental desde o nascimento destes animais e diversas adaptações ocorrem ao longo de suas vidas (Timsit *et al.*, 2016; Holman *et al.*, 2017). A estabilização da composição do microbioma gastrointestinal bovino parece ocorrer a partir dos seis meses de idade, com importantes mudanças ocorrendo durante a fase de aleitamento (até dois meses de idade) (Jami *et al.*, 2013; Malmuthuge *et al.*, 2014). Se considerarmos que algo similar ocorre no microbioma respiratório, o período de início da ocorrência de broncopneumonias em bezerros (geralmente a partir da terceira semana de vida) (McGuirk e Peek, 2014; Mahendran, 2020), está inserido numa fase de instabilidade da microbiota de bovinos, particularmente da nasofaringeana.

Além disso, a fase inicial da vida de bezerros também é marcada por significativas mudanças na alimentação e no sistema imune. O aumento gradual do consumo de leite e alimentos sólidos influencia na formação da microbiota do trato digestório (Jami *et al.*, 2013), que, por sua vez, pode influenciar no desenvolvimento da microbiota do trato respiratório (Uddin *et al.*, 2024). Em relação ao sistema imune, esta fase é caracterizada pela diminuição da imunidade passiva materna e pelo desenvolvimento progressivo do sistema imune ativo (Chase, 2022), bem como pela ação das imunoglobulinas maternas como fatores moduladores da resposta imune inicial destes bezerros (Chattha *et al.*, 2009). Essas adaptações imunes, em conjunto,

têm o potencial de modular a microbiota, visto que têm relação direta com o reconhecimento dos microrganismos que a compõem pelo sistema imune mucoso no início da vida.

Esses fatores, juntamente com a influência da microbiota materna, do ambiente e das práticas de manejo (Timsit *et al.*, 2016b; Holman *et al.*, 2017), podem modular a microbiota nasofaringeana de forma a torná-la mais ou menos suscetível a infecções respiratórias. Assim, a compreensão mais profunda da dinâmica da colonização microbiana nesse período de vulnerabilidade e transição é fundamental para traçar novas estratégias de controle e prevenção das broncopneumonias bacterianas em bezerros.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Caracterizar a microbiota bacteriana da nasofaringe de bezerros Holandês saudáveis durante as primeiras oito semanas de vida.

2.2. Objetivos específicos

- Revisar os principais pontos relacionados ao desenvolvimento do trato respiratório e do sistema imune de bovinos, bem como a colonização e composição da microbiota respiratória bovina;
- Avaliar a evolução da composição da microbiota nasofaringeana de bezerros ao longo do período de aleitamento;
- Avaliar a diversidade alfa das comunidades bacterianas da nasofaringe de bezerros em aleitamento;
- Avaliar a abundância relativa de filós e OTUs da nasofaringe de bezerros em aleitamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos anátomo-fisiológicos do sistema respiratório de bovinos

Características anatômicas e fisiológicas do sistema respiratório de bovinos são determinantes para a manutenção da saúde respiratória e podem influenciar a formação e composição da microbiota local. O desenvolvimento desse sistema tem início na vida embrionária e a maturação de suas principais funções continuam após o nascimento. A formação da microbiota, por sua vez, ocorre de forma concomitante e é capaz de modular essa maturação, especialmente do sistema imune.

3.1.1. Desenvolvimento e características topográficas do sistema respiratório de bovinos

O trato respiratório de bovinos começa a ser formado ainda na fase embrionária, a partir dos 30 dias de gestação, e continua até os 260 dias, quando o desenvolvimento alveolar se completa (De Zabala e Weinman, 1984). Dessa forma, bezerros nascem com alvéolos totalmente desenvolvidos e alterações pós-parto recaem sobre diferenciações no epitélio bronquiolar, até os 30 dias de vida, e aumento do volume pulmonar, acompanhando o crescimento dos animais e o aumento da exigência respiratória (Castleman e Lay, 1990)

As primeiras horas após o nascimento (até 4 horas, como demonstrado em humanos e cordeiros) (Blank *et al.*, 2018; Pryor *et al.*, 2022) são um período de transição, associado à remoção de fluido pulmonar e abertura completa dos alvéolos com as primeiras respirações e com a ação dos surfactantes (Pryor *et al.*, 2022).

Anatomicamente, pode-se dividir o trato respiratório em superior (TRS), que compreende cavidade nasal, faringe e laringe; e inferior (TRI), compreendendo traqueia, brônquios, bronquíolos e parênquima pulmonar (Singh, 2018). Cada um desses sítios apresenta uma ecologia própria, com alterações de temperatura, pH, pressão de oxigênio (pO_2) e de gás carbônico (pCO_2), e possui características particulares na sua conformação, composição da mucosa e microbiota e mecanismos de defesa imune inatos e adaptativos (Chase, 2022; Robinson, 2014b).

A cavidade nasal é a porção do trato respiratório que mais sofre influências do ambiente externo e nela ocorre o condicionamento do ar inspirado, através do ajuste da temperatura, de forma a nivelá-la à temperatura corporal antes que o ar chegue à

nasofaringe e vias respiratórias inferiores, e umidade. Devido a esta influência externa, a microbiota da cavidade nasal é menos densa do que a nasofaringeana e o pH (aproximadamente 6,3) e pCO_2 são mais baixos do que no restante do trato respiratório. As adequações de temperatura e umidade do ar inspirado, por sua vez, ocorrem quase que totalmente na cavidade nasal, que o prepara para a chegada ao restante do trato respiratório (Chai *et al.*, 2022; Robinson, 2014b; Timsit *et al.*, 2018a).

A nasofaringe é o local de maior densidade microbiana do trato respiratório de bovinos. Sua microbiota comensal é composta por bactérias patogênicas e não patogênicas que competem por substratos e sítios de ligação e, quando este ambiente está em equilíbrio, favorece bactérias não patogênicas (Timsit *et al.*, 2020). Desequilíbrios no ambiente nasofaringeano, por sua vez, podem levar ao desenvolvimento de doenças respiratórias, ao diminuir a diversidade microbiana e aumentar a prevalência de bactérias patogênicas sobre as não patogênicas (Nicola *et al.*, 2017; Timsit *et al.*, 2018b, 2020), o que justifica os mecanismos de regulação de temperatura e umidade da cavidade nasal. Na nasofaringe, a pO_2 ainda se mantém como a da cavidade nasal, mas já há um aumento da pCO_2 e de pH (aproximadamente 7,0) (Chai *et al.*, 2022).

O epitélio que recobre o TRS é do tipo pseudoestratificado ciliado e, entre as células epiteliais, há a presença de células caliciformes e glândulas submucosas. Uma camada de muco reveste esse epitélio e compõe o aparelho mucociliar (Liebich, 2019), cujos demais componentes e funções serão discutidos em seguida.

No TRI, os bovinos possuem uma árvore traqueobrônquica relativamente longa e estreita que, conseqüentemente, apresenta uma maior quantidade de espaço morto, turbilhonamento e suspensão de partículas em relação a outras espécies domésticas (Kirschvink, 2008). Um espaço morto maior constitui uma maior área de superfície para a deposição de particulados e maior tempo de circulação de gases e partículas nas vias aéreas inferiores (Ackermann *et al.*, 2010; Coutinho, 2004), o que afeta a colonização e manutenção da microbiota residente (McMullen *et al.*, 2020).

O epitélio do TRI mantém as características do epitélio das vias aéreas superiores na traqueia e brônquios. Os bronquíolos apresentam uma camada epitelial mais estreita (camada única de células ou pneumócitos do tipo II) intercalada por

células Clara, cuja função se assemelha à das células caliciformes. Os alvéolos são formados também por uma camada única de pneumócitos do tipo I, com a presença de pneumócitos do tipo II produtores de surfactante, que nos alvéolos substituem o muco no revestimento do epitélio (Ackermann et al., 2010).

No TRI temos o pH mais alto do trato respiratório (aproximadamente 7,5), e a pO_2 diminui gradativamente, até chegar aos alvéolos em 100 mmHg, ao passo que a pCO_2 aumenta até chegar aos alvéolos em 40 mmHg, valores importantes para ocorrência das trocas gasosas no local ao contrastarem com a pO_2 e pCO_2 dos capilares sanguíneos alveolares (40 mmHg e 46 mmHg, respectivamente) (Chai et al., 2022; Robinson, 2014a).

Ainda em relação a características anatômicas do sistema respiratório, temos, nos grandes animais, um tórax menos complacente que nos pequenos. Assim, conforme o crescimento, o tórax, que deve ser complacente para a passagem do bezerro pelo canal do parto, vai se tornando mais rígido. Essa característica é importante no contexto da ocorrência da atelectasia, mais comum, portanto, em bezerros, do que em animais adultos. A conexão dos pulmões com o tórax, via ligação entre as pleuras parietal e torácica pelo líquido pleural, dá suporte aos pulmões e evita seu colapso (Robinson, 2014b). Ainda, os pulmões dos bovinos são separados em lobos por septos de tecido conjuntivo (septos interlobulares), que, por si só, limitam a comunicação entre eles e aumentam a resistência do parênquima, o que também contribui para diminuição da complacência pulmonar (Ackerman *et al.*, 2010). A ventilação colateral também está reduzida nos bovinos devido à falta de comunicação broncoalveolar (canais de Lambert), poros alveolares (poros de Kohn), e conexões interbronquiolares (canais de Martin), o que precipita a atelectasia e dificulta a recuperação das áreas consolidadas (Robinson, 2014b).

Por fim, é importante destacar a presença do brônquio traqueal nos bovinos. Este brônquio tem origem cranialmente à bifurcação da traqueia, de onde partem os brônquios que ventilam os demais lobos pulmonares e ventila o lobo cranial do pulmão direito (Dyce *et al.*, 2010). A presença deste brônquio influencia o trajeto de patógenos e a dinâmica de infecções bacterianas aerógenas nos pulmões, caso das broncopneumonias que acometem bezerros, e que geralmente têm sua distribuição inicial neste lobo pulmonar (Binversie *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2025).

Para além dos aspectos anatômicos e ecológicos do sistema respiratório, as funções do sistema respiratório bovino se correlacionam com a ocorrência e a resposta dos animais frente aos desafios impostos pelo ambiente e por patógenos microbianos. Assim, o conhecimento dos processos fisiológicos do sistema respiratório de bovinos contribui para o entendimento pleno da sua relação com o meio externo, com a microbiota residente e frente a possíveis infecções.

3.1.2. Fisiologia respiratória de bovinos

A função primordial do sistema respiratório é promover o transporte de oxigênio e dióxido de carbono entre o meio ambiente e os tecidos, embora também desempenhe funções não respiratórias, como as relacionadas a mecanismos de defesa local (que terão tópicos dedicados), produção de linfa e fluido pleural, e funções metabólicas (remoção e inativação de hormônios e toxinas do sangue) (Robinson, 2014b).

A troca de oxigênio e dióxido de carbono entre alvéolo e sangue capilar pulmonar ocorre por difusão, dependendo, portanto, de um gradiente de pressão dirigida (diferença entre a tensão desses gases nos alvéolos e capilares alveolares), favorável a esta troca. Ela se dá através da barreira hematoaérea nos pulmões, que possui de 0,2 a 0,6 μm , e é composta por uma camada de líquido e surfactantes recobrando internamente os alvéolos; pelo epitélio alveolar; pela membrana basal; pelo espaço intersticial entre o epitélio alveolar e o endotélio capilar; pela membrana basal do endotélio; e pelo endotélio capilar em si (Jana *et al.*, 2023).

A tensão de oxigênio nos alvéolos é de cerca de 100 mmHg em um animal em repouso, enquanto nos capilares alveolares é de aproximadamente 40 mmHg, o que gera um gradiente de pressão dirigida de 60 mmHg, levando a uma rápida difusão do oxigênio no capilar, onde se combina com a hemoglobina. Em condições normais, no animal em repouso, o equilíbrio entre as tensões de oxigênio alveolar e capilar se dá em 0,25 segundo. Em um pulmão doente, contudo, a difusão do oxigênio pode ser impedida em decorrência de eventos como inflamação ou edema, que podem aumentar a espessura da barreira hematoaérea ou reduzir a área de superfície disponível para a troca gasosa (Robinson, 2014a).

A tensão de dióxido de carbono, por sua vez, é de cerca de 46 mmHg nos capilares alveolares e de 40 mmHg nos alvéolos, gerando uma pressão dirigida para sua difusão de 6 mmHg. A pressão dirigida de dióxido de carbono é menor que a de oxigênio, pois sua solubilidade é 20 vezes maior, o que resulta numa capacidade de difusão por minuto similar à de oxigênio. Pela mesma razão, a difusão de dióxido de carbono entre o sangue e os alvéolos raramente é afetada por doenças pulmonares (Robinson, 2014a; Jana et al., 2023).

Outro componente fundamental para o adequado funcionamento do sistema respiratório é o surfactante pulmonar, que impede o colapso dos alvéolos, ao diminuir a tensão superficial criada pela camada de líquido que recobre o interior deles. O surfactante, produzido pelos pneumócitos do tipo II, é uma mistura de lipídios e proteínas (Robinson, 2014a; Jana et al., 2023). A dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) é a fração lipídica mais abundante e é a principal responsável pela redução da tensão superficial. No componente proteico, destacam-se as proteínas surfactantes (*surfactant protein* [SP]) A, B, C e D. Enquanto SP-B e SP-C são hidrofóbicas e atuam em conjunto a DPPC na redução da tensão superficial dos alvéolos, SP-A e SP-D são hidrofílicas e desempenham funções importantes na defesa antimicrobiana inata, inativando agentes microbianos através da ligação de domínios de reconhecimento de carboidratos com resíduos de manose presentes nos patógenos (Robinson, 2014a; Grubor et al., 2006; Jana et al., 2023). Uma vez ligados, o resultante complexo patógeno e proteína surfactante é fagocitado por macrófagos alveolares. A SP-A também pode ser absorvida pelo sistema de drenagem linfática pulmonar e chegar à circulação sanguínea, enquanto a SP-D normalmente está presente apenas nos alvéolos. Quando há inflamação pulmonar, entretanto, a permeabilidade alveolar aumenta e a SP-D pode ser detectada na corrente sanguínea (McClenahan et al., 2008). Bezerros com pneumonia apresentam significativo aumento sérico de SP-A e SP-D, com redução após o tratamento, bem como redução na concentração sérica de DPPC durante a infecção, validando-os como biomarcadores eficazes para o diagnóstico e monitoramento da doença (Dezfouli et al., 2017).

Dentre as funções não respiratórias, os mecanismos de defesa locais ao longo de todo trato respiratório são críticos para manutenção da saúde pulmonar de bezerros. Para melhor entendê-lo, contudo, é necessário colocá-lo em contexto,

compreendendo sua atuação dentro de um sistema imune que está passando por importantes adaptações no início da vida desses animais.

3.1.3. Sistema imune de bezerros

O sistema imune merece destaque no entendimento da dinâmica de formação e desenvolvimento do ecossistema respiratório de bezerros. O início da vida dos bovinos é marcado por importantes adaptações na imunidade desses animais, com destaque para sua relação com os microrganismos que passam a colonizar suas mucosas logo após o nascimento. Essa interação é particularmente relevante no sistema respiratório, pois interfere diretamente no processo saúde-doença desse sistema.

Assim, é necessário compreender como o sistema imune se desenvolve nas fases embrionária e fetal nesses animais e como se modifica nas primeiras semanas de vida, bem como é sua interação com a microbiota residente.

Ao nascer, o bezerro bovino possui todos os componentes imunológicos essenciais, mas eles não são totalmente funcionais. O desenvolvimento completo de algumas funções imunológicas pode se estender até a puberdade. Além disso, a placentação dos ruminantes é do tipo sinepiteliocorial (Leiser e Kaufmann, 1994). Isso implica na não transferência de imunoglobulinas maternas pela placenta, tornando o bezerro neonato agamaglobulinêmico (com concentrações irrisórias de imunoglobulinas circulantes) e dependente da transferência de imunidade passiva via ingestão de colostro nas primeiras horas de vida (Godden *et al.*, 2019).

Logo após o nascimento, os bezerros são expostos a uma alta carga microbiana no ambiente e, embora sejam capazes de montar uma resposta imune a partir dos mecanismos de imunidade inata que desenvolveram ainda na fase fetal, são mais bem caracterizados nesse momento da vida como imunologicamente ingênuos (Barrington e Parish, 2001). Essa incapacidade de iniciar uma resposta imune eficaz é atribuída à imaturidade dos mecanismos de proteção e ao atraso no início e na produção dos mecanismos necessários para a geração da imunidade humoral e celular (Cangiano *et al.*, 2024).

A imunidade celular do neonato bovino é caracterizada por uma atividade fagocitária de neutrófilos e macrófagos reduzida (Kampen *et al.*, 2006) , embora melhore significativamente após a ingestão de colostro; por um número reduzido de células dendríticas, com menor capacidade de apresentação de antígenos; por uma menor frequência de células *natural killer* (NK) na primeira semana de vida, aumentando para níveis estáveis apenas entre seis e oito semanas de vida e por uma baixa proporção de linfócitos B na primeira semana de vida (4%) em comparação com bezerros de 6 meses de idade (30%) (Kampen *et al.*, 2006).

De modo geral, o sistema imunológico do bezerro neonato é modulado por um ambiente hormonal supressor. A placenta produz progesterona, prostaglandina E2 e citocinas (IL-4, IL-10) que suprimem as respostas imunes mediadas por células (resposta de perfil Th1) (Morein *et al.*, 2002). Além disso, a vaca e o bezerro produzem altos níveis de cortisol durante o parto, e este permanece elevado durante a primeira semana de vida do bezerro (Hoyer *et al.*, 1990; Jacob *et al.*, 2001). O aumento substancial do cortisol fetal antes do parto induz uma resposta de células T CD4+ com viés para o tipo Th2 (anti-inflamatório) nas primeiras semanas de vida. Isso estabelece um fenótipo de tolerância, prevenindo respostas imunes aberrantes contra alérgenos do novo ambiente (Harris e Barletta, 2001; Chase *et al.*, 2008).

Além dessa condição hormonal do bezerro, o colostro materno pode influenciar na sua resposta imune inicial. O colostro fornece não apenas imunoglobulinas, mas também leucócitos maternos, citocinas e outros componentes que ativamente promovem o desenvolvimento do sistema imunológico e atuam como fatores modulares da resposta imune do bezerro.

As imunoglobulinas transferidas ativamente do soro materno para a glândula mamária durante a colostrogênese são principalmente do subtipo IgG1, que representa mais de 75% das imunoglobulinas no colostro (Larson *et al.*, 1980). As IgG maternas presentes no colostro exercem uma ação imunossupressora sobre os linfócitos B ingênuos do bezerro. Essa interação, mediada pelo receptor de membrana celular FcγRII (CD32), limita a ativação e diferenciação dos linfócitos B do bezerro, permitindo que a imunidade passiva predomine enquanto o sistema imune do animal amadurece gradualmente (Minskoff *et al.*, 1998; Cangiano *et al.*, 2024).

Os leucócitos maternos, presentes em alta concentração no colostro (1 a 3 milhões de células/mL), estão presentes obedecendo a proporção de 40 a 50% de macrófagos, 25 a 37% de neutrófilos e 22 a 25% de linfócitos (Lee *et al.*, 1980; Liebler-Tenorio *et al.*, 2002; Reber *et al.*, 2005). Essas células podem ser absorvidas via parede intestinal do bezerro, entrar na corrente sanguínea e permanecer detectáveis por cerca de 36 horas. A ingestão de colostro integral (com leucócitos) acelera o desenvolvimento e a ativação dos linfócitos do bezerro e promove o desenvolvimento da função de apresentação de antígenos, um passo essencial para a resposta imune adquirida (Reber *et al.*, 2008).

O colostro parece promover, ainda, a expansão de linfócitos T gama delta ($\gamma\delta$). Em bovinos, essas células são o subconjunto linfocitário principal, representando mais de 50% de todos os linfócitos circulantes ao nascimento (Guzman *et al.*, 2014). Elas atuam como uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, com duas subpopulações funcionais principais: WC1.1+, que secretam IFN- γ e IL-17, fornecendo um mecanismo de defesa precoce contra infecções virais e bacterianas; e WC1.2+, que produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , exercendo uma função imunomoduladora (Hsu *et al.*, 2015; McGill *et al.*, 2013; Guerra-Maupome *et al.*, 2019; Baldwin *et al.*, 2021). O subconjunto WC1.2+ é o mais abundante após o nascimento, promovendo a tolerância imune durante a exposição a um grande número de novos antígenos (Cangiano *et al.*, 2024).

Por fim, o colostro contém citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) que podem auxiliar na migração de linfócitos neonatais para o intestino, promovendo o desenvolvimento imunológico normal (Chase *et al.*, 2008), e microrganismos (como *Staphylococcus* e *Streptococcus*) presentes na glândula mamária (Oliver *et al.*, 1992; Trinidad *et al.*, 1990) podem ativar células imunes imaturas e acelerar o desenvolvimento imunológico nos bezerros.

Esse perfil inicial de um sistema imune mais tolerante em bezerros é fundamental para o estabelecimento de uma microbiota comensal saudável e equilibrada. Os microrganismos que colonizam os animais a partir do nascimento têm que interagir com o sistema imune em um ambiente controlado, o que ajuda no desenvolvimento desse sistema e na formação de uma microbiota equilibrada e que possa exercer uma função de auxílio à proteção contra infecções. Um importante sítio

de interação microorganismo-hospedeiro são as mucosas, fazendo com que seja crucial o entendimento do sistema imune mucoso para a compreensão mais ampla da formação da microbiota e dos processos saúde-doença nos animais.

3.1.4. Imunidade de mucosas

O sistema imune de mucosas é a primeira barreira de defesa contra mais de 90% de patógenos em potencial. É um sistema integrado que reforça a barreira mucosa com respostas inatas e adaptativas, e tem papel no acionamento e regulação do sistema imune. Dessa forma, se considerado como uma unidade, é o maior órgão imune de animais e tem maior concentração de anticorpos que qualquer outro tecido (Chase e Kaushik, 2019).

Além de atuar contra patógenos, um papel importante da imunidade de mucosas é tolerar antígenos originados de componentes da dieta e a microbiota comensal, de maneira que haja um equilíbrio e o organismo possa entrar em contato com estes antígenos e microrganismos sem que o sistema imune reaja de forma indevida e/ou exacerbada (Chase, 2022).

O sistema imune mucoso se comunica e está interligado pela circulação de linfócitos pela corrente sanguínea entre os tecidos linfáticos associados às superfícies mucosas (MALT). Linfócitos T maduros e linfócitos B estimulados por antígenos a produzir IgA saem destes tecidos e, via corrente sanguínea, chegam à lâmina própria de mucosas (Brandtzaeg, 2011). Grande parte destas células retornam à superfície mucosa de origem, porém alguns podem migrar para mucosas diferentes. O retorno de linfócitos para outros MALTs pelo corpo configura o “sistema imune mucoso comum” (Mestecky, 1987; Wu e Russell, 1997).

O equilíbrio e saúde da mucosa dependem e têm como pilares de sua manutenção três estruturas distintas: a barreira mucosa; as células epiteliais mucosas; e as células imunes da lâmina própria (Chase e Kaushik, 2019).

A barreira mucosa consiste em muco e mucinas, secretados pelas células caliciformes na mucosa e que compõem a maior parte dela (Pelaseyed *et al.*, 2014; Zanin *et al.*, 2016); mas também de peptídeos antimicrobianos, produzidos no trato

respiratório pelas células epiteliais ciliadas; e imunoglobulina A secretora (slgA), o anticorpo predominante do sistema imune de mucosas e que é responsável por aglutinar agentes infecciosos, impedindo sua ligação às células epiteliais e neutralizando toxinas (Maynard *et al.*, 2012). A camada mais interna de muco, em contato direto com as células epiteliais, junto aos peptídeos antimicrobianos e slgA formam uma “zona de destruição”, dificilmente transposta por patógenos e até mesmo por microrganismos comensais (Chase, 2022).

A zona de destruição, o epitélio e a lâmina própria constituem juntos, por sua vez, uma forte barreira contra a invasão, conhecida como “*firewall* da mucosa” (Chase e Kaushik, 2019).

O epitélio da mucosa é a camada de células que recobre uma variedade de órgãos de sistemas diferentes. Trata-se de células epiteliais especializadas para desempenhar funções relacionadas ao funcionamento dos órgãos que recobre, mas também para desempenhar funções imunes, exercendo o papel de primeiro combate a microrganismos. A exemplo de outras células imunes, expressam receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors* [PRRs]), como os receptores do tipo *toll* (*toll-like receptors* [TLR]), para reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns* [PAMPs]) e ativar diferentes vias de sinalização para acionar o sistema imune (Belkaid e Hand, 2014). Além disso, essas células epiteliais são unidas por zonas de oclusão que promovem a formação de uma barreira física contra patógenos (Marchiando *et al.*, 2010) e, como já mencionado, produzem e secretam os peptídeos antimicrobianos que compõem a barreira mucosa.

Os PRRs expressos pelas células epiteliais da mucosa detectam componentes microbianos, como lipopolisacarídeos (LPS, oriundos de bactérias Gram-negativas). Os TLR, contudo, são expressos na membrana basal das células epiteliais, não nas suas superfícies apicais, fazendo com que sejam reguladas positivamente apenas quando a célula está infectada (Katwal *et al.*, 2019). Essa resposta é predominantemente anti-inflamatória, ao contrário das células imunes inatas que são pró-inflamatórias e atuam como células de primeira resposta. A resposta normal à sinalização pelos TLR é a resposta pró-inflamatória através da via do fator nuclear kappa B (FN-κB), porém o aumento na produção de muco pelas células caliciformes

da mucosa em resposta a metabólitos e microrganismos comensais afeta o epitélio mucoso levando-o a aumentar a produção de peptídeos antimicrobianos, a inibição do FN-κB e a produção do fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor beta* [TGF-β]), cuja ação é anti-inflamatória (Belkaid e Hand, 2014; Troy e Kasper, 2010). Este equilíbrio entre respostas anti- e pró-inflamatórias é crucial para a resolução dos processos inflamatórios e essa dinâmica se torna mais bem ajustada com a idade (Chase e Kaushik, 2019). Um dos mecanismos responsáveis por essa homeostase imune também é consequência das funções imunológicas das células epiteliais da mucosa. Elas expressam quimiocinas que são quimiotáticas para os linfócitos da lâmina própria, trazendo-os para o epitélio mucoso e provocando o aumento da produção de sIgA, redução da expressão de moléculas ativadoras de células apresentadoras de antígeno (como as células dendríticas), aumento do número e atividade de células T reguladoras e sua produção de citocinas anti-inflamatórias e interleucina 10 (IL-10) (Belkaid e Hand, 2014; Troy e Kasper, 2010). Além de todos esses mecanismos, a resposta adaptativa também faz parte desse processo e ocorre nos tecidos linfoides associados a mucosa (MALT). A interação do sistema imune com os diferentes tipos de antígeno são fundamentais para o estímulo e modulação desses processos e os microrganismos comensais desempenham função importante nessa modulação (Chase e Kaushik, 2019; Liebler-Tenorio e Pabst, 2006).

Os peptídeos antimicrobianos, também chamados defensinas, possuem diferentes ações antimicrobianas contra bactérias, fungos e alguns vírus envelopados. De modo geral, ligam-se à membrana desses microrganismos e atuam como enzimas líticas que promovem a formação de poros que causam efluxo de íons e nutrientes (Maldonado-Contreras e McCormick, 2011). Sua produção é estimulada pela presença de componentes ou produtos microbianos, bem como pelo sistema imune (Zhang e Gallo, 2016).

As zonas de oclusão, por sua vez, consistem em uma série de proteínas estruturais organizadas e reguladas de forma a controlar a passagem de moléculas através do espaço entre as células do epitélio (Marchiando et al., 2010). Distúrbios a estas zonas de oclusão levam o epitélio a se tornar mais permeável. Mais descrita no trato gastrointestinal, a síndrome inflamatória associada a estas alterações na função das zonas de oclusão é chamada síndrome do intestino permeável (ou “*leaky gut*”)

(Kvidera *et al.*, 2017). Esse aumento de permeabilidade, entretanto, também ocorre nos tratos respiratório e reprodutivo (Chase e Kaushik, 2019).

A lâmina própria é uma camada de tecido conjuntivo localizada logo abaixo do epitélio e que contém células de músculo liso, vasos sanguíneos e uma variedade de células imunes como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos e mastócitos.

Linfócitos B modificados em células plasmáticas presentes na lâmina própria produzem e secretam IgA dimérica, transportada pelos receptores de poli-immunoglobulina da membrana basal das células epiteliais até a superfície dessas células. Nesse local, esses receptores são clivados e o produto desse processo, o “componente secretor”, permanece ligado à IgA dimérica (conjunto nomeado IgA secretora [sIgA]) e protege a molécula de IgA contra a ação de enzimas proteolíticas, além de ser responsável por fixá-la a superfície mucosa (Maynard *et al.*, 2012).

O sistema respiratório apresenta algumas particularidades em relação ao funcionamento do sistema imune em sua mucosa. O epitélio mucoso do trato respiratório é formado pelas já mencionadas células epiteliais ciliadas, que são especializadas em eliminar partículas e patógenos que a todo momento chegam via respiração para impedi-los de chegar ao trato respiratório inferior via depuração mucociliar. A partir deste mecanismo, as partículas depositadas sobre a superfície do epitélio respiratório são transportadas até a faringe, onde serão deglutidas, ou levadas até a cavidade nasal. Essa “esteira mucociliar” se dá pela movimentação dos cílios alcançando a camada mucosa em que as partículas estão presas (Derscheid e Ackermann, 2013; Robinson, 2014b).

O tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT) é um excelente tecido alvo para vacinas com ação local, visto que apresenta uma grande quantidade de folículos linfóides e contém células M, que facilitam o acesso de antígenos ao sistema imune para formação de resposta adaptativa (Brandtzaeg, 2011; Osman *et al.*, 2018). Seu microbioma é rico e contém microrganismos comensais, mas também possíveis patógenos, como as principais bactérias implicadas nos casos de broncopneumonia em bezerros: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma bovis* (Osman *et al.*, 2018; Timsit *et al.*, 2016a).

O trato respiratório inferior possui um epitélio mucoso que desempenha as mesmas funções que o epitélio do trato respiratório superior. Nos alvéolos, contudo, o muco é substituído pelo surfactante, cuja principal função é a de manter a tensão superficial dos alvéolos e impedir que colabem, mas também estimula fagocitose (Bernhard, 2016). Além disso, a principal linha de defesa contra partículas inaladas e patógenos microbianos nos pulmões são os macrófagos alveolares (Robinson, 2014b). O tecido linfoide associado aos brônquios (BALT) também apresenta células M e produz IgA (Osman *et al.*, 2018). O microbioma do trato respiratório inferior, por sua vez, tem uma microbiota de menor densidade e complexidade que o nasofaríngeo. Em animais saudáveis, inclusive, espera-se a ausência de microrganismos nos alvéolos (Man *et al.*, 2017).

Assim, com o conhecimento de como se forma e funciona o sistema imune de bezerros, é possível compreender melhor sua relação com a microbiota, tanto passando por modulações mediadas por ela, como sendo fator de influência sobre a formação e manutenção da comunidade microbiana nos diferentes sítios de colonização no animal. No caso do trato respiratório, essa interação vai ser particularmente importante, visto o papel central do microbioma sobre a ocorrência de infecções respiratórias, notadamente das broncopneumonias, em bovinos.

3.2. Microbioma respiratório bovino

O avanço tecnológico em análises independentes de cultura, por meio de plataformas de sequenciamento de nova geração, em particular abordagens de metagenômica, permitiram um melhor entendimento da composição de comunidades microbianas e como elas se estabelecem para formar a microbiota de diferentes sistemas dos animais (Turnbaugh *et al.*, 2007).

3.2.1. Colonização microbiana em bovinos

O microbioma é um ecossistema dinâmico, que depende profundamente de fatores ligados ao hospedeiro que exercem papel fundamental na seleção, adaptação e estabilização de comunidades microbianas. Assim, o entendimento da colonização bacteriana deve considerar o desenvolvimento do próprio animal e estudos diferentes

já demonstraram que o microbioma bovino sofre mudanças ao longo da vida (Furman *et al.*, 2020; Jami *et al.*, 2013). Tipo de parto, tipo de aleitamento, idade, forma de desaleitamento, vacinas aplicadas, bem como fatores ambientais e genéticos podem influenciar essas mudanças (Clemmons *et al.*, 2019; Oh *et al.*, 2014; Rinninella *et al.*, 2019).

Alguns autores apontam o início da colonização microbiana de mamíferos ainda na vida uterina, a partir de evidências da presença de microrganismos no líquido amniótico (Aagaard *et al.*, 2014; D'argenio, 2018; Walker *et al.*, 2017), mas esse é um tema ainda não completamente elucidado. De forma geral, considera-se o momento do nascimento como ponto de partida para o estabelecimento da microbiota desses animais a partir da microbiota da vagina e da pele maternas; e do ambiente (Cholewińska *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2016).

Pensando nisso, o tipo de parto (vaginal ou via cesariana) afeta o microbioma inicial de bezerros. Diferentes estudos corroboram esta tese, demonstrando que o parto vaginal leva a uma microbiota mais rica, uniforme e diversa em bezerros quando comparado ao parto via cesariana (Furman *et al.*, 2020; Greenhalgh *et al.*, 2016).

Em bovinos, a colonização do trato gastrointestinal é a mais estudada, principalmente a formação da microbiota ruminal. Neste ambiente, bezerros de parto vaginal têm o filo *Proteobacteria* como o mais abundante, mas também se destaca a presença dos filios *Bifidobacteria* e *Bacteroides* (associados ao trato gastrointestinal) e dos gêneros *Prevotella* e *Butyrivibrio* (associados ao canal vaginal) (Cunningham *et al.*, 2018; Furman *et al.*, 2020). Já bezerros de parto via cesariana têm uma tendência a serem colonizados pelo filo *Firmicutes* e pelos gêneros *Peptostreptococcus* e *Dorea* (Furman *et al.*, 2020).

No trato respiratório, a colonização também tem início imediatamente após o nascimento e possui rápida evolução nas primeiras semanas de vida. Em bezerras leiteiras, a microbiota nasofaringeana sofre grande influência da microbiota vaginal materna, com 73%, 76% e 87% das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) detectadas aos 3, 14 e 35 dias de idade, respectivamente, sendo compartilhadas entre essas microbiotas (Lima *et al.*, 2019). Até os 14 dias de vida, é esperado um aumento considerável na abundância bacteriana na nasofaringe, com uma estabilização ou

discreta diminuição até os 35 ou 42 dias. O período até os 14 dias de idade é, portanto, crucial para o estabelecimento da microbiota e determinante para a saúde respiratória em bezerros (Lima et al., 2016, 2019; Osman et al., 2018).

Nesta fase, até 70% da diversidade bacteriana da nasofaringe é representada por bactérias do filo *Proteobacteria*. Depois dos 14 dias, essa diversidade aumenta e outros filios, como *Tenericutes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* se tornam mais abundantes (Lima et al., 2016, 2019; Osman et al., 2018). Por sua vez, os gêneros mais abundantes são *Mannheimia*, *Moraxella*, *Mycoplasma*, *Psychrobacter* e *Pseudomonas* (Lima et al., 2016, 2019).

Por ser o local de maior densidade microbiana, a microbiota nasofaringeana em bovinos é a mais avaliada, mas os demais sítios do sistema respiratório possuem microbiotas próprias e distintas (McMullen *et al.*, 2020). Durante muitos anos, inclusive, acreditou-se na teoria de que os pulmões eram um ambiente estéril e esta afirmação foi reproduzida sem suficientes informações para corroborá-la em diferentes textos acadêmicos (Cotran *et al.*, 1999). Hoje esta ideia já foi devidamente contradita, e estudos utilizando abordagens moleculares modernas demonstraram que não apenas microrganismos vindos das vias aéreas chegam aos pulmões, como se mantém no local uma microbiota residente bem definida, embora menos abundante que nos demais sítios do sistema respiratório (Dickson *et al.*, 2016; McMullen *et al.*, 2020).

Ainda não está completamente elucidado o momento em que a microbiota respiratória se estabelece completamente e atinge a estabilidade após o nascimento, embora já se saiba que eventos estressantes podem causar desequilíbrios à microbiota respiratória em geral, e à nasofaringeana em particular. O transporte de bezerros e sua entrada em sistemas de confinamento, por exemplo, causam mudanças à microbiota nasofaringeana que volta a se estabilizar apenas cerca de 40 dias após a chegada dos animais (Timsit *et al.*, 2016a).

O processo de colonização bacteriana tem papel decisivo na saúde respiratória, não só pelo estabelecimento de uma microbiota saudável ou não, mas também porque a microbiota interfere diretamente na maturação e manutenção do sistema imune local, mecanismo conhecido como imunomodulação. Para compreendê-lo melhor, no

entanto, é necessário entender o funcionamento do sistema imune respiratório, o que passa necessariamente pela compreensão da imunidade de mucosas.

3.2.2. Composição da microbiota respiratória bovina

A microbiota do trato respiratório bovino é dominada por seis filos principais (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Bacteroidetes*), porém estes se distribuem de formas distintas ao longo dele (McMullen *et al.*, 2020).

As microbiotas dos tratos respiratórios superior (TRS) e inferior (TRI) de bovinos já foram comparadas em diferentes ocasiões, porém com amostras limitadas à suabes nasais ou nasofaríngeas no TRS e a lavados traqueais ou bronquioalveolares no TRI, sem uma distinção maior entre os locais no trato respiratório (Nicola *et al.*, 2017; Zeineldin *et al.*, 2017; Timsit *et al.*, 2018). Mais recentemente, McMullen *et al.* (2020) compararam amostras de 17 pontos diferentes do trato respiratório de bovinos saudáveis e que não haviam sido tratados com antimicrobianos e puderam fazer uma análise mais minuciosa das variações da microbiota respiratória bovina. Em sua avaliação, os autores puderam determinar em relação ao TRS que o filo *Proteobacteria* prevaleceu nas narinas, nasofaringe e orofaringe, enquanto *Firmicutes* esteve presente em maior quantidade no assoalho no palato duro e *Fusobacteria* foi predominante nas tonsilas. Quanto aos gêneros presentes, *Mycoplasma* foi predominante em narinas e nasofaringe, *Streptococcus* no assoalho do palato duro, *Bibersteinia* na orofaringe e *Fusobacterium* nas tonsilas.

Outro gênero que se destaca pela sua abundância no TRS em diferentes avaliações é *Moraxella* (Nicola *et al.*, 2017; Zeineldin *et al.*, 2017; McMullen *et al.*, 2019; McMullen *et al.*, 2020). Seu papel na ocorrência de broncopneumonia em bezerros já foi questionado, mas este é um assunto ainda não pacificado (Lima *et al.*, 2016). McMullen *et al.* (2019) observaram que *Moraxella bovoculi* foi uma das principais bactérias que determinaram diferenças na composição da comunidade microbiana entre bezerros saudáveis e que desenvolveram broncopneumonia, com uma abundância maior na nasofaringe de animais saudáveis. Esse achado foi complementado por McMullen *et al.* (2020), que encontraram *M. bovoculi* em grande

abundância nas narinas e nasofaringe de bovinos saudáveis, o que pode indicar que cepas dessa bactéria façam parte da microbiota nasal normal.

Dentre os diferentes ambientes do TRS de bovinos, o que mais se assemelha aos pulmões, no que diz respeito à microbiota, é a nasofaringe (McMullen *et al.*, 2020), indicando que ela é a fonte primária de bactérias para os pulmões e pode ser um ótimo alvo de manipulações com o intuito de prevenir e tratar broncopneumonias em bezerros.

A concepção de um trato respiratório inferior (TRI) estéril, especialmente os pulmões, foi amplamente aceita durante anos. Hoje, no entanto, já está comprovada a presença de uma microbiota residente única em bovinos (Nicola *et al.*, 2017; Zeineldin *et al.*, 2017; Timsit *et al.*, 2018). As comunidades bacterianas no TRI são menos ricas e diversas que no TRS, o que é justificado pela constante exposição do TRS a comunidades microbianas transportadas pelo ar ambiente (Nicola *et al.*, 2017; Timsit *et al.*, 2018). Além disso, algumas bactérias, como *Mycoplasma* spp. (Nicola *et al.*, 2017; Timsit *et al.*, 2018; Stroebel *et al.*, 2018) e *Pasteurella* spp. (Nicola *et al.*, 2017; Zeineldin *et al.*, 2017) normalmente são mais ricas no TRI em comparação com o TRS.

Apesar das diferenças entre microbiotas, a maioria dos gêneros bacterianos identificados no TRI também estão presentes no TRS (Nicola *et al.*, 2017; Zeineldin *et al.*, 2017; McMullen *et al.*, 2020). O motivo é que, em animais saudáveis, a composição bacteriana do TRI é determinada mais por um fluxo constante (imigração e eliminação) de bactérias transitórias originárias do TRS do que pela replicação de bactérias residentes (Dickson *et al.*, 2017). Enquanto em humanos as bactérias que chegam aos pulmões originam-se principalmente da orofaringe e da boca (Dickson *et al.*, 2017), em bovinos a nasofaringe parece ser a fonte primária de bactérias para o TRI (McMullen *et al.*, 2020).

Mesmo entre as estruturas que compõem o TRI há diferenças na composição da microbiota. Em seu estudo, McMullen *et al.* (2020) puderam caracterizar metacomunidades bacterianas distintas em traqueia e brônquios das porções cranial e caudal do lobo pulmonar cranial direito e de brônquios primários e secundários nos lobos pulmonares caudais direito e esquerdo. Esta diferença é esperada, visto que há

diferenças fisiológicas e bioquímicas entre os diferentes locais no trato respiratório, como variações de pH, níveis de CO₂, temperatura, tipos de células epiteliais, espessura da mucosa e células imunes (Dickson *et al.*, 2015; Glendinning *et al.*, 2016; Chase e Kaushik, 2019).

Ainda nesta caracterização, McMullen *et al.* (2020) puderam demonstrar que o filo *Tenericutes* dominava a traqueia distal e os pulmões, com exceção dos brônquios secundários dos lobos caudais direito e esquerdo, que eram colonizados principalmente pelo filo *Actinobacteria*.

Mycoplasma é um dos gêneros mais comumente identificados em nasofaringe e pulmões de bovinos (Holman *et al.*, 2017; Nicola *et al.*, 2017; Timsit *et al.*, 2018; McMullen *et al.*, 2020), com alguns trabalhos apontando maiores abundâncias relativas em pulmões, especialmente de *M. dispar* (Timsit *et al.*, 2018; McMullen *et al.*, 2020). O papel de *M. dispar* na saúde respiratória ainda não está claro, mas esta espécie já foi identificada em pulmões saudáveis e com pneumonia (Howard *et al.*, 1987; Tortorelli *et al.*, 2017) e, mesmo tendo mostrado vários fatores de virulência para células epiteliais bovinas e efeitos imunossupressores, *M. dispar* está associado apenas a infecções respiratórias mais leves e, provavelmente, não é um agente causador de broncopneumonia em bezerros (Howard *et al.*, 1987; Tortorelli *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019). No entanto, se *M. dispar* exerce algum efeito de proteção, ao inibir *Mycoplasma bovis* em bovinos saudáveis pela competição por sítios de adesão, por exemplo, ainda não se sabe (McMullen *et al.*, 2020).

Deste modo, abordagens de sequenciamento de nova geração vêm mudando a forma de analisar a composição da microbiota respiratória bovina e melhorando o entendimento dos processos envolvidos na ocorrência de broncopneumonias em bezerros como uma consequência de disbiose do trato respiratório superior.

3.2.3. Fatores que afetam a colonização e manutenção da microbiota respiratória

A colonização microbiana do trato respiratório e a manutenção dessa microbiota são processos multifacetados, moldados pela interação contínua entre o ambiente, as características fisiológicas do hospedeiro e as propriedades intrínsecas dos próprios microrganismos. Ademais da já abordada influência do tipo de parto e

das características ecológicas do local do sistema respiratório sobre a composição da microbiota, temos o sistema imune exercendo um papel crucial no estabelecimento e controle da comunidade microbiana formada. Ainda, quando se trata de bovinos, condições de manejo do início da vida desses animais merecem destaque quanto à sua relação com a microbiota desses animais. Em especial, serão abordadas as influências da dieta, do uso de antimicrobianos e da aplicação de vacinas.

3.2.3.1. Interação microbiota e sistema imune

A interação entre a microbiota e o sistema imune é um campo de estudo complexo e dinâmico, fundamental para a compreensão da saúde e da doença, bem como da colonização microbiana do hospedeiro. Embora os mecanismos de imunomodulação estejam melhor consolidados e sejam mais explorados, o efeito do sistema imune sobre a microbiota também tem sua importância e o entendimento de como os componentes imunes do hospedeiro, como os anticorpos, moldam a composição e a função das comunidades microbianas pode elucidar em parte as variações nas comunidades bacterianas durante a colonização até a estabilização do microbioma do hospedeiro.

Imunomodulação pode ser compreendida, de modo amplo, como qualquer intervenção com o objetivo de modificar a resposta imune, seja para estimulá-la ou inibi-la, e ao longo dos anos têm-se explorado seu uso terapêutico (Dham, 1995; Strzelec *et al.*, 2023). No início da vida, entretanto, tanto a microbiota quanto o sistema imune dos bezerros está se modificando e passando por alterações marcantes e um afeta o desenvolvimento do outro (Chase, 2022; Chase e Kaushik, 2019).

A maturação das respostas imunes nas mucosas de bezerros neonatos está diretamente relacionada à interação das células epiteliais da mucosa com microrganismos e/ou seus produtos e isso é essencial para o desenvolvimento do sistema imune e para regulação e manutenção da homeostase imune (Chase e Kaushik, 2019). A interação microbiota-hospedeiro se dá principalmente nas superfícies mucosas, que têm que existir e se desenvolver de forma a facilitar a colonização e estabelecimento da comunidade bacteriana local, ao mesmo tempo em que têm que reconhecer e responder a patógenos (Gensollen *et al.*, 2016).

De modo geral, o hospedeiro se beneficia da presença de bactérias comensais com seu efeito no estímulo ao estabelecimento de uma microbiota saudável e na inibição da colonização por patógenos, mas também na modulação da resposta imune (Anderson *et al.*, 2010; Audy *et al.*, 2012; Riedel *et al.*, 2006). A presença dessas bactérias na superfície mucosa incita o desenvolvimento do sistema imune inato, com efeito sobre componentes como as zonas de oclusão e a secreção de muco, IgA e peptídeos antimicrobianos (Ewaschuk *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2014). Da mesma forma, há a influência sobre fatores do sistema imune adaptativo como a ativação de células apresentadoras de antígeno (células dendríticas e macrófagos), linfócitos B, T e T reguladores (Huhta *et al.*, 2016).

Em bovinos, já existem estudos que abordaram essa interação microbiota-hospedeiro no trato gastrointestinal, útero, glândula mamária e trato respiratório com conclusões que caminham para um mesmo sentido, de que a interação é fundamental para a maturação e funcionamento do sistema imune e que há a possibilidade de manipular essa microbiota com fins terapêuticos e/ou preventivos (Gomez *et al.*, 2019).

Estudos sobre o microbioma respiratório bovino, contudo, são mais abundantes na caracterização da microbiota em diferentes pontos do trato respiratório ou de variações que levam à ocorrência de doenças do que no entendimento de seu estabelecimento e influência sobre o sistema imune do neonato (Gaeta *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2016; McMullen *et al.*, 2020). Esse efeito imunomodulatório é mais explorado em outros modelos animais, mas os resultados desses estudos podem ser transpostos para o bovino e fomentar novas hipóteses sobre o tema. As propriedades imunoestimulatórias de bactérias comensais, por exemplo, foram demonstradas a partir de estudos de desenvolvimento imune e funcional de sistemas como o gastrointestinal e respiratório com modelos animais gnotobióticos, particularmente ratos *germ-free*, em que a presença de uma microbiota comensal foi fundamental para a resposta adequada contra patógenos nesses animais (Brown *et al.*, 2017; Vicentini *et al.*, 2021).

Se levada em conta uma outra abordagem, que avalia a resposta imune após um desequilíbrio importante no microbioma (disbiose), também já é sabido que este possui um efeito deletério ao sistema imune, particularmente na resposta inata, com a depleção da zona de destruição em consequência do estreitamento da camada de

muco e diminuição drástica da produção de sIgA e peptídeos antimicrobianos (Chase, 2022).

Em se tratando da influência específica de bactérias probióticas sobre o sistema imune do hospedeiro, mecanismos diferentes já foram elucidados e associados à ação dessas bactérias com impacto positivo na modulação da resposta imune e sobre o desenvolvimento do sistema imune a partir de uma série de estímulos gerados pela presença dessas bactérias no ambiente mucoso. Esses estímulos moldam não apenas a resposta local, como têm potencial de provocar respostas sistêmicas, e ativam tanto respostas inatas quanto adaptativas, cada uma a sua maneira (Mazziotta *et al.*, 2023).

Um desses mecanismos, que é bastante estudado e afeta a resposta inata é o estímulo à expressão de receptores reconhecedores de padrão (PRRs) na superfície das células epiteliais, notadamente receptores do tipo *Toll* (TLRs), receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (*NOD-like receptors* [NLRs]) e receptores de lectina tipo C (*C-type lectin receptors* [CTRs]).

É por meio de TLRs que o sistema imune inato reconhece um grande número de estruturas químicas de patógenos, como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas e ácidos lipotécóicos (LTA) de bactérias Gram-positivas, e a partir disso é capaz de sinalizar a presença de microrganismos patogênicos e dar início a uma cascata de mecanismos de defesa imunológica, ao incitar respostas de células dendríticas, que levam à produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias e à regulação positiva e negativa das moléculas de superfície celular (Anderson *et al.*, 2010; Granucci e Ricciardi-Castagnoli, 2003). Inclusive, são as células dendríticas, junto aos macrófagos, as principais responsáveis pela expressão de TLRs, embora outras células, como linfócitos B e células epiteliais, também expressem esse tipo de receptor (Gómez-Llorente *et al.*, 2010).

Por sua função, TLRs são de suma importância para a defesa inata contra patógenos e acionam respostas imunes adaptativas. Em mamíferos, existem 11 receptores do tipo *Toll* (TLR1 – TLR11) e, em humanos, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 estão associadas à membrana celular externa e respondem primariamente a PAMPs da superfície bacteriana. TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9

apresentam-se nas superfícies de endossomos e respondem primariamente a PAMPs à base de ácido nucleico de vírus e bactérias. A sinalização via TLR controla a maturação de células dendríticas e a sinalização via TLR9 é fundamental para a mediação do efeito anti-inflamatório de probióticos na superfície epitelial (Bermudez-Brito et al., 2012; Gómez-Llorente et al., 2010; Plaza-Diaz et al., 2019). A ativação de TLR9 induz vias de sinalização intracelulares para a expressão, através das superfícies apical e basolateral, de fatores de necrose kappa beta (NF- κ B) e tumoral alfa (TNF- α) (Bermudez-Brito et al., 2012; Lee et al., 2006).

Diferentes cepas de bactérias com potencial probiótico, como *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus (Lactobacillus) rhamnosus* e *Lactobacillus (Lactobacillus) casei* induzem a produção de quantidades distintas de citocinas em células imunes primárias de humanos e ratos. *B. breve*, por exemplo, induz a produção de citocinas via ativação de TLR9, resultando em um perfil inflamatório mais brando, o que se deve também aos seus efeitos inibitórios sobre TLR2 (Plantinga et al., 2011).

O TLR2 também é importante para a dinâmica com probióticos, ao se ligar a componentes da parede celular de lactobacilos, estimulando a produção de citocinas (Ren et al., 2016; Wells, 2011). Shida et al. (2009) demonstraram que *L. casei*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus (Lactobacillus) zeae* e *Limosilactobacillus (Lactobacillus) fermentum* induzem grande produção, por macrófagos, de interleucina 12, que media a resposta inicial a microrganismos intracelulares e induz a imunidade mediada por células. Vizoso Pinto et al. (2009), ainda, demonstraram que *L. rhamnosus* GG e *Lactiplantibacillus (Lactobacillus) plantarum* BFE 1685 aumentam a atividade de TLR2 em células intestinais de humanos.

Bifidobacteria spp. também estimula TLR e *B. breve* C50, especificamente, induz a maturação, a produção de IL-10 e prolonga a sobrevivência de células dendríticas (Hoarau et al., 2006). Zeuthen i. (2008) foram capazes de concluir, ainda, que o efeito imunoinibitório de bifidobactérias é dependente de TLR2.

No sistema respiratório, diferentes estudos demonstraram a capacidade imunomodulatória de lactobacilos administrados por via intranasal, regulando beneficemente a resposta imune inata contra vírus induzida pela ativação de TLR3,

melhorando a proteção contra vírus sincicial respiratório e influenza em camundongos e SARS-CoV-2 *in vitro* (Clua *et al.*, 2020; Islam *et al.*, 2021; Zelaya *et al.*, 2015).

A importância dos receptores do tipo NOD se dá pelo reconhecimento que fazem de peptidoglicanos. Dentre eles, NOD1 e NOD2 são expressos por células imunes e o reconhecimento de peptidoglicanos de lactobacilos por NOD2 foram relacionados à mediação de efeitos anti-inflamatórios destas bactérias em modelos de colite (Macho Fernandez *et al.*, 2011).

Alguns patógenos escapam do sistema imune ao ligar-se ao receptor DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing*), uma molécula não-integrina lectina tipo C de células dendríticas. A ligação a esse receptor afeta a maturação de células dendríticas e aumenta a expressão de IL-10, reduzindo a capacidade dessas células na indução de resposta contra patógenos mediada por linfócitos T. Essa atividade de ligação à DC-SIGN já foi descrita em algumas cepas de *Lactobacillus* spp., o que pode refletir em um efeito imunomodulatório também por essa via (Konstantinov *et al.*, 2008; Pretzer *et al.*, 2005).

Além de sua influência sobre PRRs, diferentes espécies de bactérias probióticas estimulam fortemente a produção de sIgA, o que leva a uma melhora na função de barreira da imunidade mucosa (Harbige *et al.*, 2016; Plaza-Diaz *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Ainda, no sistema digestivo a estrutura das vilosidades intestinais, a produção de mucina pelas células caliciformes e a produção de peptídeos antimicrobianos pelo epitélio sofre influências positivas de bactérias probióticas (Galdeano *et al.*, 2011; Schlee *et al.*, 2008; Tobita *et al.*, 2010).

Enquanto o efeito da microbiota sobre o desenvolvimento do sistema imune, especialmente o de mucosas, é bastante documentado (Cangiano *et al.*, 2023; Villot *et al.*, 2020; Wopereis *et al.*, 2014), o efeito contrário, ou seja, a influência do sistema imune sobre a composição da microbiota, ainda está sendo explorada e compreendida (Kato *et al.*, 2014; Kubinak e Round, 2016).

Esta influência pode ser explorada por alguns ângulos, mas que passam, invariavelmente pela dinâmica da imunidade de mucosas, que está em contato direto e se molda a partir da microbiota local (Chase *et al.*, 2022). Assim, podemos pensar

na interação entre os componentes celulares do sistema imune ou dos anticorpos com a microbiota.

No intestino, a depender do segmento, 10 a 80% das bactérias que compõem a microbiota local estão ligados a IgA (Bunker *et al.*, 2015), imunoglobulina mais abundantes do sistema imune de mucosas. Esta ligação se dá a um grupo de bactérias específicos, que são as intimamente associadas aos tecidos dos hospedeiros (Bunker *et al.*, 2015; Planer *et al.*, 2016), e a partir daí inicia-se o entendimento da influência das imunoglobulinas sobre a composição da microbiota. Kubinak e Round (2016) nomearam este mecanismo de “antibody-mediated immunoselection – AMIS”, ou imunoseleção mediada por anticorpos, em tradução livre, indicando que há uma seleção de bactérias pelas imunoglobulinas presentes nas mucosas, até certo nível.

Além disso, a sIgA auxilia na seleção de antígenos do lúmen intestinal, melhorando a apresentação de antígenos pelas APCs aos linfócitos B e T nas placas de Peyer (Mantis *et al.*, 2002). Tanto os peptídeos antimicrobianos quanto a sIgA representam um dos principais mecanismos de defesa não inflamatórios do intestino e ajudam a moldar a composição da microbiota intestinal na proximidade das células epiteliais (Pabst *et al.*, 2016).

Até onde foi possível buscar, não há trabalhos que explorem esse mecanismo no sistema respiratório, mas é plausível inferir que o comportamento das imunoglobulinas do sistema imune mucoso respiratório seja o mesmo.

Para além dessa interação com o sistema imune, existem evidências da relação da microbiota, especialmente na fase de colonização microbiana, com tipo de parto, ambiente, dieta, tratamento com antimicrobianos e administração de vacinas. Dentre estes, a dieta, os antimicrobianos e as vacinas serão consideradas com mais aprofundamento a seguir.

3.2.3.2. Efeito do manejo alimentar e sanitário sobre a microbiota

A dieta, especialmente na fase inicial da vida dos bovinos, exerce um efeito profundo na estrutura e diversidade da microbiota intestinal, funcionando como um catalisador fundamental para o estabelecimento de um microbioma saudável.

O colostro, em particular, acelera a colonização bacteriana total, aumentando a densidade bacteriana (Malmuthuge *et al.*, 2015). Quando tratado termicamente (pasteurização), é responsável por um aumento de 3,2 vezes na prevalência de *Bifidobacterium*, além de reduzir (cerca de 58 vezes menos) a colonização por patógenos potenciais, como a *Escherichia coli*, quando comparado a animais não colostrados (Malmuthuge *et al.*, 2015).

Ainda, o colostro contém oligossacarídeos resistentes à digestão que agem como prebióticos, estimulando o desenvolvimento de espécies chave, como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Essas bactérias fermentam os oligossacarídeos em Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) e ácido lático, diminuindo o pH local e, competitivamente, excluindo grupos bacterianos menos adaptados (Fischer *et al.*, 2018). Os AGCC são responsáveis, ainda, por fornecer energia para as células epiteliais do intestino, pelo estímulo à liberação de mucina pelas células caliciformes e por atuar como moléculas de sinalização (Donohoe *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012). Além disso, modulam a função imune, promovendo a expansão de células T reguladoras (Tregs) e estimulando a secreção de IgA (Atarashi *et al.*, 2013).

Adicionalmente, compostos antimicrobianos, como lactoferrina e lisozimas, presentes no colostro, reduzem a carga microbiana próxima às células epiteliais, promovendo um ambiente regulado (Laforest-Lapointe e Arrieta, 2017).

Com o avançar da idade e, conseqüentemente, com a mudança da dieta em bezerros, que deixam de se alimentar com leite para consumir alimentos sólidos (forragens e concentrados de origem vegetal), o perfil microbiano no trato gastrointestinal também muda. Jami *et al.* (2013) caracterizaram essa evolução, destacando o processo ordenado de colonização bacteriana no rúmen de bezerros. Os animais foram avaliados desde o nascimento até os dois anos de idade e, de modo geral, observou-se um aumento da diversidade da microbiota ao longo do tempo, porém este foi acompanhado de um aumento na similaridade da comunidade entre indivíduos da mesma idade. Destaca-se a mudança no perfil de gêneros bacterianos do filo Bacteroidetes presente no rúmen desses animais. Ao passo que bezerros mais jovens apresentavam um predomínio de *Bacteroides* enquanto se alimentavam de leite e colostro (alimentos ricos em carboidratos e gorduras, respectivamente), a partir

dos seis meses de idade os animais, momento em que já recebiam uma dieta rica em fibras, apresentaram um predomínio de *Prevotella*.

Dessa forma, podemos ressaltar o impacto do tipo de alimento na composição predominante da microbiota gastrointestinal. Esse efeito, entretanto, pode atingir até certa medida a composição da microbiota nasofaríngea em bezerros. Uddin *et al.* (2024) identificaram a influência da microbiota do trato gastrointestinal sobre a saúde respiratória, por meio da imunomodulação e de produtos metabólicos, sugerindo a existência de um eixo funcional pulmão-intestino em bezerros.

Antimicrobianos também influenciam de forma significativa a microbiota em formação dos bezerros. O uso profilático de microbianos ao nascimento ou nas primeiras semanas de vida, bem como a alimentação com leite de descarte (que geralmente inclui leite proveniente de vacas em tratamento com antimicrobianos), são práticas relatadas na criação de bezerros (USDA, 2014; Uyama *et al.*, 2022).

Em estudos que avaliam a microbiota intestinal, fica evidente o efeito do uso profilático de antimicrobianos e da alimentação com leite de descarte como causadores de disbiose (Fallani *et al.*, 2011). A disbiose induzida pelo uso de antimicrobianos estabelece um profundo impacto no metabolismo sistêmico do hospedeiro. Essencialmente, a redução da diversidade microbiana e das bactérias benéficas — como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* — leva ao comprometimento da barreira mucosa intestinal, resultando na diminuição da produção de sIgA e de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), estreitamento da camada de muco e aumento da permeabilidade intestinal (Jeon *et al.*, 2012; Tamburini *et al.*, 2016). Essa desregulação permite maior contato entre o conteúdo luminal e o epitélio, promovendo inflamação e desencadeando respostas imunes indesejadas, o que constitui um dos principais mecanismos de perturbação da homeostase intestinal (Laforest-Lapointe e Arrieta, 2017).

Em paralelo, a alteração microbiana perturba criticamente o eixo microbiota-ácidos biliares, um sistema de sinalização essencial. Os ácidos biliares, para além da sua função como emulsificantes de gordura, atuam como potentes moléculas sinalizadoras que regulam o metabolismo lipídico e a inflamação via receptores nucleares (FXR) e de superfície celular (TGR5) no fígado, intestino e tecidos periféricos (Lefebvre *et al.*, 2009; Ipharraguerre *et al.*, 2018). A microbiota é

fundamental, pois transforma os ácidos biliares primários do hospedeiro em secundários, alterando o seu poder de sinalização (Lefebvre *et al.*, 2009). A administração de antimicrobianos, ao reduzir as bactérias modificadoras de ácidos biliares, desregula drasticamente o perfil e a concentração desses ácidos, resultando em alteração na expressão de genes relacionados ao metabolismo e à ativação imune no fígado e no tecido adiposo (Cangiano *et al.* 2023a).

No trato respiratório, vêm sendo estudados os efeitos moduladores de tratamentos metafiláticos com antimicrobianos injetáveis sobre a composição da microbiota nasofaringeana, visto que esta é uma prática comum em animais na chegada a confinamentos (DeDonder e Apley, 2015), justamente com o intuito de prevenir a ocorrência de broncopneumonias nessa categoria animal. Os principais antimicrobianos utilizados para esse fim são a Tulatromicina e a Oxitetraciclina (USDA, 2013).

Amat *et al.* (2023) avaliaram a microbiota nasofaringeana de bezerros de seis meses de idade após a aplicação metafilática de Tulatromicina, e observaram que houve alteração na estrutura, diversidade e composição desta microbiota. Enquanto o número total de bactérias diminuiu (especialmente das pertencentes ao filo Proteobacteria), a diversidade e a riqueza aumentaram sete dias após a metafilaxia. Os autores concluem, no entanto, que esse aumento de diversidade resulta de uma microbiota mais permissiva à colonização por bactérias exógenas após a aplicação de Tulatromicina, visto que foi observada uma alteração nas relações ecológicas entre as bactérias presentes nesse microbioma.

Holman *et al.* (2019) também avaliaram o efeito da Tulatromicina, assim como da Oxitetraciclina, sobre a microbiota de nasofaringe de bezerros, e observaram um efeito significativo da Tulatromicina até cinco dias após a aplicação (sem aumento da diversidade) e da Oxitetraciclina até 34 dias após a aplicação (com aumento da diversidade), sendo as bactérias da família Microbacteriaceae as mais afetadas por esses antimicrobianos.

A duração do efeito dos antimicrobianos sobre a microbiota de nasofaringe, inclusive, foi alvo de análise em outros trabalhos. Amat *et al.* (2023) acompanharam os animais até 42 dias após a aplicação de Tulatromicina e Holman *et al.* (2018)

durante 60 dias após a aplicação de Tulatromicina ou Oxitetraciclina e, em ambos os casos, o efeito persistiu durante todo o período de avaliação, indicando um efeito modulador de longo prazo.

Contudo, além dos efeitos sobre a composição da microbiota, os antimicrobianos têm ação na seleção de cepas resistentes e no aumento da presença de genes de resistência. Snyder *et al.* (2017) observaram rápida transmissão de uma cepa de *M. haemolytica* resistente a tulatromicina após o uso em massa deste antimicrobiano na chegada ao confinamento. Em um cenário similar, a administração parenteral de tulatromicina e oxitetraciclina provocou um aumento na abundância dos genes de resistência *erm(X)*, *sul2*, *tet(M)*, *msr(E)* e *tet(H)* na microbiota nasofaringeana bovina (Holman *et al.*, 2018; Holman *et al.*, 2019).

É por essas desvantagens que a busca por alternativas para a modulação da microbiota respiratória em bovinos vem sendo investigada. Amat *et al.* (2019) selecionaram seis cepas de lactobacilos de quatro espécies diferentes (*L. amylovorus*, *L. bucharis* [duas cepas] e *L. paracasei* [duas cepas]), isoladas da nasofaringe de bovinos saudáveis, devido a sua capacidade de adesão a células do epitélio nasal bovino, competição por essa adesão com *Mannheimia haemolytica*, e capacidade de modulação da expressão gênica destas células (provocando uma regulação positiva na expressão de IL-8 e IL-6). Estas cepas foram utilizadas em testes *in vivo* com bezerros leiteiros (Amat *et al.*, 2020) e bovinos de corte (Amat *et al.*, 2023). Os bezerros de aptidão leiteira foram submetidos a infecção experimental com *M. haemolytica* após a administração intranasal das cepas de probióticos. Além da observação de que a administração do coquetel reduziu significativamente a colonização por *M. haemolytica*, as cepas de probióticos foram reisoladas a partir de suabes nasais até 13 dias após a inoculação e modificaram a composição da microbiota nasal, reduziram sua diversidade e alteraram a relação entre os dez gêneros mais abundantes (Amat *et al.*, 2020). Em bovinos de corte, a mesma combinação de probióticos foi administrada por via intranasal a um grupo de 20 novilhos na chegada ao confinamento (outros dois grupos de 20 animais foram utilizados, um grupo controle e um grupo que recebeu Tulatromicina injetável). Suabes nasofaringeanos foram realizados durante 42 dias e foi possível demonstrar que a administração de probióticos modificou a composição e diminuiu a diversidade da microbiota nasofaringeana por todo o período de avaliação. Não houve, entretanto,

efeito significativo sobre a abundância relativa de *M. haemolytica*, *P. multocida* ou *H. somni* e não foi possível determinar o efeito do uso dos probióticos sobre a saúde respiratória dos animais, visto que a prevalência de DRB no estudo foi muito baixa (5 animais positivos entre os 60 avaliados) (Amat *et al.*, 2023).

Estes resultados são promissores, não só pelas evidências de modulação da microbiota a médio prazo, o que é uma vantagem do ponto de vista do manejo necessário para a administração do probiótico, mas também pelo efeito direto sobre a redução no número de infecções respiratórias.

Por fim, as vacinas locais também têm efeito modulador sobre a microbiota. Há, no Brasil, vacinas comerciais para agentes etiológicos do sistema respiratório bovino tipo parenteral ou intranasal (Quadro 1) (BRASIL, 2025). As vacinas parenterais são, em geral, feitas a partir de vírus e/ou bactérias inativados e incluem um ou mais agentes etiológicos, podendo, ainda, estar associados a agentes causadores de doenças reprodutivas em bovinos. As vacinas intranasais, por sua vez, possuem apenas antígenos de agentes etiológicos virais em suas composições, e seu objetivo primário é a ativação do sistema imune local, sem que haja interferência dos anticorpos maternos que, porventura, ainda estejam circulando nos bezerros no início da vida.

Em humanos, Tarabichi *et al.* (2015) estabeleceram uma relação causal entre uma vacina intranasal viva atenuada sobre a estrutura, diversidade e composição taxonômica central das comunidades bacterianas da nasofaringe. Esta influência foi creditada à regulação positiva na transcrição de genes de interferon tipos I (IFN- α e IFN- β) e II (IFN- γ) no grupo vacinado, visto que já foi demonstrado em modelo murino a relação de uma maior persistência nasal de *Staphylococcus aureus* na cavidade nasal nos animais com estímulo vacinal. Em bovinos, vacas vacinadas no dia do parto com vacina intranasal viva modificada (Herpesvírus Bovino Tipo 1, Vírus Parainfluenza 3 e Vírus Respiratório Sincicial Bovino) apresentaram maiores concentrações de IFN- γ na cavidade nasal por até 14 dias em comparação com a concentração basal (pré-vacinação) (Cortese *et al.*, 2017). Neste mesmo trabalho, a concentração de IFN- β na cavidade nasal de vacas vacinadas no dia do parto foi numericamente maior que no momento basal, embora sem diferença estatística. Esses resultados permitem inferir

que efeitos similares de modulação da microbiota nasal e/ou nasofaringeana pode ocorrer em animais vacinados.

Quadro 1 – Vacinas contra patógenos do sistema respiratório de bovinos com autorização para comercialização no Brasil.

Estabelecimento Titular Do Registro	Denominação Do Produto	Insumos ativos
Bayer S.A.	Bayovac Reprodução 15	<i>Campylobacter fetus</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Leptospira borgpetersenii</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> ; <i>Leptospira kirschneri</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina
Biogénesis Bagó Saúde Animal Ltda.	Bioabortogen H	<i>Campylobacter fetus</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Histophilus somni</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina
	Biopoligen HS	Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Histophilus somni</i> ; <i>Mannheimia haemolytica</i> ; <i>Pasteurella multocida</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina
	Bioqueratogen Oleo	Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Moraxella bovis</i>
Boehringer Ingelheim Animal Health do Brasil Ltda.	Bovela	Vírus da Diarreia Viral Bovina
Ceva Saúde Animal Ltda.	Vacina IBR/BVD	Herpesvírus Bovino Tipo 1; Vírus da Diarreia Viral Bovina
	Tifopasteurina	<i>Pasteurella multocida</i> ; <i>Salmonella dublin</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i>
Dechra Brasil Produtos Veterinários Ltda.	Paraven	<i>Clostridium perfringens</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Pasteurella multocida</i> ; <i>Salmonella dublin</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i>
	Supravac 10	Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Leptospira interrogans</i> ; <i>Leptospira kirschneri</i> ; <i>Mannheimia haemolytica</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
	Supravac LCH	<i>Campylobacter fetus</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Histophilus somni</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> ; <i>Leptospira kirschneri</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina
Elanco Saúde Animal Ltda.	Bayovac Respiratória RD	<i>Clostridium novyi</i> Tipo D; <i>Escherichia coli</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Pasteurella multocida</i> ; <i>Salmonella</i> sp.; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina
Hipra Saúde Animal Ltda.	Civtest Bovis BVD/BD P80	Vírus da Diarreia Viral Bovina
	Hiprabovis - 4	Herpesvírus Bovino Tipo 1; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
	Hiprabovis 9	Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Leptospira interrogans</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina

	Hiprabovis Balance	Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
	Hiprabovis Ibr Marker Live	Herpesvírus Bovino Tipo 1
	Hiprabovis Somni/ Lkt	<i>Histophilus somni</i> ; <i>Mannheimia haemolytica</i>
	Nasym	Vírus Respiratório Sincicial Bovino
Laboratório Bio-Vet Ltda.	Bio-Plurivac	Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
	Vaxxon Srp Klebsiella	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Laboratório Cherry do Brasil Ltda.	Vac-Cherry Reprodutiva	<i>Campylobacter fetus</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Histophilus somni</i> ; <i>Leptospira borgpetersenii</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> ; <i>Leptospira kirschneri</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina
Laboratório Microsules do Brasil Ltda.	Vacsules Reprodutiva Plus	<i>Campylobacter fetus</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Histophilus somni</i> ; <i>Leptospira borgpetersenii</i> ; <i>Leptospira interrogans</i> ; <i>Leptospira kirschneri</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina
	Vacsules Respiratória Plus	Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Histophilus somni</i> ; <i>Mannheimia haemolytica</i> ; <i>Moraxella bovis</i> ; <i>Moraxella bovoculi</i> ; <i>Pasteurella multocida</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda.	Mastiplus Br	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella aerogenes</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Pasteurella multocida</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ; <i>Streptococcus uberis</i>
Laboratórios Rosenbusch do Brasil S.A.	Cultivac 6	Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Histophilus somni</i> ; <i>Mannheimia haemolytica</i> ; <i>Pasteurella multocida</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina
Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda.	Supravac Resp	Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Mannheimia haemolytica</i> ; <i>Pasteurella multocida</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino

Labovet Produtos Veterinários Ltda.	Vacina Contra a Pasteurelose e Salmonelose Bovina	<i>Mannheimia haemolytica; Pasteurella multocida; Salmonella dublin; Salmonella typhimurium</i>
Merck Sharp & Dohme Saúde Animal Ltda.	Bovilis Vista 5 L5 Cfp	Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Leptospira interrogans; Leptospira kirschneri</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
	Bovilis Vista Once Sq	Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Mannheimia haemolytica; Pasteurella multocida</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
	Fertiguard Selenium Max	<i>Campylobacter fetus</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Leptospira interrogans; Leptospira kirschneri</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
Ouro Fino Agronegócio Ltda.	Cdv Feedlot Plus	Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Histophilus somni; Mannheimia haemolytica; Moraxella bovis; Moraxella ovis; Pasteurella multocida</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
	Cdvac Reprodutiva	<i>Campylobacter fetus</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Histophilus somni; Leptospira interrogans</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina
Tecnovax do Brasil Imp. e Com de Produtos Veterinários Ltda.	Providean Clostridial 10P	<i>Clostridium chauvoei; Clostridium novyi; Clostridium novyi</i> Tipo D; <i>Clostridium perfringens; Clostridium septicum; Clostridium sordellii; Clostridium tetani; Mannheimia haemolytica; Pasteurella multocida</i>
União Química Farmacêutica Nacional S.A.	Providean Repto 12	<i>Campylobacter fetus</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Histophilus somni; Leptospira interrogans</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina
	Providean Respiratória	<i>Histophilus somni; Mannheimia haemolytica; Pasteurella multocida</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus da Rinotraqueíte Bovina
Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda.	Bovigen Repto Total Se	<i>Campylobacter fetus</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Leptospira borgpetersenii; Leptospira interrogans</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina
	Bovigen V4J5	<i>Escherichia coli</i> ; Herpesvírus Bovino Tipo 1; Herpesvírus Bovino Tipo 5; <i>Mannheimia haemolytica; Pasteurella multocida; Salmonella dublin</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino

Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda.

Bovi-Shield Gold One Shot	Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Mannheimia haemolytica</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
Cattlemaster 4 + L5	<i>Leptospira interrogans</i> ; <i>Leptospira kirschneri</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Herpesvírus Bovino Tipo 1; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
Cattlemaster Gold FP 5/L5	Herpesvírus Bovino Tipo 1; <i>Leptospira interrogans</i> ; <i>Leptospira kirschneri</i> ; Vírus da Diarreia Viral Bovina; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino
Inforce 3	Herpesvírus Bovino Tipo 1; Vírus da Parainfluenza Bovina; Vírus Respiratório Sincicial Bovino

Fonte: Ministério da Agricultura Pecuária (MAPA), (BRASIL, 2025)

4. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades desenvolvidas estavam de acordo com o projeto submetido e aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal de Minas Gerais, sob protocolo nº 90/2024.

4.1.1. Local e animais amostrais

Foram selecionados oito bezerros da raça Holandês provenientes de fazenda comercial localizada no município de Inhaúma/MG e transportados para a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG) em Belo Horizonte/MG durante as primeiras 48h de vida.

Na fazenda de origem, os bezerros ficaram alojados em baias individuais desinfetadas com dióxido de cloro 3,5% e forradas com cama de serragem. Imediatamente após o nascimento, foi realizada cura de umbigo com tintura de iodo 10% (que seguiu diariamente até a queda do coto umbilical) e os bezerros receberam, por sonda oroesofágica, colostro com no mínimo 25% de Brix e em quantidade equivalente à 10% do peso vivo PV (Godden *et al.*, 2019).

Entre 24h e 48h de vida, foi coletado sangue por venopunção da veia jugular em tubos secos para obtenção de soro sanguíneo. A partir dele foi mensurada a proteína total sérica com refratrômetro óptico manual para a avaliação da transferência de imunidade passiva (Godden *et al.*, 2019).

A partir do segundo dia de vida, já na EV-UFMG, os bezerros foram alojados em bezerreiro do tropical, com cobertura de grama, onde permaneceram até o término do estudo. Durante este período, os animais receberam 6 litros de substituto de leite (Lactech – Lactalis®; 22,5% PB, 18% EE, 42% Lactose e 1% FB) por dia, dividido em duas refeições. Além disso, receberam concentrado com 22% PB (farelo de milho, farelo de soja e premix mineral), feno de Tifton 85 e água *ad libitum*.

Durante a segunda semana de vida, os bezerros receberam vacina intranasal contra os vírus Parainfluenza 3, Vírus Respiratório Sincicial Bovino e Herpesvírus Bovino Tipo 1 (Inforce 3[®], Zoetis).

4.1.2. Avaliação clínica

Os animais passaram por avaliações clínicas ao longo do período experimental para averiguação da ocorrência de doenças respiratórias. Para isso, foi determinado o Escore Clínico Respiratório (McGuirk, 2008) diariamente, e realizada ultrassonografia torácica (Cramer & Ollivett, 2019) no sétimo dia de vida e, em dias alternados, dos 10 aos 56 dias de idade.

Para a detecção de outras enfermidades, os animais eram monitorados diariamente através de inspeção e aferição de frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, coloração de mucosas, grau de desidratação e escore de fezes. Caso fosse necessário, era realizado o exame detalhado de outros sistemas e exames complementares, que variaram de acordo com o quadro clínico observado.

4.1.3. Coleta e processamento de amostras

Aos 3, 7, 14, 28, 42 e 56 dias de vida, foi realizado *swab* nasofaríngeo dos bezerros. Foram utilizados *swabs* de haste plástica e extremidade de algodão, protegidos por tubo plástico estéril para reduzir contaminação decorrente da inserção na narina. O *swab* foi introduzido na narina esquerda a uma profundidade aproximada de 12 a 18 cm (dependendo do tamanho do bezerro no momento do procedimento), ultrapassando o tubo protetor, até atingir a mucosa nasofaríngea. No local de coleta, o *swab* foi rotacionado enquanto em contato com a mucosa e depois retraído de volta para o tubo protetor e removido em conjunto com ele.

Os espécimes obtidos foram alocados em tubos contendo 1 mL de solução PBS e armazenados a temperatura de -80°C.

4.1.4. Extração de DNA e sequenciamento genético

Os espécimes coletados via *swab* nasofaríngeo foram submetidos a extração de DNA com uso do kit comercial QIAamp DNA Microbiome Kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante.

Foi realizado sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neoprosecta *Microbiome Technologies*, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F com sequência (CCTACGGGRSGCAGCAG), e 806R com sequência (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Wang & Qian, 2009; Caporaso et al., 2012). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se a plataforma MiSeq (Illumina Inc., USA).

4.1.5. Análise bioinformática e estatística

Os arquivos FASTA foram processados utilizando o *pipeline* de QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), responsável pela trimagem das *reads*, remoção de quimeras e classificação de ASV's com base no banco de dados SILVA (Quast et al., 2013).

As leituras *paired-end* foram processadas por filtragem de qualidade usando DADA2 com base na pontuação de qualidade Phred (pontuação média < 20), mesclando as extremidades pareadas, e removendo quimeras e *singletons*. Uma tabela de características foi construída consistindo em variantes de sequência de *amplicon* (*amplicon sequence variants* - ASV). Usando o método de redução de ruído DADA2, regiões de baixa qualidade das sequências foram removidas e a opção de sequência truncada foi definida como 260. Todas as ASV foram alinhadas por MAFFT usando alinhamento q2 e a análise filogenética foi realizada usando Fasttree2. Um classificador de taxonomia de aprendizado de máquina (scikit-learn naïve Bayes) foi treinado com o plugin q2-feature-classifier usando as regiões V3–V4 das sequências 16S rRNA contra sequências de referência do banco de dados SILVA 138 SSU 16S rRNA RefSeq

Versão 15.1 (projeto de banco de dados SILVA rRNA, <https://www.arb-silva.de>). A taxonomia foi atribuída a cada ASV usando o comando “classifysklearn” no q2-feature-classifier. Usando a árvore filogenética enraizada construída, análises de diversidade foram realizadas usando o plugin *diversity* no pacote QIIME 2.

O efeito da idade na estrutura da comunidade microbiana foi avaliado usando a análise de permutação de variância (PERMANOVA) e as dissimilaridades de Bray-Curtis com a função *adonis2* no pacote *vegan*. As métricas de diversidade alfa (índice de diversidade de Shannon, índice de diversidade de Simpson inverso e número de OTUs observadas), e as abundâncias relativas da composição do microbioma foram determinadas usando o pacote *vegan* v. 2.6-6.1.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando RStudio versão 4.3.3 (R Core Team, 2024), e um valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado significativo e valor de p maior que 0,05 e menor ou igual a 0,10 foi considerado como tendência.

5. RESULTADOS

Ao longo do período experimental, dois bezerros necessitaram de tratamento com antimicrobianos. O primeiro apresentou um quadro de onfalouraquite, confirmada por exame ultrassonográfico, aos 7 dias de idade, e que não respondeu a tratamento com penicilina (20.000 UI/Kg, IM, SID, por quatro dias) e aos 13 dias de idade, novamente via ultrassonografia, observou-se imagens sugestivas de cistite. Devido ao quadro de cistite, o animal passou, entre 13 e 30 dias de idade, por mais dois tratamentos com antimicrobiano (enrofloxacino, 7,5 mg/Kg, IM, SID), que totalizaram dez dias de tratamento. Por fim, aos 55 dias de idade, foi diagnosticado com anaplasmosse (*A. marginale*) e foi mais uma vez tratado com enrofloxacino (7,5 mg/Kg, dose única). O segundo bezerro apresentou quadros de beber ruminal, requerendo tratamento com penicilina (15.000 UI/Kg, VO, dose única) aos cinco, oito e dez dias de idade; diarreia, requerendo tratamento com enrofloxacino (7,5 mg/Kg, IM, SID, por três dias) aos quatro e 18 dias de idade; e anaplasmosse (*A. marginale*), requerendo tratamento com enrofloxacino (7,5 mg/Kg, IM, dose única) aos 28 dias de idade.

Em função da possibilidade dos tratamentos múltiplos e/ou extensos com antimicrobianos interferirem no desenvolvimento normal da microbiota nasofaringeana, estes dois animais foram excluídos da análise. Assim, os resultados apresentados a seguir incluem os dados obtidos de 6 bezerros.

A concentração de proteínas séricas foi mensurada entre 24h e 48h após a colostragem e todos apresentaram TIP boa/excelente (proteína sérica total > 5.8 mg/dL) (Godden et al., 2019). O escore clínico respiratório (McGuirk, 2008) e a ultrassonografia torácica (Cramer & Ollivett, 2019) demonstraram a ausência de doença respiratória durante o período experimental.

O sequenciamento resultou em 832 ASVs e um total de 1.022.544 *reads* provenientes de 35 amostras, seis amostras dos dias 3, 7, 14, 42 e 56; e cinco amostras do dia 28. Uma amostra foi excluída do dia 28, pois continha apenas 5 *reads*. Após a exclusão, o total de *reads* das amostras variou de 1.169 a 118.650.

Dos 17 diferentes filos identificados ao longo de todas as amostras, os mais abundantes foram Proteobacteria (89,84%), Actinobacteria (4,93%) e Firmicutes (4,15%). O filo Proteobacteria predominou em todas as amostras, tornando-se ainda mais evidente a partir dos 28 dias de idade (Fig. 1). Essa dominância foi impulsionada principalmente pelos gêneros *Pseudomonas* spp., cuja abundância variou de 74,27% aos 28 dias para 63,89% aos 42 dias e 49,09% aos 56 dias, e *Stenotrophomonas* spp., que aumentou de 15,28% aos 28 dias para 34,41% aos 42 dias e 46,58% aos 56 dias (Fig. 2).

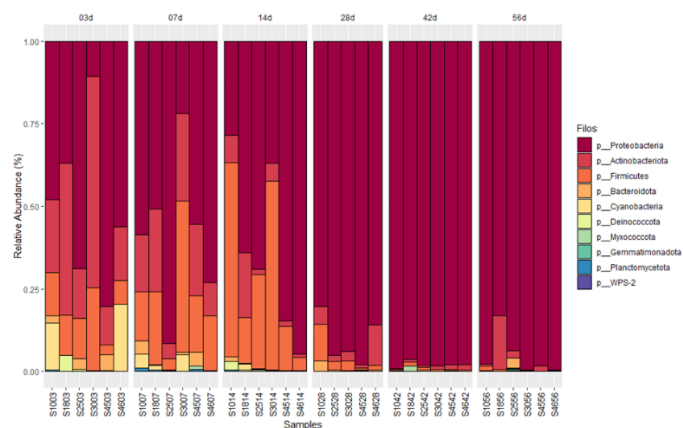


Figura 1. Gráfico de barras apresentando a abundância relativa dos 10 filos mais abundantes nas amostras de nasofaringe de bezerros em aleitamento, separadas pelos dias de coleta. Cada barra representa uma amostra individual, enquanto as diferentes cores indicam os distintos filos. As proporções dos filos são apresentadas como porcentagem do total de sequências em cada amostra.

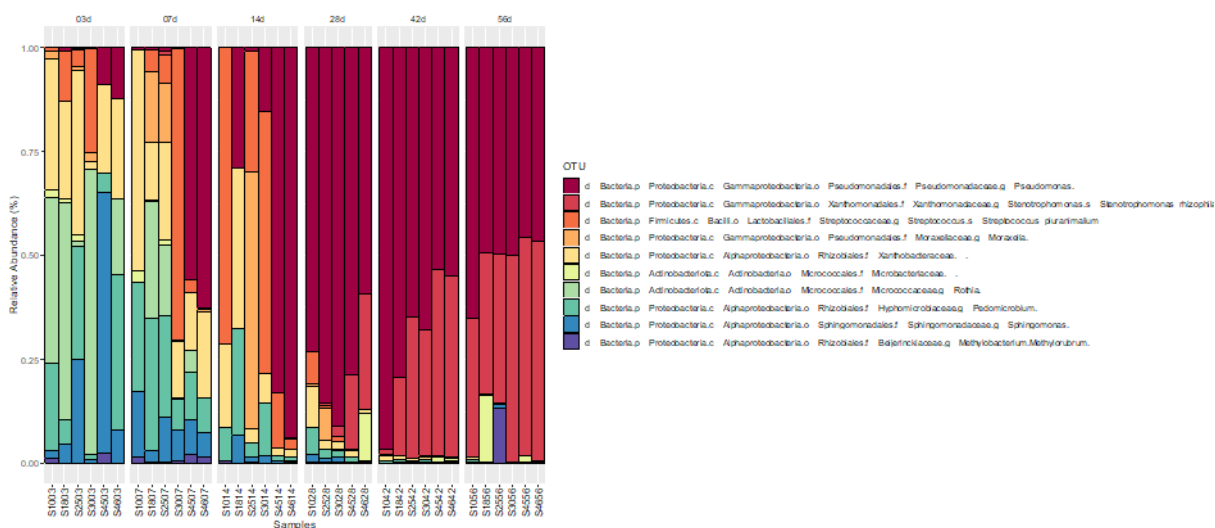


Figura 2. Gráfico de barras apresentando a abundância relativa das 10 OTUs mais abundantes nas amostras de nasofaringe de bezerros em aleitamento, separadas pelos dias de coleta. Cada barra representa uma amostra individual, enquanto as diferentes cores indicam as distintas OTUs. As proporções das OTUs são apresentadas como porcentagem do total de sequências em cada amostra.

A análise temporal revelou variações significativas na abundância relativa de alguns dos principais filos. Proteobacteria apresentou uma faixa de variação de 62,25% a 95,17% ($p < 0,01$), sendo a abundância aos 56 dias significativamente maior em

relação aos dias iniciais (3 e 7 dias). Além do aumento progressivo, este filo manteve-se como o mais abundante em todos os períodos analisados. O filo Firmicutes teve maior abundância aos 14 dias em comparação aos 42 e 56 dias ($p < 0,01$), enquanto o filo Planctomycetota apresentou maior abundância aos 7 dias em relação aos 56 dias ($p < 0,05$) (Fig. 3).

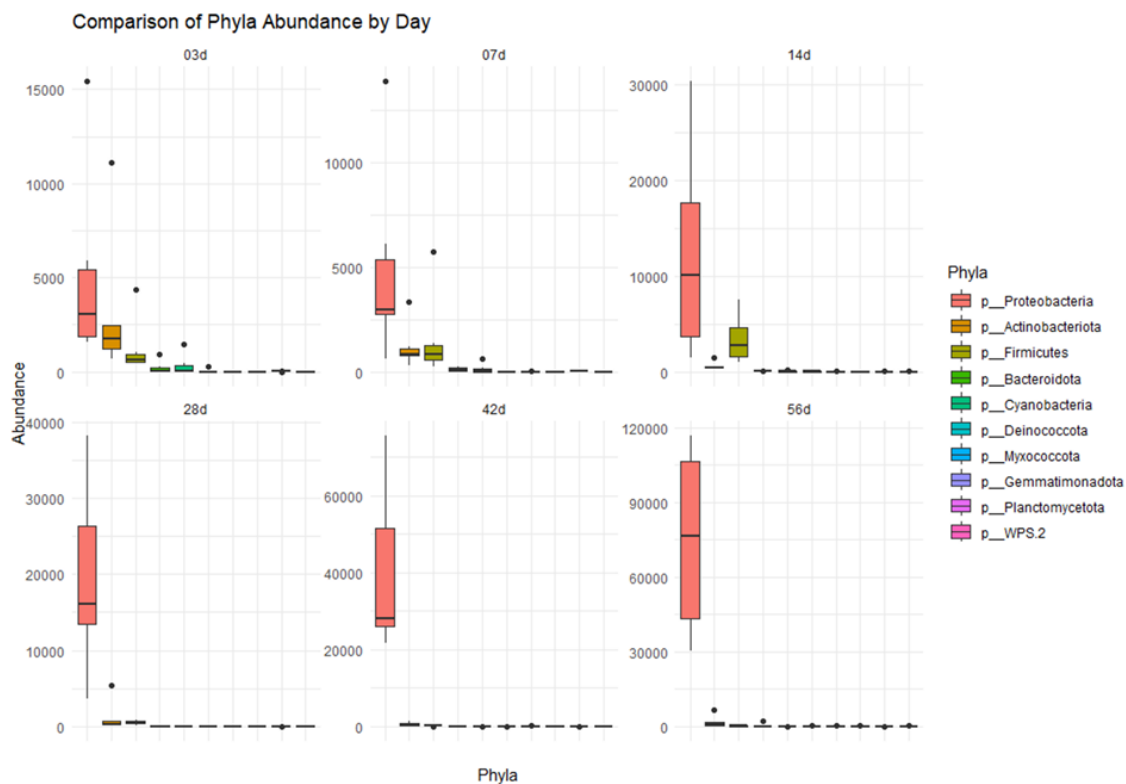


Figura 3. Box-plot da comparação de abundância relativa dos 10 filós mais abundantes identificados nas amostras de nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento, separados pelos dias de coleta.

Em relação às 10 OTUs mais abundantes, não houve diferença significativa na abundância relativa entre as OTUs em cada dia de coleta ou de cada OTU ao longo dos dias (Fig. 4). Entretanto, ao avaliar a homogeneidade das comunidades bacterianas de cada um dos dias de coleta, foi possível notar diferença entre elas ($p = 0.002$). Ao comparar os dias de coleta em pares, identificou-se que os dias 03, 07 e 14 foram diferentes dos dias 42 e 56 ($p < 0,05$); e que os dias 03 ($p = 0,08$) e 07 ($p = 0,07$) tendiam a ser diferentes do dia 28 (Quadro 2).

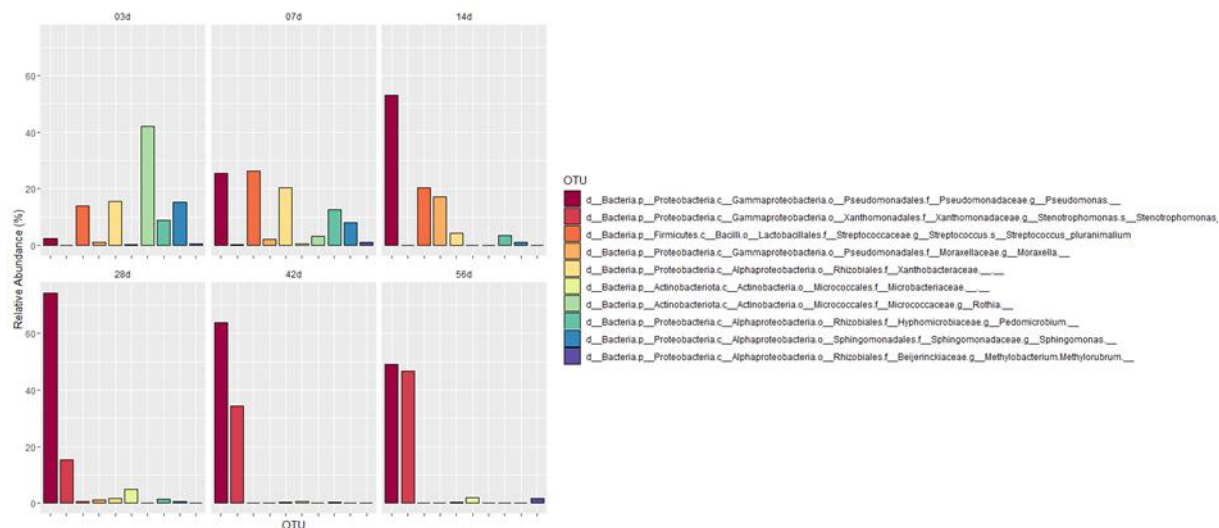


Figura 4. Gráfico de barras da comparação de abundância relativa das 10 OTUs mais abundantes identificados nas amostras de nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento, separados pelos dias de coleta.

Quadro 2. Avaliação ad hoc do teste de permutação para homogeneidade de dispersões multivariadas (comparação em pares) das comunidades bacterianas da nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento.

	03d	07d	14d	28d	42d	56d
03d		0.762	0.820	0.074	0.005	0.016
07d	0.762		0.647	0.086	0.012	0.015
14d	0.817	0.628		0.121	0.009	0.023
28d	0.083	0.073	0.123		0.313	0.558
42d	0.003	0.003	0.006	0.315		0.548
56d	0.007	0.008	0.015	0.564	0.572	

Valor p observado na diagonal inferior e valor p permutado na diagonal superior.

Assim, os dias de coleta foram agrupados em dois períodos distintos (Período 1, contemplando os dias 03, 07 e 14; e Período 2, contemplando os dias 28, 42 e 56), e realizou-se a análise PCoA (Principal Coordinates Analysis), que revelou uma separação visível entre a composição das comunidades bacterianas dos dois períodos (Fig. 5). Os índices de diversidade de Shannon e de Simpson calculados para os períodos também se mostraram distintos, com a diminuição de ambos no período 2 (Fig. 6).

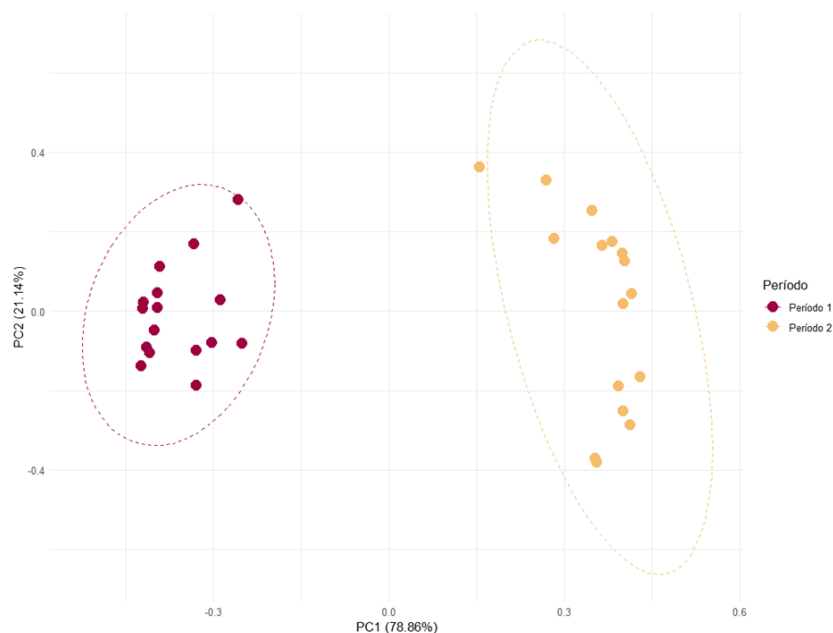


Figura 5. Representação em PCoA (Principal Coordinates Analysis) das comunidades microbianas da nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento, coletadas nos períodos 1 (03, 07 e 14 dias de idade) e 2 (28, 42 e 56 dias de idade). Cada ponto no gráfico corresponde a uma amostra, colorido de acordo com o período de coleta. As elipses representam a dispersão das amostras em torno da média de cada período, com nível de confiança de 95%. A análise foi baseada na abundância das OTUs, utilizando a métrica de dissimilaridade de Bray-Curtis. A proximidade entre pontos reflete a similaridade nas comunidades microbianas entre as amostras.

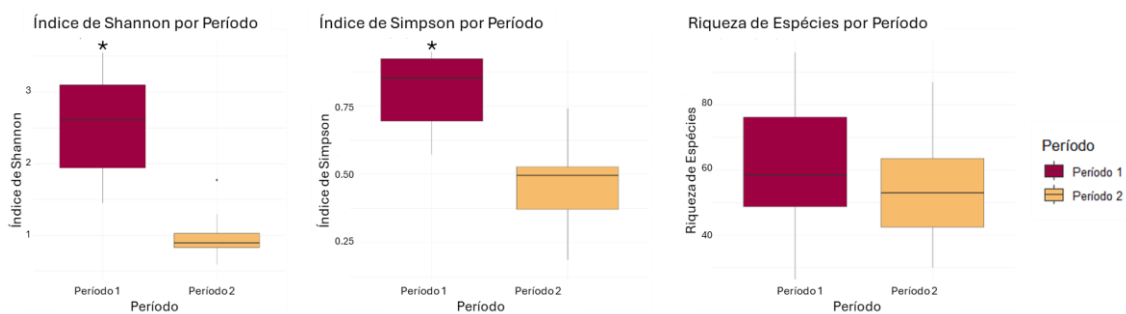


Figura 6. Índices de diversidade (índice de Shannon e índice de Simpson) e riqueza de espécies das comunidades microbianas da nasofaringe de bezerros Holandês em aleitamento, coletadas nos períodos 1 (03, 07 e 14 dias de idade) e 2 (28, 42 e 56 dias de idade). * indica diferença estatística ($p < 0.05$).

6. DISCUSSÃO

A avaliação da composição da microbiota nasofaringeana de bezerros ao longo das primeiras oito semanas de vida trouxe informações importantes no entendimento da dinâmica de colonização do trato respiratório superior (TRS) de bovinos e, associado a outros estudos que explorem a correlação entre microbioma nasofaringeano e a ocorrência de broncopneumonias bacterianas, podem auxiliar a traçar estratégias de prevenção a partir da manipulação da microbiota nasofaringeana.

A abundância relativa de filos observada ao longo das amostras segue um padrão já observado em outros estudos recentes, que também apresentam Proteobacteria como o mais abundante e Actinobacteria e Firmicutes (respectivamente segundo e terceiro filos mais abundantes neste estudo) aparecendo entre os cinco filos mais abundantes ao longo do período de aleitamento de bezerros (Bringhenti et al., 2021; Gaeta et al., 2017; Holman et al., 2017; Lima et al., 2016; Magossi et al., 2024).

A abundância relativa de OTUs, contudo, não sofreu variações significativas neste estudo, tanto ao comparar os animais entre si, quanto ao comparar os dias de coleta. Em relação às OTUs presentes, é difícil achar paralelos claros na literatura, visto que, nesse nível, as variações entre estudos são maiores, demonstrando a susceptibilidade da microbiota a aspectos individuais e condições ambientais. Neste estudo, os aspectos individuais não parecem ser tão importantes, dada a uniformidade dos animais, provenientes do mesmo rebanho, de parto vaginal e nascidos durante um intervalo de 20 dias entre o primeiro e o último. Dentre as variações ambientais que podem relacionar-se à composição de OTUs da microbiota nasofaringeana, podemos destacar a dieta, as instalações, as condições edafoclimáticas e outras práticas de manejo (Doster et al., 2018; Huebner et al., 2019; Weinroth et al., 2019). Os seis bezerros avaliados foram mantidos em uma mesma instalação e submetidos às mesmas práticas de manejo ao longo do período de coletas. Notadamente, passaram pelo mesmo manejo nutricional e receberam vacina intranasal contra vírus respiratórios.

O gênero mais observado ao longo do período de avaliação em todos os animais foi *Pseudomonas* spp. (abundância média de 39,34%). Embora associado a doenças do trato respiratório em humanos (Ishii et al., 2024; Recanatini et al., 2024), *Pseudomonas* spp. foi detectado em bezerros saudáveis de 3, 14 e 35 dias de idade por Lima et al. (2019), e na microbiota vaginal de suas mães, sendo um dos cinco gêneros mais abundantes deste microbioma compartilhado. No presente estudo, os bezerros nasceram de parto vaginal, mas não foi possível a análise da microbiota vaginal materna

para confirmar esta relação. Além disso, não saber qual espécie de *Pseudomonas* spp. predomina nestas amostras impede uma análise mais precisa de seu papel, se benéfico, maléfico ou indiferente. Gaeta et al. (2017), identificaram *Pseudomonas* spp. como um dos 20 gêneros mais abundantes da nasofaringe de bezerros e associaram a um aumento de sua abundância em bezerros com DRB, porém este aumento sabidamente causado por *Pseudomonas fluorescens*. Outro ponto a considerar, é a presença importante de *Pseudomonas* spp. na cavidade oral de bovinos saudáveis (Borsanelli et al., 2018), o que pode influenciar na sua ocorrência no TRS.

Ao avaliar as variações de abundância relativa ao longo do tempo, foram observadas diferenças significativas apenas no nível de filo, com aumento da abundância de Proteobacteria aos 56 dias quando comparado aos 3 e 7 dias de idade (embora tenha se mantido como o filo mais abundante em todos os dias de coleta), e diminuição de Firmicutes aos 42 e 56 dias quando comparado aos 14 dias e de Planctomycetota aos 56 dias quando comparado aos 7 dias. Essa mudança do perfil de filios pode indicar uma mudança rumo à formação da microbiota nasofaringeana estabilizada em bovinos adultos, mas são escassos os estudos que descrevam essa microbiota. Em bovinos na chegada de confinamentos (idade aproximada de um ano), Timsit et al. (2018) observaram Proteobacteria como filo mais abundante da microbiota nasal, seguido de Firmicutes.

A análise PCoA sugere mudanças significativas na estrutura e composição da microbiota entre os períodos 1 (3, 7 e 14 dias) e 2 (28, 42 e 56 dias), ou seja, que alterações ocorrem entre os dias 14 e 28 de vida dos bezerros e estas persistem até o final da avaliação (Fig. 5). Essa mudança é refletida pela diminuição da diversidade observada no Período 2 (Fig. 6). Dada a uniformidade entre os bezerros e a padronização do manejo entre eles, ao se observar uma variação da composição da microbiota nasofaringeana ao longo do tempo, é preciso buscar possíveis mudanças que afetaram a todos de forma semelhante.

Ao traçar um paralelo com a epidemiologia da broncopneumonia em bezerros, sabe-se que o período entre 14 e 28 dias de idade é apontado como o de início da ocorrência da doença nesses animais (Buczinski et al., 2013; Binversie et al., 2020; Mahendran, 2020; Alves, 2022) e esta variação da microbiota pode ser um fator contribuinte para a ocorrência da doença, visto que a diminuição da diversidade da microbiota nasofaringeana está associada à ocorrência de broncopneumonia bacteriana em bovinos (Holman et al., 2015; Timsit et al., 2016, 2018).

Em relação ao que causa essa variação na microbiota, é possível fazer algumas suposições. De modo geral, este é um período de variações pelo caráter de formação da microbiota, com a colonização tendo início no momento do parto e continuando nas semanas subsequentes, a partir da influência de fatores ambientais e da interação com outros animais (Gaeta et al., 2017; Lima et al., 2016, 2019; Osman et al., 2018). Esta evolução da microbiota é corroborada pelos resultados do presente estudo, com variações das comunidades microbianas, representadas também por mudanças em filos específicos.

No presente estudo, devemos considerar a vacinação intranasal a qual os bezerros foram submetidos como um fator contribuinte para mudanças na microbiota nasofaringeana. Em humanos, estudos apontam o uso de vacinas vivas atenuadas como causador de mudanças significativas na estrutura, diversidade e composição taxonômica central de comunidades bacterianas da nasofaringe (Tarabichi et al., 2015). Os bezerros neste estudo foram submetidos à administração de vacina intranasal justamente entre 7 e 14 dias de idade, podendo isso ter influenciado as mudanças observadas na composição das comunidades bacterianas entre os dias 14 e 28.

Este é também um período de marcadas mudanças nos componentes do sistema imune de bezerros. Os anticorpos maternos obtidos via colostro estão diminuindo sua concentração, ao passo que a produção de anticorpos próprios aumenta para suprir a demanda gerada pelo contato com microrganismos, patogênicos ou não. Durante esse momento de transição, a titulação de anticorpos para os diferentes patógenos passa por momentos de baixa, resultando na ocorrência da chamada janela imunológica. O momento de ocorrência dela varia para diferentes imunoglobulinas e dependem da quantidade absorvida via colostro (...). Este momento deixa o bezerro mais propenso a infecções e pode ter um efeito significativo na colonização microbiana (Chase, 2022).

O efeito da microbiota sobre o desenvolvimento do sistema imune, especialmente o de mucosas, é bastante documentado (Cangiano et al., 2023; Villot et al., 2020; Wopereis et al., 2014), mas evidências de que o contrário ocorre, ou seja, que o sistema imune influencia a composição da microbiota, ainda são escassas (Kato, et al., 2014; Kubinak & Round, 2016).

No intestino, 10 a 60% das bactérias que compõem a microbiota local estão ligados a IgA, e existe um perfil para essas bactérias, que são as intimamente associadas aos tecidos dos hospedeiros (Bunker et al., 2015; Planer et al., 2016). No

sistema respiratório, o comportamento é similar, e postula-se que esta característica de ligação de IgA a bactérias sirva como mecanismo de imunoseleção da microbiota (“antibody-mediated immunoselection” – AMIS) (Kubinak & Round, 2016). Assim, podemos levantar dois pontos sobre a relação da colonização microbiana em bezerros com o sistema imune destes animais. O primeiro é que a qualidade da transferência de imunidade passiva (TIP), ao definir o perfil de anticorpos nas primeiras semanas de vida, pode influenciar na colonização microbiana inicial; e o segundo é que a janela imunológica pode ser um momento de interferência na dinâmica de colonização, levando a mudanças ecológicas nas comunidades bacterianas.

No presente estudo, todos os bezerros receberam colostro de um banco de colostro congelado, obtido de vacas de um mesmo rebanho e padronizados para, ao menos, 25% Brix e a mensuração de proteína sérica total demonstrou TIP boa/excelente em todos os animais. De fato, não houve variações individuais na microbiota mensurada aos 3, 7 e 14 dias, mas a diminuição da diversidade alfa ($p < 0.05$) e a mudança na composição da microbiota a partir do dia 28, coincidem com a janela imunológica de bezerros e ela pode ajudar a explicar essas variações.

Outro fator explorado na literatura sobre formação de microbiota em mamíferos é a relação entre a colonização bacteriana dos tratos digestório e respiratório (Maynou et al., 2019). Em bovinos, o comportamento de lambar as narinas, além da comunicação entre oro e nasofaringe, ajudam a explicar alguns paralelos entre as microbiotas oral e do TRS. Embora o microbioma da cavidade oral e orofaringe tenha sido pouco explorado na literatura até então, bactérias da família Pasteurellacea, associadas à ocorrência de DRB, já foram descritas na cavidade oral e orofaringe de bezerros, por exemplo (Barden et al., 2020; McMullen, Alexander, Léguillette, et al., 2020), bem como outras taxa descritas como importantes na nasofaringe de bezerros, como *Pseudomonas*, também já foram apontadas como predominantes na cavidade oral saudável de bovinos (Borsanelli et al., 2018).

Considerando a influência do microbioma oral sobre a colonização bacteriana do TRS, destaca-se a influência da dieta e manejo nutricional sobre a formação da microbiota do trato digestório e as mudanças marcantes que a dieta de bezerros sofre durante a fase de aleitamento, que são acompanhadas por mudanças na fisiologia digestiva desses animais, como o início da ruminação (Baldwin et al., 2004; Malmuthuge et al., 2015). Embora durante todo recorte de tempo da avaliação os bezerros estivessem em aleitamento, desde a primeira semana de vida, o consumo de feno e concentrado foi estimulado, também visando a transição para uma dieta sólida ao final

da oitava semana de vida. Concomitantemente, o crescimento dos animais leva ao aumento no consumo, a princípio de substituto de leite, e, posteriormente, de alimentos sólidos (visto que o fornecimento de substituo de leite era limitado e o acesso a feno e concentrado não), e muda a característica da dieta desses animais e pode influenciar o perfil microbiano que irá colonizar os tratos digestório e respiratório. A influência da dieta na formação e composição da microbiota ao longo do trato digestório vem sendo alvo de estudos há anos (Jami et al., 2013; Li et al., 2012; Malmuthuge et al., 2014), mas sua influência sobre o microbioma respiratório é menos explorada. Maynou et al. (2019) compararam a composição da microbiota fecal e nasal de bezerros sob dois regimes de aleitamento (substituto de leite e leite de descarte pasteurizado), e puderam detectar diferença na abundância relativa de certas taxa no nível de família e gênero na microbiota nasal de acordo com o tipo de aleitamento fornecido, indicando influência da dieta na microbiota respiratória e um caminho a ser explorado em estudos futuros. A presença de baixas concentrações de antimicrobianos no leite de descarte pasteurizado foi apontada como possível causa para essa variação na microbiota entre bezerros alimentados com substituto de leite ou leite de descarte, indicando o potencial de impacto que a dieta promove sobre a microbiota respiratória (Maynou et al., 2019).

A influência da dieta como fator de diferenciação entre animais foi minimizada no presente estudo, pois foi padronizada entre os bezerros, mas pode ajudar a explicar as variações ao longo do tempo, que foram comuns a todos. O período entre 14 e 28 dias, em que se observa a principal mudança na comunidade bacteriana identificadas na nasofaringe dos animais, coincide com a estabilização do consumo de substituto de leite e o aumento do consumo de alimentos sólidos. Um ponto negativo do estudo foi o não monitoramento preciso do consumo de alimentos sólidos pelos bezerros, apenas o volume de substituto de leite era monitorado e limitado, mas é possível afirmar que houve um aumento no consumo de feno e concentrado pela necessidade do maior fornecimento de ambos ao longo de todo o período de experimento para os seis animais avaliados.

7. CONCLUSÃO

A dinâmica de colonização bacteriana da nasofaringe em bezerras observadas neste estudo demonstra que o período compreendido entre 2 e 4 semanas de vida constitui uma fase crítica de transição na composição da microbiota em desenvolvimento, acompanhada por uma redução significativa da diversidade microbiana. Embora múltiplos fatores possam contribuir para essas alterações, investigações adicionais são necessárias para elucidar seu real impacto biológico. Os

achados do presente estudo, contudo, corroboram observações prévias acerca do início da ocorrência de doenças respiratórias em bezerros e sugerem potenciais oportunidades para o estabelecimento de medidas preventivas direcionadas a essas enfermidades.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A saúde respiratória em bezerros neonatos é um determinante crucial da produtividade zootécnica e do bem-estar animal, e o presente trabalho ressalta o estabelecimento da microbiota respiratória como um processo dinâmico, intimamente ligado ao desenvolvimento anátomo-fisiológico e, fundamentalmente, ao amadurecimento do sistema imune de bovinos.

O processo de colonização do trato respiratório inicia-se ao nascimento, com a nasofaringe emergindo como o reservatório microbiano primário. Esta fase inicial é marcada, ainda, por um estado agamaglobulinêmico do bezerro ao nascimento, e que apresenta também um sistema imune com viés Th2, cuja modulação e aceleração dependem criticamente da imunidade passiva fornecida pelo colostro. A ação conjunta de imunoglobulinas, leucócitos, citocinas colostrais e o perfil hormonal do neonato facilita um estado de tolerância imune que é essencial para o estabelecimento seguro e saudável do microbioma respiratório.

O presente estudo forneceu uma caracterização inicial da dinâmica da microbiota nasofaringeana em bezerros em aleitamento, revelando uma reestruturação ecológica significativa. Foi observada uma diminuição acentuada na diversidade microbiana entre os 14 e 28 dias de idade, um período que se alinha com eventos fisiológicos críticos, como a janela imunológica e o mudanças no perfil alimentar. Este declínio na diversidade e a subsequente dominância progressiva de filos como *Proteobacteria* e de gêneros como *Stenotrophomonas* spp. em idades mais avançadas sugerem uma forte influência de fatores ambientais, de manejo (como a vacinação) e da correlação das microbiotas gastrointestinal e respiratória.

A coincidência deste período de diminuição da diversidade nasofaringeana com a suscetibilidade epidemiológica à ocorrência de broncopneumonias bacterianas reforça a hipótese de que a disbiose no trato respiratório superior é um fator de risco significativo. Esta correlação não só estabelece o microbioma como um potencial biomarcador para a saúde respiratória, mas também o consolida como um alvo estratégico para intervenções preventivas.

Dada a sensibilidade deste ecossistema em formação, o uso de antimicrobianos profiláticos deve ser desaconselhado devido à sua capacidade de alterar a estrutura e diversidade microbiana por longos períodos e o risco de selecionar cepas resistentes. Em contraste, a administração de probióticos emerge como uma via promissora. Ao modular benéficamente o ecossistema respiratório e, indiretamente, o sistema imune, as abordagens baseadas no microbioma oferecem um caminho para mitigar a ocorrência de broncopneumonias, otimizando assim a saúde animal e a produtividade na indústria leiteira.

Em última análise, este trabalho representa um passo fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo informadas e baseadas na modulação da microbiota, visando a melhoria sustentável da saúde respiratória de bezerros Holandês.

9. PERSPECTIVAS

Com base nas conclusões do estudo e nas lacunas identificadas, propõe-se, como perspectivas futuras:

- Avaliar de forma mais aprofundada o período entre 14 e 28 dias de idade, por meio de coletas em intervalos menores, buscando identificar padrões de adaptação da microbiota nasofaringeana nesta fase;
- Investigar a adaptação do sistema imune e a transição alimentar que ocorre durante a fase de aleitamento de bezerros e seu impacto sobre a formação e manutenção da microbiota respiratória;
- Correlacionar o metagenoma respiratório bovino com o estado saúde-doença do animal e associar este conhecimento à dinâmica de colonização para traçar estratégias preventivas que possam atuar em janelas críticas para a ocorrência de doença respiratória bovina;
- Identificar e isolar bactérias da nasofaringe de bovinos saudáveis para a seleção de probióticos respiratórios e avaliar sua aplicação para determinação de posologia e momento de aplicação ideais;
- Investigar o impacto do tratamento profilático com antimicrobianos em bovinos, com base no estudo do resistoma da microbiota respiratória de bovinos.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, K.; MA, J.; ANTONY, K.M. *et al.* The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* v.6, n.237, p.237-65, 2014.
- ACKERMANN, M. R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J. A. Innate immunology of bovine respiratory disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v.26, n.2, p. 215-28, 2010.
- ALLEN, J.W.; VIEL, L.; BATEMAN, K.G. *et al.* The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can. J. Vet. Res.* v.55, p.341, 1991.
- AMAT, S.; ALEXANDER, T.W.; HOLMAN, D.B. *et al.* Intranasal bacterial therapeutics reduce colonization by the respiratory pathogen *Mannheimia haemolytica* in dairy calves. *mSystems.* v.5, n.2, p.1110-28, 2020.
- AMAT, S.; TIMSIT, E.; BAINES, D. *et al.* Development of bacterial therapeutics against the bovine respiratory pathogen *Mannheimia haemolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.85, n.21, p.e01359-19, 2019.
- AMAT, S.; TIMSIT, E.; WORKENTINE, M. *et al.* A Single Intranasal Dose of Bacterial Therapeutics to Calves Confers Longitudinal Modulation of the Nasopharyngeal Microbiota: a Pilot Study. *mSystems.* v.8, n.2, 2023.
- ANDERSON, R.C.; COOKSON, A.L.; MCNABB, W.C. *et al.* *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS. Microbiol. Lett.* v.309, n.2, p.84–92, 2010.
- ANDRADE, J.P.; ANTEVELI, G.; ALVES, B.A. *et al.* Comparison of diagnostic methods for respiratory disease in calves used on farms with thoracic radiography. *Vet. Med. Int.* v.2025, p.5539202, 2025.
- ATARASHI, K.; TANOUE, T.; OSHIMA, K. *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* v.500, p.232–236, 2013.
- AUDY, J.; MATHIEU, O.; BELVIS, J. *et al.* Transcriptomic response of immune signalling pathways in intestinal epithelial cells exposed to lipopolysaccharides, Gram negative bacteria or potentially probiotic microbes. *Benef. Microbes.* v.3, n.4, p.273-86, 2012.
- BALDWIN, R.L.; MCLEOD, K.R.; KLOTZ, J.L. *et al.* Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J. Dairy Sci.*, v.87, p. E55-E65, 2004.
- BARDEN, M.; RICHARDS-RIOS, P.; GANDA, E. *et al.* Maternal influences on oral and faecal microbiota maturation in neonatal calves in beef and dairy production systems. *Anim. Microbiome.* v.2, n.1, p.31, 2020.

- BARRINGTON G.M.; PARISH, S.M. Bovine neonatal immunology, *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pr.* v.17, p.463–476, 2001.
- BELKAID, Y.; HAND, T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* v.157, p.121-41, 2014.
- BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DÍAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S. *et al.* Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* v.61, p.160–74, 2012.
- BERNHARD, W. Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology. *Ann. Anat.* v.208, p.146-150, 2016.
- BINVERSIE, E.S.; RUEGG, P.L.; COMBS, D.K. *et al.* Randomized clinical trial to assess the effect of antibiotic therapy on health and growth of preweaned dairy calves diagnosed with respiratory disease using respiratory scoring and lung ultrasound. *J. Dairy Sci.* v.103, n.12, p.11723–11735, 2020.
- BLANK, D.A.; KAMLIN, C.O.F.; ROGERSON, S.R. *et al.* Lung ultrasound immediately after birth to describe normal neonatal transition: an observational study. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal.* v.103, p.F157–F162, 2018.
- BORSANELLI, A.C.; LAPPIN, D.F.; VIORA, L. *et al.* Microbiomes associated with bovine periodontitis and oral health. *Vet. Microbiol.* v.218, p.1–6, 2018.
- BRANDTZAEG, P. Potential of nasopharynx-associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* v.183, p.1595–604, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Produtos Biológicos**. Brasília, DF: MAPA, 2025. Disponível em: https://mapa-indicadores.agricultura.gov.br/publico/extensions/Produtos_Biologicos/Produtos_Biologicos.html. Acesso em: 19 dez. 2025.
- BRINGHENTI, L.; PALLU, M.; SILVA, J.C. *et al.* Effect of treatment of pneumonia and otitis media with tildipirosin or florfenicol + flunixin meglumine on health and upper respiratory tract microbiota of preweaned Holstein dairy heifers. *J. Dairy Sci.* v.104, n.9, p.10291–10309, 2021.
- BROWN, R.L.; SEQUEIRA, R.P.; CLARKE, T.B. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat. Commun.* v.8, p.1512, 2017.
- BUCZINSKI, S.; FORTÉ, G.; BÉLANGER, A.M. Short communication: Planning considerations for on-farm dairy processing enterprises. *J Dairy Sci.*, v.96, n.7, p.4523–4528, 2013.
- BUNKER, J.J.; FLYNN, T.M.; KOVAL, J.C. *et al.* (). Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity.* v.43, n.3, p.541–553, 2015.
- CANGIANO, L.R.; IPHARRAGUERRE, I.R.; GUAN, L.L. *et al.* Prophylactic feeding of neomycin to Holstein calves alters gut microbiota, bile acid metabolism

and expression of genes involved in immunometabolic regulation. *Front. Microbiol.* v.14, p.1210142, 2023a.

CANGIANO, L.R.; VILLOT, C., GUAN, L.L. *et al.* Graduate Student Literature Review: Developmental adaptations of immune function in calves and the influence of the intestinal microbiota in health and disease. *J. Dairy Sci.* v.107, p.2543-55, 2024.

CANGIANO, L.R.; VILLOT, C.; AMORIN-HEGEDUS, R. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* boulardii accelerates intestinal microbiota maturation and is correlated with increased secretory IgA production in neonatal dairy calves. *Front. Microbiol.* v.14, p. 1129250, 2023.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, v.6, n.8, p.1621–1624, 2012.

CASTLEMAN, W.L.; LAY, J.C. Morphometric and ultrastructural study of postnatal lung growth and development in calves. *Am. J. Vet. Res.* v.51, n.5, p.789-95, 1990.

CHAI, J.; CAPIK, S.F.; KEGLEY, B. *et al.* Bovine respiratory microbiota of feedlot cattle and its association with disease. *Vet. Res.* v.53, n.1, p.4, 2022.

CHASE, C. Fatos essenciais: os elementos básicos do sistema imune bovino. In: CHASE, C.; PARREÑO, V.; BRADFORD, B. *et al.* (1ªEd), Imunidade bovina: uma abordagem pratica da imunologia e da vacinologia. Espanha: HIPRA S.A., 2022. p.2-29.

CHASE, C.; KAUSHIK, R.S. Mucosal immune system of cattle: all immune responses begin here. *Vet. Clin. N. Am-Food A.* v.35, n.3, p.431-51, 2019.

CHASE, C.C.L.; HURLEY, D.J.; REBER, A.J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* v.24, p.87–104, 2008.

CHATTHA, K.S.; FIRTH, M.A.; HODGINS, D.C. *et al.* Age-related variation in expression of CD21 and CD32 on bovine lymphocytes: A cross-sectional study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.130, p.70–78, 2009.

CHEN, S.; HAO, H.; YAN, X. *et al.* Genome-wide analysis of *Mycoplasma dispar* provides insights into putative virulence factors and phylogenetic relationships. *G3.* v.9, n.2, p.317-25, 2019.

CHOLEWINSKA, P.; CZYZ, K.; NOWAKOWSKI, P. *et al.* The microbiome of the digestive system of ruminants—A review. *Anim. Health Res. Rev.* v.21, p.3-14, 2020.

CLEMMONS, B.A.; VOY, B.H.; MYER, P.R. Altering the gut microbiome of cattle: Considerations of host-microbiome interactions for persistent microbiome manipulation. *Microb. Ecol.* v.77, p.523-36, 2019.

CLUA, P.; TOMOKIYO, M.; RAYA TONETTI, F. *et al.* The role of alveolar macrophages in the improved protection against respiratory syncytial virus and pneumococcal superinfection induced by the peptidoglycan of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. *Cells*. v9, p.1653, 2020.

CORTESE, V.S.; WOOLUMS, A.; HURLEY, D.J. *et al.* Comparison of interferon and bovine herpesvirus-1-specific IgA levels in nasal secretions of dairy cattle administered an intranasal modified live viral vaccine prior to calving or on the day of calving. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.187, p.35-41, 2017.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS, S.L. (6^a Ed.). *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: Saunders, 1999. 1425p.

COUTINHO, A. S. *Mannheimiose pneumônica experimentalmente induzida em bezerras pela Mannheimia (Pasteurella) haemolytica A1- cepa D153: achados do exame físico, hemograma e swabs nasal e nasofaríngeo*. 2004. 189f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo.

CRAMER, M.C.; OLLIVETT, T.L. Growth of preweaned, group-housed dairy calves diagnosed with respiratory disease using clinical respiratory scoring and thoracic ultrasound—A cohort study. *J. Dairy Sci.* v. 102, n. 5, 2019.

CUNNINGHAM, H.C.; AUSTIN, K.J.; CAMMACK, K.M. Influence of maternal factors on the rumen microbiome and subsequent host performance. *Transl. Anim. Sci.* v.2, p.S101-S105, 2018.

D'ARGENIO, V. The prenatal microbiome: a new player for human health. *High-Throughput*. v.7, p.4, 2018.

DE ZABALA, L.E.; WEINMAN, D.E. Prenatal development of bovine lung. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. v.13, p.1-14, 1984.

DEDONDER, K.D.; APLEY, M.D. A review of the expected effects of antimicrobials in bovine respiratory disease treatment and control using outcomes from published randomized clinical trials with negative controls. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v.31, p.97–111, 2015.

DERSCHEID, R.J.; ACKERMANN, M.R. The innate immune system of the perinatal lung and responses to respiratory syncytial virus infection. *Vet Pathol.* v.50, n.5, p.827-41, 2013.

DEZFOULI, M.R.; EFTEKHARI, Z.; SURESHJANI, M. *et al.* The hydrophilic proteins of lung surfactant as a prognostic marker in experimental pneumonia. *Iran. J. Vet. Med.* v.11, n.1, p.1-8, 2017.

DHAM, S. Immunomodulation — clinical applications. *Med J. Armed Forces India*, v.51, n.3, p.149–150, 1995.

DICKSON, R.P.; ERB-DOWNWARD, J.R.; FREEMAN, C.M. *et al.* Bacterial topography of the healthy human lower respiratory tract. *mBio*. v.8, p.e02287-16, 2017.

DICKSON, R.P.; ERB-DOWNWARD, J.R.; FREEMAN, C.M. *et al.* Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, v.12, n.6, p.821-30, 2015.

DICKSON, R.P.; ERB-DOWNWARD, J.R.; MARTINEZ F.J. *et al.* The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu. Rev. Physiol.* v.78, p.481-504, 2016.

DICKSON, R.P.; MARTINEZ, F.J.; HUFFNAGLE, G.B. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet*, v.384, p.691-702, 2014.

DONOHUE, D.R.; COLLINS, L.B.; WALI, A. *et al.* The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol. Cell*. v.48, p.612–626, 2012.

DOSTER, E.; ROVIRA, P.; NOYES, N.R. *et al.* Investigating Effects of Tulathromycin Metaphylaxis on the Fecal Resistome and Microbiome of Commercial Feedlot Cattle Early in the Feeding Period. *Front. Microbiol.* v.9, p. 1715, 2018.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. (4^a Ed.) *Tratado de anatomia veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 872p.

EWASCHUK, J.B.; DIAZ, H.; MEDDINGS, L. *et al.* Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* v.295, n.5, p.1025-34, 2008.

FALLANI, M.; AMARRI, S.; UUSIJARVI, A. *et al.* Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology* v.157, p.1385–1392, 2011.

FERNANDEZ, E.M.; VALENTI, V.; ROCKEL, C. *et al.* Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*. v.60, n.8, p.1050–1059, 2011.

FISCHER, A.J.; MALMUTHUGE, N.; GUAN L.L. *et al.* Short communication: The effect of heat treatment of bovine colostrum on the concentration of oligosaccharides in colostrum and in the intestine of neonatal male Holstein calves. *J. Dairy Sci.* v.101, p.401–407, 2018.

FURMAN, O.; SHENHAV, L.; SASSON, G. *et al.* Stochasticity constrained by deterministic effects of diet and age drive rumen microbiome assembly dynamics. *Nat. Commun.* v.11, p.1-13, 2020.

GAETA, N.C.; LIMA, S.F.; TEIXEIRA, A.G. *et al.* Deciphering upper respiratory tract microbiota complexity in healthy calves and calves that develop respiratory disease using shotgun metagenomics. *J. Dairy Sci.* v.100, n.2, p.1445-58, 2017.

GALDEANO, M.C.; NUÑEZ, I.N.; DE MORENO DE LE BLANC, A. *et al.* Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy malnutrition model in mice. *BMC Gastroenterol.* v.11, p.64, 2011.

GENSOLLEN, T.; IYER, S.S.; KASPER, D.L. *et al.* How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science.* v.352, p.539-44, 2016.

GLENDINNING, L.; WRIGHT, S.; POLLOCK, J. *et al.* Variability of the sheep lung microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* v.82, n.11, p.3225, 2016.

GODDEN, S.M.; LOMBARD, J.E.; WOOLUMS, A.R. Colostrum management for dairy calves. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* v.35, p.535–556, 2019.

GOMEZ, D.E.; GALVÃO, K.N.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C. *et al.* The Cattle Microbiota and the Immune System: An Evolving Field. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v.35, n.3, p.485-505, 2019.

GÓMEZ-LLORENTE, C.; MUÑOZ, S.; GIL, A. Role of toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proc. Nutr. Soc.* v.69, p.381–9, 2010.

GRANUCCI, F.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Interactions of bacterial pathogens with dendritic cells during invasion of mucosal surfaces. *Curr. Opin. Microbiol.* v.6, p.72-76, 2003.

GREENHALGH, K.; MEYER, K.M.; AAGAARD, K.M. *et al.* The human gut microbiome in health: Establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environ. Microbiol.* v.18, p.2103-16, 2016.

GRIFFIN, D.; CHENGAPPA, M.M.; KUSZAK, J. *et al.* Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. of N. Am. - Food Anim. Pract.* v.26, n.2, p.381–94, 2010.

GRUBOR, B.; MEYERHOLZ, D.K.; ACKERMANN, M.R. Collectins and cationic antimicrobial peptides of the respiratory epithelia. *Vet. Pathol.* v.43, p.595–612, 2006.

GUERRA-MAUPOME, M.; SLATE, J.R.; MCGILL, J.L. Gamma delta T cell function in ruminants. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* v.35, p.453–469, 2019.

GUZMAN, E.; HOPE, J.; TAYLOR, G. *et al.* Bovine $\gamma\delta$ T cells are a major regulatory T cell subset. *J. Immunol.* v.193, p.208–222, 2014.

HARBIGE, L.S.; PINTO, E.; ALLGROVE, J. *et al.* Immune response of healthy adults to the ingested probiotic *Lactobacillus casei* Shirota. *Scand. J. Immunol.* v.84, p.353-64, 2016.

HARRIS, N.B.; BARLETTA, R.G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* v.14, p.489 -512, 2001.

HASSIG, M.; STADLER, T.; LUTZ, H. Transition from maternal to endogenous antibodies in newborn calves. *Vet. Rec.*, v.160, n.7, p.234-235, 2007.

HOARAU, C.; LAGARAINÉ, C.; MARTIN, L. *et al.* Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.117, n.3, p.696-702, 2006.

HOLMAN, D.B.; MCALLISTER, T.A.; TOPP, E. *et al.* The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease. *Vet Microbiol.* v.180, n.1-2, p.90–5, 2015.

HOLMAN, D.B.; TIMSIT, E.; AMAT, S. *et al.* The nasopharyngeal microbiota of beef cattle before and after transport to a feedlot. *BMC Microbiol.* v.17, p.1–12, 2017.

HOLMAN, D.B.; TIMSIT, E.; BOOKER, C.W. *et al.* Injectable antimicrobials in commercial feedlot cattle and their effect on the nasopharyngeal microbiota and antimicrobial resistance. *Vet. Microbiol.* v.214, p.140-47, 2018.

HOLMAN, D.B.; YANG, W.; ALEXANDER, T.W. Antibiotic treatment in feedlot cattle: a longitudinal study of the effect of oxytetracycline and tulathromycin on the fecal and nasopharyngeal microbiota. *Microbiome.* v.7, n.1, p.86, 2019.

HOWARD, C.J.; THOMAS, L.H.; PARSONS, K.R. Comparative pathogenicity of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma dispar* for the respiratory tract of calves. *Isr. J. Med. Sci.* v.23, n.6, p.621-24, 1987.

HOYER, C.; GRUNERT, E.; JOCHLE, W. Plasma glucocorticoid concentrations in calves as an indicator of stress during parturition. *Am. J. Vet. Res.* v.51, p.1882–1884, 1990.

HSU, H.; CHEN, C.; NENNINGER, A. *et al.* WC1 is a hybrid $\gamma\delta$ TCR coreceptor and pattern recognition receptor for pathogenic bacteria. *J. Immunol.* v.194, p.2280–2288, 2015.

HUEBNER, K.L.; MARTIN, J.N.; WEISSEND, C.J. *et al.* Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on liver abscesses, fecal microbiome, and resistome in feedlot cattle raised without antibiotics. *Sci. Rep.* v.9, n.1, 2019.

HUHTA, H.; HELMINEN, O.; KAUPPILA, J.H. *et al.* The expression of toll-like receptors in normal human and murine gastrointestinal organs and the effect of microbiome and cancer. *J. Histochem. Cytochem.* v.64, n.8, p.470-82, 2016.

IPHARRAGUERRE, I.R.; PASTOR, J.J.; GAVALDA-NAVARRO, A. *et al.* Antimicrobial promotion of pig growth is associated with tissue-specific remodeling of bile acid signature and signaling. *Sci. Rep.* v.8, p.13671, 2018.

ISHII, H.; KUSHIMA, H.; KOIDE, Y. *et al.* *Pseudomonas fluorescens* pneumonia. *International Journal of Infectious Diseases*, v.140, p.92–94, 2024.

ISLAM, A.; ALBARRACIN, L.; TOMOKIYO, M. *et al.* Immunobiotic Lactobacilli Improve Resistance of Respiratory Epithelial Cells to SARS-CoV-2 Infection. *Pathogens*. v.10, n.9, p.1197, 2021.

JACOB, S.K.; RAMNATH, V.; PHILOMINA, P.T. *et al.* Assessment of physiological stress in periparturient cows and neonatal calves *Indian J. Physiol. Pharmacol.* v.45, p.233–238, 2001.

JAMI, E.; ISRAEL, A.; KOTSER, A. *et al.* Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.* v.7, p.1069-79, 2013.

JANA, S.; MANJARI, P.; HYDER, I. (2023). Physiology of Respiration. In: Das, P.K., Sejian, V., Mukherjee, J., Banerjee, D. (eds) Textbook of Veterinary Physiology. Springer:Singapore.

JEON, S.G.; KAYAMA, H.; UEDA, Y. *et al.* Probiotic bifidobacterium breve induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* v.8, p.e1002714, 2012.

KAMPEN, A.H.; OLSEN, I.; TOLLERSRUD, T. *et al.* Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life, *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.113, p.53–63, 2006.

KATO, L.M.; KAWAMOTO, S.; MARUYA, M. *et al.* The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunol. Rev.* v.260, n.1, p.67-75, 2014.

KATWAL, P.; THOMAS, M.; UPRETY, T. *et al.* Development and biochemical and immunological characterization of early passage and immortalized bovine intestinal epithelial cell lines from the ileum of a young calf. *Cytotechnology.* v.71, p.127-48, 2019.

KIM, M.; QIE, Y.; PARK, J. *et al.* Gut microbial metabolites fuel host antibody responses. *Cell Host Microbe.* v.20, p.202–214, 2016.

KIRSCHVINK N. Respiratory function in cattle: impact of breed, heritability, and external factors. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* v.115, p.265-70, 2008.

KONSTANTINOV, S.R.; SMIDT, H.; DE VOS W.M. *et al.* S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.105, n.49, p.19474-79, 2008.

KUBINAK, J.L.; ROUND, J.L. Do antibodies select a healthy microbiota? *Nat. Rev. Immunol.* v.16, n.12, p.767-774, 2016.

KVIDERA, S.K.; DICKSON, M.J.; ABUAJAMIEH, M. *et al.* Intentionally induced intestinal barrier dysfunction causes inflammation, affects metabolism, and reduces productivity in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* v.100, p.4113-27, 2017.

LAFORÉST-LAPOINTE, I.; ARRIETA, M.C. Patterns of early-life gut microbial colonization during human immune development: An ecological perspective. *Front. Immunol.* v.8, p.788, 2017.

LARSON, B.K.; HEARY, H.K.; DEVERY, J.E. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland, *J. Dairy Sci.*, v.63, p.665–671, 1980.

LEE, C.S.; WOODING, F.B.; KEMP, P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows' secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res.*, v.47, p.39–50, 1980.

LEE, J.; MO, J.H.; KATURA, K. *et al.* Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* v.8, p.1327-36, 2006.

LEFEBVRE, P.; CARIOU, B.; LIEN, F. *et al.* Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* v.89, n.147–191, 2009.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp. Clin. Endocrinol.* v.245, p.57-60, 1994.

LI, R.W.; CONNOR, E.E.; LI, C. *et al.* Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* v.14, n.1, p.129–139, 2012.

LIEBICH, H.G. (2019). *Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds: textbook and color atlas.* (5th ed.). 5M Publishing Ltd.:Sheffield.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; PABST, R. MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res.* v.37, p.257-80, 2006.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIEDEL-CASPARI, G.; POHLENZ, J.F. Uptake of colostrum leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.85, p.33–40, 2002.

LIMA S.F.; BICALHO M.L.S.; BICALHO R.C. The *Bos taurus* maternal microbiome: Role in determining the progeny early-life upper respiratory tract microbiome and health. *PLoS One.* v.14, p.e0208014, 2019.

LIMA, S.F.; TEIXEIRA, A.G.; HIGGINS, C.H. *et al.* The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. *Sci. Rep.* v.6, p.29050, 2016.

MACHO FERNANDEZ, E.; VALENTI, V.; ROCKEL, C. *et al.* Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut.* v.60, n.8, p.1050-9, 2011.

MAGOSSI, G.; SCHMIDT, K.N.; WINDERS, T.M. *et al.* A single intranasal dose of essential oil spray confers modulation of the nasopharyngeal microbiota and short-term inhibition of Mannheimia in feedlot cattle: a pilot study. *Sci. Rep.* v.14, n.1, 2024.

MAHENDRAN, S.A. Use of fever detection in combination with thoracic ultrasonography to identify respiratory disease, and compare treatments of antimicrobials and NSAID: A randomised study in dairy calves. *Vet. Rec. Open.* v.7, n.1, p.e000415, 2020.

MALDONADO-CONTRERAS, A.L.; MCCORMICK, B.A. Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell Tissue Res.* v.343, p.5-12, 2011.

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P.J.; GUAN, L.L. Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. *Appl. Environ. Microbiol.* v.80, n.6, p.2021–2028, 2014.

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P.J.; GUAN, L.L. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Front. Vet. Sci.* v.2, p.36, 2015.

MAN, W.H.; DE STEENHUIJSEN PITERS, W.A.A.; BOGAERT, D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* v.15, p.259-70, 2017.

MANTIS, N.J.; CHEUNG, M.C.; CHINTALACHARUVU, K.R. *et al.* Selective adherence of IgA to Murine Peyer's patch M cells: Evidence for a novel IgA receptor. *J. Immunol.* v.169, p.1844–1851, 2002.

MARCHIANDO, A.M.; GRAHAM, W.V.; TURNER, J.R. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu. Rev. Pathol.* v.5, p.119-44, 2010.

MAYNARD, C.L.; ELSON, C.O.; HATTON, R.D. *et al.* Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* v.489, p.231-41, 2012.

MAYNOU, G.; CHESTER-JONES, H.; BACH, A. *et al.* Feeding pasteurized waste milk to preweaned dairy calves changes fecal and upper respiratory tract microbiota. *Front. Vet. Sci.* v.6, 2019.

MAZZIOTTA, C.; TOGNON, M.; MARTINI, F. *et al.* Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells.* v.12, p.184, 2023.

MCCLENAHAN, D.; HILLENBRAND, K.; KAPUR, A. *et al.* Effects of Extracellular ATP on Bovine Lung Endothelial and Epithelial Cell Monolayer Morphologies, Apoptoses, and Permeabilities. *Clin. Vaccine Immunol.* v.16, n.1, 2009.

MCGILL, J.L.; NONNECKE, B.J.; LIPPOLIS, J.D. *et al.* Differential chemokine and cytokine production by neonatal bovine $\gamma\delta$ T-cell subsets in response to viral toll-like receptor agonists and in vivo respiratory syncytial virus infection. *Immunology.* v.139, p.227–244, 2013.

MCGUIRK, S.M. Disease management of dairy calves and heifers. *Vet. Clin. N. Am. - Food Anim. Pract.* v. 24, 2008.

MCGUIRK, S.M.; PEEK, S.F. Timely diagnosis of dairy calf respiratory disease using a standardized scoring system. *Anim. Health Res. Rev.* v.15, n.2, p.145-7, 2014.

MCMULLEN, C.; ALEXANDER, T.W.; LÉGUILLETTE, R. *et al.* Topography of the respiratory tract bacterial microbiota in cattle. *Microbiome.* v.8, n.1, p.91, 2020.

MCMULLEN, C.; ORSEL, K.; ALEXANDER, T.W. *et al.* Comparison of the nasopharyngeal bacterial microbiota of beef calves raised without the use of antimicrobials between healthy calves and those diagnosed with bovine respiratory disease. *Vet. Microbiol.* v.231, p.56-62, 2019.

MESTECKY, J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.* v.7, p.265, 1987.

MINSKOFF, S.A.; MATTER, K.; MELLMAN, I. Fc gamma RII-B1 regulates the presentation of B cell receptor-bound antigens. *J. Immunol.* v.161, p.2079–2083, 1998.

MOREIN, B.; ABUSUGRA, I.; BLOMQUIST, G. Immunity in neonates. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.87, p.207–213, 2002.

NICOLA, I.; CERUTTI, F.; GREGO, E. *et al.* Characterization of the upper and lower respiratory tract microbiota in Piedmontese calves. *Microbiome.* v.5, p.152, 2017.

OH, J.Z.; RAVINDRAN, R.; CHASSAING, B. *et al.* TLR5-Mediated Sensing of Gut Microbiota is Necessary for Antibody Responses to Seasonal Influenza Vaccination. *Immunity.* v.41, n.3, p.478-92, 2014.

OLIVER, S.P.; LEWIS, M.J.; GILLESPIE, B.E. *et al.* Influence of prepartum antibiotic therapy on intramammary infections in primigravid heifers during early lactation. *J. Dairy Sci.* v.75, p.406–41, 1992.

OSMAN, R.; MALMUTHUGE, N.; GONZÁLEZ-CANO, P. *et al.* Development and function of the mucosal immune system in the upper respiratory tract of neonatal calves. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* v.6, p.141-55, 2018.

PABST, O.; CEROVIC, V.; HORNEF, M. Secretory IgA in the coordination of establishment and maintenance of the microbiota. *Trends Immunol.* v.37, p.287–296, 2016.

PELASEYED, T.; BERGSTRÖM, J.H.; GUSTAFSSON, J.K. *et al.* The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* v.260, p.8-20, 2014.

PLANER, J. D.; PENG, Y.; KAU, A.L. *et al.* Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature.* v.534, n.7606, p.263–266, 2016.

PLANTINGA, T.S.; VAN MAREN, W.W.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J. *et al.* Differential Toll-like receptor recognition and induction of cytokine profile by Bifidobacterium breve and Lactobacillus strains of probiotics. *Clin. Vaccine Immunol.* v.18, n.4, p.621-8, 2011.

PLAZA-DIAZ, J.; GOMEZ-LLORENTE, C.; CAMPAÑA-MARTIN, L. *et al.* Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults: SETOPROB study. *PLoS One.* v.8, p.e78111, 2013.

PLAZA-DIAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F.J.; GIL-CAMPOS, M.; GIL, A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv. Nutr.* v.10, p.S49-S66, 2019.

PRETZER, G.; SNEL, J.; MOLENAAR, D. *et al.* Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* v.187, n.17, p.6128-36, 2005.

PRYOR, E.J.; BLANK, D.A.; HOOPER, S.B. *et al.* Quantifying lung aeration in neonatal lambs at birth using lung ultrasound. *Front Pediatr.* v.10, p.990923, 2022.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* v.41, n.D1, 2013.

R Core Team. (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing (4.3.3). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

REBER A.J.; DONOVAN, D.C.; GABBARD, J. Transfer of maternal colostrum leukocytes promotes development of the neonatal immune system, II. Effects on neonatal lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.123, p.305–313, 2008.

REBER, A.J.; HIPPEN, A.R.; HURLEY, D.J. Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures. *Am. J. Vet. Res.* v.66, p.1854–1860, 2005.

RECANATINI, C.; VAN WERKHOVEN, C.H.; VAN DER SCHALK, T.E. *et al.* Impact of Pseudomonas aeruginosa carriage on ICU-acquired pneumonia: a European multicentre prospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* v.31, n.3, p.433-440, 2024.

REN, C.; ZHANG, Q.; DE HAAN, B.J. *et al.* Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Sci. Rep.* v.6, p.345-61, 2016.

RIEDEL, C.U.; FOATA, F.; PHILIPPE, D. *et al.* Anti-inflammatory effects of bifidobacterial by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. *World J. Gastroenterol.* v.12, n.23, p.3729-35, 2006.

RINNINELLA, E.; RAOUL, P.; CINTONI, M. *et al.* What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. v.7, p.14, 2019.

ROBINSON, N.E. (2014a). Função Respiratória. In B.G. Klein (Ed.), *Tratado de Fisiologia Veterinária* (5a, pp. 495–542). Elsevier.

ROBINSON, N.E. (2014b). Funções Não Respiratórias do Pulmão. In B.G. Klein (Ed.), *Tratado de Fisiologia Veterinária* (5a, pp. 495–452). Elsevier.

RYAN, R.P.; MANCHY, S.; CARDINALE, M. *et al.* The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* v. 7, n.7, p.514-525, 2009.

SCHLEE, M.; HARDER, J.; KOTEN, B. *et al.* Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta defensin 2. *Clin. Exp. Immuno.* v.1151, p.528-35, 2008.

SHIDA, K.; KIYOSHIMA-SHIBATA, J.; NAGAOKA, M. *et al.* Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Inmunology*. v.128, p.e858-69, 2009.

SINGH, B. (2018). *DYCE, SACK AND WENSING'S TEXTBOOK OF VETERINARY ANATOMY* (5th ed.). Elsevier Inc.

SMITH, R. A.; STEP, D. L.; WOOLUMS, A. R. Bovine Respiratory Disease: Looking Back and Looking Forward, What Do We See? *Vet. Clin. of N. Am. - Food Anim. Pract.*, v.36, n.2, p.239–251, 2020.

SNYDER, E.; CREDILLE, B.; BERGHAUS, R. *et al.* Prevalence of multi drug antimicrobial resistance in isolated from high-risk stocker cattle at arrival and two weeks after processing. *J Anim Sci*. v.95, 1124-31, 2017.

STRZELEC, M.; DETKA, J.; MIESZCZAK, P. *et al.* Immunomodulation—a general review of the current state-of-the-art and new therapeutic strategies for targeting the immune system. *Front. Immunol.* v.14, p.1127704, 2023.

TAMBURINI, S.; SHEN, N.; WU, H.C. *et al.* The microbiome in early life: Implications for health outcomes. *Nat. Med.* v.22, p.713–722, 2016.

TARABICHI, Y.; LI, K.; HU, S. *et al.* The administration of intranasal live attenuated influenza vaccine induces changes in the nasal microbiota and nasal epithelium gene expression profiles. *Microbiome*. v.3, p.74, 2015.

TIMSIT, E., WORKENTINE, M., VAN DER MEER, F., *et al.* Distinct bacterial metacommunities inhabit the upper and lower respiratory tracts of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bronchopneumonia. *Vet. Microbiol.* v.221, p.105–113, 2018b.

TIMSIT, E.; HOLMAN, D.B.; HALLEWELL, J. *et al.* The nasopharyngeal microbiota in feedlot cattle and its role in respiratory health. *Anim. Front.* v.6, p.44-50, 2016a.

TIMSIT, E.; MCMULLEN, C.; AMAT, S. *et al.* Respiratory Bacterial Microbiota in Cattle: From Development to Modulation to Enhance Respiratory Health. *Vet. Clin. of N. Am. - Food Anim. Pract.* v.36, n.2, p.297–320, 2020.

TIMSIT, E.; WORKENTINE, M.; SCHRYVERS, A.B. *et al.* Evolution of the nasopharyngeal microbiota of beef cattle from weaning to 40 days after arrival at a feedlot. *Vet. Microbiol.* v.187, p.75-81, 2016b.

TIMSIT, E.; WORKENTINE, M.; VAN DER MEER, F. *et al.* Distinct bacterial metacommunities inhabit the upper and lower respiratory tracts of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bronchopneumonia. *Vet. Microbiol.* v.221, p.105-13, 2018a.

TOBITA, K.; YAKANA, H.; OTANI, H. *Lactobacillus crispatus* KT-11 enhances intestinal immune functions in C3H/HeN mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* v.56, p.441-45, 2010.

TORTORELLI, G.; CARRILLO GAETA, N.; MENDONÇA RIBEIRO, B.L. *et al.* Evaluation of mollicutes microorganisms in respiratory disease of cattle and their relationship to clinical signs. *J. Vet. Intern. Med.* v.31, n.4, p.1215–20, 2017.

TRINIDAD, P.; NICKERSON, S.C.; LUTHER, D.G. Antimicrobial susceptibilities of staphylococcal species isolated from mammary glands of unbred and primigravid dairy heifers, *J. Dairy Sci.* v.73, p.357–362, 1990.

TROY, E.B.; KASPER, D.L. Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. *Front. Biosci.* v.15, p.25-34, 2010.

TURNBAUGH P.J.; LEY R.E.; HAMADY M. *et al.* The human microbiome project. *Nature.* v.449, p.804-810, 2007.

UDDIN, M.S.; GULUARTE, J.O.; WALDNER, M. *et al.* The respiratory and fecal microbiota of beef calves from birth to weaning. *Vet. Microbiol.* v.9, n.7, p. e00238-24, 2024.

USDA. Dairy 2014, Health and Management Practices on U.S. Dairy Operations. Fort Collins (CO): USDA: APHIS:VS, CEAH, 2014.

USDA. Feedlot 2011 Part IV: Health and Health Management on US Feedlots with a Capacity of 1000 or More Head. Fort Collins (CO): USDA: APHIS:VS, CEAH, 2013.

UYAMA, T.; RENAUD, D.L.; MORRISON, E.I. *et al.* Associations of calf management practices with antimicrobial use in Canadian dairy calves. *J. Dairy Sci.* v.105, p.9084–9097, 2022.

VICENTINI, F.A.; KEENAN, C.M.; WALLACE, L.E. *et al.* Intestinal microbiota shapes gut physiology and regulates enteric neurons and glia. *Microbiome.* v.9, p.210, 2021.

VILLOT, C.; CHEN, Y.; PEDGERACHNY, K. *et al.* Early supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii CNCM I-1079 in newborn dairy calves

increases IgA production in the intestine at 1 week of age. *J. Dairy Sci.* v.103, n.9, p.8615–8628, 2020.

VIZOSO-PINTO, M.G.; RODRIGUEZ GÓMEZ, M.; SEIFERT, S. *et al.* Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *Int. J. Food Microbiol.* v.133, p.86-93, 2009.

WALKER, R.W.; CLEMENTE, J.C.; PETER, I. *et al.* The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr. Obes.* v.12, p.3-17, 2017.

WANG, H.; GAO, K.; WEN, K. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates innate signaling pathway and cytokine responses to rotavirus vaccine in intestinal mononuclear cells of gnotobiotic pigs transplanted with human gut microbiota. *BMC Microbiol.* v.16, n.1, p.109, 2016.

WANG, Y.; QIAN, P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE.* v.4, n.10, 2009.

WEINROTH, M.D.; MARTIN, J.N.; DOSTER, E. *et al.* Investigation of tylosin in feed of feedlot cattle and effects on liver abscess prevalence, and fecal and soil microbiomes and resistomes. *J. Anim. Sci.* v.97, n.11, p.4567–4578, 2019.

WELLS, J.M. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb. Cell Fact.* v.10, p.17, 2011.

WOLF, A.; FRITZE, A.; HAGEMANN, M. *et al.* *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.52, n.6, p.1937–1944, 2002.

WOPEREIS, H.; OOZEER, R.; KNIPPING, K. *et al.* The first thousand days - intestinal microbiology of early life: Establishing a symbiosis. *Pediatr. Allergy Immunol.* v.25, n.5, p.428–438, 2014.

WU, H.Y.; RUSSELL, M.W. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol. Res.* v.16, p.187, 1997.

ZANIN, M.; BAVISKAR, P.; WEBSTER, R. *et al.* The interaction between respiratory pathogens and mucus. *Cell Host Microbe.* v.19, p.159-68, 2016.

ZEINELDIN, M.M.; LOWE, J.F.; GRIMMER, E.D. *et al.* Relationship between nasopharyngeal and bronchoalveolar microbial communities in clinically healthy feedlot cattle. *BMC Microbiol.* v.17, n.1, p.138, 2017.

ZELAYA, H.; TADA, A.; VIZOSO-PINTO, M.G. *et al.* Nasal priming with immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* modulates inflammation-coagulation interactions and reduces influenza virus-associated pulmonary damage. *Inflamm. Res.* v.64, p.589–602, 2015.

ZEUTHEN, L.H.; FINK, L.N.; FRØKIAER, H. Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-

derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology*. v.124, n.4, p.489-502, 2008.

ZHANG L.J.; GALLO R.L. Antimicrobial peptides. *Curr. Biol*. v.26, p.14-9, 2016.