

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/08/2024.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MICROBIOTA DENTAL ASSOCIADA A GENGIVITE E
PERIODONTITE EM BOVINOS JOVENS**

Juliana Vaccari

Médica Veterinária

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MICROBIOTA DENTAL ASSOCIADA A GENGIVITE E
PERIODONTITE EM BOVINOS JOVENS**

Juliana Vaccari

Orientador: Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra

Co-orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti-Jardim Júnior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

2023

V114m	<p>Vaccari, Juliana</p> <p>Microbiota dental associada a gengivite e periodontite em bovinos jovens / Juliana Vaccari. -- Jaboticabal, 2023</p> <p>72 p. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Iveraldo dos Santos Dutra</p> <p>Coorientador: Elerson Gaetti-Jardim Júnior</p> <p>1. Bovinos. 2. Periodontal diseases. 3. Gengivite. 4. Periodontite. 5. High-throughput nucleotide sequencing. I. Título.</p>
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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

Essa ficha não pode ser modificada.

REGISTRO DE IMPACTO

De acordo com a portaria Unesp nº 117, de 22 de dezembro de 2022, abaixo estão descritos os impactos esperados a partir desta pesquisa.

A demanda mundial por proteína de origem bovina, decorrente do crescimento populacional humano e da sua importância na segurança alimentar e nutricional, exigem uma abordagem contemporânea e desafiadora da bovinocultura. Nos ruminantes, a dentição saudável é fator primordial para a eficiência produtiva, reprodutiva, e o bem-estar. Afecções bucais, como as gengivites e periodontites, causam impactos sanitários e econômicos nos bovinos e estão associadas à presença de um biofilme dentário disbiótico que atua como um agente iniciador. Biofilmes são estruturas complexas, formadas por inúmeras espécies microbianas e que exibem propriedades benéficas à multiplicação e permanência dos microrganismos colonizadores. Os biofilmes de lesões periodontais foram investigados em estudos microbiológicos por cultivo bacteriano em anaerobiose e também pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR); posteriormente, o sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA se consagrou como ferramenta de investigação mais moderna das comunidades microbianas. Com uso da técnica de sequenciamento genético do biofilme dentário é possível incluir nos estudos as diferentes categorias animais, englobando biofilmes de sítios dentários saudáveis, com gengivite ou com periodontite, trazendo certezas e um novo horizonte dentro da compreensão do universo das doenças periodontais em ruminantes. Com os dados inéditos gerados neste estudo pode-se caracterizar, sob o ponto de vista microbiológico, os três fenótipos distintos da dentição decídua de bovinos jovens: periodonto saudável, com gengivite e com periodontite. Nesse contexto, pode-se ainda ressaltar que a microbiota do biofilme de sítios dentários com periodontite é muito mais diversa do que os sítios com gengivite. Assim, a análise metagenômica proporcionou uma visão objetiva e abrangente da microbiota bucal, incluindo a identificação de gêneros e espécies bacterianas associadas às doenças periodontais, o que é essencial para o desenvolvimento de estudos visando o tratamento e controle dessas enfermidades de impacto econômico e que interferem na eficiência produtiva, reprodutiva e no bem-estar dos bovinos.

IMPACT RECORD

In accordance with Unesp Ordinance No. 117, of December 22, 2022, the expected impacts from this research are described below.

The global demand for protein of bovine origin, resulting from human population growth and its importance in food and nutritional security, requires a contemporary and challenging approach to cattle farming. In ruminants, healthy dentition is a key factor for productive and reproductive efficiency and well-being. Oral diseases, such as gingivitis and periodontitis, cause health and economic impacts on cattle and are associated with the presence of a dysbiotic dental biofilm that acts as an initiating agent. Biofilms are complex structures, formed by numerous microbial species and which exhibit beneficial properties for the multiplication and permanence of colonizing microorganisms. Biofilms from periodontal lesions were investigated in microbiological studies by bacterial cultivation in anaerobiosis and also by the polymerase chain reaction (PCR) technique; subsequently, high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene became established as the most modern investigation tool for microbial communities. Using the genetic sequencing technique of dental biofilm, it is possible to include different animal categories in studies, encompassing biofilms from healthy dental sites, those with gingivitis or periodontitis, bringing certainty and a new horizon within the understanding of the universe of periodontal diseases in ruminants. With the unprecedented data generated in this study, it is possible to characterize, from a microbiological point of view, the three distinct phenotypes of the deciduous dentition of young cattle: healthy periodontium, with gingivitis and with periodontitis. In this context, it can also be highlighted that the biofilm microbiota of dental sites with periodontitis is much more diverse than sites with gingivitis. Thus, metagenomic analysis provided an objective and comprehensive view of the oral microbiota, including the identification of bacterial genera and species associated with periodontal diseases, which is essential for the development of studies aimed at the treatment and control of these diseases with an economic impact and that interfere in the productive and reproductive efficiency and welfare of cattle.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: MICROBIOTA DENTAL ASSOCIADA A GENGIVITE E PERIODONTITE EM BOVINOS JOVENS

AUTORA: JULIANA VACCARI

ORIENTADOR: IVERALDO DOS SANTOS DUTRA

COORIENTADOR: ELERSON GAETTI JARDIM JUNIOR

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

Prof. Dr. IVERALDO DOS SANTOS DUTRA (Participação Presencial)
Departamento de Produção e Saúde Animal / FMVA UNESP Aracatuba

Dra. JOSIR LAINE APARECIDA VESCHI (Participação Presencial)
Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Semi-Árido / Petrolina/PE

gov.br

Documento assinado digitalmente
JOSIR LAINE APARECIDA VESCHI
Data: 07/08/2023 16:06:51-0300
Verifique em <https://validar.jl.gov.br>

Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE (Participação Presencial)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP

gov.br

Documento assinado digitalmente
ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Data: 08/08/2023 15:12:23-0300
Verifique em <https://validar.jl.gov.br>

Pesquisadora Dra. VERA CLÁUDIA LORENZETTI MAGALHÃES CURCI (Participação Presencial)
Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento / APTA - Araçatuba/SP

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FMV UNESP Araçatuba

Jaboticabal, 02 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Juliana Vaccari – nascida em Birigui, São Paulo, em 08 de julho de 1993. Ingressou na Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) em 2011 e concluiu o curso pela mesma universidade em 2016. Realizou treinamento técnico nas áreas de Obstetria Veterinária (2011) e assistência técnica e extensão rural (2012/2016). Possui Iniciação Científica com projeto intitulado “Caracterização Físicoquímica de Águas Residuárias de Indústria de Abate e Processamento de Tilápias” em 2014 e monitoria nas áreas de Fisiopatologia da Reprodução (2013) e Enfermidades Infecciosas dos Animais domésticos (2015). No ano de 2017 ingressou no curso de mestrado em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação do Professor Tit. Iveraldo dos Santos Dutra, concluindo o mesmo em 2019.

“Nunca me preocupei com o tempo que fosse necessário para conquistar meus objetivos, só estive empenhado em conquistá-los” (Iveraldo Dutra)

Dedico esta Tese aos meus pais, Jair Vaccari e Luzia Mazieiro Vaccari e também ao meu marido Fernando Henrique Zago, por serem as mãos, os braços e os corações onde eu vivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, peça fundamental e alicerce de minha existência, pelas infinitas oportunidades que me concede diariamente e pelos planos que Ele tem para minha vida, na certeza de que não caminho sozinha.

Gratidão aos meus pais Jair Vaccari e Luzia Mazieiro Vaccari, pela vida e amor, demonstrado no cuidado e doação incondicional; ao meu marido Fernando Henrique Zago, por ser o ponto de esteio e acolhimento neste período.

Gratidão ao meu orientador Professor Titular Iveraldo dos Santos Dutra, que neste balé das incertezas pós pandemia, soube pacientemente dedicar seu tempo com bons conselhos e histórias. Minha imensa gratidão ao aprendizado que levarei sempre comigo. Obrigada!

Gratidão ao professor Elerson Gaetti-Jardim Júnior, meu coorientador pela sua atenciosa contribuição, seus ensinamentos e paciência durante a elaboração do presente estudo.

Agradeço as grandes amigas e companheiras de equipe: Júlia Rebecca Saraiva, Thamiris Naiasha Minari Ramos, Natália Cristina de Souza e Ana Carolina Borsanelli. Vocês tornaram possível, mais branda e muito melhor esta caminhada, com cada uma de vocês pude aprender tanto que não consigo mensurar em um singelo parágrafo.

Gratidão a toda dedicação, paciência, e disponibilidade dos funcionários Adão Ângelo Custódio e Alexandre José Teixeira. Vocês foram fundamentais para a execução de todos os trabalhos da nossa equipe. Obrigada por tudo.

Gratidão aos meus amados irmãos: Carla Patrícia Vaccari e Jair Vaccari Júnior, pelo amor profundo que só os irmãos compartilham em essência.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, por ser uma segunda casa que me possibilitou contruir mais um sonho.

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

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Caracterização estrutural e microbiológica do biofilme supragengival em ruminantes com doença periodontal**", protocolo nº 013966/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 05 de outubro de 2017.

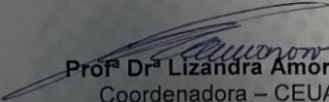
Microbiologia - PCR

Vigência do Projeto	06/10/2017 a 06/10/2018
Espécie / Linhagem	Bovinos de raça leiteira ou seus mestiços e ovinos de raça de corte
Nº de animais	12 bovinos e 12 ovinos
Peso / Idade	Bovinos: 12 meses Ovinos: 6-7 meses
Sexo	Machos
Origem	Propriedade rurais de Araçatuba e região (aquisição)

Microscopia eletrônica de Varredura - Abatedouros

Vigência do Projeto	06/10/2017 a 06/10/2018
Espécie / Linhagem	Bovinos e ovinos de corte
Nº de animais	10 dentes de bovinos e 10 dentes de ovinos
Peso / Idade	Bovinos: entre 1,5 ano e 5 anos; e ovinos: entre 1,5 ano e 5 anos;
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Abatedouros da região de Araçatuba (SP)

Jaboticabal, 05 de outubro de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

MICROBIOTA DENTAL ASSOCIADA À GENGIVITE E PERIODONTITE EM BOVINOS JOVENS

RESUMO- Gengivite e periodontite são doenças induzidas pelo biofilme dental polimicrobiano disbiótico e que acarreta um processo inflamatório destrutivo em hospedeiros suscetíveis. O presente estudo teve como objetivo avaliar pelo sequenciamento de nova geração a microbiota gengival de sítios dentários considerados clinicamente saudáveis (n=5) de bovinos com dentição decídua, de sítios com gengivite (n=5) e com periodontite (n=5). As análises da microbiota dental foram agrupadas em sequências únicas denominadas *amplicon sequence variance* (ASVs). O filo Proteobacteria, foi o mais abundante em sítios dentários saudáveis, com gengivite e periodontite, enquanto o filo Fusobacteriota, representou quase 30% de abundância nos sítios dentários com periodontite. Gêneros como *Neisseria*, *Moraxella* e *Conchiformibius*, foram os mais abundantes nos sítios dentários com gengivite; e *Caviibacter*, *Moraxella* e *Fusobacterium*, foram os mais predominantes nos sítios dentários com periodontite. A microbiota dos sítios dentários com periodontite é mais diversa do que a de sítios dentários com gengivite (p=0,04). Nos três fenótipos avaliados ocorreram diferentes ASVs de *Moraxella*. Na avaliação da rede de coocorrência foi observado que os filamentos mais importantes dentro das redes se diferiram entre as três diferentes condições clínicas avaliadas com mais interações positivas nos sítios dentários com periodontite quando comparado aos outros fenótipos. Assim, o presente estudo contribui de forma inédita no entendimento e observação da microbiota de diferentes sítios dentários de bovinos jovens.

Palavras-chave: Gengivite, periodontite, bovinos, doença periodontal, sequenciamento de nucleotídeos em larga escala

DENTAL MICROBIOTA ASSOCIATED WITH GINGIVITIS AND PERIODONTITIS IN YOUNG BOVINE

ABSTRACT- Gingivitis and periodontitis are diseases induced by the dysbiotic polymicrobial dental biofilm that causes a destructive inflammatory process in susceptible hosts. The present study aimed to evaluate, by means of new generation sequencing, the gingival microbiota of dental sites considered clinically healthy (n=5) of cattle with deciduous dentition, sites with gingivitis (n=5) and periodontitis (n=5). Analyses of the dental microbiota were grouped into unique sequences called amplicon sequence variance (ASVs). The phylum Proteobacteria was the most abundant in healthy dental sites with gingivitis and periodontitis, while the phylum Fusobacteriota represented almost 30% of abundance in dental sites with periodontitis. Genera such as Neisseria, Moraxella and Conchiformibius were the most abundant in dental sites with gingivitis; and Caviibacter, Moraxella and Fusobacterium, were the most prevalent in dental sites with periodontitis. Microbial diversity was higher in dental sites with periodontitis when compared to dental sites with gingivitis and (p=0.04). In the three evaluated phenotypes different Moraxella ASVs occurred. In the evaluation of the co-occurrence network, it was observed that the most important phyla within the networks differed between the three different clinical conditions evaluated and the number of positive interactions in the dental sites with periodontitis was higher than that observed in the other dental clinical conditions. Thus, the present study contributes in an unprecedented way to the understanding and observation of the microbiota of different dental sites in young cattle.

Keywords: Gingivitis, periodontitis, cattle, periodontal disease, high-throughput nucleotide sequencing

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais: Avanços sobre o conhecimento dos microbiomas no ambiente bucal de ruminantes associado as doenças periodontais

1.Introdução

A boca dos ruminantes é formada por um universo com as funções básicas comuns a todos os animais como preensão e mastigação, e de maneira única, a ruminação, assim uma dentição saudável nesta classe de animais é fator primordial para a eficiência alimentar na vida produtiva, reprodutiva e no bem-estar animal; porém para o exame clínico bucal os critérios utilizados são adaptados da odontologia humana.

Assim uma problemática surge: estabelecer critérios técnicos clínico-veterinários para avaliar objetivamente a saúde bucal dos ruminantes, e estabelecer diretrizes para o diagnóstico e controle das doenças periodontais nestes animais.

Diversas manifestações clínicas já foram observadas como gengivites e periodontites, porém por não existirem esquemas de classificação consensuais nos ruminantes para as doenças periodontais, os critérios clínico-bucais são os mesmos utilizados em humanos.

O desencadeamento das doenças periodontais está relacionado, a presença de um biofilme disbiótico que atua como um agente iniciador. Biofilmes são estruturas heterogêneas formadas por inúmeras espécies microbianas, que exibem propriedades benéficas a multiplicação e permanência dos micro-organismos colonizadores.

Devido as características estruturais dos dentes, o acúmulo de biofilme supra e subgengival é um evento natural e sua ocorrência quando em equilíbrio, geralmente não causa danos ao hospedeiro.

Nos bovinos, o cálculo/biofilme supragengival pode ser observado como um acúmulo visivelmente pigmentado de marrom ou preto, que se adere a estrutura da coroa clínica dental, frequentemente encontrado durante o exame clínico da cavidade bucal dos animais.

As gengivites e as periodontites apresentam ocorrência através de

episódios, que podem se resolver de maneira espontânea como nos processos de gengivite ou evoluir para a periodontite, forma mais grave da enfermidade.

A periodontite é caracterizada pela perda dos ligamentos periodontais, reabsorção óssea e conseqüentemente perda da unidade dental e lesão dos tecidos adjacentes, resultante de uma exagerada resposta imune do hospedeiro.

Também é observado que episódios sucessivos de gengivites, as formas reversíveis das doenças periodontais, podem propiciar o animal a apresentar periodontite no futuro.

Os aspectos microbiológicos que norteiam o biofilme de lesões periodontais foram investigados em estudos microbiológicos nas décadas de 1980 e 1990, por cultivo bacteriano em anaerobiose, permitindo a observação de colônias bacterianas pigmentadas de preto, pertencente a gêneros como *Prevotella* e *Porphyromonas*. Porém, com o surgimento das tecnologias de sequenciamento de próxima geração, pode-se ampliar o conhecimento sobre a complexidade da microbiota bucal.

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posteriormente o sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA, consagraram-se como ferramentas de investigação mais modernas e elucidativas das comunidades microbianas.

Em análises de PCR, de biofilme dentário de ruminantes bactérias potencialmente patogênicas como as espécies de *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* foram identificadas e associadas as diversas condições de gengivite e periodontite.

O uso da técnica de sequenciamento genético do biofilme dentário possibilitou a realização de análises dos microbiomas para diversidade microbiana sob as diferentes condições clínicas periodontais, que incluiu animais saudáveis periodontalmente, com gengivite ou periodontite.

A técnica de sequenciamento genético também permite observar as diferenças no microbioma bucal de diversas categorias como: animais jovens em fase de dentição decídua ou adultos em fase de dentição permanente.

A identificação de microorganismos chaves na etiologia das doenças periodontais; como as bactérias do gênero *Fusobacterium* são detectadas em alta prevalência no sequenciamento genético do biofilme de ovinos, assim como *Petrimonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, o que indica possíveis patógenos-chave da comunidade disbiótica destes ruminantes com periodontite.

O microbioma dental de ovinos com periodontite é mais rico e diverso que o microbioma dental de ovinos clinicamente saudáveis, com presença de interações sinérgicas e antagônicas entre os microorganismos.

Em bovinos pôde-se observar que os microbiomas de incisivos dentários e de fluido ruminal são compostos por bactérias dos Filos Firmicutes e Bacteroidetes, e ainda, famílias de proteínas relacionadas à resposta inflamatória, morte celular, patogênese de micro-organismos e superantígenos, preditos no microbioma dental e ruminal destes animais com periodontite.

Observar portanto os parâmetros microbiológicos utilizando técnicas modernas como o sequenciamento de alto rendimento em diferentes categorias animais e condições clínicas, traz certezas e um novo horizonte dentro da compreensão do universo das doenças periodontais em ruminantes.

O presente estudo desta forma tem como objetivo avaliar a microbiota dental associada a gengivite e periodontite em bovinos jovens, e verificar interações entre as comunidades microbianas neste biofilme dentário.

5. Conclusão

A microbiota de diferentes sítios dentários de bovinos jovens com periodontite é mais diversa do que a dos sítios dentários com gengivite.

O filo Fusobacteriota representou 27,6% de abundância nos sítios dentários com periodontite, assim como o gênero *Caviibacter* foi o mais prevalente nesse fenótipo.

O gênero *Moraxella* foi observado em todas as condições clínicas avaliadas, exercendo um papel crucial dentro dos nichos simbióticos e disbióticos nas doenças periodontais.

Financiamento

Agradecemos à USAID e a Academia Nacional de Ciências, Engenharia e Medicina dos Estados Unidos (NAS) pelo financiamento de nossa pesquisa no projeto PEER 4-299, acordo da USAID AID-OAA-A-11-00,012.

O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de

Financiamento 001.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Comissão de Ética em Pesquisa

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus Jaboticabal/SP (Processo FCAV-Unesp nº 013966/17).

Referências

- Antiabong, J.F., Boardman, W., Smith, I., Brown, M.H., Ball, A.S., Goodman, A.E., 2013. A molecular survey of a captive wallaby population for periodontopathogens and the co-occurrence of *Fusobacterium necrophorum* subspecies *necrophorum* with periodontal diseases. *Vet. Microbiol.* 163, 335-343.
- Ai, D., Huang, R., Wen, J., Li, C., Zhu, J., Xia, L.C., 2017. Integrated metagenomic data analysis demonstrates that a loss of diversity in oral microbiota is associated with periodontitis. *BMC Genomics.* 18,1041.
- Bemis, D.A., Johnson, B.H., Bryant, M.J., Jones, R.D., McCleery, B.V., Greenacre, C.B., Perreten, V., Kania, S.A., 2016. Isolation and identification of *Caviibacter abscessus* from cervical abscesses in a series of pet guinea pigs (*Cavia porcellus*). *J Vet Diagn Invest.* 28, 763-769.

- Borsanelli, A.C., Athayde, F.R.F., Agostinho, S.D., Riggio, M.P., Dutra, I.S., 2021a. Dental biofilm and its ecological interrelationships in ovine periodontitis. *J Med Microbiol.* 70.
- Borsanelli, A.C., Athayde, F.R.F., Saraiva, J.R., Riggio, M. P., Dutra, I. S., 2022a. Dysbiosis and Predicted Functions of the Dental Biofilm of Dairy Goats with Periodontitis. *Microb. Ecol.*
- Borsanelli, A.C, Athayde, F.R.F., Riggio, M.P., Brandt, B.W., Rocha, F.I., Jesus, E.C., Gaetti-Jardim E Jr., Schweitzer, C.M., Dutra, I.S., 2022b. Dysbiosis and predicted function of dental and ruminal microbiome associated with bovine periodontitis. *Front. Microbiol.* 13, 936021.
- Borsanelli, A.C., Lappin, D.F., Viora, L., King, G., Bennett, D., Dutra, I.S., Riggio, M. P., 2018a. Evaluation of tissue levels of Toll-like receptors and cytokine mRNAs associated with bovine periodontitis and oral health. *Res. Vet. Sci.* 118, 439-443.
- Borsanelli, A.C., Viora, L., Parkin, T., Lappin, D.F., Bennett, D., King, G., Dutra, I.S., Riggio, M.P., 2021b. Risk factors for bovine periodontal disease – a preliminary study. *Animal.*
- Boyanova, L., Kolarov, R., Mateva, L., Markovska, R., Mitov, I., 2015. Actinomycosis: a frequently forgotten disease. *Future Microbiol.* 10, 613-628.
- Campello, P.L., Borsanelli, A.C., Agostinho, S.D., Schweitzer, C.M., Gaetti-Jardim, Jr E., Döbereiner, J., Dutra, I.S., 2019. Occurrence of periodontitis and dental wear in dairy goats. *Small. Ruminant. Res.* 175, 133-141.

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6,1621–1624.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh P.J., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4516–4522.
- Darveau, R.P., 2010. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 481-490.
- Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C., Yu, W.H., Lakshmanan, A., Wade, W.G., 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 192, 5002-5017.
- Dixon, P. 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 14, 927-930.
- Dutra, I.S., Borsanelli, A.C., 2022. Saúde bucal de ruminantes: atlas para o reconhecimento das doenças periodontais, p. 1641. Ed. Jaboticabal: Funep, v. 1.
- Emery, D.L., Vaughan, J.A., Clark, B.L., Dufty, J.H. Stewart, D.J., 1985. Cultural characteristics and virulence of strains of *Fusobacterium necrophorum* isolated from the feet of cattle and sheep. *Austr. Vet. J.* 62, 43-46.

- Fernandez, M., Riveros, J. D., Campos, M., Mathee, K., Narasimhan, G., 2015. Microbial “social networks”. *BMC Genomics*. 16, 1–13.
- Fesseha, 2021. H. Ovine Footrot and Its Clinical Management. *Vet Med (Auckl)*. 11,95-99.
- Finley, A.M., Beeson, M.S., 2010. Actinomycosis osteomyelitis of the mandible. *Am J. Emerg. Med.* 28, 118.e1-4.
- Friedman, J., Alm, E.J., 2012. Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Comput. Biol.* 8, 1–11.
- Gao, W., Chan, Y., You, M., Lacap-Bugler, D.C., Leung, W.K., Watt, R.M., 2016. In-depth snapshot of the equine subgingival microbiome. *Microb. Pathog.* 94, 76–89.
- Gajdács, M., Urbán, E., Terhes, G., 2019. Microbiological and Clinical Aspects of Cervicofacial *Actinomyces* Infections: An Overview. *Dent J (Basel)*. 1; 7, 85.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Zhang, J., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80.
- Hajishengallis, G., 2015. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 30– 44.
- Jacinto, R.C., Montagner, F., Signoretti, F.G., Almeida, G.C., Gomes, B.P., 2008. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *J Endod.* 34, 1451-1456.

- Jenkinson, H.F., Lamont, R.J., 2005. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 13, 589-595.
- Kaplan, I., Anavi, K., Anavi, Y., Calderon, S., Schwartz-Arad, D., Teicher, S., Hirshberg, A., 2009. The clinical spectrum of Actinomyces-associated lesions of the oral mucosa and jawbones: correlations with histomorphometric analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 108, 738-746.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*
- Massand, A., Kumar, N., Patial, V., 2015. Actinomycosis (lumpy jaw) in cow: a case report. *Comp. Clin Path.* 24, 541-543.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596.
- Ramos, T.N.M., Borsanelli, A.C., Saraiva, J.R., Vaccari, J., Schweitzer, C.M., Gaetti-Jardim, Jr, E., Dutra, I.S., 2019. Efficacy of virginiamycin for the control of periodontal disease in calves. *Pesq. Vet. Bras.* 39, 112-122.
- Riggio, M.P., Jonsson, N., Bennett, D., 2013. Culture-independent identification of bacteria associated with ovine “broken-mouth” periodontitis. *Vet. Microbiol.* 166, 664–669.
- Rice, J.A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D.C., Shewen, P.E., 2007. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim. Health. Res. Rev.* 8, 117-128.

- Saraiva, J.R., Ramos, T.N.M., Borsanelli, A.C., Schweitzer, C.M., Gaetti-Jardim, Jr, Hofling, J.F., Ramos, T.N.M., Dutra, I.S., 2019. Chemical and structural composition of black pigmented supragingival biofilm of bovines with periodontitis. *Pesq. Vet. Bras.* 39, 933-941.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ Microbiol.* 75, 7537-7541.
- Silva, N.S., Borsanelli, A.C., Gaetti-Jardim, E. Jr., Schweitzer, C.M., Silveira, J.A., Bomjardim, H.A., Dutra, I.S., Barbosa, J.D., 2019. Subgingival bacterial microbiota associated with ovine periodontitis. *Pesq. Vet. Bras.* 39, 454–459.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., Kent, R.L., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25, 134–144.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000. 28,12-55.
- Tadepalli, S., Narayanan, S.K., Stewart, G.C., Chengappa, M.M., Nagaraja, T.G., 2009. *Fusobacterium necrophorum*: A ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. *Anaerobe.* 15, 36-43.