

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**GENOTIPAGEM DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS  
ASSOCIADAS ÀS LESÕES DA PERIODONTITE BOVINA**

**Ana Carolina Borsanelli**

**Médica Veterinária**

**2017**

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

**GENOTIPAGEM DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS**  
**ASSOCIADAS ÀS LESÕES DA PERIODONTITE BOVINA**

**Ana Carolina Borsanelli**

**Orientador: Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra**

**Coorientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti-Jardim Júnior**

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

**2017**

B738g Borsanelli, Ana Carolina  
Genotipagem de bactérias anaeróbias associadas às lesões da periodontite bovina / Ana Carolina Borsanelli. -- Jaboticabal, 2017  
v, 116 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Iveraldo dos Santos Dutra

Co-orientador: Elerson Gaetti-Jardim Júnior

Banca examinadora: Vera Cláudia Magalhães Curci, Rita de Cássia Campbell Machado Botteon, Samir Issa Samara, Luís Antonio Mathias

Bibliografia

1. Periodontite. 2. Bovinos. 3. Anaeróbios. 4. PCR. 5. Sequenciamento de alto rendimento. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616:636.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: GENOTIPAGEM DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ASSOCIADAS ÀS LESÕES DA PERIODONTITE BOVINA

AUTORA: ANA CAROLINA BORSANELLI

ORIENTADOR: IVERALDO DOS SANTOS DUTRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. IVERALDO DOS SANTOS DUTRA  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA / UNESP Araçatuba, SP

  
Pesquisadora Dra. VERA CLÁUDIA MAGALHÃES CURCI  
APTA / Araçatuba, SP

  
Prof. Dra. RITA DE CASSIA CAMPEBELL MACHADO BOTTEON  
Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ

  
Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. LUIS ANTONIO MATHIAS  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 07 de fevereiro de 2017

Trabalho realizado com bolsas concedidas pela Fapesp –  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –  
(Proc. nº 2013/13701-7 e Proc. nº 2015/06917-9).

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Ana Carolina Borsanelli** – nascida em Rondonópolis, Mato Grosso, em 26 de agosto de 1988. Graduiu-se em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Araçatuba, em dezembro de 2010. Recebeu, em fevereiro de 2013, sob orientação do Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, o título de mestre em Medicina Veterinária, na área de Medicina Veterinária Preventiva, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Jaboticabal. Em março de 2013, iniciou o Doutorado, também sob orientação do Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, na mesma instituição, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva, com bolsa FAPESP (Processo 2013/13701-7). Realizou Doutorado Sanduíche, no período de julho a dezembro de 2015, na *University of Glasgow*, em Glasgow, Escócia, sob a orientação do Prof. Dr. Marcello Pasquale Riggio, com bolsa FAPESP (Processo 2015/06917-9).

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”*  
*Albert Einstein*

*Dedico esta tese ao meu orientador,  
Professor Iveraldo Dutra,  
pela amizade, aconselhamento, apoio e  
por me confiar este lindo projeto.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, pela formação de qualidade que me proporcionou e pela oportunidade de continuação de meus estudos na Pós-Graduação;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelas bolsas de estudos;

À minha mãe, Zilda Aparecida da Silva Borsanelli pelo amor, apoio, incentivo, além do bom exemplo de trabalho e honestidade.

Ao meu orientador, Professor Iveraldo Dutra, por todos os ensinamentos e por ter compartilhado comigo todas as dificuldades, conquistas e vitórias nesses anos de convivência.

À minha irmã, Francesca Antoniella Borsanelli, pelo amor, companheirismo e por acreditar tanto em mim.

Ao meu co-orientador, Professor Elerson Gaetti-Jardim Júnior, pelo apoio, ensinamentos e paciência.

Ao meu supervisor na *University of Glasgow*, Professor Marcello Riggio, e a toda equipe, David Lappin, Lorenzo Viora, David Bennett e George King, por terem me recebido tão bem e pela troca de conhecimentos.

Às colegas de equipe, Paula Campello, Sabrina Donatoni, Júlia Saraiva e Thamiris Ramos pela amizade e convivência diária.

Às amigas, Fernanda Paes e Karina Akemi Issagawa, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes e torceram por mim.

Às amigas Natália Souza, Simone Souza, Juliane Teramachi, Milena Souza e Beatriz Pimenta pela amizade de tantos anos, pelo companheirismo e pelas risadas. O apoio de vocês foi essencial nessa trajetória.

Aos funcionários, Robson, Adão e Alexandre pela paciência e apoio durante anos de convivência.

## SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A PERIODONTITE BOVINA, HUMANA E EM OUTRAS ESPÉCIES.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	2
2.1 Definição.....	2
2.2. Periodontite no homem.....	2
2.3 Periodontite em pequenos ruminantes.....	11
2.4 Periodontite em outros animais.....	14
2.5 Periodontite em bovinos.....	16
3. Referências.....	21
CAPÍTULO 2 – <i>Treponema denticola</i> NA MICROBIOTA DA PERIODONTITE BOVINA	
RESUMO.....	33
1. Introdução.....	34
2. Material e métodos.....	35
3. Resultados.....	36
4. Discussão.....	37
5. Referências.....	39
CAPÍTULO 3 – PRESENÇA DE ESPÉCIES DE <i>Porphyromonas</i> E <i>Prevotella</i> NA MICROBIOTA ORAL DE BOVINOS COM PERIODONTITE.....	42
RESUMO.....	42
1. Introdução.....	43
2. Material e métodos.....	44
3. Resultados.....	46
4. Discussão.....	47
5. Conclusão.....	50
6. Referências.....	50

CAPÍTULO 4 – MICROBIOTA BACTERIANA ASSOCIADA ÀS LESÕES DA PERIODONTITE BOVINA.....	57
RESUMO.....	57
1. Introdução.....	58
2. Materiais e métodos.....	59
3. Resultados.....	61
4. Discussão.....	62
5. Referências.....	66
CAPÍTULO 5 – LESÕES PERIODONTAIS EM BOVINOS ABATIDOS NO OESTE DA ESCÓCIA (Short Communication.....	72
CAPÍTULO 6 – FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À PREVALÊNCIA DE LESÕES PERIODONTAIS EM BOVINOS ABATIDOS NA ESCÓCIA .....	81
RESUMO.....	81
1. Introdução.....	81
2. Materiais e métodos.....	83
3. Resultados.....	83
4. Discussão.....	84
5. Referências.....	87
CAPÍTULO 7 – MICROBIOMA ASSOCIADO À PERIODONTITE BOVINA.....	93
RESUMO.....	93
1. Introdução.....	94
2. Materiais e métodos.....	95
3. Resultados.....	96
4. Discussão.....	97
5. Referências.....	100
CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Genotipagem de bactérias anaeróbias associadas às lesões da periodontite bovina**", Processo FOA nº 2013-01402, sob responsabilidade de Iveraldo dos Santos Dutra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 12 de março de 2014.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 31 de Agosto de 2016.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 30 de Outubro de 2016.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Genotyping of anaerobic bacteria isolated from bovine periodontitis lesions**", Protocol FOA nº 2013-01402, under the supervision of Iveraldo dos Santos Dutra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 12, 2014.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** August 31, 2016.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** October 30, 2016.

**Prof. Dr. Edilson Ervolino**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

## GENOTIPAGEM DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ASSOCIADAS ÀS LESÕES DA PERIODONTITE BOVINA

**RESUMO** – A periodontite bovina é um processo infeccioso purulento e progressivo associado com a presença de biofilme subgengival anaeróbio. De caráter sazonal e associada ao manejo do solo e à dieta, a doença tem variações na sua apresentação clínica, que inclui desde uma forma agressiva até manifestações crônicas. Os prejuízos econômicos são significativos e decorrem das dificuldades na apreensão, mastigação e ruminação. O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar a periodontite bovina e identificar por métodos moleculares os micro-organismos associados às lesões periodontais. Na avaliação da microbiota da bolsa periodontal (n=26) e do sulco subgengival (n=25) de bovinos, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e com o emprego de 35 iniciadores de espécies de patógenos potenciais, pôde-se associar a ocorrência de *Actinobacillus naeslundii*, *Enterococcus faecium*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Treponema denticola* e *Treponema pectinovorum* com a periodontite bovina. Em estudo complementar realizado na Escócia para verificar a ocorrência de lesões periodontais em animais abatidos, foram examinadas 200 arcadas dentárias, das quais 24 (12%) apresentaram lesões periodontais nos dentes incisivos ou mastigatórios. Este estudo inédito revela que a periodontite não é incomum em bovinos abatidos no oeste da Escócia e é claramente um problema sanitário negligenciado na produção e bem-estar animal. Na oportunidade, os fatores de risco associados à doença foram avaliados em um universo de 250 animais abatidos, dos quais 35 apresentavam lesões periodontais e 40 eram periodontalmente saudáveis. Pela análise de regressão logística foi avaliada a associação entre as variáveis independentes, sexo, idade e raça com periodontite. A idade dos animais foi significativamente associada à presença de lesões periodontais. Para cada ano de idade, um bovino tem 1,53 vezes chances de desenvolver periodontite ( $p < 0,001$ ). A variável sexo não se mostrou significativamente associada à periodontite ( $p = 0,887$ ), enquanto os animais de corte têm 0,36 a chance de desenvolver a doença quando comparados com os de aptidão leiteira. Na mesma ocasião, amostras de biofilme subgengival de 40 bovinos com periodontite e de 38 periodontalmente saudáveis foram coletadas e realizou-se o sequenciamento do gene 16S rRNA. No microbioma de animais saudáveis os gêneros mais prevalentes foram *Gastranaerophilus*, *Planifilus*, *Burkholderia* e *Arcobacter*. Já nos animais com periodontite, os filos mais prevalentes foram Elusimicrobia, Synergista e Fusobacteria e os gêneros *Propionivibrio*, *Wolinella*, *Porphyromonas*, *Candidatus*, *Prevotella*, *Firmicutes* (não cultivável), *Bacteroides* e *Treponema*. Em conclusão, os dois grupos de bovinos avaliados abrigaram perfis microbianos distintos, sendo que as amostras de bovinos com periodontite foram mais diversas em micro-organismos do que as de bovinos saudáveis. Nesse contexto inédito na microbiologia oral de bovinos, pode-se constatar os componentes principais na homeostase bacteriana do biofilme de sítios saudáveis e a disbiose nas lesões periodontais, fornecendo indicadores para a evolução do conhecimento sobre a periodontite bovina.

**Palavras-chave:** periodontite, bovinos, anaeróbios, PCR, sequenciamento de alto rendimento, fatores de risco

## GENOTYPING OF ANAEROBIC BACTERIA ASSOCIATED WITH BOVINE PERIODONTITIS LESIONS

**ABSTRACT** - Bovine periodontitis is a progressive purulent infectious process associated with the presence of strict anaerobic subgingival biofilm. Seasonal and associated to soil and dietary management, the disease has variations in its clinical presentation, which includes since an aggressive form until chronic manifestations. The economic losses are significant and result from difficulties in gripping, chewing and rumination. The present study aimed to identify and characterize bovine periodontitis and identify the microorganisms associated with periodontal lesions by molecular methods. In the evaluation of the microbiota of the periodontal pocket (n=26) and gingival sulcus (n=25) of cattle, by polymerase chain reaction (PCR) and with the use of 35 primers of species of potential pathogens, it can be associate the occurrence of *Actinobacillus naeslundii*, *Enterococcus faecium*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Treponema denticola* and *Treponema pectinovorum* with bovine periodontitis. In a study carried out in Scotland to verify the occurrence of periodontal lesions in slaughtered animals, 200 dental arches were examined, of which 24 (12%) presented periodontal lesions in the incisors or masticatory teeth. This unpublished study reveals that periodontitis is not uncommon in cattle slaughtered in West of Scotland and is clearly a neglected health problem in animal production and welfare. At the opportunity, the risk factors associated with the disease were evaluated in a universe of 250 slaughtered animals, of which 35 had periodontal lesions and 40 were periodontally healthy. By the logistic regression analysis was evaluated the association between the independent variables, sex, age and race with periodontitis. The age of the animals was significantly associated with the presence of periodontal lesions. For each extra year in age, a cow is 1.53 times more likely to develop periodontitis ( $p < 0.001$ ). Gender was not significantly associated with periodontitis ( $p = 0.887$ ). Regarding the variable breed type, beef cattle were 0.36 times as likely to have periodontitis compared to dairy cattle. At the same occasion, samples of subgingival biofilm of 40 bovines with periodontitis and 38 periodontally healthy were submitted to high-throughput sequencing. In the bovine microbiome the most discriminative taxa in the samples of healthy animals were *Gastranaerophilus*, *Planifilus*, *Burkholderia* and *Arcobacter*. In animals with periodontitis, the most prevalent microorganisms were Elusimicrobia, Synergista, *Propionivibrio*, Fusobacteria, *Wolinella*, *Porphyromonas*, *Candidatus*, *Prevotella*, *Firmicutes* (uncultivable), *Bacteroides* and *Treponema*. In conclusion, the two groups of bovines evaluated harboured distinct microbial profiles, and the samples of bovines with periodontitis were more diverse in microorganisms than those of healthy cattle. In this unprecedented context, in the oral microbiology of bovines we can verify the main components in the bacterial homeostasis of the biofilm of healthy sites and the dysbiosis in the periodontal lesions, providing indicators for and evolution of the knowledge on bovine periodontitis.

**Keywords:** periodontitis, bovine, anaerobics, PCR, high-throughput sequencing, risk factors

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais sobre a periodontite bovina, humana e em outras espécies animais**

### **1. Introdução**

A periodontite bovina é uma enfermidade infecciosa crônica, associada à dieta e que incide em animais jovens e adultos em extensas regiões do Brasil. A doença também já foi descrita no Reino Unido e nos Estados Unidos. A enfermidade afeta o bem-estar, a saúde e o desempenho animal, já que pode ocasionar alteração na oclusão, dificuldade na mastigação e ruminção e conseqüentemente perda de condição corporal, suscetibilidade a doenças, redução da produtividade e da longevidade dos animais.

Considerada uma enfermidade multifatorial, na qual as bactérias são necessárias para que ocorra o processo infeccioso, mas não suficientes, ela tem características clínico-patológicas e epidemiológicas particulares. Inicialmente descrita em bezerros, foi associada à formação de pastagem em extensas áreas das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte do país, a periodontite pode reincidir após a reforma dos pastos ou alimentação dos animais com forragens cultivadas em áreas consideradas anteriormente endêmicas nos biomas Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Amazônia.

Em rebanhos ovinos a doença ocorre em episódios, tem características sazonais e permanece sob a forma crônica em animais adultos. A esfoliação prematura espontânea dos dentes é a consequência natural da enfermidade, que incide em elevada porcentagem nos rebanhos acometidos e contribui para má nutrição, perda de peso, problemas sistêmicos de saúde e conseqüentemente descarte precoce dos animais.

Algumas evidências epidemiológicas, microbiológicas e clínico-patológicas da periodontite bovina indicam a participação de microbiota periodontal anaeróbia potencialmente patogênica. Nos cultivos de materiais das lesões periodontais predominaram as bactérias Gram-negativas anaeróbias não esporuladas, com destaque aos *Bacteroides* spp. pigmentados de preto, sacarolíticos e não sacarolíticos, de *Bacteroides* spp. não pigmentados e fermentativos, de *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii* e *Actinomyces pyogenes*.

Classificadas inicialmente com base nas suas características morfo-tintoriais e

bioquímicas, alguns desses micro-organismos produzem enzimas e toxinas com potencial de provocar danos tissulares e reabsorção óssea; no entanto, a identificação objetiva dos micro-organismos envolvidos na doença permanece ainda um desafio.

Estima-se que aproximadamente 50% da flora oral humana não é cultivável. Bactérias não cultiváveis e não caracterizadas anteriormente foram identificadas na periodontite humana por meio de técnicas moleculares modernas. Os métodos independentes de cultivo, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento de alto rendimento, podem detectar os micro-organismos cultiváveis e também serem empregados para identificar micro-organismos não cultiváveis ou fastidiosos e, em adição, identificar novas espécies.

A periodontite bovina é um problema sanitário que revela complexidades peculiares, pois não é prática usual no meio produtivo realizar o exame clínico da cavidade oral dos animais, estudos sobre a etiopatogênese da doença são raros e os estudos bacteriológicos existentes foram realizados sem o emprego das ferramentas e do conhecimento atual. Assim, o presente estudo teve como objetivo geral identificar e caracterizar a periodontite bovina e identificar por métodos moleculares os micro-organismos associados às lesões periodontais.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1 Definição**

Periodontite é a resposta imuno-inflamatória de um hospedeiro suscetível causada por uma complexa microbiota, que resulta na perda dos tecidos de sustentação do dente e na sua eventual esfoliação (LOESCHE, 1993; SCHENKEIN, 2006). Sua etiologia é multifatorial e inclui fatores microbiológicos, comportamentais no homem, ambientais e genéticos que contribuem para a suscetibilidade individual e a manifestação clínica da doença.

### **2.2 Periodontite no homem**

Durante muito tempo acreditou-se que a espécie humana fosse universalmente suscetível à periodontite. Considerava-se que todos os seres humanos e todos os dentes eram igualmente suscetíveis, todas as bactérias eram consideradas

patogênicas e acreditava-se que a gengivite sempre evoluía para periodontite (BECK, 1994).

Duas hipóteses foram elaboradas para explicar a etiologia da doença periodontal. Um grupo de pesquisadores denominado de localistas defendia a hipótese de que as causas primárias da periodontite seriam intraorais; assim, intervenções intraorais poderiam, por si só, prevenir e tratar com sucesso a periodontite. Já o outro grupo de pesquisadores, denominado generalistas, defendia a hipótese de que a causa primária da doença periodontal estaria distante da cavidade oral e que o controle da enfermidade só seria possível quando essas causas fossem identificadas (HUJOEL et al., 2012).

Os dois grupos debateram entre si por mais de 100 anos e os localistas se tornaram dominantes na segunda metade do século 20. Sob a sua influência, as causas distantes ou remotas se tornaram menos importantes e a prevenção e o tratamento da periodontite se centralizaram no controle da placa. Esta hipótese se estabeleceu como uma verdade antes mesmo de estudos comparativos. Pode-se dizer que uma ideia razoavelmente aceitável evoluiu sem um processo de inferência e investigações clínicas e epidemiológicas rigorosas (HUJOEL et al., 2012).

Atualmente, está bem estabelecido que a presença do biofilme é o agente iniciador da periodontite. No entanto, embora a presença do biofilme cause gengivite, estágio inicial da lesão periodontal, esta nem sempre evolui para a periodontite. Esta informação sugere que as bactérias são essenciais, mas não suficientes para o desenvolvimento da enfermidade e que certamente existe interferência de outros fatores (LÖE, 1994; ALBANDAR et al., 2000; ALBANDAR, 2002).

A incapacidade dos antigos generalistas de apontar as causas sistêmicas da periodontite tornou a hipótese ultrapassada diante do desenvolvimento de estudos epidemiológicos e clínicos modernos. Nesse contexto, as evidências do papel do biofilme como fator causal possibilitou a identificação de novas abordagens na prevenção, no tratamento e em possíveis curas para os pacientes periodontais (HUJOEL et al., 2012).

Como resultado desse processo, a classificação das doenças periodontais evoluiu, procurando refletir a ampliação do conhecimento e da história natural dessas doenças; dois elementos inicialmente considerados importantes, como a taxa de

progressão da doença ou a idade do paciente, são na atualidade menos enfatizados. Embora existam diferentes classificações, os principais tipos de doença periodontal são: doenças gengivais, periodontite crônica, formas necrosantes das doenças periodontais e periodontite agressiva (LINDHE et al., 2010).

A periodontite crônica apresenta progressão lenta a moderada, maior prevalência em adultos, e, apesar de iniciada e mantida por placa bacteriana, os fatores do hospedeiro determinam a patogênese e a progressão da doença. As suas características clínicas incluem: alterações de cor, textura e volume da gengiva marginal, sangramento à sondagem, perda de osso alveolar, exposição de furca, aumento da mobilidade dentária e eventual esfoliação do dente. A periodontite crônica é a doença inflamatória mais prevalente e a maior causa de perda de dentes em humanos (KIM et al., 2006), afetando aproximadamente 30% dos adultos (NARES, 2003). Ela tem sido associada com o risco aumentado de parto prematuro, diabetes, doenças cardiovasculares e osteoarticulares (KUO et al., 2008).

A periodontite agressiva compreende um grupo de formas de periodontite de progressão rápida, raras e frequentemente graves, muitas vezes caracterizadas pela idade precoce da manifestação clínica. Na ausência de uma classificação etiológica, as formas agressivas da doença periodontal foram definidas com base nas seguintes características principais: história médica não significativa, rápida perda de inserção e destruição óssea e concentração familiar dos casos (LANG et al., 1999). Alguns aspectos secundários são considerados, mas não necessariamente devem estar presentes, como a quantidade de depósitos microbianos incompatíveis com a gravidade da destruição do tecido periodontal, proporções elevadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (em algumas populações do Extremo Oriente, *Porphyromonas gingivalis*), anormalidades fagocitárias, fenótipos de macrófagos hiper-reativos e a progressão da perda de inserção e perda óssea podem ser autointerrompidas (TONETTI; MOMBELLI, 1999).

Gengivite, periodontite e estomatite necrosante são as formas de doença periodontal inflamatória mais graves provocadas pelo biofilme bacteriano. As doenças periodontais necrosantes geralmente apresentam características clínicas agudas, são debilitantes, de rápida evolução e parecem representar estágios diferentes de uma mesma doença (RILEY et al., 1992).

A gengivite necrosante é caracterizada por ulceração e necrose da papila e da margem gengival. As úlceras são cobertas por uma camada branco-amarelada ou cinza composta principalmente por leucócitos, eritrócitos e uma massa bacteriana. Quando há considerável destruição tecidual e ocorre envolvimento do ligamento periodontal e do osso alveolar, com perda de inserção, a periodontite necrosante está estabelecida (RILEY et al., 1992). Quando o processo de necrose progride além da junção mucogengival, a condição é denominada estomatite necrosante. A intensa destruição tecidual característica dessa doença está relacionada a um grave comprometimento da função imune, tipicamente associada com a infecção pelo vírus da HIV e a desnutrição (WILLIAMS et al., 1990).

Bactérias anaeróbias são predominantes na microbiota bucal humana e animal (GOLDSTEIN et al., 1984), e a bolsa periodontal fornece um nicho ecológico para pelo menos 500 espécies bacterianas (MOORE; MOORE, 1994; SOCRANSKY et al., 1998; PASTER et al., 2001). Diferentes espécies foram identificadas em casos de periodontite, gengivite e osteomielite em humanos (Tabela 1).

Socransky et al. (1998) avaliaram pela técnica de *checkerboard DNA-DNA hybridization* mais de 13.000 amostras de placa subgengival de humanos para estabelecerem a presença de grupos microbianos específicos na placa dental. Foram reconhecidos seis grupos de espécies bacterianas intimamente relacionadas (Figura 1). A colonização inicial parece envolver membros dos complexos amarelo, verde e roxo juntamente com espécies de *Actinomyces*. Isso leva a uma sucessão autogênica na qual membros dos complexos vermelho e laranja se tornam mais dominantes.

Suspeita-se que a presença de níveis aumentados dos últimos dois complexos levem a mudança no habitat, manifestado clinicamente como gengivite, e os membros desses complexos são considerados os principais periodontopatógenos envolvidos na etiologia das periodontites (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

Uma das associações mais fortes entre um suposto patógeno e a doença periodontal destrutiva em humanos envolve *Aggregatibacter* (anteriormente *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*. Este micro-organismo produz uma gama de metabólitos potencialmente patogênicos, incluindo leucotoxina, epiteliotoxina, fator inibidor de fibroblastos, fator indutor de reabsorção óssea, e induz a morte celular por apoptose, entre outros (LINDHE et al., 2010). *A. actinomycetemcomitans* apresenta

elevada ocorrência em lesões ativas de periodontite juvenil e tem sido relacionado com as formas adultas da doença periodontal destrutiva. A espécie foi isolada de lesões de periodontite crônica, embora menos frequentemente e em menores proporções que em lesões de indivíduos com periodontite agressiva localizada (RONDENBURG et al., 1990; SLOTS et al., 1990).

**Tabela 1. Bactérias anaeróbias detectadas em casos de periodontite, gengivite e osteomielite em humanos**

Espécie	Autor
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	MANDELL, 1984; ASHIMOTO et al., 1996; MULLER et al., 1997; AVILA-CAMPOS; VELÁSQUES-MELÉNDEZ, 2002; MALHEIROS; AVILA-CAMPOS, 2004; CORTELLI et al., 2005; FENG; WEINBERG, 2006; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010; BENRACHADI et al., 2012; SHADDOX et al., 2012
<i>Actinobacillus israelii</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Staphylococcus mutans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i> e <i>S. Sobrinus</i>	GAETTI-JARDIM JR et al., 2010
<i>Campylobacter rectus</i>	RAMS et al., 1993; ASHIMOTO et al., 1996; AVILA-CAMPOS; VELÁSQUES-MELÉNDEZ, 2002; CORTELLI et al., 2005; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010
<i>Capnocytophaga ochracea</i> , <i>Capnocytophaga sputigena</i> , <i>Centipeda periodontii</i> , <i>Eubacterium saphenum</i> , <i>Micromonas micros</i> , <i>Mogibacterium timidum</i> , <i>Prevotella tanneriae</i> , <i>Selenomonas sputigena</i> , <i>Slackia exigua</i> , <i>Treponema amylovorum</i> , <i>T. maltophilum</i> , <i>T. medium</i> , <i>T. socranskii</i> e <i>T. vincentii</i>	MAYANAGI et al., 2004
<i>Dialister pneumosintes</i>	CONTRERAS et al., 2000; MAYANAGI et al., 2004; FERRARO et al., 2007; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010
<i>Eikenella corrodens</i>	MANDELL, 1984; ASHIMOTO et al., 1996; MULLER et al., 1997; AVILA-CAMPOS; VELÁSQUES-MELÉNDEZ, 2002; MAYANAGI et al., 2004; FENG; WEINBERG, 2006; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010
<i>Fillifactor alocis</i>	SCHLAFER et al., 2010; SHADDOX et al., 2012
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	AVILA-CAMPOS; VELÁSQUES-MELÉNDEZ, 2002; MALHEIROS; AVILA-CAMPOS, 2004; MAYANAGI et al., 2004; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	MAYANAGI et al., 2004; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010; BEDRAN et al., 2012
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ZAMBON et al., 1986; ASHIMOTO et al., 1996; AVILA-CAMPOS; VELÁSQUES-MELÉNDEZ, 2002; CORTELLI et al., 2005; FENG; WEINBERG, 2006; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010; BEDRAN et al., 2012; BENRACHADI et al., 2012; TOMITA et al., 2013
<i>Prevotella intermedia</i>	ASHIMOTO et al., 1996; AVILA-CAMPOS; VELÁSQUES-MELÉNDEZ, 2002; MAYANAGI et al., 2004; CORTELLI et al., 2005; FOSCHI et al., 2005; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010; BENRACHADI et al., 2012; STINGU et al., 2013
<i>Prevotella melaninogenica</i>	ZAMBON et al., 1986
<i>Prevotella nigrescens</i>	MAYANAGI et al., 2004; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010; STINGU et al., 2013
<i>Tannerella forsythia</i>	ASHIMOTO et al., 1996; AVILA-CAMPOS; VELÁSQUES-MELÉNDEZ, 2002; MAYANAGI et al., 2004; CORTELLI et al., 2005; FOSCHI et al., 2005; FENG; WEINBERG, 2006; YOO et al., 2007; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010; BEDRAN et al., 2012; BENRACHADI et al., 2012; TOMITA et al., 2013
<i>Treponema denticola</i>	ASHIMOTO et al., 1996; AVILA-CAMPOS; VELÁSQUES-MELÉNDEZ, 2002; MAYANAGI et al., 2004; FOSCHI et al., 2005; FENG; WEINBERG, 2006; GAETTI-JARDIM JR et al., 2010; BENRACHADI et al., 2012

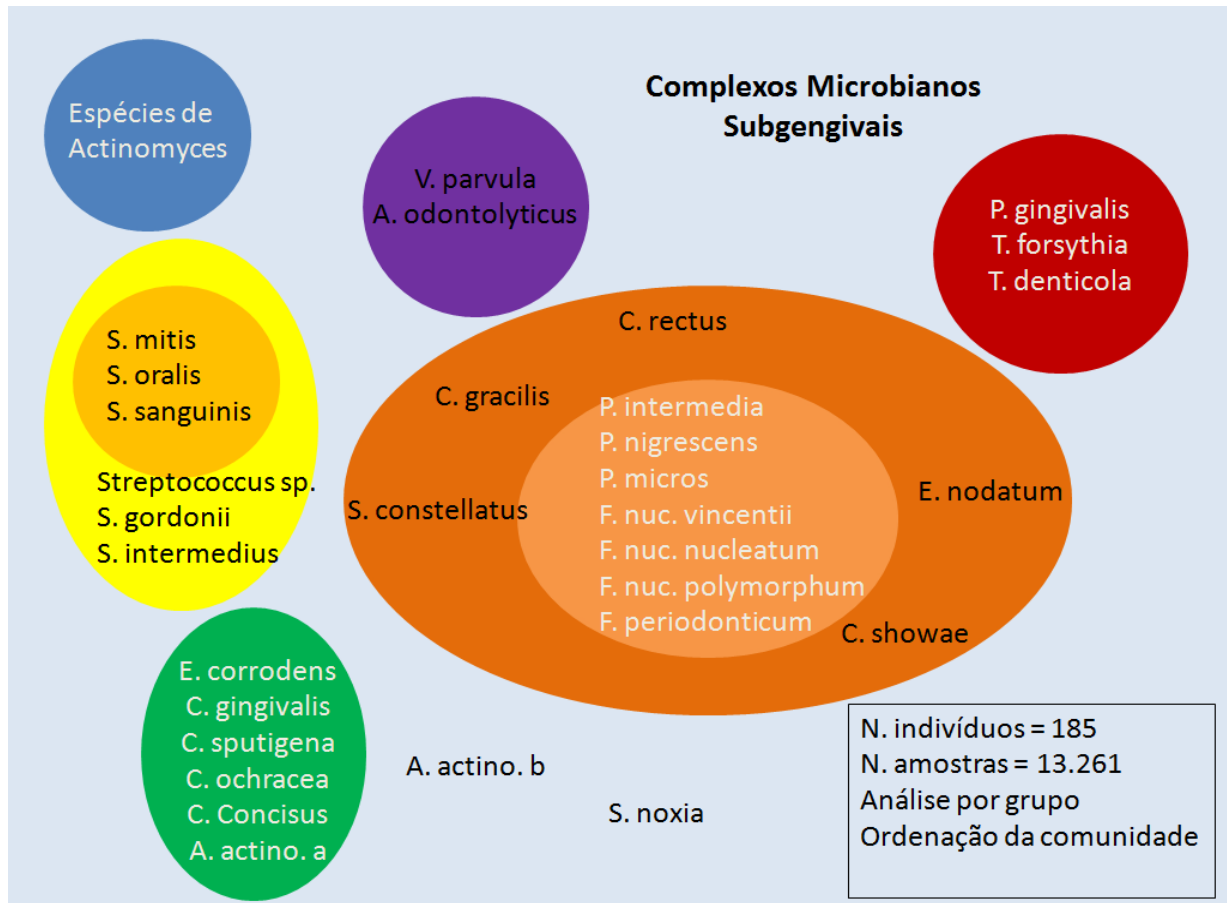


Figura 1. Diagrama da associação entre espécies bacterianas subgengivais (adaptado de Socransky et al., 1998). Os dados derivam da análise de 13.261 amostras de placas subgengivais coletadas da face mesial de cada dente em 185 indivíduos adultos. Os complexos do lado esquerdo compreendem as espécies que colonizam a superfície dentária e se proliferam nos estágios iniciais. O complexo laranja torna-se posteriormente dominante em número, e presume-se que espécies desse complexo atuem agregando os colonizadores iniciais. Já o complexo vermelho torna-se dominante em número nos estágios tardio de desenvolvimento da placa.

Dentre os micro-organismos considerados potencialmente patogênicos, pelo conjunto de evidências, *Porphyromonas gingivalis* é um dos principais representantes dos “*Bacteroides* produtores de pigmentos pretos”. Os anaeróbios desse grupo formam colônias de pigmento castanho a preto em placas de ágar sangue após 7 a 15 dias de cultivo em meios especiais (LINDHE et al., 2010). Potencialmente são bactérias produtoras de colagenase, uma série de proteases, hemolisinas, endotoxinas, ácidos graxos, fibrinolissina, fator indutor de reabsorção óssea, entre outros. Estudos indicam que *P. gingivalis* é incomum ou está presente em números reduzidos na saúde ou na gengivite, sendo mais frequentemente encontrado nas formas destrutivas da doença (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994). Em indivíduos com periodontite, observa-se estreita relação entre *P. gingivalis* e a profundidade da bolsa

(SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). O patógeno também está presente em números elevados e/ou é frequentemente detectado em sítios de deterioração periodontal ou em indivíduos exibindo progressão da doença periodontal (ALBANDAR et al., 1997).

O terceiro patógeno periodontal de maior interesse, *Tannerella forsythia*, inicialmente era considerado uma espécie subgingival relativamente incomum. No entanto, os estudos de Gmur et al. (1989) sugeriram que *T. forsythia* era mais comum do que o observado previamente nos estudos de cultura e que seus níveis eram fortemente relacionados ao aumento da profundidade da bolsa. Segundo Haffajee et al. (2006), a bactéria é encontrada em maiores contagens, proporções e prevalência em indivíduos com várias formas de periodontite do que em indivíduos saudáveis (HAFFAJEE et al., 2006). Além disso, *T. forsythia* é detectado mais frequentemente e em maior número em lesões periodontais ativas e progressivas do que em lesões inativas (DZINK et al., 1988).

As espiroquetas são micro-organismos comuns em bolsas periodontais e também consideradas um importante patógeno periodontal. O *Treponema* spp. é um gênero difícil de ser cultivado em meios convencionais (CHOI et al., 1994). De acordo com Moore et al. (1982), os métodos cultivo-independentes são os mais apropriados na verificação da presença desses micro-organismos na microbiota oral. A principal razão pelo interesse nesse grupo de micro-organismos tem sido o seu elevado número em sítios com aumento da profundidade da bolsa. Sítios sadios têm poucas ou não exibem espiroquetas, enquanto sítios com inflamação gengival, mas sem perda de inserção, exibem níveis baixos a moderados. Já as bolsas profundas abrigam grande número desses micro-organismos, que são apontados como prováveis agentes etiológicos da gengivite ulcerativa necrosante aguda. No entanto, o seu papel em outras periodontites é menos conhecido.

A tríade bacteriana composta pelo complexo vermelho: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* tem sido tradicionalmente considerada como causadora da periodontite, com base nos seus fatores de virulência e forte associação com sítios doentes (HAJISHENGALLIS, 2014). Este modelo de patogênese da doença periodontal apontava os depósitos de biofilme bacteriano como o fator primário responsável pelo desenvolvimento da periodontite e não levava em

consideração outros fatores não bacterianos, como trauma oclusal, condições sistêmicas e dieta (KORNMAN, 2008).

Dados recentes de estudos de metagenômica e metatranscriptômica consideram um novo modelo de patogênese da doença periodontal. Neste modelo, a doença resulta não de patógenos individuais mas da sinergia polimicrobiana e disbiose, as quais perturbam o nicho ecológico do biofilme associado à homeostase do tecido periodontal saudável. A disbiose da microbiota periodontal é caracterizada por um desequilíbrio na abundância ou influência das espécies dentro de uma comunidade microbiana que é associada com uma doença, como, por exemplo, a periodontite (HAJISHENGALLIS, 2015).

Ainda de acordo com esse autor, a transição de saúde para doença periodontal é associada com uma mudança dramática de uma comunidade microbiana simbiótica, geralmente composta por bactérias facultativas como *Actinomyces* e *Streptococcus*, para uma comunidade disbiótica composta principalmente por bactérias anaeróbias dos filos Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes e Synergistetes. A microbiota oral disbiótica é enriquecida com fatores de virulência e é adaptada a prosperar num ambiente inflamatório.

A saúde periodontal requer um estado imuno-inflamatório controlado e que possa manter a homeostase hospedeiro-micro-organismo no periodonto. Entretanto, na periodontite a resposta imune do hospedeiro é desregulada, devido à microbiota subvertida ou a defeitos imunorregulatórios do hospedeiro, e não é efetiva em restringir a multiplicação bacteriana e a patogenicidade (HAJISHENGALLIS, 2014).

Estudos confirmaram que, além da presença de complexos bacterianos, um pequeno grupo de fatores modificadores da doença, incluindo diabetes, genótipo e o hábito de fumar, contribuem fortemente para as diferenças individuais de pacientes na suscetibilidade à periodontite em humanos (KORNMAN, 2008). O mesmo autor enfatiza que o modelo antigo de patogênese da periodontite não considerava a natureza dinâmica dos processos bioquímicos, como por exemplo, as diferenças inatas entre indivíduos e alterações em fatores ambientais que podem acelerar mudanças bioquímicas ou arrefecer essas mudanças.

Ao avaliar a composição da microbiota de pacientes com periodontite crônica de quatro países, Haffajee et al. (2004) constataram que as espécies predominantes

nos pacientes do Brasil foram *Actinomyces naeslundii* e *Prevotella intermedia*, nos pacientes chilenos foram *Prevotella melaninogenica* e *Neisseria mucosa*, e nos pacientes da Suécia *A. naeslundii*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Peptostreptococcus micros* foram mais prevalentes; nos pacientes dos Estados Unidos, *A. naeslundii*, *P. intermedia* e *C. gingivalis*. Esses resultados permitiram identificar diferenças significativas nos perfis microbianos de pacientes com periodontite e evidenciar a heterogeneidade na etiologia da doença, com possíveis implicações terapêuticas.

Faveri et al. (2008) identificaram 110 espécies de bactérias em 10 pacientes com periodontite agressiva generalizada. Destas, 70 espécies foram mais prevalentes, e diversas espécies de *Selenomonas* e *Streptococcus* foram encontradas em grande número em todos os pacientes. Já o patógeno periodontal clássico *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* não foi indentificado, o que sugere que outros micro-organismos além dos já conhecidos possam estar associados com a doença.

### **2.3 Periodontite em pequenos ruminantes**

Alterações dentárias são a principal razão para o abate de ovinos antes do término de sua vida reprodutiva natural, levando ao aumento de gastos com a reposição dos animais. Desgaste excessivo dos incisivos e doença periodontal são as duas síndromes mais importantes que afetam os dentes de ovinos e suas estruturas de suporte (WEST; SPENCE, 2000).

Existem relatos sobre a ocorrência e o impacto do desgaste e da perda prematura dos incisivos permanentes em ovinos desde que eles foram domesticados. Para Coop e Abrahamson (1973), a vida produtiva dos ovinos é essencialmente determinada pela condição dos dentes incisivos permanentes e a decisão subjetiva se os animais poderão pastar e então produzir de forma satisfatória. A maioria dos guias sobre o abate de ovinos inclui, em uma longa lista de características/razões a condição dos incisivos. Porém, poucos autores demonstraram a real perda em produtividade que tal condição traz.

No Reino Unido, Nova Zelândia e em diversos outros países é descrita uma forma natural de periodontite conhecida como “broken-mouth”, que envolve os incisivos e provoca o afrouxamento e a perda dos dentes. A esfoliação prematura

espontânea dos dentes é a consequência natural da enfermidade (SPENCE et al., 1988), que predomina em ovinos adultos, incide em elevada porcentagem dos animais e contribui para má nutrição, perda de peso e problemas sistêmicos de saúde (ANDERSON; BULGIN, 1984; BAKER; BRITT, 1984).

Os sinais clínicos podem variar consideravelmente; frequentemente nenhum sinal é evidenciado. Entretanto, ao exame da cavidade oral pode haver formação de cálculo e retração gengival, e em alguns casos há presença de pus. Pode haver desconforto na mastigação e esta pode ocorrer apenas de um lado. Se há envolvimento ósseo, o abaulamento da maxila ou mandíbula será palpável (ANDREWS, 1985). Cannon et al. (1971) relataram que, enquanto a “broken-mouth” era o fator predominante para o abate de ovinos com 5,5 anos, apenas metade dos fazendeiros realmente examinavam suas bocas.

A etiopatogenia da “broken-mouth” é desconhecida, embora o envolvimento de uma ou mais espécies de periodontopatógenos que estimulam uma resposta imune resultando em destruição tecidual possa ser o mecanismo primordial (RIGGIO et al., 2013).

Alguns estudos sobre doença periodontal em ovinos descreveram outra afecção que afeta principalmente os dentes molares (SALISBURY et al., 1953; HART; MACKINNON, 1958; ARMSTRONG, 1960; PORTER et al., 1970). A doença foi caracterizada por inflamação da gengiva, formação de bolsa periodontal, acúmulo de alimento e, eventualmente, perda de dentes. Além do envolvimento dos molares, ocorre ainda a presença de lesões nos incisivos do mesmo animal (PORTER et al., 1970).

Para Cutress e Ludwig (1969), existem duas formas de doença periodontal que afetam os ovinos. Uma delas é a gengivite aguda, ulcerativa e necrosante, que pode acometer os dentes incisivos e molares; a outra é uma forma mais crônica que acomete principalmente os incisivos, eventualmente resultando em perda de dentes. No entanto, são necessários estudos para elucidação da etiologia dessas doenças e para estabelecer se as manifestações clínicas são sintomas de doenças distintas ou do mesmo problema (WEST, 2002).

Na Grã-Bretanha, Richardson et al. (1979) observaram em 481 ovelhas 93% de espaçamento interdental anormal, 84% de hipertrofia gengival, 82% de desgaste

dental, 48% de impactação alimentar e bolsa periodontal e 27% de recessão gengival. Apenas duas ovelhas avaliadas não apresentaram alterações nas arcadas dentárias.

No Brasil, Saldanha (2006) identificou e caracterizou as afecções buco-dentais de 211 cabras em diferentes regiões do estado de Pernambuco. A população de caprinos examinada apresentou alto índice de anormalidades buco-dentárias como: desgaste da coroa dental (99,5%), doença periodontal (9,5%), perda dental (6,2%), abscessos (6,2%) e extrusão (8,5%).

Suzuki et al. (2006) observaram a ocorrência de periodontite espontânea em 34 cabras miniaturas ao buscarem um modelo animal para experimentação. Os animais apresentavam bolsas periodontais com profundidades maior que 3 e 4 mm (46,4% e 22,1% respectivamente) e incidência de sangramento à sondagem de 73,5%.

Estudos indicam que a flora microbiana oral em ovinos com periodontite é compatível com a encontrada na periodontite humana (FRISKEN et al., 1989; ISMAEL et al., 1989; McCOURTIE et al., 1990). Riggio et al. (2013) avaliaram a presença de determinadas espécies de bactérias em amostras de ovinos com “broken-mouth” e sadios e evidenciaram que há diferenças claras na composição da microflora de animais doentes e sadios. *Mannheimia ruminalis* foi a espécie predominante no grupo de animais com a enfermidade.

Em estudo preliminar para a determinação de gêneros bacterianos cultiváveis presentes no biofilme subgengival de ovinos com periodontite foram isolados *Bacteroides* pigmentados de preto, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Veillonella* e outros anaeróbios frequentemente envolvidos na doença periodontal em humanos e outros animais (McCOURTIE et al., 1989).

Duncan et al. (2003) constataram a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* em lesões de ovinos com periodontite. Riggio et al. (2013) identificaram diversas espécies bacterianas em bolsa periodontal de ovinos com “broken mouth”, entre elas periodontopatógenos comuns na periodontite humana. *Bacteroides assaccharolyticus* (*Porphyromonas asaccharolytica*), *B. buccae*, *B. capillosus*, *B. forsythus* (*Tannerella forsythia*), *B. gingivalis* (*Porphyromonas gingivalis*), *B. oris*, *Fusobacterium naviforme*,

*F. necrophorum* e *F. nucleatum* foram detectados em ovinos com quadros de periodontite (McCOURTIE et al., 1989).

Suzuki et al. (2006) detectaram *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em cabras com periodontite.

#### **2.4 Periodontite em outros animais**

A doença periodontal, incluindo a gengivite, a periodontite e os abscessos periodontais, é um processo infeccioso oral que comumente afeta animais adultos. Nesse contexto, a periodontite em cães é considerada uma doença da civilização, uma vez que animais submetidos a fatores de domesticação apresentam quadros periodontais mais severos (HARVEY, 1998) e tem sido associada a problemas renais, hepáticos e cardíacos (PEDDLE et al., 2009). É responsável ainda por mortalidade em animais selvagens livres e em cativeiro (MIKKELSEN et al., 2008) e já foi identificada em diversas espécies, como cangurus (MIKKELSEN et al., 2008), ursos (FOURNIER et al., 2001), lobos, coiotes, onças (LALIBERTE; MAYRAND, 1983), macacos (GAETTI-JARDIM JR et al., 2012), entre outras.

Segundo Gioso (2001), a doença periodontal pode apresentar-se latente ou ativa, sendo possível observar um animal com grande quantidade de cálculo, porém sem sintomas evidentes de inflamação grave. Vários fatores podem exacerbar a doença, e a explicação desse fenômeno ainda é desconhecida.

Se por um lado muito é investigado a respeito da microbiota anaeróbia humana, poucos estudos ainda são realizados em relação à sua composição em animais (MIKKELSEN et al., 2008). Diferentes espécies periodontais foram identificadas em animais de pequeno porte, especialmente em cães (Tabela 2).

Segundo Elliot et al. (2005), os gêneros da microbiota bucal de cães são similares aos observados em humanos, embora diferenças significativas sejam notórias em nível de espécie. Em gatos, a microbiota oral normal é dominada por bactérias anaeróbias, principalmente dos gêneros *Bacteroides* e *Fusobacterium* (LOVE et al., 1990). *Porphyromonas* spp. (MALLONEE et al., 1988), *P. gulae* e *Tannerella forsythia* (BOOIJ-VRIELING et al., 2010) foram identificadas em gatos com doença periodontal.

Nos animais silvestres também já foram identificadas diversas espécies de bactérias anaeróbias associadas à doença periodontal. Gaetti-Jardim Jr et al. (2012) evidenciaram que em macacos-prego com gengivite e periodontite há um aumento na frequência de bactérias anaeróbias Gram-negativas pigmentadas de preto (*Porphyromonas* e *Prevotella*), *Tannerella forsythia*, fusobactérias, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* e *Parvimonas micra*, além de uma pequena prevalência de *Prevotella nigrescens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, assim como a ausência de *Treponema denticola*. *Porphyromonas gingivalis* e *P. gulae* foram isoladas da cavidade oral de cangurus com diferentes graus de doença periodontal (MIKKELSEN et al., 2008).

Diferentes espécies de *Prevotella* foram isoladas da cavidade oral de burros, como *Prevotella dentasini*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens* (TAKADA et al., 2010).

**Tabela 2. Bactérias anaeróbias detectadas em cães com periodontite**

<b>Espécie</b>	<b>Autor</b>
<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Dialister pneumosintes</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Treponema denticola</i>	NISHIYAMA et al., 2007
<i>Atopobium rimae</i> , <i>Bacteroides denticanium</i> , <i>B.</i> <i>uniformis</i> , <i>Campylobacter curvus</i> , <i>Enterococcus</i> <i>gallinarium</i> , <i>Fusobacterium alocis</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Pasteurella canis</i> , <i>Porphyromonas canis</i> , <i>P.</i> <i>denticanis</i> , <i>Rikenella microfusus</i> , <i>Streptococcus</i> <i>bovis</i> , <i>S. Suis</i>	HARDHAM et al., 2005
<i>Bacteroides pyogenes</i> , <i>B. splanchnicus</i> ( <i>Odoribacter</i> <i>splanchnicus</i> ), <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> , <i>P.</i> <i>circumdentaria</i> , <i>Prevotella bivia</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P.</i> <i>buccalis</i> , <i>P. corporis</i> , <i>P. disiens</i> , <i>P. heparinolytica</i> , <i>P.</i> <i>loescheii</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. oris</i> , <i>P. oulorum</i> , <i>P. veroralis</i> , <i>P.</i> <i>Zoogleoformans</i>	FORSBLOM et al., 1997
<i>Bacteroides tectum</i> , <i>Campylobacter oricanis</i> , <i>Filifactor alocis</i> , <i>F. villosus</i> , <i>Fusobacterium russi</i> , <i>Pasteurella stomatis</i> , <i>Porphyromonas crevioricanis</i>	DAHLÉN et al., 2011
<i>Campylobacter rectus</i>	HIRAI et al., 2013
<i>Fusobacterium canifelinum</i>	CONRADS et al., 2004; DAHLÉN et al., 2011; SENHORINHO et al., 2012
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	NISHIYAMA et al., 2007; SENHORINHO et al., 2012
<i>Peptostreptococcus canis</i>	DAHLÉN et al., 2011; LAWSON et al., 2012
<i>Porphyromonas cangingivalis</i> , <i>P. canoris</i> , <i>P. salivosa</i>	FORSBLOM et al., 1997; HARDHAM et al., 2005; DAHLÉN et al., 2011
<i>P. cansulci</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>P. levii</i>	FORSBLOM et al., 1997; HARDHAM et al., 2005
<i>P. gulae</i>	HARDHAM et al., 2005; DAHLÉN et al., 2011; SENHORINHO et al., 2011; SENHORINHO et al., 2012; HIRAI et al., 2013
<i>P. macacae</i>	FORSBLOM et al., 1997; SENHORINHO et al., 2012
<i>Tannerella forsythia</i>	HARDHAM et al., 2005; NISHIYAMA et al., 2007; DAHLÉN et al., 2011; HIRAI et al., 2013
<i>T. socranskii</i>	NORDHOFF et al., 2008

## 2.5 Periodontite em bovinos

Com ocorrência em extensas áreas de criação de bovinos no Brasil, a “cara inchada” é uma doença periodontal que acomete principalmente bezerros em fase de dentição (DÖBEREINER et al., 1975). Caracteriza-se clinicamente por uma periodontite purulenta, progressiva, que se inicia geralmente na papila interdental

entre o 2º e 3º pré-molares decíduos maxilares, com formação de bolsa periodontal. Com o desenvolvimento do processo alveolar purulento, as raízes dos dentes ficam expostas e há afrouxamento e perda de pré-molares decíduos e molares (DÖBEREINER et al., 1974). Em casos avançados os animais apresentam um mau estado nutricional, causado pela incapacidade de se alimentar e podem morrer por inanição, o que resulta em prejuízos econômicos significativos (DUTRA et al., 1993).

Nas décadas de 1960 e 1970, com a abertura de extensas áreas de vegetação natural para a introdução da pecuária nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, a “cara inchada” tornou-se nessas áreas uma das mais importantes enfermidades dos bovinos (DÖBEREINER et al., 2004). A enfermidade, cuja incidência declina naturalmente após períodos variáveis, reincide em áreas anteriormente endêmicas após a reforma das pastagens ou o emprego das forrageiras cultivadas na alimentação dos animais (DUTRA et al., 1993). Inicialmente restrita às pastagens formadas em solo de boa qualidade em áreas de matas virgens, a doença também incidiu nas áreas de cerrado após a introdução das braquiárias, a partir da década de 1970 (DÖBEREINER et al., 2000).

Dentre as causas nutricionais possivelmente envolvidas na etiologia da “cara inchada”, a que recebeu desde o início a maior ênfase da pesquisa foi uma provável deficiência ou desequilíbrio de minerais na dieta dos animais. No entanto, inexistem sequer uma evidência que corrobore esta hipótese, e os experimentos que relataram efeitos benéficos de suplementos minerais desconsideraram particularidades epidemiológicas importantes (ROSA; DÖBEREINER, 1994).

Com fundamento em estudos histopatológicos e microrradiográficos de costelas de bezerros com “cara inchada”, Döbereiner e Dammrich (1997) concluíram que as alterações ósseas da enfermidade são de natureza secundária, consequência da doença, e não podem ser consideradas como fator desencadeante da periodontite.

Baseados em informações empíricas de que animais afetados se recuperavam espontaneamente quando transferidos para áreas indenes, Döbereiner et al. (1975) e Dutra et al. (2000) transferiram bovinos de diferentes idades com lesões periodontais da “cara inchada” para área considerada livre da doença. Nesta circunstância, os bovinos apresentaram cura clínica, com epitelação das bolsas periodontais,

desaparecimento do odor fétido bucal, regressão do abaulamento facial e melhora no estado nutricional.

Dutra et al. (2000) realizaram um estudo bacteriológico longitudinal, monitorando as lesões periodontais em bezerros transferidos para área indene. Na ocasião, avaliaram a modificação da microbiota anaeróbia após a remissão clínica da doença. Enquanto nas bolsas periodontais dos animais quando transferidos a porcentagem média dos *Bacteroides* pigmentados de preto foi de 71,3% da microbiota total cultivada em anaerobiose e em ágar sangue, contendo hemina e vitamina K, nos mesmos animais foi de 1,7% após a epitelização das lesões e cura clínica. Com base na modificação quantitativa dos possíveis periodontopatógenos pigmentados de preto e nas suas peculiaridades epidemiológicas, os autores sugerem tratar-se de uma enfermidade infecciosa multifatorial.

A enfermidade não ocorre sem a presença desses micro-organismos, que são encontrados na microbiota oral dos bovinos (DUTRA; DÖBEREINER, 2001). O desencadeamento da “cara inchada” estaria assim associado à presença de bactérias anaeróbias no sulco subgengival e a um fator alimentar relacionado à formação de pastagens em determinadas áreas, como descrito por Döbereiner et al. (1974), ou à reforma de áreas anteriormente endêmicas para a enfermidade (DUTRA et al., 1993).

Blobel et al. (1984) isolaram *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides bivius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Corynebacterium pyogenes* e *Actinomyces israeli* em cultivos de lesões da periodontite bovina, identificados na ocasião por meio das suas características morfo-tintoriais e bioquímicas. Da mesma forma, Botteon et al. (1993) caracterizaram bioquimicamente bactérias anaeróbias envolvidas nas lesões da periodontite bovina, evidenciando a presença de grupos específicos de Gram-negativos não esporulados nas lesões, com a predominância de *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium nucleatum*.

O acúmulo e produção de enzimas, toxinas e outros produtos metabólicos por bactérias anaeróbias Gram-negativas são considerados fatores primários importantes na etiologia da doença periodontal no homem (LÖE et al., 1965; ELLISON, 1970; SLOTS, 1982) e nos animais (LINDHE et al., 1973; SLOTS; HAUSMANN, 1979). De uma maneira geral, as bactérias não invadem o tecido periodontal, mas elaboram uma série de produtos que podem participar direta ou indiretamente na destruição de

tecidos (McDONALD et al., 1960; SOCRANSKY, 1970; PAGE; SCHROEDER, 1976; SLOTS; GENCO, 1984).

Dutra et al. (1986) avaliaram a produção “in vitro” de enzimas histolíticas pelas principais espécies de bactérias isoladas de lesões periodontais da “cara inchada” (*Actinomyces israeli*, *Actinomyces pyogenes*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium nucleatum*), assim como a atividade biológica de endotoxinas extraídas das mesmas, todas com alguma capacidade de produzir substâncias com potencial para destruição tissular. No entanto, apesar de todas as amostras de *Bacteroides* spp. terem apresentado atividade proteolítica, a sua exata identificação permaneceu incerta devido à limitação na informação taxonômica.

Ao caracterizar os micro-organismos anaeróbios isolados de lesões periodontais da “cara inchada”, considerando-se os seus aspectos morfo-tintoriais, fisiológicos, bioquímicos e de cultivo, Botteon et al. (1993) evidenciaram a presença de grupos específicos de bactérias Gram-negativas não esporuladas, com predominância de *Bacteroides* spp. pigmentados de preto e marrom, sacarolíticos e não sacarolíticos, de *Bacteroides* spp. não pigmentados e fermentativos e de *Fusobacterium nucleatum*. Os autores relataram a dificuldade de classificar os micro-organismos em nível de espécie e manutenção de amostras como cultura pura, pois muitos dos isolados não apresentaram os perfis microbiológicos semelhantes aos das espécies descritas na literatura.

Schmitt et al. (1996) investigaram os possíveis efeitos da periodontite em bezerros sobre a imunidade celular, utilizando a determinação da aderência, fagocitose e quimiotaxia de *Bacteroides melaninogenicus* frente a leucócitos de animais com e sem lesões da enfermidade. Os autores verificaram que a aderência de *B. melaninogenicus* e a sua fagocitose por granulócitos polimorfonucleares eram diminuídas em bezerros com periodontite, porém a quimiotaxia não era afetada.

Em prosseguimento aos estudos sobre a patogênese da doença, Kopp et al. (1996) verificaram a influência da estreptomicina sobre a aderência de *B. melaninogenicus* e *Actinomyces pyogenes* em células epiteliais orais de bovinos. Em concentrações sub-inibitórias a estreptomicina aumentou em dez vezes a taxa de aderência de *B. melaninogenicus*. Por outro lado, a estreptomicina não influenciou significativamente a aderência de *A. pyogenes*. Com base nesses resultados os

autores relataram que a estreptomicina em doses subinibitórias pode ser um fator que contribuiria para o desenvolvimento da infecção periodontal característica da “cara inchada”.

Grassmann et al. (1997) realizaram ensaios *in vitro* e *in vivo* para estudar o possível envolvimento de actinomicetos do solo, como produtores de estreptomicina e actinomicina, na patogênese da periodontite bovina. Os resultados confirmaram que antibióticos produzidos pelo cultivo de actinomicetos do solo aumentam a aderência de *Bacteroides* spp. às células epiteliais da gengiva de bezerros e provavelmente desempenhariam um papel na patogênese da “cara inchada”.

A eficácia da adição de espiramicina ao suplemento mineral para o controle da periodontite foi avaliada por Döbereiner et al. (1990). Os bezerros entraram no experimento antes de completarem 15 dias de idade, e os exames da cavidade oral foram realizados até a idade de 7 a 8 meses. Os bezerros que receberam a mistura mineral com o antibiótico não revelaram a presença de lesões periodontais, enquanto 10,8% dos animais que receberam somente a mistura mineral desenvolveram lesões periodontais típicas da enfermidade.

Dutra et al. (1992) e Tims et al. (1992) avaliaram a eficácia da virginiamicina, adicionada ou não à mistura mineral, e verificaram que o aditivo contribuiu no controle e profilaxia da periodontite bovina. A periodontite bovina também já foi relatada no Reino Unido, no entanto em outro contexto epidemiológico. Ingham (2001) examinou 501 arcadas de bovinos em abatedouros e relatou que 15 (3%) animais apresentaram lesões periodontais e concluiu que anormalidades dentárias são comuns em bovinos e deveriam receber mais atenção.

Nos Estados Unidos, Fadden et al. (2015) descreveram a ocorrência de patologias dentárias em 71 bovinos de leite alimentados com pasto e 200 suplementados com ração. A presença de lesão periodontal, recessão gengival ou perda de dentes foi observada em cinco animais alimentados com pasto e em três suplementados com ração, ressaltando-se que não avaliaram as arcadas dentárias completas dos animais.

Atenção significativa e recursos financeiros são investidos na eficiência reprodutiva, saúde podal, qualidade do leite e condição corporal em rebanhos bovinos, mas a saúde oral raramente é considerada. Isso é peculiar, considerando-se que a

importância da mastigação e da digestão para o ganho de peso e a produção de leite é bem conhecida e que a baixa produtividade é a principal causa de descarte de animais do rebanho (BASCUM; YOUNG, 1998). É provável que a periodontite bovina tenha um impacto significativo sobre o bem-estar dos animais afetados, já que pode ser uma condição dolorosa crônica, levando à dificuldade de alimentação com a consequente perda de condição corporal e peso, aumento da susceptibilidade à doença e diminuição da produtividade. A dor bucal pode ter apenas efeitos sutis sobre o comportamento do gado, e assim, a enfermidade é facilmente ignorada ou esquecida.

No contexto da pecuária brasileira, apenas um grupo de pesquisa cadastrado no Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil, na Plataforma Lattes ([www.dgp.cnpq.br](http://www.dgp.cnpq.br)), tem produção científica relacionada à doença periodontal em ruminantes nos últimos 15 anos. Por outro lado, a pouca atenção que se dá ao tema da dentição em ruminantes muito provavelmente não é reflexo da sua real prevalência e significado, mas possivelmente decorre da complexidade em se avaliar a sua ocorrência nos rebanhos.

## Referências

- ALBANDAR, J. M.; BROWN, L. J.; LOE, H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 68, p. 973-981, 1997.
- ALBANDAR, J. M.; STRECKFUS, C. F.; ADESANYA, M. R.; WINN, D. M. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 12, p. 1874-1881, 2000.
- ALBANDAR, J. M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 29, n. 1, p. 177-206, 2002.
- ANDERSON, B. C.; BULGIN, M. S. Starvation associated with dental disease in range ewes. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.184, p. 737-738, 1984.
- ANDREWS, A. H. Acquired diseases of the teeth and mouth in ruminants. In:\_\_\_\_. *Veterinary Dentistry*. Philadelphia:W.B. Saunders, 1985, p. 256-271.
- ARMSTRONG, M. C. Parodontal disease of sheep in South Canterbury. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 100, p. 429-431, 1960.

ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 11, p. 266-273, 1996.

AVILA-CAMPOS, M. J.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 1-5, 2002.

BAKER, J. R.; BRITT, D. P. Dental calculus and periodontal disease in sheep. **Veterinary Record**, v. 108, p. 331-333, 1984.

BASCOM, S. S.; YOUNG, A. J. A summary of the reasons why farmers cull cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2299-2305, 1998.

BECK, J. D. Methods of assessing risk for periodontitis and developing multifactorial models. **Journal of Periodontology**, v. 65, S. 5, p. 468-478, 1994.

BEDRAN, T. B. L.; MARCANTONIO, R. A. C.; NETO, R. S.; MAYER, M. P. A.; GRENIER, D.; SPOLIDORIO, L. C.; SPOLIDORIO, D. P. *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, p. 1-7, 2012.

BENRACHADI, L.; BOUZINAE, A.; AZZIMAN, Z.; BOUZIANE-QUARTINI, F.; ENNIBI, O. Screening for periodontopathogenic bacteria in severe chronic periodontitis in a Moroccan population. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 42, p. 599-602, 2012.

BLOBEL, H.; DÖBEREINER, J.; LIMA, F. G. F.; ROSA, I. V. Bacterial isolations from "cara inchada" lesions of cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 73-77, 1984.

BOOIJ-VRIELING, H. E.; VAN DER REIJDEN, W. A.; HOUWERS, D. J.; DE WIT, W. E. A. J.; BOSCH-TIJHOF, C. J.; PENNING, L. C.; VAN WINKELHOFF, A. J.; HAZEWINKEL, H. A. W. Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 147-152, 2010.

BOTTEON, R. M.; DUTRA I. S.; DÖBEREINER, J.; BLOBEL, H. Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 13, n. 3/4, p. 51-55, 1993.

CANNON, D. J.; NAPIER, K.; HANRAHAN, P. D. Some sheep-wheat men could reduce costs. **Agricultural Journal of Victoria**, v. 69, p. 154-156, 1971.

CHOI, B. K.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; GÖBEL, U. B. Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1889-1895, 1994.

- CONRADS, G.; DCITRON, D. M.; MUTTERS, R.; JANG, S.; GOLDSTEIN, E. J. C. *Fusobacterium canifelinum* sp. nov., from the oral cavity of cats and dogs. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 407-413, 2004.
- CONTRERAS, A.; DOAN, N.; CHEN, C.; RUSITANONTA, T.; FLYNN, M. J.; SLOTS, J. Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 269-272, 2000.
- COOP, I. E.; ABRAHAMSON, M. Effect of teeth condition on intake of grazing sheep. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 58-64, 1973.
- CORTELLI, J. R.; CORTELLI, S. C.; JORDAN, S.; HARASZTHY, V. I.; ZAMBON, J. J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 860-866, 2005.
- CUTRESS, T. W.; LUDWIG, T. G. Periodontal disease in sheep. I. Review of the literature. **Journal of Periodontology**, v. 40, p. 529-534, 1969.
- DAHLÉN, G.; CHARALAMPAKIS, G.; ABRAHAMSSON, I.; BENGTSSON, L.; FALSEN, E. Predominant bacterial species in subgingival plaque in dogs. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, p. 354-364, 2011.
- DÖBEREINER, J.; CHAVES, J. A.; ROSA, I. V.; HOUSER, R. H. Efeito da transferência de bovinos com “cara inchada”(doença peridentária) para pastos de região indene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 10, p. 99-103, 1975.
- DÖBEREINER, J.; DÄMMRICH, K. “Are alveolar bone changes a determinant factor for “cara inchada” in cattle?”. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 45-48, 1997.
- DÖBEREINER, J.; DUTRA, I. S.; ROSA, I. V. A etiologia da “cara inchada”, uma periodontite enzoótica dos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 50-56, 2004.
- DÖBEREINER, J.; DUTRA, I. S.; ROSA, I. V.; BLOBEL, H. 2000. Cara inchada of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependant periodontitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 47-64, 2000.
- DÖBEREINER, J.; INADA, T.; TOKARNIA, C. H. “Cara inchada”, doença peridentária em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 9, p. 63-85, 1974.
- DÖBEREINER, J.; ROSA, I. V.; DUTRA, I. S.; PEREIRA, A. R.; BLOBEL, H. Efeito da espiramicina na profilaxia da “cara inchada” dos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 10, n. 1/2, p. 27-29, 1990.

DUNCAN, W. J.; PERSSON, G. R.; SIMS, T. J.; BRAHAM, P.; PACK, A. R. C.; PAGE, R. C. Ovine periodontitis as a potential model for periodontal studies. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 63-72, 2003.

DUTRA, I. S.; BOTTEON, R. C. M.; DÖBEREINER, J. Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerros transferidos para área indene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 71-74, 2000.

DUTRA, I. S.; KANOE, M.; BLOBEL, H. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 6, n. 2, p. 59-63, 1986.

DUTRA, I. S.; MATSUMOTO, T.; DÖBEREINER, J. Surtos de periodontite em bezerros (“cara inchada”) associados ao manejo do solo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 13, n. 1/2, p. 1-4, 1993.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J. Cara inchada dos bovinos. In: RIET-CORREA, F. et al. Doenças de Ruminantes e Equídeos, 2ªed. Varela: São Paulo, v.1, p. 397-401, 2001.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J. Efficacy of virginiamycin for the prophylaxis of “cara inchada”, a periodontal disease of cattle. In: XIII CONGRESS PANAMERICANO DE CIENCIAS VETERINARIAS, 1992, Santiago, Chile. **Resumos...** Santiago: 1992, 237.

DZINK, J. L.; SOCRANSKY, S. S.; EBERSOLE, J. L.; FREY, D. E. ELISA and conventional techniques for identification of black-pigmented *Bacteroides* isolated from periodontal pockets. **Journal of Periodontal Research**, v. 18, p. 316-323, 1988.

ELLIOT, D. R.; WILSON, M.; BUCKLEY, M. F.; DAVID, A. S. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5470-5476, 2005.

ELLISON, S. A. Oral bacteria and periodontal disease. **Journal of Dental Research**, v. 49, p. 198-202, 1970.

FADDEN, A. N.; POULSEN, K. P.; VANEGAS, J.; MECHAM, J.; BILDFELL, R.; STIEGER-VANEGAS, S. M. Dental pathology in conventionally fed and pasture managed dairy cattle. **Veterinary Record**, v. 2, p.1-7, 2015.

FAVERI, M.; MAYER, M. P. A.; FERES, M.; FIGUEIREDO, L. C.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 112-118, 2008.

FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 50-76, 2006.

FERRARO, C. T. L.; GORNIC, C.; BARBOSA, A. S.; PEIXOTO, R. J. M.; COLOMBO, A. P. V. Detection of *Dialister pneumosintes* in the subgingival biofilm of subjects with periodontal disease. **Anaerobe**, v. 13, p. 244-248, 2007.

FORSBLOM, B.; LOVE, D. N.; SARKIALA-KESSEL, E.; JOUSIMIES-SOMER, H. Characterization of anaerobic, gram negative, nonpigmented, saccharolytic rods from subgingival sites in dogs. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, Suppl. 2, p. S100-S106, 1997.

FOSCHI, F.; CAVRINI, F.; MONTEBUGNOLI, L.; STASHENKO, P.; SAMBRI, V.; PRATI, C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, p. 289-295, 2005.

FOURNIER, D.; MOUTON, C.; LAPIERRE, P.; KATO, T.; OKUDA, K.; MENARD, C. *Porphyromonas Gulae* sp. Nov., an Anaerobic, Gram Negative *Coccobacillus* from the Gingival Sulcus of Various Animal Hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1179-1189, 2001.

FRISKEN, K. W.; LAWS, A. J.; TAGG, J. R.; ORR, M. B. Environmental influences on the progression of clinical and microbiological parameters of sheep periodontal disease. **Research of Veterinary Science**, v. 46, p. 147-152, 1989.

GAETTI-JARDIM JR, E.; FARDIN, A. C.; GAETTI-JARDIM, E. C.; CASTRO, A. L.; SCHWEITZER, C. M.; AVILA-CAMPOS, M. J. Microbiota associated with chronic osteomyelitis of the jaws. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1056-1064, 2010.

GAETTI-JARDIM JR, E.; MONTI, L. M.; CIESIELSKI, F. I. N.; GAETTI-JARDIM, E. C.; OKAMOTO, A. C.; SCHWEITZER, C. M.; AVILA-CAMPOS, M. J. Subgingival microbiota from *Cebus paella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions. **Anaerobe**, v. 18, p. 263-269, 2012.

GIOSSO, M. A. **Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais**. 4. ed. rev. São Paulo: FMVZ-USP, 2001. p. 1-7.

GMUR, R.; STRUB, J. R.; GUGGENHEIM, R. V. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. **Journal of Periodontal Research**, v. 24, p. 113-120, 1989.

GOLDSTEIN, E. J. C.; CITRON, D. M.; FINEGOLD, S. M. Role of anaerobe bacteria in bite-wounds infection. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, p. 177-183, 1984.

- GRASSMANN, B.; DÖBEREINER, J.; DUTRA, I. S.; KOPP, P. A.; BLOBEL, H. Adherence and experimental infection of bacteria associated with periodontal infections of young cattle in Brazil ("cara inchada"). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 3/4, p. 123-125, 1997.
- HAFFAJEE, A. D.; BOGREN, A.; HASTURK, H.; FERES, M.; LOPES, N. J.; SOCRANSKY, S. S. Subgingival microbiota of chronic periodontitis from different geographic locations. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, p. 996-1002, 2004.
- HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 5, p. 78-111, 1994.
- HAFFAJEE, A. D.; TELES, R. P.; SOCRANSKY, S. S. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. **Oral Microbiology & Immunology**, v. 21, p. 1-14, 2006.
- HAJISHENGALIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature**, v. 15, p. 30-44, 2015.
- HAJISHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobiontes and host response. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 1, p. 3-11, 2014.
- HARDHAM, J.; DREIER, K.; WONG, J.; SFINTESCU, C.; EVANS, R. T. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 119-128, 2005.
- HART, K. E.; MACKINNON, M. M. Enzootic paradental disease of adult teeth in the Bulls-Santoft area. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 6, p. 118-123, 1958.
- HARVEY, C. E. Periodontal disease in dogs. Etiopathogenesis, prevalence and significance. **Veterinary Clinics North America Small Animal Practice**, v. 28, p. 1111-1128, 1998.
- HIRAI, N.; SHIRAI, M.; KATO, Y.; MURAKAMI, M.; NOMURA, R.; YAMASAKI, Y.; TAKAHASHI, S.; KONDO, C.; MATSUMOTO-NAKANO, M.; NAKANO, K.; ASAI, F. Correlation of age with distribution of periodontitis-related bacteria in Japanese dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, p. 999-1001, 2013.
- HUJOEL, P.; ZINA, L. G.; CUNHA-CRUZ, J.; LOPEZ, R. Historical perspectives on theories of periodontal disease etiology. **Periodontology 2000**, v. 58, p. 153-160, 2012.
- INGHAM, B. Abattoir survey of dental defects in cull cows. **Veterinary Record**, v. 148, p. 739-742, 2001.
- ISMAEL, M. O.; GREENMAN, J.; MORGAN, K.; GLOVER, M. G.; REES, A. S.; SCULLY, C. Periodontitis in sheep: a model for human periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 60, p. 279-284, 1989.

- KIM, D. M.; RAMONI, M. F.; NEVINS, M.; FIORELLINI, J. P. The gene expression. Profile in refractory periodontitis patients. **Journal of Periodontology**, v. 77, p. 1043-1050, 2006.
- KOPP, P. A.; DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; SCHMITT, M.; GRASSMANN, B.; BLOBEL, H. Estreptomicina aumenta a aderência em células epiteliais de *Bacteroides melaninogenicus* associados às lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 16, n. 2/3, p. 53-57, 1996.
- KORNMAN, K. S. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1560-1568, 2008.
- KUO, L.; POLSON, A. M.; KANG, T. Associations between periodontal disease and systemic diseases: A review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. **Public Health**, v. 122, p. 417-433, 2008.
- LALIBERTE, M; MAYRAND, D. Characterization of black-pigmented *Bacteroides* strains isolated from animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 247-252, 1983.
- LANG, N. P.; BARTOLD, P. M.; CULLINAM, M.; JEFFCOAT, M.; MOMBELLI, A.; MURAKAMI, S.; PAGE, R.; PAPAPANOU, P.; TONETTI, M. VAN DYKE, T. International Classification Workshop. Consensus report: Aggressive periodontitis. **Annals of Periodontology**, v. 4, p. 53, 1999.
- LAWSON, P. A.; JOHSON, C. N.; BENGTSSON, L.; CHARALAMPAKIS, G.; DAHLÉN, G.; MOORE, E.; FALSEN, E. *Peptostreptococcus canis* sp. nov., isolated from subgingival plaque from canine oral cavity. **Anaerobe**, v. 18, p. 597-601, 2012.
- LINDHE, J.; HAMP, S. E.; LÖE, H. Experimental periodontitis in the beagle dog. **Journal of Periodontology Research**, v. 8, p. 1-10, 1973.
- LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral, 5ª edição. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, p. 197-254, 2010.
- LÖE, H. Periodontal disease as we approach the year 2000. **Journal of Periodontology**, v. 65, S. 5, p. 464-467, 1994.
- LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, v. 36, p. 177-187, 1965.
- LOESCHE, W. J. Bacterial mediator in periodontal diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16 (supp4), p. S203-S210, 1993.

- LOVE, D. N.; VEKSELSTEIN, R.; COLLINGS, S. The obligate and facultatively anaerobic bacterial flora of the normal feline gingival margin. **Veterinary Microbiology**, v. 22, n. 2-3, p. 267-275, 1990.
- MALHEIROS, V. J.; AVILA-CAMPOS, M. J. Detection of pathogens from periodontal lesions. **Revista Brasileira de Saúde Pública**, v. 38, p. 723-728, 2004.
- MALLONEE, D. H.; HARVEY, C. E.; VENNER, M.; HAMMOND, B. F. Bacteriology of periodontal disease in the cat. **Archives of Oral Biology**, v. 33, p. 677-683, 1988.
- MANDELL, R. L. A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. **Infection and Immunity**, v. 45, p. 778-780, 1984.
- MAYANAGI, G.; SATO, T.; SHIMAUCHI, H.; TAKAHASHI, N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, p. 379-385, 2004.
- McCOURTIE, J.; POXTON, I. R.; BROWN, R.; WHITTAKER, C. R.; SPENCE, J. A.; AITCHISON, G. U. A Longitudinal Study of the Cultivable Subgingival Bacteria Isolated from Sheep During the Development of Broken Mouth Periodontitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 31, p. 275-283, 1990.
- McCOURTIE, J.; POXTON, I. R.; SPENCE, J. A.; AITCHISON, G. U. Preliminary Study of the Anaerobic Bacteria Isolated from Subgingival Plaque from Sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 21, p. 139-146, 1989.
- McDONALD, J.B.; GIBBONS, R.J.; SOCRANSKY, S.S. Bacterial mechanisms in periodontal disease. **Oral Microbiology**, v. 85, p. 467-478, 1960.
- MIKKELSEN, D.; MILINOVICH, G. J.; BURRELL, P. C.; HUYNH, S. C.; PETTETT, L. M.; BLACKALL, L. L.; TROTT, D. J.; BIRD, P. S. Phylogenetic Analysis of *Porphyromonas* Species Isolated from the Oral Cavity of Australian Marsupials. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 2425-2432, 2008.
- MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V.; SMIBERT, R. M.; HASH, D. E.; BURMEISTER, J. A.; RANNEY, R. R. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. **Infection & Immunity**, v. 38, p. 1137-1148, 1982.
- MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 5, p. 66-77, 1994.
- MULLER, H. P.; HEINECKE, A.; BORNEFF, M.; KNOPF, A.; KEINCKE, C.; POHL, S. Microbial ecology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* and *Capnocytophaga* spp. in adult periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 32, p. 530-542, 1997.

- NARES, S. The genetic relationship to periodontal disease. **Periodontology**, v. 32, p. 36-49, 2003.
- NISHIYAMA, S. A. B.; SENHORINHO, G. N. A.; GIOSO, M. A.; AVILA-CAMPOS, M. J. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens of dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 23-28, 2007
- NORDHOFF, M.; RÜHE, B.; KELLERMEIER, C.; MOTER, A.; SCHMITZ, R.; BRUNNBERG, L.; WIELER, L. H. Association of *Treponema* spp. with canine periodontitis. **Veterinary Microbiology**, v. 27, p. 334-342, 2008.
- PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. **Laboratory Investigation**, v. 33, p. 235-249, 1976.
- PASTER, B. J.; BOCHES, S. K.; GALVIN, J. L. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3770-3783, 2001.
- PEDDLE, G. D.; DROBATZ, K. J.; HARVEY, C. E.; ADAMS, A.; SLEEPER, M. M. Association of periodontal disease, oral procedures, and other clinical findings with bacterial endocarditis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, p. 100-107, 2009.
- PORTER, W. L.; SCOTT, R. S.; MANKTELOW, B. W. The occurrence of paradontal disease in sheep in relation to superphosphate topdressing, stocking rate and other related factors. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 18, p. 21-27, 1970.
- RAMS, T. E.; FEIK, D.; SLOTS, J. *Campylobacter rectus* in human periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 8, p. 230-235, 1993.
- RICHARDSON, C.; RICHARDS, M.; TERLECKI, S.; MILLER, W. M. Jaws and Culled Ewes. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 93, p. 521-529, 1979.
- RIGGIO, M. P.; JONSSON, N.; BENNETT, D. Culture-Independent Identification of Bacteria Associated with Ovine "broken-mouth" Periodontitis. **Veterinary Microbiology**, v. 166, p. 664-669, 2013.
- RILEY, C.; LONDON, J.P.; BURMEISTER, J. A. Periodontal health in 200 HIV-positive patients. **Journal of Oral Pathology e Medicine**, v. 21, p. 124-127, 1992.
- RONDERBURG, J. P.; VAN WINKELHOFF, A. J.; WINKEL, E. G.; GOENE, R. J.; ABBAS, F.; GRAFF, J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, p. 392-399, 1990.
- ROSA, I. V.; DÖBEREINER, J. "Cara inchada" dos bovinos e deficiências minerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 43-48, 1994.

- SALDANHA, S. V. **Aspectos Clínicos e Epidemiológicos das Alterações Bucodentais em Caprinos Criados na Mesorregião Metropolitana de Recife, Mata Pernambucana e Sertão Pernambucano**. 2006. 64 f. Dissertação de Mestrado em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.
- SALISBURY, R. M.; ARMSTRONG, M.C.; GRAY, K. G. Ulcero-membranous gingivitis in sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 1, p. 51-52, 1953.
- SCHENKEIN, H. A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 77-93, 2006
- SCHLAFER, S.; RIEP, B.; GRIFFEN, A. L.; PETRICH, A.; HÜBNER, J.; BERNING, M.; FRIEDMANN, A.; GÖBEL, U .B.; MOTER, A. *Filifactor alocis* – involvement in periodontal biofilms. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 66, p. 1-13, 2010.
- SCHMITT, M.; DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; KOPP, P. A.; BLOBEL, H. “Cara inchada” and cellular immunity in cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 1-3, 1996.
- SENHORINHO, G. N. A.; NAKANO, V.; LIU, C.; SONG, Y.; FINEGOLD, S.; AVILA-CAMPOS, M. J. Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without periodontitis. **Anaerobe**, v. 17, p. 257-258, 2011.
- SENHORINHO, G. N. A.; NAKANO, V.; LIU, C.; SONG, Y.; FINEGOLD, S. M.; AVILA-CAMPOS, M. J. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas* spp. and *Fusobacterium* spp. in dogs with and without periodontitis. **Anaerobe**, v. 18, p. 381-385, 2012.
- SHADDOX, L. M.; HUANG, H.; LIN, T.; HOU, W.; HARRISON, P. L.; AUKHIL, I.; WALKER, C. B.; CERAJ-KLEPAC, V.; PASTER, B. J. Microbiological characterization in children with aggressive periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 91, p. 927-933, 2012.
- SLOTS, J. Importance of black-pigment *Bacteroides* in human periodontal disease. In: Host-parasite interaction in periodontal disease, p. 27-45, 1982.
- SLOTS, J.; FEIK, D.; RAMS, T. E. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides intermedius* in human periodontitis: age relationship and mutual association. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, p. 659-662, 1990.
- SLOTS, J.; GENCO, R. J. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. **Journal of Dental Research**, v. 63, p. 412-421, 1984.

SLOTS, J.; HAUSMANN, E. Longitudinal study of experimentally induced periodontal disease in *Macaca arctoides*. Relationship between microflora and alveolar bone loss. **Infection and Immunity**, v. 23, p. 260-269, 1979.

SOCRANSKY, S. S. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. **Journal of Dental Research**, v. 49, p. 203-222, 1970.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology 2000**, v. 38, p.135-187, 2005.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT JR, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134-44, 1998.

SPENCE, J. A.; AITCHINSON, G. U.; FRASER, J. Developmente of periodontal disease in a single flock of sheep: clinical signs, morphology of subgingival plaque and influence of antimicrobial agents. **Research in Veterinary Science**, v. 45, p. 323-331, 1988.

STINGU, C. S.; SCHAUMANN, R.; JENTSCH, H.; ESCHRICH, K.; BROSTEANU, O.; RODLOFF, A. C. Association of periodontitis with increased colonization by *Prevotella nigrescens*. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 4, p. 20-25, 2013.

SUZUKI, S.; MITANI, A.; KOYASU, K.; ODA, S. I.; YOSHINARI, N.; FUKUDA, M.; HANAMURA, H.; NAKAGAKI, H.; NOGUCHI, T. A Model of Spontaneous Periodontitis in the Miniature Goat. **Journal Periodontology**, v. 77, n. 5, p. 847-855, 2006.

TAKADA, K.; HAYASHI, K.; SATO, Y.; HIRASAWA, M. *Prevotella dentasini* sp. nov., a black-pigmented species isolated from the oral cavity of donkeys. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1637-1639, 2010.

TIMS, F. M.; DUTRA, I. S.; MATSUMOTO, T.; DÖBEREINER, J. Eficácia de virginiamicina na recuperação de bezerros com a doença peridentária “cara inchada”. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 77-80, 1992.

TOMITA, S.; KOMIYA-ITO, A.; IMAMURA, K.; KITA, D.; OTA, K.; TAKAYAMA, S.; MAKINO-OI, A.; KINUMATSU, T.; OTA, M.; SAITO, A. Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 61, p. 11-15, 2013.

TONETTI, M.; MOMBELLI, A. Early onset periodontitis. **Annals of Periodontology**, v. 4, p. 39-53, 1999.

WEST, D. M. Dental disease of sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 50, n. 3, p. 102-104, 2002.

WEST, D. M.; SPENCE, J. A. Diseases of the oral cavity. In: Martin W. B., Aiken I. D (eds). **Diseases of sheep**. 3.rd edtn. London: Blackwell Science, 2000. P. 125-131.

WILLIAMS, C. A.; WINKLER, J. R.; GRASSI, M.; MURRAY, P. A. HIV-associated periodontitis complicated by necrotizing stomatitis. **Oral Surgery, Oral Pathology**, v. 69, p. 351-355, 1990.

YOO, J. Y.; KIM, H. C.; ZHU, W.; KIM, S.; SABET, M.; HANDFIELD, M.; HILLMAN, J.; PROGULSKE-FOX, A.; LEE, S. Identification of *Tannerella forsythia* antigens specifically expressed in patients with periodontal disease. **Federation of European Microbiological Societies Letters**, v. 275, p. 344-352, 2007.

ZAMBON, J. J.; REYNOLDS, H. S.; SLOTS, J. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. **Infection and Immunity**, v. 32, n. 1, 198-203, 1986.

**CAPÍTULO 2 - *Treponema denticola* na microbiota da periodontite bovina<sup>1</sup>**

Ana Carolina Borsanelli<sup>2</sup>, Elerson Gaetti-Jardim Júnior<sup>3</sup>, Jürgen Döbereiner<sup>4</sup> e Iveraldo S. Dutra<sup>5\*</sup>

**ABSTRACT.-** Borsanelli A.C., Gaetti-Jardim Júnior E., Döbereiner J. & Dutra I.S. 2015. [***Treponema denticola* in the microflora of bovine periodontitis.**] *Treponema denticola* na microbiota da periodontite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(3):237-240. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, Rua Clóvis Pestana 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680, Brazil. E-mail: [dutrais@hotmail.com](mailto:dutrais@hotmail.com)

Periodontitis in cattle is an infectious purulent progressive disease associated with strict anaerobic subgingival biofilm and is epidemiologically related to soil management at several locations of Brazil. This study aimed to detect *Treponema* species in periodontal pockets of cattle with lesions deeper than 5 mm in the gingival sulcus of 6 to 24-month-old animals considered periodontally healthy. We used paper cones to collect the materials, after removal of supragingival plaques, and kept frozen (at -80°C) up to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) using *Treponema amylovorum*, *Treponema denticola*, *Treponema maltophilum*, *Treponema medium* and *Treponema vincentii* primers. In periodontal pocket, it was possible to identify by PCR directly the presence of *Treponema amylovorum* in 73% of animals (19/26), *T. denticola* in 42.3% (11/26) and *T. maltophilum* in 54% (14/26). Among the 25 healthy sites, it was possible to identify *T. amylovorum* in 18 (72%), *T. denticola* in two (8%) and *T. maltophilum* in eight (32%). *Treponema medium* and *T. vincentii* were not detected over all 51 evaluated samples. The presence of *Treponema amylovorum*, *T. maltophilum* and, in particular, the widely recognized *T. denticola* in subgingival microflora brings an original and potentially important contribution in studies of the bovine periodontitis.

INDEX TERMS: Bovine periodontitis, periodontal disease, subgingival microflora, *Treponema denticola*.

**RESUMO.-** A periodontite bovina é um processo infeccioso purulento e progressivo associado à presença de biofilme subgingival anaeróbico estrito e epidemiologicamente relacionada ao manejo do solo em amplas áreas geográficas do Brasil. Este trabalho teve por objetivo detectar espécies de *Treponema* presentes na bolsa periodontal de bovinos com lesões de profundidade maior que 5 mm e do sulco gengival de animais com idade de 6 a 24 meses e considerados periodontalmente saudáveis. Os materiais foram colhidos por meio de cones de papel, após a remoção do

<sup>1</sup> Recebido em 5 de Janeiro de 2015.

Aceito para publicação em 16 de Março de 2015.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. E-mail: [carol.borsanelli@yahoo.com.br](mailto:carol.borsanelli@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Rua José Bonifácio 1193, Araçatuba, SP 16015-050, Brazil. E-mail: [gaettijardim@gmail.com](mailto:gaettijardim@gmail.com)

<sup>4</sup> Ex-Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), General Editor of "Pesquisa Veterinária Brasileira", Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: [jurgen.dobereiner@pvb.com.br](mailto:jurgen.dobereiner@pvb.com.br)

<sup>5</sup> Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, Rua Clóvis Pestana 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680. \*Autor para correspondência: [isdutra@fmva.unesp.br](mailto:isdutra@fmva.unesp.br)

biofilme supragengival, e mantidos sob congelamento (-80°C) até a extração do DNA e realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) com o emprego de iniciadores de *Treponema amylovorum*, *Treponema denticola*, *Treponema maltophilum*, *Treponema medium* e *Treponema vincentii*. Na bolsa periodontal de 73% (19/26) dos animais foi possível detectar diretamente, pela PCR, a presença de *Treponema amylovorum*, de 42,3% (11/26) *T. denticola* e de 54% (14/26) *T. maltophilum*. Dos 25 sítios sadios, em 18 (72%) foi possível identificar *T. amylovorum*, em dois (8%) *T. denticola* e em oito (32%) *T. maltophilum*. *Treponema medium* e *T. vincentii* não foram detectados nas 51 amostras avaliadas. A presença de *Treponema amylovorum*, *T. maltophilum* na microbiota subgengival, e em especial do amplamente reconhecido periodontopatógeno *T. denticola*, traz uma contribuição original de importância potencial nos estudos da periodontite bovina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Periodontite bovina, doença periodontal, microbiota subgengival, *Treponema denticola*.

## INTRODUÇÃO

A “cara inchada” em bovinos é uma periodontite purulenta progressiva, associada à microbiota Gram-negativa anaeróbia estrita. A doença de características epidemiológicas peculiares teve grande impacto econômico e sanitário na pecuária nas décadas de 1960 a 1980. Inicialmente associada à formação de pastagem em extensas áreas das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte do país (Döbereiner et al. 2000), a enfermidade reincide na sua manifestação clínica aparente em rebanhos após a reforma dos pastos ou alimentação dos bovinos em fase de dentição com forragem cultivada em área anteriormente endêmica (Dutra et al. 1993, Döbereiner et al. 2004).

A presença de micro-organismos considerados periodontopatogênicos na bolsa periodontal de bezerros é uma constante nos cultivos da “cara inchada” em meio de cultura convencional, principalmente os *Bacteroides* pigmentados de negro, *Fusobacterium* e outras bactérias anaeróbias Gram-negativas (Blobel et al. 1987, Dutra et al. 1986, Botteon et al. 1993). Nesse contexto, a transferência de bovinos com periodontite de área endêmica para indene resulta na remissão clínica espontânea do processo e modificação da microbiota da bolsa periodontal, com destaque aos *Bacteroides* pigmentados de negro (Dutra et al. 2000).

Em diversas formas de apresentação clínica da doença periodontal em humanos, a presença de espiroquetas na microbiota está associada ao risco elevado de determinado sítio desenvolver lesão (Socransky & Haffajee 2010). Considerado um

importante patógeno periodontal e componente do complexo vermelho de Socransky, o *Treponema denticola* (Socransky et al. 1998) é mais comum em sítios com doença periodontal do que em sítios saudáveis, e na placa subgengival do que na supragengival (Riviere et al. 1992, Haffajee et al. 1998, Ximénez-Fyvie et al. 2000, Avila-Campos & Velásquez-Melendéz 2002).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a microbiota envolvida na periodontite bovina, o presente estudo teve por objetivo identificar pela reação em cadeia da polimerase (PCR) espécies de espiroquetas do gênero *Treponema* em amostras de biofilme subgengival de bovinos com e sem periodontite.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Caracterização da periodontite e colheita de material.** O status clínico dos bovinos com idade entre 6 e 24 meses foi estabelecido após o exame intraoral e avaliação periodontal, observando-se em todas as etapas os critérios aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (Processo FOA nº 2013-01402). Os indicadores para a caracterização da lesão periodontal foram os observados por Döbereiner et al. (2000), e decorrentes do aspecto visível da arcada dentária, possibilitada pela contenção do animal e com o auxílio de abridor de boca, acrescidos da sondagem para mensuração da profundidade da bolsa periodontal. Os materiais foram obtidos da bolsa periodontal de bovinos com lesões (n=26) e do sulco gengival de animais considerados periodontalmente saudáveis (n=25), oriundos de propriedades rurais com rebanhos considerados endêmicos ou indenes para a enfermidade. Do sulco gengival a colheita foi realizada entre a porção medial palatina do segundo e do terceiro pré-molar maxilar e dos animais com lesões somente daqueles cujas bolsas tinham profundidade maior que 5 mm.

A colheita de material da bolsa periodontal foi realizada após a retirada de alimentos, quando presentes. Os procedimentos para a colheita de material do sulco gengival ou da bolsa periodontal foram os descritos por Gaetti-Jardim Jr et al. (2012). Após a remoção do biofilme bacteriano supragengival com gaze esterilizada, os materiais do sulco ou da bolsa foram colhidos inserindo-se cone de papel, que permaneceu no local por aproximadamente 60 segundos. Em seguida, o cone foi

transferido para tubo contendo 1 mL de água ultrapura esterilizada, e armazenado a -80 °C, até a extração do DNA.

**Identificação bacteriana pela reação em cadeia da polimerase (PCR).** A detecção do DNA bacteriano de cada amostra em água ultrapura estéril foi realizada inicialmente pela extração do DNA por kit comercial (*GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit*, Sigma). A presença de *Treponema amylovorum*, *T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. medium* e *T. vincentii* foi avaliada pelo emprego de iniciadores específicos (Quadro 1).

As amplificações foram realizadas em volumes de 25 µL, contendo 11,9 µL de água para PCR, 5 µL de PCR/Mg<sup>++</sup> *buffer* (Boehring Mannheim, Indianapolis, IN, USA), 1 µL de Dntp (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 0,1µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 0,2 µL de cada par de primer (Invitrogen do Brasil) e 5 µL da amostra. A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700, Norwalk, CT, USA) programado para 1 ciclo de 94°C (5 min.), de 30 a 36 ciclos de 94°C (1 min.); temperatura de anelamento de cada iniciador por um tempo que variou de 30 segundos a 1 min., 72°C por 2 min. e 1 ciclo de 72°C (5 min.), para a extensão final da cadeia de DNA. Os produtos da amplificação pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 mg/ml).

## RESULTADOS

Na bolsa periodontal de 73% (19/26) dos bovinos foi possível detectar diretamente, pela PCR, a presença de *Treponema amylovorum*, de 42,3% (11/26) *T. denticola* e de 54% (14/26) *T. maltophilum*. Dos 25 bovinos sem lesões periodontais, em 18 (72%) foi possível identificar *T. amylovorum*, em 2 (8%) *T. denticola* e em 8 (32%) *T. maltophilum* (Quadro 2). *Treponema medium* e *T. vincentii* não foram detectados nas 51 amostras pesquisadas.

## DISCUSSÃO

A periodontite bovina ocorre em condições epidemiológicas específicas e associada predominantemente à presença de microbiota bacteriana anaeróbia no biofilme subgingival, em especial pelos *Bacteroides* pigmentados de negro, *Fusobacterium* e outros micro-organismos (Döbereiner et al. 2000, Dutra et al. 2000).

Nos estudos microbiológicos iniciais da doença, realizados nas décadas de 1980 e 1990, foi possível caracterizar por meio das propriedades de cultivo, morfo-tintoriais e de provas bioquímicas bactérias presentes nas lesões periodontais a partir do isolamento em ágar sangue enriquecido com hemina e vitamina K (Blobel et al. 1987, Dutra et al. 1986, Botteon et al. 1993). No presente estudo, o emprego da reação em cadeia da polimerase, com o uso de iniciadores de algumas espécies de *Treponema* conhecidas da microbiota oral de humanos e animais, possibilitou identificar espiroquetas diretamente do material colhido das lesões periodontais e do sulco gengival e após a extração de DNA. Segundo Socransky & Haffajee (2010), a PCR além de ser capaz de detectar pequenos números celulares tem a vantagem de ser específica, o que contribui para enumerar as espécies e melhor entender o seu possível papel na doença.

Como enfatizado por Socransky & Haffajee (2010), a caracterização desses micro-organismos como periodontopatógenos específicos é problemática devido à sua inabilidade de crescer *in vitro*. De uma maneira geral, as espécies do gênero *Treponema* spp. são de cultivo e identificação complexos, e a verificação da sua presença na microbiota oral associada às periodontites encontra limitações quando empregados meios de cultivo e métodos clássicos de isolamento, particularidades essas que certamente impossibilitaram a sua identificação nos estudos iniciais da doença.

De acordo com Ellen & Galimanas (2005), apenas 10 espécies de espiroquetas são cultiváveis e pelo menos 50 são reconhecidas por meio da análise do 16S rRNA (Dewhirst et al. 2000). Nesse contexto, há uma diversidade de estudos qualitativos ou quantitativos que avaliaram a presença de espécies de *Treponema* envolvidas na periodontite humana ou em sítios saudáveis (Willis et al. 1999, Sato & Kuramitsu 2000, Asai et al. 2002), da mesma forma que detectadas na doença periodontal em cães (Riviere et al. 1996, Nordhoff et al. 2008); no entanto, a prevalência de *T. denticola* está mais frequentemente associada à maior severidade da periodontite, tanto em humanos quanto em cães.

Neste estudo qualitativo, a identificação do *Treponema denticola*, *T. amylovorum* e *T. maltophilum* em bolsa periodontal com profundidade acima de 5mm e de sítios saudáveis contribui para ampliar o conhecimento sobre os micro-organismos

potencialmente envolvidos na etiopatogenia da enfermidade. Determinadas espécies de espiroquetas têm sido relacionadas com a destruição periodontal, evidenciada quando se emprega técnicas moleculares ou baseadas na detecção de anticorpos. Segundo estudos quantitativos da microbiota oral humana, quando prevalente e em alto nível na periodontite severa em humanos o *T. denticola* desempenha um importante papel na progressão da doença (Fenno & McBride 1998).

Cabe ressaltar que a etiologia da doença periodontal em humanos, e de diversas espécies animais, está associada a micro-organismos específicos ou a biofilmes complexos, e algumas bactérias são consideradas periodontopatógenos potenciais, e dentre elas o *Treponema denticola* (Socransky et al. 1998, Socransky & Haffajee, 2010). *T. denticola* e os outros membros do complexo vermelho de Socransky estão presentes em maior número em bolsas periodontais com profundidade maior que 3 mm (Ximénez-Fyvie et al. 2000), e a intensidade da lesão ou doença é relacionada à maior prevalência, contagens e proporções das espécies desse complexo (Socransky et al. 1998).

Entre os fatores de virulência de espécies do gênero *Treponema* que podem exercer um papel importante na periodontite estão motilidade, quimiotaxia, aderência a fibroblastos e células epiteliais de várias origens e eritrócitos, citotoxicidade, aquisição de ferro, atividade protease quimotripsina like, atividade hemolítica, imunomodulação, fosfolipase C, metabólitos tóxicos, resistência a antibióticos e plasmídeo (Fenno & McBride 1998, Dashper et al. 2011). Estudos *in vitro* sugerem ainda os efeitos combinados da motilidade e atividade proteolítica da *T. denticola* de penetrar na membrana basal. Isso sugere que o comportamento invasivo das espiroquetas pode contribuir para a doença periodontal, uma vez que esses micro-organismos invadem tecidos por migração mesmo através de junções intercelulares apertadas (Socransky & Haffajee 2010).

A presença de *Treponema amylovorum*, *T. maltophilum* e em especial de *T. denticola* traz uma contribuição original e relevante nos estudos da etiopatogenia e no controle da periodontite bovina.

**Agradecimentos.** – À FAPESP pelo apoio financeiro (Processo FAPESP nº 2013/13701-7), e Robson V. Ranieri pela assistência técnica.

## REFERÊNCIAS

- Asai Y., Jinno T., Igarashi H. & Ogawa T. 2002. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40(9):3334-3340.
- Ashimoto A., Chen C., Bakker I. & Slots J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immun.* 11:266-273.
- Avila-Campos M.J. & Velásquez-Meléndez G. 2002. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. *Revta Inst. Med. Trop.* 44(1):1-5.
- Blobel H., Döbereiner J., Lima F.G.F. & Rosa I.V. 1987. Bacterial isolations from “cara inchada” lesions of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2):73-77.
- Botteon R.C.M., Dutra I.S., Döbereiner J. & Blobel H. 1993. Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 13(3/4):51-55.
- Dashper S.G, Seers C.A., Tan K.H. & Reynolds E.C. 2011. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J. Dent. Res.* 90(6):691-703.
- Dewhirst F.E., Tamer M.A., Ericson R.E., Lau C.N., Levanos V.A., Boches S.K., Galvin J.L. & Paster B.J. 2000. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol. Immun.* 15:196-202.
- Döbereiner J., Dutra I.S., Rosa I.V. & Blobel H. 2000. “Cara inchada” of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependent periodontitis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2):47-64.
- Döbereiner J., Dutra I.S. & Rosa I.V. 2004. A etiologia da “cara inchada”, uma periodontite enzoótica dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 24(1):50-56.
- Dutra I.S., Kanoe M. & Blobel H. 1986. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 6(2):59-63.
- Dutra I.S., Matsumoto T. & Döbereiner J. 1993. Surtos de periodontite em bezerros (“cara inchada”) associados ao manejo do solo. *Pesq. Vet. Bras.* 13(1/2):1-4.
- Dutra I.S., Botteon R.C.M. & Döbereiner J. 2000. Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerros transferidos para área indene. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2):71-74.
- Ellen R.P & Galimanas V.B. 2005. Spirochetes at the forefront of periodontal infections. *Periodontology* 38:13-32.
- Fenno J.C. & McBride B.C. 1998. Virulence factors of oral treponemes. *Anaerobe* 4:1-17.

- Gaetti-Jardim Jr E., Monti L.M., Ciesielski F.I.N., Gaetti-Jardim E.C., Okamoto A.C., Schweitzer C.M. & Avila-Campos M.J. 2012. Subgingival microbiota from *Cebus paella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions. *Anaerobe* 18:263-269.
- Haffajee A.D., Cugini M.A., Tanner A., Pollack R.P., Smith C., Kent R.I. & Socransky S.S. 1998. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J. Clin. Periodontol.* 25:346-353.
- Mayanagi G., Sato T., Shimauchi H. & Takahashi N. 2004. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol. Immun.* 19:379-385.
- Nordhoff M., Ruhe B., Kellermeier C., Moter A., Schmitz R., Brunnberg L. & Wieler L.H. 2008. Association of *Treponema* spp. with canine periodontitis. *Vet. Microbiol.* 27:334-342.
- Riviere G.R., Elliot K.S., Adams D.F., Simonson L.G., Forgas L.B., Nilius A.M. & Lukehart S.A. 1992. Relative proportions of pathogen-related oral spirochetes (PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis. *J. Periodontol.* 63:131-136.
- Riviere G.R., Thompson A.J., Brannan R.D., McCoy D.E. & Simonson L.G. 1996. Detection of pathogen-related oral spirochetes, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii* in dental plaque from dogs. *J. Vet. Dent.* 13:135-138.
- Sato T. & Kuramitsu H.K. 2000. Polymerase chain reaction for the detection of *flaA-1* genes of oral spirochetes in human advanced periodontal pockets. *Arch. Oral Biol.* 45:921-925.
- Socransky S.S. & Haffajee A.D. 2010. Infecções periodontais, p.197-254. In: Lindhe J., Lang N.P. & Karring T. (Eds), *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 5<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1340p.
- Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C. & Kent Jr R.L. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25(2):134-44.
- Willis S.G., Smith K.S., Dunn V.L., Gapter L.A., Riviere K.H. & Riviere G.R. 1999. Identification of seven *Treponema* species in health and disease-associated dental plaque by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37(3):867-869.
- Ximénez-Fyvie L.A., Haffajee A.D. & Socransky S.S. 2000. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 27:722-732.

**Quadro 1. Iniciadores empregados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação das espécies do gênero *Treponema* spp. presentes na microbiota subgingival de bovinos com periodontite e de sítios saudáveis de animais sem evidência clínica da doença**

Espécie	Primers (5' - 3')	Temperatura de anelamento	Referências
<i>Treponema amylovorum</i>	AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG CAC-GCC-TTT-ATT-CCG-TGA-G	55 °C	Mayanagi et al. (2004)
<i>Treponema denticola</i>	TAA-TAC-CGA-ATG-TGC-TCA-TTT-ACA-T TCA-AAG-AAG-CAT-TCC-CTC-TTC-TTC-TTA	60 °C	Ashimoto et al. (1996)
<i>Treponema maltophilum</i>	AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG CTA-TTG-TGC-TTA-TTC-ATC-AGG-C	55 °C	Mayanagi et al. (2004)
<i>Treponema medium</i>	CAC-TCA-GTG-CTT-CAT-AAG-GG CGG-CCT-TAT-CTC-TAA-GAC-C	55 °C	Mayanagi et al. (2004)
<i>Treponema vincentii</i>	GTC-TCA-ATG-GTT-CAT-AAG-AA CAA-GCC-TTA-TCT-CTA-AGA-CT	55 °C	Mayanagi et al. (2004)

**Quadro 2. Espécies do gênero *Treponema* spp. detectadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) na bolsa periodontal de bovinos com periodontite e no sulco gengival de animais saudáveis**

Espécies	Bolsa periodontal (n=26)	Sulco gengival (n=25)
<i>Treponema amylovorum</i>	19	18
<i>Treponema denticola</i>	11	2
<i>Treponema maltophilum</i>	14	8
<i>Treponema medium</i>	0	0
<i>Treponema vincentii</i>	0	0

### CAPÍTULO 3 - Espécies dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* na microbiota da periodontite bovina<sup>1</sup>

Ana Carolina Borsanelli<sup>2</sup>, Elerson Gaetti-Jardim Jr.<sup>3</sup>, Christiane Marie Schweitzer<sup>4</sup>, Jürgen Döbereiner<sup>5</sup>, Iveraldo S. Dutra<sup>6\*</sup>

**ABSTRACT.-** Borsanelli A.C., Gaetti-Jardim Júnior E., Schweitzer C.M., Döbereiner J., & Dutra I.S. 2015. [**Species of *Porphyromonas* and *Prevotella* genera in the microflora of bovine periodontitis.**] Espécies dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* na microbiota da periodontite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(10): 829-834. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, Rua Clóvis Pestana 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680, Brazil. E-mail: [dutrais@hotmail.com](mailto:dutrais@hotmail.com)

Bovine periodontitis is a progressive, purulent, infectious process associated with the presence of strict anaerobic and facultative subgingival biofilm and epidemiologically related to soil management in large geographic areas in Brazil. This study aimed to detect species of the genera *Porphyromonas* and *Prevotella* in periodontal pockets of cattle with injuries deeper than 5 mm (n=26) and in gingival sulcus of animals that are 6 to 24 months old with great periodontal health (n=25). The presence of microorganisms was evaluated by independent culture medium method, through polymerase chain reaction (PCR) and using specific primers for *Porphyromonas asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. gulae*, *Prevotella buccae*, *P. intermedia*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. oralis* and *P. tanneriae*. In samples of cattle with periodontitis, *P. endodontalis* (80,7%), *P. melaninogenica* (73,1%) and *P. intermedia* (61,5%) were the most predominant. Regarding non-injured gingival sulcus of cattle, *P. endodontalis* (40%) and *P. loeschei* (40%) prevailed. *Porphyromonas gingivalis*, *P. gulae* and *Prevotella tanneriae* were not detected in the 51 studied samples. Data evaluation by T test, enabled to verify that manifestation of *Porphyromonas asaccharolytica* ( $p=0,000003$ ), *P. endodontalis* ( $p=0,0023$ ), *Prevotella buccae* ( $p=0,0017$ ), *P. intermedia* ( $p=0,0020$ ), *P. melaninogenica* ( $p=0,00006$ ) and *P. oralis* ( $p=0,0028$ ) is associated with bovine periodontitis.

INDEX TERMS: *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., bovine periodontitis.

**RESUMO.** A periodontite bovina é um processo infeccioso purulento e progressivo associado à presença de biofilme subgingival anaeróbico estrito e facultativo e de incidência em extensas áreas geográficas do Brasil. Este trabalho teve por objetivo

<sup>1</sup> Recebido em 28 de maio de 2015.

Aceito para publicação em 4 de setembro de 2015

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. E-mail: [carol\\_borsanelli@yahoo.com.br](mailto:carol_borsanelli@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Rua José Bonifácio 1193, Araçatuba, SP 16015-050, Brasil. E-mail: [gaettijardim@gmail.com](mailto:gaettijardim@gmail.com)

<sup>4</sup> Departamento de Matemática, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Unesp, Alameda Rio de Janeiro 266, Ilha Solteira, SP 15385-000, Brasil. E-mail: [chris@mat.feis.unesp.br](mailto:chris@mat.feis.unesp.br)

<sup>5</sup> Ex-Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), General Editor of "Pesquisa Veterinária Brasileira", Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: [jurgen.dobereiner@pvh.com.br](mailto:jurgen.dobereiner@pvh.com.br)

<sup>6</sup> Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, Rua Clóvis Pestana 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680. \*Autor para correspondência: [dutrais@hotmail.com](mailto:dutrais@hotmail.com)

detectar espécies dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* na bolsa periodontal de bovinos com lesões de profundidade maior que 5 mm (n=26) e do sulco gengival de animais com idade de 6 a 24 meses e considerados periodontalmente saudáveis (n=25). A presença dos micro-organismos foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e com iniciadores específicos para *Porphyromonas asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. gulae*, *Prevotella buccae*, *P. intermedia*, *P. loeschei*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. oralis* e *P. tanneriae*. *P. endodontalis* (80,7%), *P. melaninogenica* (73,1%) e *P. intermedia* (61,5%) foram os mais prevalentes nas amostras de bovinos com periodontite, s. Já no sulco gengival de bovinos sem lesões prevaleceram *P. endodontalis* (40%) e *P. loeschei* (40%). *Porphyromonas gingivalis*, *P. gulae* e *Prevotella tanneriae* não foram detectados nas 51 amostras pesquisadas. A partir da avaliação dos dados pelo teste T, verificou-se que a ocorrência de *Porphyromonas asaccharolytica* ( $p=0,000003$ ), *P. endodontalis* ( $p=0,0023$ ), *Prevotella buccae* ( $p=0,0017$ ), *P. intermedia* ( $p=0,0020$ ), *P. melaninogenica* ( $p=0,00006$ ) e *P. oralis* ( $p=0,0028$ ) está associada à periodontite bovina.

Palavras-chave: *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., bovine periodontitis

## INTRODUÇÃO

A “cara inchada” em bovinos é uma periodontite purulenta, progressiva, com alterações macroscópicas e histológicas, que geralmente se iniciam na papila interdental entre o segundo e o terceiro pré-molares maxilares decíduos, com formação de bolsa periodontal. Em seguida, partículas de alimento se acumulam, fato que agrava o processo, determinando aumento, extensão e profundidade da lesão. Com o desenvolvimento do processo alveolar purulento, a raiz do dente se torna exposta com afrouxamento e eventual perda do dente (Döbereiner et al. 1974).

A ocorrência da periodontite bovina está associada à presença e prevalência de bactérias anaeróbias Gram-negativas não esporuladas formadoras de colônias pigmentadas de preto em meio de cultivo enriquecido com hemina e vitamina K (Blobel et al. 1984, Botteon et al. 1993, Dutra et al. 1986, 2000). De grande impacto econômico e sanitário na pecuária brasileira, a enfermidade tem características epidemiológicas peculiares. Inicialmente associada à formação de pastagem em extensas áreas das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte do país (Döbereiner et al. 2000), a enfermidade reincide com alta prevalência em rebanhos após a reforma dos pastos ou alimentação dos bovinos em fase de dentição com forragem cultivada em área endêmica (Dutra et al. 1993, Döbereiner et al. 2000).

Bactérias anaeróbias são predominantes na microbiota oral humana e em diversas espécies animais. Dentre elas, destacam-se os anaeróbios Gram-negativos

produtores de pigmento preto pertencentes aos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*, que já foram identificadas em casos de periodontite, gengivite e osteomielite em humanos (Ashimoto et al. 1996, Socransky et al. 1998, Mayanagi et al. 2004, Gaetti-Jardim Jr. et al. 2010). Em animais de companhia, os dois gêneros já foram identificados na microbiota oral de gatos com e sem doença periodontal (Mallonee et al. 1988, Love et al. 1989, Love et al. 1990) e na bolsa periodontal de cães (Hardham et al. 2005, Nishiyama et al. 2007, Riggio et al. 2011, Senhorinho et al. 2011). Os dois gêneros parecem ainda predominar nas lesões da periodontite bovina (Blobel et al. 1987) e em ovinos com a “broken mouth” (McCourtie et al. 1989, Duncan et al. 2003).

Os gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* apresentam extensa gama de fatores de virulência, como a produção de colagenase, uma série de proteases, superantígenos, endotoxinas, ácidos graxos, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, citolisinas e hemolisinas que colaboram para a destruição dos tecidos periodontais (Haffajee & Socransky, 1994, Deshpande & Klan 1999, Holt & Ebersole 2005), que ocorre em um ritmo significativamente mais elevado nas espécies de ungulados quando comparada com animais de companhia e humanos. Assim, embora sejam conhecidos diversos aspectos da patologia, bacteriologia e epidemiologia que corroboram a etiologia infecciosa, a etiopatogênese da enfermidade e a composição detalhada da microbiota associada à “cara inchada” são aspectos ainda a serem elucidados. Visando ampliar o conhecimento sobre a microbiota envolvida na periodontite bovina, o presente estudo teve por objetivo identificar pela reação em cadeia da polimerase (PCR) espécies dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* em amostras de biofilme subgengival de bovinos com e sem periodontite.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Caracterização clínica da periodontite e colheita de material.** O status clínico dos bovinos com idade entre 6 e 24 meses foi estabelecido após o exame intraoral e avaliação periodontal, observando-se em todas as etapas os critérios aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (Processo FOA nº 2013-01402). Os indicadores para a caracterização da lesão periodontal foram os observados por Döbereiner et al. (1974), e decorrentes do aspecto visível da arcada dentária,

possibilitada pela contenção do animal e com o auxílio de abridor de boca, acrescidos da sondagem para mensuração da profundidade da bolsa periodontal.

Os materiais foram obtidos da bolsa periodontal de bovinos (n=26) em propriedades consideradas endêmicas e do sulco gengival de animais considerados periodontalmente sadios (n=25), em áreas livres da doença. Do sulco gengival a colheita foi realizada entre a porção medial palatina do segundo e a do terceiro pré-molar maxilar e dos animais com lesões, somente daqueles cujas bolsas tinham profundidade maior que 5 mm. Nos dois grupos as amostras foram coletadas com cone de papel estéril, de acordo com os procedimentos descritos por Gaetti-Jardim Jr. (2012).

Os animais examinados foram categorizados de acordo com as seguintes características: (1) presença ou ausência de recessão gengival, (2) destruição dos tecidos de suporte caracterizada pela existência de bolsas periodontais (mensuradas com sonda universal) e (3) a presença ou ausência de halitose, como relatado por Döbereiner et al. (1974). Vinte e seis animais com periodontites tinham recessão gengival e conseqüentemente perda óssea (bolsas periodontais); portanto, foi utilizado como indicador da periodontite na análise estatística.

Quando necessário, as amostras de bolsa periodontal foram coletadas depois da remoção de alimentos, e os procedimentos para coleta de amostras do sulco gengival ou do material da bolsa periodontal eram realizados como descrito por Gaetti-Jardim Jr. et al. (2012).

**Identificação bacteriana pela reação em cadeia da polimerase (PCR).** A detecção do DNA bacteriano de cada amostra em água ultrapura estéril foi realizada inicialmente pela extração do DNA por kit comercial (*GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit*, Sigma). A presença de *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas gulae*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis* e *Prevotella tanneriae* foi avaliada com o uso de primers específicos (Tabela 1).

As amplificações foram realizadas em volumes de 25 µL, contendo 11,9 µL de água para PCR, 5 µL de PCR/Mg<sup>++</sup>buffer (Boehring Mannheim, Indianapolis, IN, USA), 1 µL de Dntp (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 0,1 µL de Taq DNA

polimerase (Invitrogen do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 0,2 µL de cada par de primer (Invitrogen do Brasil) e 5 µL da amostra. A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700, Norwalk, CT, USA) programado para 1 ciclo de 94°C (5min.), de 30 a 36 ciclos de 94°C (1 min.); temperatura de anelamento de cada iniciador por um tempo que variou de 30 segundos a 1 min., 72°C por 2 min. e 1 ciclo de 72°C (5 min.), para a extensão final da cadeia de DNA. Os produtos da amplificação pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL). Como controle positivo foram usadas amostras de DNA de cepas de referências (Gaetti-Jardim Jr et al. 2012).

**Análise estatística.** Os dados foram plotados e analisados através do software SPSS. As análises de risco e prevalência foram realizadas utilizando a estatística de Cochran e Mantel-Haenszel para variáveis dicotômicas ou Teste de Person's Chi-Quadrado para análise das proporções quando as variáveis tinham 3 ou mais categorias. As interrelações entre os parâmetros clínicos e microbiológicos foram avaliados pelo Teste T de Student e o pelo Teste de Correlação de Spearman. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se a correção de Bonferroni, com o valor de p ajustado de 0,05 a 0,000003, devido à detecção de 35 espécies microbianas.

## RESULTADOS

Nas amostras de bovinos com periodontite (n=26), *P. endodontalis* (80,7%), *P. melaninogenica* (73,1%) e *P. intermedia* (61,5%) foram os mais prevalentes. Já nos bovinos sem lesões (n=25) prevaleceram *P. endodontalis* (40%) e *P. loescheii* (40%). *Porphyromonas gingivalis*, *P. gulae* e *Prevotella tanneriae* não foram detectados nas 51 amostras pesquisadas (Tabela 2, Fig. 1).

Na tabela 1 observa-se que a ocorrência de *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *Prevotella buccae*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. oralis* está associada à perda óssea. Quando as demais características dos animais são avaliadas, verifica-se que *P. asaccharolytica* ( $p=0,0000001$ ), *P. buccae* ( $p=0,0000001$ ), *P. melaninogenica* ( $p=0,0018$ ) e *P. oralis* ( $p=0,0038$ ) foram mais prevalentes entre os animais com halitose. Pelo teste de correlações de Spearman observou-se forte associação positiva entre a presença de *P. asaccharolytica* e *P. buccae* (índice de correlação-IC

variando de 0,663 a 0,76), seguidas por *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. oralis* e *P. nigrescens* (IC de 0,313 a 0,426).

Os dados sugerem a existência de interações ecológicas entre os microorganismos testados, particularmente entre *P. asaccharolytica* e *P. buccae* (IC=0,507), *P. endodontalis* e *P. melaninogenica* (IC=0,435), *P. intermedia* e *P. melaninogenica* (IC=0,408), *P. loescheii* e *P. nigrescens* (IC=0,440), *P. oralis* e *P. buccae* (IC=0,436), embora correlações positivas tenham sido observadas entre os demais anaeróbios estudados.

## DISCUSSÃO

A destruição periodontal em humanos é fortemente associada com a disbiose da microbiota periodontal, produzindo mudanças relevantes na abundância relativa dos componentes individuais do biofilme e modificação na relação hospedeiro-microorganismos suficientes para mediar inflamação destrutiva e perda óssea, que são vinculadas à presença dos anaeróbios pigmentados de preto, em particular *P. gingivalis* (Hajishengallis 2014, Hajishengallis 2015, Amaliya et al. 2015). Outras espécies como *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. loescheii* têm sido isoladas de sítios periodontais saudáveis, e suas populações são significativamente maiores em pacientes com perda de inserção conjuntiva (Darout 2014, Dahlén et al. 2014, Amaliya et al. 2015). Estudos similares foram descritos em gatos (Pérez-Salcedo et al. 2015) e cães (Hardham et al. 2005, Nishiyama et al. 2007, Riggio et al. 2011, Senhorinho et al. 2011).

A periodontite bovina ocorre em condições epidemiológicas específicas e associada predominantemente à presença de microbiota bacteriana anaeróbia no biofilme subgingival, em especial *Bacteroides* pigmentados de preto e *Fusobacterium* (Döbereiner et al. 2000, Dutra et al. 2000). As espécies produtoras de pigmento preto constituem 80% da microbiota subgingival de bezerros com a doença (Botteon et al. 1993, Dutra et al. 2000), embora a distribuição das diferentes espécies ainda não tenha sido amplamente avaliada.

Dutra et al. (2000) observaram que nas bolsas periodontais de bezerros com periodontite a porcentagem média dos pigmentados de preto foi de 71,3% da microbiota total cultivada em anaerobiose e em meio de cultura específico, nos mesmos animais, após o desaparecimento da sintomatologia clínica de inflamação,

foi de 1,7%, sugerindo que esses micro-organismos podem ser mais prevalentes e abundantes durante o período mais ativo da doença, quando ocorre o fenômeno de perda de inserção conjuntiva, como já observado em humanos.

Diferentes espécies de *Porphyromonas* e *Prevotella*, dentre elas *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. gulae*, *P. cangingivalis*, *P. denticanis*, *P. salivosa*, *Prevotella intermedia* foram identificadas em cães com periodontite (Hardham et al. 2005, Nishiyama et al. 2007, Riggio et al. 2011, Senhorinho et al. 2011). *Porphyromonas* spp., *P. gulae* e *Tannerella forsythia* (Booij-Vrieling et al. 2010) foram identificadas em gatos com doença periodontal.

Em outras espécies animais, como primatas não humanos, esses dois gêneros se mostram mais prevalentes em indivíduos com inflamação periodontal e perda de inserção (Gaetti-Jardim Jr. 2012). *Porphyromonas gingivalis* e *P. gulae* também foram isoladas da cavidade oral de cangurus com diferentes graus de doença periodontal (Mikkelsen et al. 2008). Diferentes espécies de *Prevotella* foram isoladas da cavidade oral de burros, como *Prevotella dentasini*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica* e *P. nigrescens* (Takada et al. 2010). *P. gingivalis* e *P. intermedia* estão frequentemente presentes em ovinos com periodontite (Duncan et al. 2003), além de *P. asaccharolytica* e *P. buccae* (McCourtie et al. 1989).

A partir da análise estatística, verificou-se que a ocorrência de *Porphyromonas asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *Prevotella buccae*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. oralis* está associada à perda óssea e conseqüentemente à periodontite bovina. Os resultados do presente estudo reforçam a relação entre esses anaeróbios e a presença de condições inflamatórias periodontais, mas também apresentam algumas peculiaridades ainda não descritas, como a ausência de *P. gingivalis* nas amostras avaliadas. Contudo, outras espécies desse gênero e do grupo de pigmentados de preto foram bastante frequentes, sugerindo que o nicho ecológico que essa espécie desempenha em humanos esteja sendo ocupado por outros micro-organismos em bovinos, como *P. asaccharolytica* e *P. endodontalis* (Tabela 2).

A presença de *Porphyromonas endodontalis* em infecções bucais raramente é reportada em estudos baseados em cultivo, uma vez que esse microrganismo dificilmente se desenvolve em meios de cultivo (Lillo et al. 2004). Em nosso estudo,

baseado na identificação por PCR, *P. endodontalis* mostrou forte associação com a periodontite.

*Prevotella intermedia* é o segundo pigmentado a receber considerável interesse na periodontite humana. Os níveis desse bastonete parecem ser particularmente elevados em certos tipos de periodontite e em sítios progressivos de periodontite crônica (Socransky & Haffajee 2010). *P. intermedia* é o pigmentado de preto mais frequentemente isolado de infecções supurativas como abscessos periodontais e periodontite apical, além de infecções extraorais (Mättö et al. 1997, Herrera et al. 2000, Jaramillo et al. 2005). *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* não são distinguíveis por métodos convencionais de identificação por cultivo (Ashimoto et al. 1996, Nishiyama et al. 2007). No entanto, através da utilização da PCR foi possível evidenciar que *P. intermedia* está associada à periodontite bovina, enquanto *P. nigrescens* não mostrou valores significantes.

*Porphyromonas asaccharolytica* é um pigmentado de preto prevalente no trato intestinal e urogenital e é importante em várias infecções não orais. Alguns estudos sugerem que este microrganismo raramente está presente na microbiota oral humana e que este não é hábil para colonizar bolsas periodontais (Slots 1979, Haffajee & Socransky 1994, Moore & Moore 1994, Tran et al. 1997). Já em nosso estudo, *P. asaccharolytica* mostrou forte associação com a periodontite bovina.

Nadkarni et al. (2012) evidenciaram que *P. oralis* está associada com a doença periodontal e com bolsas periodontais profundas, enquanto *P. melaninogenica* está associada com sítios saudáveis. Em nosso estudo ambos os micro-organismos mostraram fortes associações com a periodontite bovina.

Considerando a associação de diversas espécies dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* com a doença periodontal em várias espécies, estes agentes foram selecionados como o foco deste estudo. No entanto, devido à diversidade dos gêneros pesquisados possivelmente há outras espécies cuja presença ainda não foi identificada em lesões periodontais. No presente estudo, a identificação de *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. buccae*, *P. oralis*, *P. intermedia* e *P. melaninogenica* mostraram forte associação com as lesões da periodontite bovina, o que constitui uma contribuição original e importante para os estudos sobre a patogênese e medidas de controle da periodontite bovina.

## CONCLUSÃO

Esta investigação sugere o papel etiológico de bactérias na periodontite bovina, provavelmente iniciando a resposta inflamatória e levando a perda óssea derivada da ação de fatores mediados (IL-1, TNF, prostaglandina, complemento, RANKL), como observado na periodontite humana (Hajishengallis 2015, Hajishengallis et al. 2015, Pandit et al. 2015).

O presente estudo também realça a importância dos anaeróbios pigmentados de preto na etiologia da inflamação periodontal em bovinos.

A presença de espécies de *Porphyromonas* e *Prevotella* e sua associação com lesões periodontais corroboram a evidência do efeito da disbiose bacteriana na etiologia infecciosa multifatorial da periodontite bovina

O uso da PCR permitiu a identificação de espécies de pigmentados de preto que não crescem em meios de cultivo tradicionais.

**Agradecimentos.-** Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2013/13701-7)

## REFERÊNCIAS

- Amaliya A., Laine M.L., Delanghe J.R., Loos B.G., Van Wijk A.J. & Van der Velden U. 2015. Java project on periodontal diseases: periodontal bone loss in relation to environmental and systemic conditions. *J. Clin. Periodontol.* 42:325-332.
- Ashimoto A., Chen C., Bakker I. & Slots J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immun.* 11:266-273.
- Blobel H., Döbereiner J., Rosa I.V., Lima F.G.F. & Dutra I.S. 1987. Bacterial investigations of a periodontal disease, Cara Inchada in Brazilian cattle. *Tierärztliche Umschau* 42:152-154.
- Booij-Vrieling H.E., Van Der Reijden W.A., Houwers D.J., De Wit W.E.A.J., Bosch-Tijhof C.J., Penning L.C., Van Winkelhoff A.J. & Hazewinkel H.A.W. 2010. Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners. *Vet. Microbiol.* 144:147-152.
- Botteon R.C.M., Dutra I.S., Döbereiner J. & Blobel H. 1993. Characterization of anaerobic bacteria isolated from periodontal “cara inchada” lesions of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 13(3/4):51-55.
- Dahlén G., Claesson R., Aberg C.H., Haubek D., Johansson A. & Kwamin F. 2014. Subgingival bacteria in Ghanaian adolescents with or without progression of attachments loss. *J. Oral Microbiol.* 6:1-6.

- Darout I.A. 2014. Oral bacterial interactions in periodontal health and disease. *J. Dent. Oral Hyg.* 6(5):51-57.
- Deshpande R.G. & Khan M.B. 1999. Purification and characterization of hemolysin from *Porphyromonas gingivalis* A7436. *FEMS Microbiol. Lett.* 176:387-394.
- Döbereiner J., Dutra I.S., Rosa I.V. & Blobel H. 2000. "Cara inchada" of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependent periodontitis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2):47-64.
- Döbereiner J., Inada T. & Tokarnia C.H. 1974. "Cara inchada", a periodontal disease of cattle. *Pesq. Agropecu. Bras.* 9:63-85.
- Duncan W.J., Persson G.R., Sims T.J., Braham P., Pack A.R.C. & Page R.C. 2003. Ovine periodontitis as a potential model for periodontal studies. *J. Clin. Periodontol.* 30:63-72.
- Dutra I.S., Kanoe M. & Blobel H. 1986. Enzymatic and endotoxic activities of bacteria isolated from periodontal lesions of "cara inchada" in cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 6:59-63.
- Dutra I.S., Botteon R.C.M. & Döbereiner J. 2000. Modification of the microflora associated with the periodontal lesions of "cara inchada" in calves transferred to a disease-free area. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2):71-74.
- Dutra I.S., Matsumoto T. & Döbereiner J. 1993. Outbreaks of periodontitis in calves "cara inchada" related soil cultivation. *Pesq. Vet. Bras.* 13(1/2):1-4.
- Fouad A.F., Barry J., Caimano M., Clawson M., Zhu Q., Carver R., Hazlett K. & Radolf J.D. 2002. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infectious. *J. Clin. Microbiol.* 40:3223-3231.
- Gaetti-Jardim Jr E., Fardin A.C., Gaetti-Jardim E.C., Castro A.L., Schweitzer C.M. & Avila-Campos M.J. 2010. Microbiota associated with chronic osteomyelitis of the jaws. *Braz. J. Microbiol.* 41:1056-1064.
- Gaetti-Jardim Jr E., Monti L.M., Ciesielski F.I.N., Gaetti-Jardim E.C., Okamoto A.C., Schweitzer C.M. & Avila-Campos M.J. 2012. Subgingival microbiota from *Cebus paella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions. *Anaerobe* 18:263-269.
- Haffajee A.D. & Socransky S.S. 1994. Microbiology and immunology of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000 5:78-111.
- Hajishengallis G., Lamont R.J. & Graves D.T. 2015. The enduring importance of animals models in understanding periodontal disease. *Virulence* 6(3):229-235.
- Hajishengallis G. 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 35(1):3-11.
- Hajishengallis G. 2015. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature* 15:30-44.
- Hardam J., Dreier K., Wong J., Sfintescu C. & Evans R.T. 2005. Pigmented- anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *Vet. Microbiol.* 106:119-128.
- Herrera D., Roldán S., González I. & Sanz M. 2000. The periodontal abscess (I). Clinical and microbiological findings. *J. Clin. Periodontol.* 27:387-394.
- Holt S.C. & Ebersole J. 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacteria pathogenic consortia in periodontitis. *Periodontol.* 2000 38:72-122.
- Jaramillo A., Arce R.M., Herrera D., Betancourth M., Botero J.E. & Contreras A. 2005. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. *J. Clin. Periodontol.* 32:1213-1218.

- Kato Y., Shirai M., Murakami M., Mizusawa T., Hagimoto A., Wada K., Nomura R., Nakano K., Ooshima T. & Asai F. 2011. Molecular detection of human periodontal pathogens in oral swab specimens from dogs in Japan. *J. Vet. Dent.* 28:84–89.
- Lillo A., Booth V., Kyriacou L., Weightman A.J. & Wade W.G. 2004. Culture-independent identification of periodontitis associated *Porphyromonas* and *Tannerella* populations by targeted molecular analysis. *J. Clin. Microbiol.* 42(12):5523-5527.
- Love D.N., Johson J.L. & Moore L.V. 1989. *Bacteroides* species from the oral cavity and oral-associated diseases of cats. *Vet. Microbiol.* 19:275-281.
- Love D.N., Vekselstein R. & Collings S. 1990. The obligate and facultatively anaerobic bacteria of normal flora of the normal feline gingival margin. *Vet. Microbiol.* 22:267-275.
- Mallonee D.H., Harvey C.E., Venner M. & Hammond B.F. 1988. Bacteriology of periodontal disease in the cat. *Arch. Oral Biol.* 33:677-683.
- Mättö J., Asikainen S. & Väisänen M.L. 1997. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. *Clin. Infect. Dis.* 25(2):194-198.
- Mayanagi G., Sato T., Shimauchi H. & Takahashi N. 2004. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol. Immun.* 19:379-385.
- McCourtie J., Poxton I.R., Spence J.A. & Aitchison G.U. 1989. Preliminary study of the anaerobic bacteria isolated from subgingival plaque from sheep. *Vet. Microbiol.* 21:139-146.
- Mikkelsen D., Milinovich G.J., Burrell P.C., Huynh S.C., Pettett L.M., Blackall L.L., Trott D.J. & Bird P.S. 2008. Phylogenetic analysis of *Porphyromonas* species isolated from the oral cavity of Australian marsupials. *Environ. Microbiol.* 10(9):2425-2432.
- Moore W.E.C. & Moore L.V.H. 1994. The bacteria of periodontal disease. *Periodontol.* 2000 5:66-77.
- Nadkarni M.A., Browe G.V., Chhour K.L., Byun R., Nguyen K.A., Chapple C.C., Jacques N.A. & Hunter N. 2012. Pattern of distribution of *Prevotella* species/phylotypes associated with healthy gingiva and periodontal disease. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 31:2989-2999.
- Nishiyama S.A.B., Senhorinho G.N.A., Gioso M.A. & Avila-Campos M.J. 2007. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens of dogs. *Braz. J. Microbiol.* 38:23-28.
- Pandit N., Changela R., Bali D., Tikoo P. & Gugnani S. 2015. *Porphyromonas gingivalis*: Its virulence and vaccine. *J Int. Clin. Dent. Res. Organ.* 7(1):51-58.
- Pérez-Salcedo L., Laguna E., Sánchez M.C., Marín M.J., O'Connor A., González I., Sanz M. & Herrea D. 2015. Molecular identification of black-pigmented bacteria from subgingival samples of cats suffering from periodontal disease. *J. Small Anim. Pract.* 56:270-275.
- Riggio M.P., Lennon A., Taylor D.J. & Bennet D. 2011. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. *Vet. Microbiol.* 150:394-400.
- Senhorinho G.N.A., Nakano V., Liu C., Song Y., Finegold S. & Avila-Campos M.J. 2011. Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without periodontitis. *Anaerobe* 17:257-258.

- Slots J. 1979. Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 6:351-382.
- Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C. & Kent Jr R.L. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25(2):134-44.
- Socransky S.S. & Haffajee A.D. 2010. Infecções periodontais, p.197-254. In: Lindhe J., Lang N.P. & Karring T. (Eds), *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1340p.
- Takada K., Hayashi K., Sato Y. & Hirasawa M. 2010. *Prevotella dentasini* sp. nov., a black-pigmented species isolated from the oral cavity of donkeys. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 60:1637-1639.
- Tran T., Flynn M.J., Chen C. & Slots J. 1997. Absence of *Porphyromonas asaccharolytica* and *Clamidia pneumoniae* in human subgingival plaque. *Oral Microbiol. Immun.* 12(6):377-378.

**Quadro 1. Primers utilizados para identificar espécies de *Porphyromonas* e *Prevotella* na microbiota subgingival de bovinos com periodontite e em sítios de animais periodontalmente saudáveis, pela reação em cadeia de polimerase (PCR)**

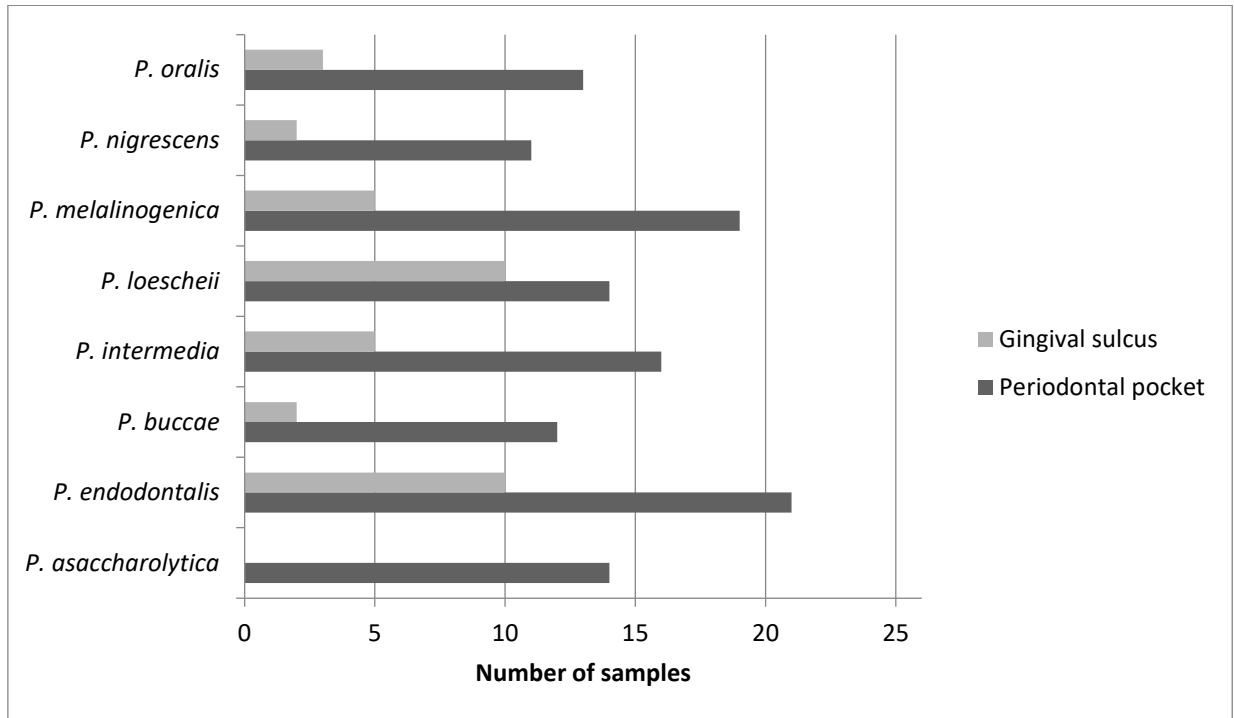
Espécies de <i>Porphyromonas/Prevotella</i>	Primers (5' - 3')	Temperatura de anelamento	Referências
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	CTC-TAG-CTA-GAG-TGT-ACT-GG ATA-GGG-TTT-ATA-GAT-TAG-CTC-TCT	60°C	Tran et al. 1997
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	GCT-GCA-GCT-CAA-CTG-TAG-TC CCG-CTT-CAT-GTC-ACC-ATG-TC	60°C	Fouad et al. 2002
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AGG-CAG-CTT-GCC-ATA-CTG-CG CTG-TTA-GCA-ACT-ACC-GAT-GT	60°C	Ashimoto et al. 1996
<i>Porphyromonas gulae</i>	TTG-CTT-GGT-TGC-ATG-ATC-GGG-CTT- ATT-CT TAC-GGT-ACA-TTC-ACA	60°C	Kato et al. 2011
<i>Prevotella buccae</i>	TCC-TCC-TTT-GAA-GGC-ATC-TGA GTT-GGG-CCG-CTG-CTT-TT	60°C	Nadkarni et al. 2012
<i>Prevotella intermedia</i>	CGT-GGA-CCA-AAG-ATT-CAT-CGG-T CTT-TAC-TCC-CCA-ACA-AAA-GCA	55°C	Ashimoto et al. 1996
<i>Prevotella loescheii</i>	TGC-CAA-CTC-CCG-ATT-TC TAC-ACC-AAG-GTT-TTC-CCC	58°C	Nadkarni et al. 2012
<i>Prevotella melaninogenica</i>	CGT-CAT-GAA-GGA-GAT-TGG ATA-GAA-CCG-TCA-ACG-CTC	59°C	Nadkarni et al. 2012
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATG-AAA-CAA-AGG-TTT-TCC-GGT-AAG CCC-ACG-TCT-CTG-TGG-GCT-GCG-A	55°C	Ashimoto et al. 1996
<i>Prevotella oralis</i>	TTC-CCA-TTA-CTA-CGG-CAT-ACC-C CCG-CCT-GCT-TAC-TGC-GTA-C	60°C	Nadkarni et al. 2012
<i>Prevotella tanneriae</i>	CTT-AGC-TTG-CTA-AGT-ATG-CCG AGC-TGA-CTT-ATA-CTC-CCG	60°C	Mayanagi et al. 2004

**Quadro 2. Espécies de *Porphyromonas* e *Prevotella* detectadas por PCR na bolsa periodontal (n=26) de bovinos com periodontite e no sulco gengival de animais periodontalmente saudáveis (n=25)**

Espécies	Bolsa periodontal n (%)	Sulco gengival n (%)	P
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	14 (53,8)	0 (0,0)	0,000003*
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	21(80,7)	10 (40,0)	0,0023*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	
<i>Porphyromonas gulae</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	
<i>Prevotella buccae</i>	12 (46,1)	2 (8,0)	0,0017*
<i>Prevotella intermedia</i>	16 (61,5)	5 (20,0)	0,0020*
<i>Prevotella loescheii</i>	14 (53,8)	10 (40,0)	0,33
<i>Prevotella melaninogenica</i>	19 (73,1)	5 (20,0)	0,00006*
<i>Prevotella nigrescens</i>	11 (42,3)	2 (8,0)	0,0042
<i>Prevotella oralis</i>	13 (50,0)	3 (12,0)	0,0028*
<i>Prevotella tanneriae</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	

\* Valores significativos de p pelo teste T de Student.

Figura 1. Prevalência de espécies de *Porphyromonas* e *Prevotella* identificadas por PCR na bolsa periodontal de bovinos com periodontite e no sulco gengival de animais considerados periodontalmente saudáveis



## CAPÍTULO 4 - MICROBIOTA BACTERIANA DA PERIODONTITE BOVINA

Ana C. Borsanelli <sup>a,\*</sup>, Elerson Gaetti-Jardim Jr.<sup>b</sup>, Christiane M. Schweitzer <sup>c</sup>, Marcello P. Riggio <sup>d</sup>, Iveraldo S. Dutra <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *School of Veterinary Medicine, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brazil.*

<sup>b</sup> *Dental School, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brazil*

<sup>c</sup> *School of Engineering, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, Brazil*

<sup>d</sup> *Dental School, University of Glasgow, Glasgow, UK*

\*Corresponding author at: Postgraduate Program in Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Clovis Pestana Street, Araçatuba, 16050-680, Brazil. Tel: +55 18 36361357

E-mail address: [carol\\_borsanelli@yahoo.com.br](mailto:carol_borsanelli@yahoo.com.br) (A.C. Borsanelli).

### RESUMO

A periodontite bovina é um processo infeccioso purulento e progressivo associado à presença de biofilme subgingival anaeróbico estrito e facultativo. Este trabalho teve por objetivo avaliar pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e com iniciadores específicos a presença de 35 espécies de periodontopatógenos na bolsa periodontal de bovinos com lesões de profundidade maior que 5 mm (n=26) e no sulco gengival de animais considerados periodontalmente sadios (n=25). Nos 26 animais com lesões periodontais, os micro-organismos mais prevalentes foram *Fusobacterium nucleatum* (96,2%), *Fusobacterium necrophorum* (80,7%), *Actinomyces naeslundii* (80,7%), *Porphyromonas endodontalis* (80,7%), *Prevotella melaninogenica* (73,1%) e *Treponema amylovorum* (73,1%). Já nos 25 bovinos sem lesões periodontais, *Fusobacterium nucleatum* (84%), *Eikenella corrodens* (72%), *Treponema amylovorum* (72%), *Treponema maltophilum* (72%) e *Fusobacterium necrophorum* (68%) foram os micro-organismos mais identificados. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces viscosus*, *Campylobacter curvus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas gulae*, *Prevotella tanneriae*, *Treponema medium*, *Treponema socranskii* e *Treponema vincentii* não foram detectados em nenhuma das amostras pesquisadas. A análise estatística indica que a ocorrência de *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecium*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Treponema denticola* e *Treponema pectinovorum* está associada com a periodontite bovina e traz uma contribuição original aos estudos sobre a etiopatogenia da enfermidade.

Palavras-chave: doença periodontal, bovinos, periodotopatógenos, anaeróbios

## 1. Introdução

A periodontite bovina é um processo infeccioso purulento e progressivo associado com a presença de biofilme subgengival anaeróbio estrito. De caráter sazonal, associada ao manejo do solo e à dieta, a doença tem variações na sua apresentação clínica, que inclui desde uma forma agressiva até manifestações crônicas. Os prejuízos econômicos são significativos; não raro até 60% dos animais são acometidos, o que se reflete em baixo desempenho do rebanho, aumento dos custos de produção e da mortalidade (Döbereiner et al., 2000).

Em humanos, a bolsa periodontal abriga uma microflora de considerável complexidade e predominantemente anaeróbia (Paster et al., 2001). Griffen et al. (2012) compararam, através do sequenciamento do gene 16S rRNA, a microbiota subgengival de pacientes com periodontite crônica e pacientes periodontalmente saudáveis, nos quais foram identificadas 123 e 53 espécies de bactérias respectivamente, e concluíram que a diversidade microbiana foi maior nos pacientes com periodontite.

Embora a microbiota subgengival seja complexa e numerosa, é relativamente pequeno o número de micro-organismos considerados potencialmente patogênicos, com evidências suficientes e reconhecidos no “Consensus Report” (Hur et al., 1996). Em estudos de associação, das aproximadamente 600 espécies de bactérias presentes no ambiente subgengival, apenas algumas espécies ou grupos restritos mostraram ser especificamente relacionadas com a doença em humanos. Nesse contexto, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, do complexo vermelho de Socransky, mostraram associação com o sangramento à sondagem, tanto individualmente quanto em grupo (Socransky et al., 1998).

Organismos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Eikenella corrodens* têm sido considerados de grande importância na patogenia da doença periodontal em humanos (Ashimoto et al., 1996; Socransky et al., 1998; Gaetti-Jardim Jr. et al., 2010) e diversas espécies animais (Mallonee et al., 1988; Love et al., 1989; McCourtie et al., 1989; Duncan et al., 2003; Nishiyama et al., 2007; Riggio et al., 2011). A forte correlação entre a presença de organismos putativos e a destruição dos tecidos periodontais foi demonstrada em diversos estudos (Ashimoto et al., 1996; Socransky et al., 1998).

A presença de micro-organismos considerados potencialmente patogênicos nas lesões periodontais de bezerros é uma constante nos cultivos em meio de cultura convencional, principalmente os *Bacteroides* pigmentados de preto, *Fusobacterium* spp. e outras bactérias anaeróbias Gram-negativas (Blobel et al., 1984; Dutra et al., 1986; Botteon et al., 1993). Por outro lado, a transferência de bovinos com periodontite de área endêmica para indene resulta na remissão clínica espontânea do processo e modificação da microbiota da bolsa periodontal, com destaque para os *Bacteroides* pigmentados de preto que têm sua presença reduzida (Dutra et al., 2000).

Um método de identificação microbiana rápido e confiável pode ser útil para associar organismos específicos com a doença periodontal. Métodos de cultivo são demorados, caros e podem apresentar falhas no crescimento de alguns micro-organismos importantes (Ashimoto et al., 1996). A PCR oferece um meio de detecção altamente sensível e específico para bactérias em amostras biológicas e é particularmente valioso na detecção de micro-organismos que não podem ser cultivados ou que não são facilmente distinguíveis no cultivo (Slots et al., 1995).

Embora alguns aspectos relacionados à patologia, bacteriologia e epidemiologia da enfermidade sejam conhecidos, a composição detalhada da microbiota associada à periodontite bovina e a sua etiopatogênese ainda necessitam ser elucidados. Nesse cenário, o presente estudo teve por objetivo detectar patógenos periodontais reconhecidos em humanos e nos animais em amostras de biofilme subgingival de bovinos com e sem periodontite pela reação em cadeia da polimerase.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1 Caracterização clínica da periodontite e colheita de material*

A condição clínica dos bovinos com idade entre 6 e 24 meses foi estabelecida após o exame da cavidade oral, observando-se em todas as etapas os critérios aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (Processo FOA nº 2013-01402). Os indicadores para a caracterização da lesão periodontal foram os observados por Döbereiner et al. (1974), e decorrentes do aspecto visível da arcada dentária, possibilitada pela contenção do animal e com o auxílio de abridor de boca e lanterna, acrescidos da sondagem para mensuração da profundidade da bolsa periodontal. Os materiais foram obtidos da bolsa periodontal em dentes incisivos ou mastigatórios de

bovinos com lesões (n=26) e do sulco gengival de animais considerados periodontalmente sadios (n=25). Do sulco gengival, a colheita foi realizada entre a porção medial palatina do segundo e terceiro pré-molar maxilar e dos animais com lesões somente daqueles cujas bolsas tinham profundidade maior que 5mm, medidas com sonda universal. Nos dois grupos as amostras foram coletadas com cone de papel estéril, de acordo com os procedimentos descritos por Gaetti-Jardim Jr. et al. (2012).

Os animais examinados foram categorizados de acordo com as seguintes características: presença ou ausência de recessão gengival e destruição dos tecidos de suporte caracterizada pela existência de bolsas periodontais, como relataram Döbereiner et al. (1974).

## 2.2. Identificação bacteriana pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção do DNA bacteriano de cada amostra em água ultrapura estéril foi realizada inicialmente pela extração do DNA por kit comercial (*GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit*, Sigma). A presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus israeli*, *Actinobacillus naeslundii*, *Actinobacillus viscosus*, *Campylobacter* spp., *Campylobacter curvus*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Dialister pneumosintes*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas gulae*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Prevotella tanneriae*, *Tannerella forsythia*, *Treponema amylovorum*, *Treponema denticola*, *Treponema maltophilum*, *Treponema medium*, *Treponema pectinovorum*, *Treponema socranskii* e *Treponema vincentii* foi avaliada com o uso de primers específicos (Gaetti-Jardim Jr et al., 2010; Gaetti-Jardim Jr et al., 2012).

As amplificações foram realizadas em volumes de 25,0 µL, contendo 11,9 µL de água para PCR, 5 µL de PCR/Mg<sup>++</sup>buffer (Boehring Mannheim, Indianapolis, IN, USA), 1,0 µL de Dntp (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 0,1 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 0,2 µL de cada par de primer (Invitrogen do Brasil) e 5,0 µL da amostra. A amplificação foi realizada em aparelho

de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700, Norwalk, CT, USA) programado para 1 ciclo de 94°C (5 min.), de 30 a 36 ciclos de 94°C (1 min.); temperatura de anelamento de cada iniciador por um tempo que variou de 30 segundos a 1 min., 72°C por 2 min. e 1 ciclo de 72°C (5 min.), para a extensão final da cadeia de DNA. Os produtos da amplificação pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL). Como controle positivo foram usados amostras de DNA de cepas de referências (Gaetti-Jardim Jr et al., 2012).

### 2.3. Análise estatística

Os dados foram plotados e analisados por meio do software SPSS. As inter-relações entre os parâmetros clínicos e microbiológicos foram realizadas pelo teste T de Student e pelo teste de correlação de Spearman. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se a correção de Bonferroni, com o valor de *p* ajustado de 0,05 a 0,000003, devido à detecção de 35 espécies microbianas.

## 3. Resultados

Os micro-organismos mais prevalentes nos 26 animais com lesões periodontais foram *F. nucleatum* (96,2%), *F. necrophorum* (80,7%), *A. naeslundii* (80,7%), *P. endodontalis* (80,7%), *P. melaninogenica* (73,1%) e *T. amylovorum* (73,1%). Já nos 25 bovinos sem lesões periodontais, *F. nucleatum* (84%), *E. corrodens* (72%), *T. amylovorum* (72%), *T. maltophilum* (72%) e *F. necrophorum* (68%) foram os micro-organismos mais detectados (Tabela 1).

*A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *C. curvus*, *C. ochracea*, *C. sputigena*, *Enterobacteriaceae*, *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *P. gulae*, *P. tanneriae*, *T. medium*, *T. socranskii* e *T. vincentii* não foram detectados em nenhuma das amostras pesquisadas.

A análise estatística possibilitou verificar que a ocorrência de *A. naeslundii*, *E. faecium*, *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. buccae*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. oralis*, *T. denticola* e *T. pectinovorum* está associada com a periodontite bovina (Tabela 1). Os mesmos resultados foram obtidos pelo teste de correlação de Spearman.

A análise da frequência de detecção dos diferentes micro-organismos estudados sugere associações entre os membros do biofilme subgengival. Nesse sentido, *F. necrophorum* parece ter co-ocorrência com *E. corrodens* (índice de correlação - IC=0,43) e *P. endodontalis* (IC=0,45), enquanto *F. nucleatum* estabelece associações com *P. loescheii* (IC=0,29). Associações entre as diferentes espécies de pigmentados de preto também foram detectadas, merecendo destaque entre *P. asaccharolytica* e *P. buccae* (IC=0,50), *P. endodontalis* e *P. melaninogenica* (IC=0,44), *P. nigrescens* e *P. loescheii* (IC=0,40), *P. buccae* e *P. oralis* (IC=0,45), embora correlações positivas também tenham sido observadas entre outros anaeróbios avaliados (Tabela 2).

#### 4. Discussão

No presente estudo, foi possível identificar que a ocorrência de *A. naeslundii*, *E. faecium*, *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. buccae*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. oralis*, *T. denticola* e *T. pectinovorum* está associada com a periodontite bovina.

A periodontite bovina ocorre em condições epidemiológicas específicas e está associada predominantemente à presença de microbiota bacteriana anaeróbia no biofilme subgengival, em especial pelos *Bacteroides* pigmentados de preto, *Fusobacterium nucleatum*, *Corynebacterium pyogenes* e *Actinomyces israelii* (Döbereiner et al., 2000; Dutra et al., 2000). Apesar de poucos dados sobre os aspectos microbiológicos dessa enfermidade, observou-se, por cultura em ágar sangue, que espécies produtoras de pigmento preto representavam cerca de 80% da microbiota subgengival de bezerros com a doença (Botteon et al., 1993; Dutra et al., 2000), embora a distribuição das diferentes espécies ainda não tenha sido amplamente avaliada.

A cavidade oral abriga uma população microbiana complexa, diversa e abundante que possui um papel crítico na saúde e na doença. Dewhirst et al. (2010) identificaram, através do sequenciamento do 16S rRNA, 1.179 sequências em amostras de biofilme subgengival de pacientes com periodontite e periodontalmente saudáveis. Spirochaetes, Synergistetes e Bacteroidetes foram os filos mais abundantes em pacientes humanos

com periodontite, enquanto o filo Proteobacteria foi encontrado em maior nível em pacientes sadios (Griffen et al., 2012).

Kennedy et al. (2016) identificaram 1.308 unidades taxonômicas operacionais no microbioma oral de equinos. Os gêneros *Gemella* e *Actinobacillus* foram os mais abundantes nas amostras de animais periodontalmente sadios, enquanto no grupo de animais com periodontite predominaram os gêneros *Prevotella* e *Veillonella*. Em cães periodontalmente sadios, Dewhirst et al. (2012) identificaram 353 taxa microbianas, que foram divididas em 14 filos, 23 classes, 37 ordens e 148 gêneros. Sturgeon et al. (2014) identificaram 10.177 unidades taxonômicas operacionais no microbioma oral de gatos sadios, representando 18 filos, dos quais os mais prevalentes foram Proteobacteria (75,2%), Bacteroidetes (9,3%), Firmicutes (6,7%), Spirochaetes (1,8%), Fusobacteria (1,3%) e Actinobacteria (0,6%). Dentre os gêneros, destacaram-se: *Moraxella* (10,9%), *Thermomonas* (6,9%), *Neisseria* (4,9%) e *Pasteurella* (4,3%).

Diferentes patógenos como *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola* já foram identificados em casos de periodontite, gengivite e osteomielite em humanos (Ashimoto et al., 1996; Mayanagi et al., 2004; Feng e Weinberg, 2006; Gaetti-Jardim Jr. et al., 2010). Se por um lado muito é investigado a respeito da microbiota anaeróbia humana, poucos estudos foram realizados em relação à sua composição em ruminantes.

Duncan et al. (2003) constataram que *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* e *P. intermedia* estão presentes nas lesões de ovinos com periodontite. *Treponema amylovorum*, *T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. medium* e *T. pectinovorum* foram detectados na bolsa periodontal de ovinos (Borsanelli et al., 2016). Riggio et al. (2013) identificaram 24 filotipos diferentes na bolsa periodontal de ovinos com 'broken mouth', e os mais prevalentes foram *Mannheimia ruminalis* e *Moraxella caprae*.

Em caprinos, alguns periodontopatógenos como *T. forsythia*, *C. rectus*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* já foram identificados em animais com periodontite no Japão (Suzuki et al., 2006).

A tríade bacteriana que compõe o complexo vermelho: *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* têm sido tradicionalmente considerados os principais periodontopatógenos envolvidos na etiologia das periodontites, com base nos seus

fatores de virulência e forte associação com sítios doentes (Hajishengallis, 2014). No presente estudo, *T. forsythia* e *T. denticola* foram identificadas respectivamente, em 16 e 11 bovinos com lesões periodontais, e *P. gingivalis* não foi identificada em nenhum animal. No entanto, na análise estatística apenas *T. denticola* mostrou forte associação com a periodontite. A presença deste microrganismo é frequentemente associada com o aumento na severidade da periodontite em humanos e cães. Em estudos quantitativos sobre a microflora oral humana, *T. denticola* quando prevalente e em altos níveis na periodontite severa, desempenha um papel importante na progressão da doença (Fenno e McBride, 1998).

Dentre os pigmentados de preto avaliados neste estudo, *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. buccae*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens* e *P. oralis* mostraram associação com a periodontite bovina. *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. melaninogenica* já foram isolados de sítios periodontalmente sadios, e suas populações e ocorrências são significativamente maiores em pacientes e sítios periodontais apresentando perda de inserção conjuntiva (Darout, 2014; Dahlén et al., 2014; Amaliya et al., 2015). *P. oralis* é associada com a doença periodontal e bolsas periodontais profundas (Nadkarni et al., 2012). Em cães, *Prevotella buccae* é significativamente mais frequente em sítios com periodontite do que em sadios (Forsblom et al., 1997).

*P. endodontalis*, também um importante patógeno periodontal, dificilmente cresce em meio de cultura e por isso raramente é reportado em estudos baseados em cultivo, mas é um micro-organismo frequentemente associado com a periodontite humana (Lillo et al., 2004). Já *P. asaccharolytica* é relatada como um micro-organismo que não é capaz de colonizar bolsas periodontais (Haffajee e Socransky, 1994). No entanto, no presente estudo os dois micro-organismos mostraram uma clara associação com a periodontite bovina.

*A. naeslundii*, *T. pectinovorum* e *E. faecium* também revelaram associação com a enfermidade. Actinomycetes são frequentemente isolados de infecções orais e já foram identificados em ovinos com “broken-mouth” (McCourtie et al., 1989). *A. naeslundii* já foi identificado em casos de osteomielite em humanos (Gaetti-Jardim Jr. et al., 2010) e em macacos com periodontite (Gaetti-Jardim Jr. et al., 2012). *T. pectinovorum* foi detectado em pacientes com periodontite (Willis et al., 1999) e em

maiores proporções em cães com periodontite do que em animais sadios (Riviere et al., 1996). Em humanos, a detecção de bactérias entéricas em bolsas periodontais parece ser inversamente proporcional à presença de periodontopatógenos anaeróbios (Botero et al., 2007). No entanto, esse fenômeno não foi observado no presente estudo, e *E. faecium* mostrou associação com as lesões periodontais bovinas.

Inter-relações simbióticas, antagonistas e comensais provavelmente ocorrem entre os vários micro-organismos habitantes das bolsas periodontais e possuem um papel importante na determinação da composição microbiana subgengival do biofilme e do status clínico periodontal. Investigações prévias das interações microbianas por cultivo na periodontite humana eram limitadas pelo pequeno número de pacientes e micro-organismos estudados (Rams et al., 1997).

A análise da frequência de detecção dos diferentes micro-organismos estudados sugere associações entre os membros do biofilme subgengival de bovinos. Nesse sentido, *F. necrophorum* parece ter co-ocorrência com *E. corrodens* (índice de correlação - IC=0,43) e *P. endodontalis* (IC=0,45), enquanto *F. nucleatum* estabelece associações com *P. loescheii* (IC=0,29). Associações entre as diferentes espécies de pigmentados de preto também foram observadas, merecendo destaque *P. asaccharolytica* e *P. buccae* (IC=0,50), *P. endodontalis* e *P. melaninogenica* (IC=0,44), *P. nigrescens* e *P. loescheii* (IC=0,40), *P. buccae* e *P. oralis* (IC=0,45), embora correlações positivas tenham sido encontradas entre outros anaeróbios estudados (Tabela 2). Assim, os resultados contribuem significativamente para o entendimento de algumas das complexas inter-relações ecológicas que ocorrem entre os micro-organismos habitantes das bolsas periodontais em bovinos.

Com base no conhecimento atual é possível inferir que há semelhanças nas espécies de bactérias que atuam nas periodontites, tanto em humanos quanto em cães, gatos e ovinos. Da mesma forma, existem diferenças na composição da microbiota entre as espécies animais e nas diversas apresentações clínicas e situações epidemiológicas das periodontites.

No entanto, no que diz respeito à identificação das espécies de bactérias que participam do processo em bovinos, pouco se conhece sobre quais são as bactérias associadas ao problema. Isso se deve ao fato de a periodontite bovina ser um problema sanitário não linear, que revela complexidades peculiares, pois não é prática

usual no meio produtivo realizar o exame clínico da cavidade oral dos animais, são poucos os trabalhos científicos na área e os estudos bacteriológicos existentes foram realizados sem o emprego das ferramentas e do conhecimento atual.

Por meio da PCR foi possível estabelecer que *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecium*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Treponema denticola* e *Treponema pectinovorum* estão associados à periodontite bovina crônica. Assim, os resultados originais aqui apresentados contribuem de forma substancial na construção de um dos fundamentos do postulado de Socransky, que são a base para se estabelecer a relação causal nas doenças periodontais e no desenvolvimento de medidas de controle e profilaxia da doença.

## Referências

- Amaliya, A., Laine, M.L., Delanghe, J.R., Loos, B.G., Van Wijk, A.J., Van der Velden, U., 2015. Java project on periodontal diseases: periodontal bone loss in relation to environmental and systemic conditions. *J. Clin. Periodontol.* 42, 325-332.
- Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I., Slots, J., 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 11, 266-273.
- Blobel, H., Döbereiner, J., Lima, F.G.F., Rosa, I.V., 1984. Bacterial isolations from “cara inchada” lesions of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2), 73-77.
- Borsanelli, A.C., Ramos, T.N.M., Gaetto-Jardim Jr., E., Schweitzer, C.M., Dutra, I.S. 2016. *Treponema* species in the subgingival microflora of ovine periodontitis. *Veterinary Record*, <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/early/2016/11/17/vr.103946>.
- Botero, J.E., Escudero, M., Arce, R.M., Betancourth, M., Jaramillo, A., Contreras, A., 2007. Frequency of detection of periodontopathic and superinfecting bacteria in HIV-positive patients with periodontitis. *J. Int. Acad. Periodontol.* 9, 13-18.
- Botteon, R.M., Dutra, I.S., Döbereiner, J., Blobel, H. 1993. Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 13(3/4), 51-55.
- Dahlén, G., Claesson, R., Aberg, C.H., Haubek, D., Johansson, A., Kwamin, F., 2014. Subgingival bacteria in Ghanaian adolescents with or without progression of attachments loss. *J. Oral Microbiol.* 6, 1-6.
- Darout, IA., 2014. Oral bacterial interactions in periodontal health and disease. *J. Dent. Oral Hyg.* 6(5), 51-57.

- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., 2010. The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* 192(19):5002-5017.
- Dewhirst, F.E., Klein, E.A., Thompson, E.C., Chen, T., Milella, L., Buckley, C.M.F., Davis, I.A., Bennett, M.L., Marshall-Jones, Z.V., 2012. The canine oral microbiome. *Plos One.* 6(4), 1-12.
- Dewhirst, F.E., Klein, E.A., Bennett, M.L., Croft, J.M., Harris, S.J., Marshall-Jones, Z.V., 2015. The feline oral microbiome: a provisional 16S rRNA genes based taxonomy with full-length reference sequences. *Vet. Microbiol.* 175, 294-303.
- Döbereiner, J., Dutra, I.S., Rosa, I.V., Blobel, H., 2000. Cara inchada of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependant periodontitis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2), 47-64.
- Döbereiner, J., Inada, T., Tokarnia, C.H., 1974. "Cara inchada", doença peridentária em bovinos. *Pesq. Agrop. Bras.* 9, 63-85.
- Duncan, W.J., Persson, G.R., Sims, T.J., Braham, P., Pack, A.R.C., Page, R.C., 2003. Ovine periodontitis as a potential model for periodontal studies. *J. Clin. Periodontol.* 30, 63-72.
- Dutra, I.S., Botteon, R.C.M., Döbereiner, J., 2000. Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da "cara inchada" em bezerros transferidos para área indene. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2), 71-74.
- Dutra, I.S., Kanoe, M., Blobel, H., 1986. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 6(2), 59-63.
- Feng, Z., Weinberg, A., 2006. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol.* 2000. 40, 50-76.
- Fenno, J.C., McBride, B.C., 1998. Virulence factors of oral treponemes. *Anaerobe* 4, 1-17.
- Forsblom, B., Love, D.N., Sarkiala-Kessel, E., Jousimies-Somer, H., 1997. Characterization of anaerobic, gram negative, nonpigmented, saccharolytic rods from subgingival sites in dogs. *Clin. Infect. Dis.* 25(suppl 2), S100-S106.
- Gaetti-Jardim Jr, E., Fardin, A.C., Gaetti-Jardim, E.C., Castro, A.L., Schweitzer, C.M., Avila-Campos, M.J., 2010. Microbiota associated with chronic osteolyelitis of the jaws. *Braz. J. Microbiol.* 41, 1056-1064.
- Gaetti-Jardim Jr, E., Monti, L.M., Ciesielski, F.I.N., Gaetti-Jardim, E.C., Okamoto, A.C., Schweitzer, C.M., Avila-Campos, M.J., 2012. Subgingival microbiota from *Cebus paella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions. *Anaerobe* 18, 263-269.
- Griffen, A.L., Beall, C.J., Campbell, J.H., Firestone, N.D., 2012. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME. J.* 6, 1176-1185.

Haffajee, A.D., Socransky, S.S., 1994. Microbiology and immunology of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5, 78-111.

Hajishengallis, G., 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 35(1), 3-11.

Hur, Y., Choi, S.K., Ogata, Y., Stark, P.C., Levi, P.A., Haririan, H., Moritz, A., 1996. Consensus report periodontal diseases: pathogenesis. *Ann. Periodontol.* 1(1), 926-032.

Kennedy, R., Lappin, D.F., Dixon, P.M., Buijs, M.J., Zaura, E., Crielaard, W., O'Donnell, L., Bennett, D., Brandt, B.W., Riggio, M.P., 2016. The microbiome associated with equine periodontitis and oral health. *Vet. Res.* 47, 49- 57.

Lillo, A., Booth, V., Kyriacou, L., Weightman, A.J., Wade, W.G., 2004 Culture-independent identification of periodontitis associated *Porphyromonas* and *Tannerella* populations by targeted molecular analysis. *J. Clin. Microbiol.* 42(12), 5523-5527

Love, D.N., Johson, J.L., Moore, L.V., 1989. Bacteroides species from the oral cavity and oral-associated diseases of cats. *Vet. Microbiol.* 19, 275-281.

Mallonee, D.H., Harvey, C.E., Venner, M., Hammond, B.F., 1988. Bacteriology of periodontal disease in the cat. *Arch. Oral Biol.* 33, 677-683.

Mayanagi, G., Sato, T., Shimauchi, H., Takahashi, N., 2004. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol. Immun.* 19, 379-385.

McCourtie, J., Poxton, I.R., Spence, J.A., Aitchison, G.U., 1989. Preliminary study of the anaerobic bacteria isolated from subgingival plaque from sheep. *Vet. Microbiol.* 21, 139-146.

Nadkarni, M.A., Browe, G.V., Chhour, K.L., Byun, R., Nguyen, K.A., Chapple, C.C., Jacques, N.A., Hunter, N., 2012. Pattern of distribution of *Prevotella* species/phylotypes associated with healthy gingiva and periodontal disease. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 31, 2989-2999.

Nishiyama, S.A.B., Senhorinho, G.N.A., Gioso, M.A., Avila-Campos, M.J., 2007. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens of dogs. *Brazilian J. Microbiol.* 38, 23-28.

Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A., Dewhirst, F.E., 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 183, 3770-3783.

Rams, T.E., Flynn, M.J., Slots, J., 1997. Subgingival microbial associations in severe human periodontitis. *Clin. Infect. Dis.* 25(suppl2), S224-S226.

- Riggio, M.P., Lennon, A., Taylor, D.J, Bennett, D. 2011. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. *Vet. Microbiol.* 150, 394-400.
- Riggio, P. M., Jonsson, N., Bennett, D., 2013. Culture-independent identification of bacteria associated with ovine 'broken mouth' periodontitis. *Vet. Microbiol.* 166, 664-669.
- Riviere, G.R., Thompson, A.J., Brannan, R.D., McCoy, D.E., Simonson, L.G., 1996. Detection of pathogen-related oral spirochetes, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii* in dental plaque from dogs. *J. Vet. Dent.* 13, 135-138.
- Slots, J., Ashimoto, A., Flynn, M.J., Li, G., Chen, C., 1995. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis.* 20(supl 2), S304-S307.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., Kent Jr., R.L., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25, 134-144.
- Sturgeon, A., Pinder, S.L., Costa, M.C., Weese, J.S., 2014. Characterization of the oral microbiota of healthy cats using next-generation sequencing. *Vet. J.* 201, 223-229.
- Suzuki, S., Mitani, A., Koyasu, K., Oda, S.I., Yoshinari, N., Fukuda, M., Hanamura, H., Nakagaki, H., Noguchi, T., 2006. A Model of Spontaneous Periodontitis in the Miniature Goat. *J. Periodontol.* 77(5), 847-855.
- Willis, S.G., Smith, K.S., Dunn, V.L., Gapter, L.A., Riviere, K.H., Riviere, G.R., 1999. Identification of seven *Treponema* species in health and disease-associated dental plaque by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37(3), 867-869.

**Tabela 1**

Espécies de 35 bactérias detectadas em amostras de lesões periodontais de bovinos com periodontite (n=26) e do sulco subgengival de animais periodontalmente sadios (n=25) pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Espécie	Lesões periodontais (n=26) n (%)	Sítios sadios (n=25) N (%)	p
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0	0	
<i>Actinomyces israelii</i>	5 (19,2)	4 (16)	0,7678
<i>Actinomyces naeslundii</i>	21 (80,7)	8 (32)	0,0002*
<i>Actinomyces viscosus</i>	0	0	
<i>Campylobacter</i> spp.	3 (11,5)	0	0,0082
<i>Campylobacter curvus</i>	0	0	
<i>Campylobacter rectus</i>	2 (7,7)	0	0,1634
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0	0	
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0	0	
<i>Dialister pneumosintes</i>	5 (19,2)	7 (28)	0,4704
<i>Eikenella corrodens</i>	14 (53,4)	18 (72)	0,1871
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	
Enterobacteriaceae	0	0	
<i>Enterococcus faecium</i>	5 (19,2)	0	0,0206*
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	21 (80,7)	17 (68)	0,3050
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	25 (96,2)	21 (84)	0,1503
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	14 (53,8)	0	0,000003*
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	21 (80,7)	10 (40)	0,002306*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	0	
<i>Porphyromonas gulae</i>	0	0	
<i>Prevotella buccae</i>	12 (46,1)	2 (8)	0,004277*
<i>Prevotella intermedia</i>	16 (61,5)	5 (20)	0,00204*
<i>Prevotella loescheii</i>	14 (53,8)	10 (40)	0,119970
<i>Prevotella melaninogenica</i>	19 (73,1)	5 (20)	0,00006*
<i>Prevotella nigrescens</i>	11 (42,3)	2 (8)	0,00427*
<i>Prevotella oralis</i>	13 (50)	3 (12)	0,00934*
<i>Prevotella tanneriae</i>	0	0	
<i>Tannerella forsythia</i>	16 (61,5)	10 (40)	0,12904
<i>Treponema amylovorum</i>	19 (73,1)	18 (72)	0,93304
<i>Treponema denticola</i>	11 (42,3)	2 (8)	0,00427*
<i>Treponema maltophilum</i>	14 (53,8)	8 (32)	0,11997
<i>Treponema medium</i>	0	0	
<i>Treponema pectinovorum</i>	16 (61,5)	2 (8)	0,00001*
<i>Treponema socranskii</i>	0	0	
<i>Treponema vincentii</i>	0	0	

**Tabela 2**

Índice de correlação entre micro-organismos identificados no biofilme subgingival de bovinos com periodontite e animais periodontalmente sadios obtido pelo teste de correlação de Spearman

Micro-organismos	<i>P. asaccharolytica</i>	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. buccae</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>P. nigrescens</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>T. denticola</i>	<i>T. pectinovorum</i>
<i>A. naeslundii</i>	0,45	-	0,33	-	-	0,33	-	0,39
<i>Campylobacter spp.</i>	0,41	-	0,43	0,30	-	-	0,43	0,34
<i>C. rectus</i>	0,33	-	0,35	-	-	-	0,35	-
<i>E. faecium</i>	0,39	-	-	-	-	-	-	0,31
<i>P. endodontalis</i>	-	-	-	0,35	0,29	0,34	0,38	0,34
<i>P. buccae</i>	0,50	-	-	-	0,28	-	0,28	-
<i>P. intermedia</i>	-	0,35	-	-	0,33	-	-	0,38
<i>P. loescheii</i>	-	0,29	0,31	-	0,40	-	-	-
<i>P. melaninogenica</i>	0,30	0,44	0,35	0,41	-	0,30	-	0,5
<i>P. nigrescens</i>	-	0,29	0,28	0,33	-	0,30	0,28	0,5
<i>P. oralis</i>	0,40	-	0,45	-	0,35	0,44	-	0,5
<i>T. forsythia</i>	-	0,34	-	-	0,30	-	-	0,31
<i>T. denticola</i>	-	-	0,28	-	0,28	0,39	0,39	0,42
<i>T. maltophilum</i>	-	0,29	-	-	-	-	-	0,35
<i>T. pectinovorum</i>	0,31	0,34	-	0,38	0,5	0,31	0,42	-

## **CAPÍTULO 5 - Lesões periodontais em bovinos abatidos no oeste da Escócia**

A. C. Borsanelli<sup>a</sup>, L. Viora<sup>b</sup>, D. F. Lappin<sup>c</sup>, D. Bennett<sup>c</sup>, G. King<sup>b</sup>, I. S. Dutra<sup>d</sup>, M. P. Riggio<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brazil.*

<sup>b</sup> *School of Veterinary Medicine, University of Glasgow, UK*

<sup>c</sup> *Dental School, University of Glasgow, Glasgow, UK*

<sup>d</sup> *School of Veterinary Medicine, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brazil.*

\*Corresponding author at: Postgraduate Program in Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Clovis Pestana Street, Araçatuba, 16050-680, Brazil. Tel: +55 18 36361357

E-mail address: [carol\\_borsanelli@yahoo.com.br](mailto:carol_borsanelli@yahoo.com.br) (A.C. Borsanelli).

### **Short communication**

A periodontite é uma infecção multifatorial provocada por um complexo de espécies bacterianas que interagem com os tecidos e as células do hospedeiro e causam a liberação de uma ampla gama mediadores inflamatórios, alguns dos quais levam à destruição das estruturas periodontais, incluindo os tecidos de suporte do dente, o osso alveolar e o ligamento periodontal (Holt e Ebersole 2005). Embora os bovinos tenham uma importância econômica mundial na indústria de carne e leite, sua dentição não foi tão profundamente investigada como em outras espécies. Bovinos são difiodontes e hipsodontes e a sua dentição permanente possui 32 dentes. Os incisivos permanentes entram em erupção sequencialmente entre 1,5 e 4 anos de idade. Todos os pré-molares permanentes e o segundo e terceiro molares entram em erupção entre 1 e 3 anos de idade (Page e Schroeder 1982).

A doença periodontal tem sido negligenciada por veterinários e cientistas. No Brasil, a doença periodontal foi descrita em bovinos mantidos em áreas onde o pasto foi recentemente formado ou reformado nos biomas Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Amazônia (Döbereiner e outros 2000). A doença é caracterizada por uma periodontite purulenta e progressiva, com formação de bolsa periodontal, desenvolvimento de periostite ossificante crônica e em alguns casos doenças sistêmicas. A raiz do dente se torna exposta, com eventual perda do dente (Döbereiner e outros 1974). No Reino Unido, os estudos sobre o assunto são escassos. De 501 cabeças de bovinos examinadas em um abatedouro, apenas 15 (3%) tinham lesões periodontais (Ingham 2001). Uma investigação recente conduzida na Universidade de Edimburgo, Reino Unido, revelou diversos problemas dentários em 11 vacas de leite descartadas, o que

incluía periodontite (dentes deslocados e soltos), envolvendo principalmente os dentes mastigatórios (Dr. Susan Kempson, comunicação pessoal). Apesar do tamanho da amostra nesse estudo concluiu-se que o afrouxamento dos dentes era resultado do estágio final da periodontite e sem dúvida uma causa de dor significativa e sofrimento aos animais acometidos.

O objetivo do presente estudo foi conduzir uma avaliação preliminar da presença de lesões periodontais em animais abatidos em um abatedouro local, de setembro a novembro de 2015. Duzentas cabeças completas foram examinadas e o critério para diagnóstico da periodontite foi a presença de recessão gengival (isto é, a raiz do dente era visível na gengiva marginal) e a existência de bolsas periodontais (a distância da gengiva marginal até a base da bolsa periodontal, mensurada com uma sonda periodontal universal) com profundidade superior a 5 mm. A sonda era inserida na base da bolsa periodontal, aplicando-se pouca força, e movida gentilmente ao redor da superfície do dente e a profundidade da bolsa medida.

Das 200 cabeças, 24 (12%) possuíam lesões periodontais. Apesar de o nível de inserção da margem gengival não ter sido precisamente registrado, a distância da junção cimento-esmalte até a base da bolsa periodontal excedeu 5 mm. Além do mais, as bolsas profundas não pareceram ser acompanhadas de hiperplasia gengival. Os animais tinham idade entre 18 e 197 meses; as principais raças foram Holstein-Friesian, Aberdeen Angus e Limousin. Apesar de não ser objetivo do trabalho avaliar a prevalência em diferentes sistemas de produção, dos 24 animais sete eram de aptidão leiteira e 17 de corte.

Na tabela 1 observa-se a prevalência de lesões periodontais em dentes incisivos e mastigatórios. O número de bolsas periodontais variou de 2 a 9 lesões por animal. Bolsas periodontais foram mais prevalentes entre o terceiro pré-molar e o primeiro molar mandibular (58,3%), no terceiro pré-molar maxilar (50%), entre o terceiro pré-molar e o primeiro molar maxilar (45,8%), no primeiro incisivo (41,7%) e no primeiro molar maxilar (37,5%). Lesões periodontais representativas observadas nos sítios dentários podem ser observadas na Figura 1.

A periodontite bovina ocorre em condições epidemiológicas específicas e é associada com a presença de microbiota bacteriana anaeróbia (Döbereiner e outros 2000, Borsanelli e outros 2015a, Borsanelli e outros 2015b), como previamente

relatado na periodontite ovina (Friskén e outros 1989, Ismael e outros 1989, McCourtie e outros 1990, Riggio e outros 2013) e equina (Kennedy e outros 2016). No presente estudo, houve predominância de lesões nos dentes mastigatórios, com animais mais velhos apresentando frequência maior de lesões. Em humanos, o conceito de periodontite como consequência inevitável da idade tem sido questionado e provavelmente representa o efeito cumulativo da exposição prolongada aos verdadeiros fatores de risco (Papapanou e outros 1991).

Embora o universo amostral do presente estudo seja limitado e inexistam critérios para levantamentos epidemiológicos dessa natureza em animais, os resultados revelam a necessidade de considerar a variável doença periodontal no contexto do bem-estar e da produção animal. Por outro lado, a possibilidade de levantamentos epidemiológicos em abatedouros apresenta-se como uma ferramenta mais próxima da real prevalência de doença periodontal nos rebanhos do que a percepção comum de que o problema inexistente ou não tem significado nas populações de ruminantes. É provável que a periodontite bovina tenha impacto no bem-estar dos animais afetados, já que pode ser uma condição crônica dolorosa que leva a dificuldade de alimentação com consequente perda de condição corporal e peso, aumento da suscetibilidade a doenças e produtividade reduzida. A dor oral pode ter apenas efeitos sutis no comportamento dos bovinos, e assim a doença dental é facilmente ignorada ou não notada.

Os dados deste estudo sugerem que a periodontite pode ser a causa de perda financeira e uma razão para descarte de animais. Do ponto de vista veterinário, o exame dos dentes de bovinos é uma parte essencial de qualquer investigação clínica, seja para estimar idade, seja como possível causa de baixa produtividade. Dentes funcionais são essenciais para a saúde bovina e a otimização da produtividade. Doenças dentárias devem sempre ser consideradas com sinais clínicos como perda de peso ou reduzido ganho de peso, salivação ou perda de conteúdo ruminal e impactação de alimento na bochecha.

Não foi possível determinar por que os animais do estudo foram enviados para o abate, alguns eram animais terminados e outros animais descartados por baixa performance. Este é o primeiro estudo a demonstrar que a periodontite não é incomum

em bovinos abatidos no oeste da Escócia e é claramente um problema de bovinos negligenciado até o momento.

**TABELA 1. Localização das lesões periodontais em 24 dos 200 bovinos abatidos no oeste da Escócia**

Dentes		Lesões maxilares N (%)	Lesões bilaterais N (%)	Lesões mandibulares N (%)	Lesões bilaterais N (%)
<b>Incisivos</b>	Primeiro incisivo	--	--	10 (41,7%)	8 (33,3%)
	Segundo incisivo	--	--	8 (33,3%)	5 (20,8%)
	Terceiro incisivo	--	--	5 (20,8%)	2 (8,3%)
	Quarto incisivo	--	--	1 (4,2%)	1 (4,2%)
<b>Pré-molares e molares*</b>	PM1	0	0	0	0
	PM1/PM2	1 (4,2%)	0	2 (8,3%)	0
	PM2	4 (16,7%)	0	4 (16,7%)	1 (4,2%)
	PM2/PM3	4 (16,7%)	0	5 (20,8%)	1 (4,2%)
	PM3	12 (50%)	4 (16,7%)	2 (8,3%)	0
	PM3/M1	11 (45,8%)	3 (12,5%)	14 (58,3%)	7 (29,2%)
	M1	9 (37,5%)	3 (12,5%)	3 (12,5%)	1 (4,2%)
	M1/M2	6 (25%)	2 (8,3%)	3 (12,5%)	0
	M2	4 (16,7%)	2 (8,3%)	2 (8,3%)	0
	M2/M3	1 (4,2%)	0	0	0
	M3	0	0	0	0

\*PM1, primeiro pré-molar; PM2, segundo pré-molar; PM3, terceiro pré-molar; M1, primeiro molar; M2, segundo molar; M3, terceiro molar.

Número de bolsas periodontais por animal: 2 lesões (4 animais); 3 lesões (4 animais); 4 lesões (5 animais); 5 lesões (2 animais); 6 lesões (5 animais); 7 lesões (3 animais); 9 lesões (1 animal).

**TABELA 2. Descrição das raças, sexo e idade dos animais selecionados para o estudo**

Animal	Raça	Corte/Leite	Sexo	Idade (meses)
1	Shorthorn	Corte	F	108
2	Shorthorn	Corte	F	128
3	Shorthorn	Corte	F	96
4	Shorthorn	Corte	F	120
5	Holstein Friesian	Leite	F	78
6	Limousin	Corte	F	72
7	Limousin	Corte	F	65
8	Aberdeen Angus	Corte	F	124
9	Aberdeen Angus	Corte	F	22
10	Limousin	Corte	M	18
11	British Blue	Corte	F	27
12	Hosltein Friesian	Leite	F	117
13	Holstein Friesian	Leite	F	29
14	British Friesian	Leite	F	114
15	Aberdeen Angus	Corte	F	18
16	Belted Galloway	Corte	M	30
17	Beef Shorthorn	Corte	M	29
18	Limousin	Corte	F	138
19	Bealgian Blue	Corte	F	108
20	Limousin	Corte	F	149
21	Holstein Friesian	Leite	F	117
22	Holstein Friesian	Leite	F	135
23	Holstein Friesian	Leite	F	130
24	Aberdeen Angus	Corte	F	197



Figura 1. A: Presença de recessão gengival com exposição de raiz e bolsa periodontal com profundidade superior a 10 mm entre o terceiro pré-molar e o primeiro molar maxilares em uma fêmea Aberdeen Angus de 2 anos de idade. B: Presença de recessão gengival com exposição de furca e bolsa periodontal com profundidade superior a 10 mm no segundo molar maxilar esquerdo em uma fêmea Holstein Friesian de 11 anos.

## Referências

- BORSANELLI, A. C., GAETTI-JARDIM JR, E., DÖBEREINER, J. & DUTRA, I. S. (2015a) *Treponema denticola* in microflora of bovine periodontitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **35**, 237–240.
- BORSANELLI, A. C., GAETTI-JARDIM JR, E., SCHWEITZER, C. M., DÖBEREINER, J. & DUTRA, I. S. (2015b) Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **35**, 829–834.
- DÖBEREINER, J., INADA, T. & TOKARNIA, C.H. (1974) “Cara inchada”, doença peridentária em bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **9**, 63–85.
- DÖBEREINER, J., DUTRA, I. S., ROSA, I. V. & BLOBEL, H. (2000) “Cara inchada” of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependent periodontitis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **20**, 47–64.
- FRISKEN, K. W., LAWS, A. J., TAGG, J. R. & ORR, M. B. (1989) Environmental influences on the progression of clinical and microbiological parameters of sheep periodontal disease. *Research in Veterinary Science* **46**, 147–152.
- HOLT, S. C. & EBERSOLE, J. L. (2005) *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the ‘red complex’, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000* **38**, 72–122.
- INGHAM, B. (2001) Abattoir survey of dental defects in cull cows. *Veterinary Record* **148**, 739–742.
- ISMAIEL, M. O., GREENMAN, J., MORGAN, K., GLOVER, M. G., REES, A. S. & SCULLY, C. (1989) Periodontitis in sheep: a model for human periodontal disease. *Journal of Periodontology* **60**, 279–284.
- KENNEDY, R., LAPPIN, D. F., DIXON, P. M., BUIJS, M. J., ZAURA, E., CRIELAARD, W., O’DONNELL, L., BENNETT, D., BRANDT, B. W. & RIGGIO, M. P. (2016) The microbiome associated with equine periodontitis and oral health. *Veterinary Research* **47**, 49.
- MCCOURTIE, J., POXTON, I. R., BROWN, R., WHITTAKER, C. R., SPENCE, J. A. & AITCHISON, G. U. (1990) A longitudinal study of the cultivable subgingival anaerobic bacteria isolated from sheep during the development of broken mouth periodontitis. *Journal of Medical Microbiology* **31**, 275–283.
- PAGE, R. C. & SCHROEDER, H. E. (1982). Periodontitis in other mammalian animals. In: *Periodontitis in Man and Other Animals: A Comparative Review*. pp 58–221.
- PAPAPANOU, P. N., LINDHE, J., STERRETT, J. D. & ENEROTH, L. (1991) Considerations on the contribution of ageing to loss of periodontal tissue support. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 611–615.

RIGGIO, P.M., JONSSON, N. & BENNETT, D. (2013) Culture-independent identification of bacteria associated with ovine 'broken mouth' periodontitis. *Veterinary Microbiology* **166**, 664–669.

## **CAPÍTULO 6 - Fatores de risco associados à prevalência de lesões periodontais em bovinos abatidos no Oeste da Escócia**

A. C. Borsanelli <sup>a</sup>, L. Viora <sup>b</sup>, T. Parkin <sup>b</sup>, D. F. Lappin <sup>c</sup>, I. S. Dutra <sup>a</sup>, M. P. Riggio <sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculty of Veterinary Medicine, Araçatuba, Department of Animal Health and Production, Sao Paulo, Brazil*

<sup>b</sup> *School of Veterinary Medicine, University of Glasgow, Bearsden Road, Glasgow G61 1GH, United Kingdom*

<sup>c</sup> *Oral Sciences Research Group, Dental School, University of Glasgow, 378 Sauchiehall Street, Glasgow G2 3JZ, United Kingdom*

\* Corresponding author. Tel.: XXXXXX.

*E-mail address:* marcello.riggio@glasgow.ac.uk (M. P. Riggio).

### **Resumo**

A periodontite bovina é um processo infeccioso e purulento progressivo que provoca alterações cumulativas que são facilmente observadas em animais abatidos. A etiopatogenia da doença não é totalmente compreendida, e os fatores de risco ainda são desconhecidos. Este estudo teve como objetivo identificar possíveis fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença. De 250 bovinos examinados em um abatedouro no Oeste da Escócia, 35 arcadas dentárias com lesões periodontais e 40 consideradas periodontalmente sadias foram selecionadas. A análise de regressão logística foi utilizada para avaliar a associação entre as variáveis independentes, sexo, idade e raça e a periodontite. Observou-se maior ocorrência de lesões periodontais entre o terceiro pré-molar e o primeiro molar mandibular esquerdo (40%). A idade dos animais foi significativamente associada à presença de lesões periodontais. Para cada ano de idade, um bovino tem 1,53 vezes a chance de desenvolver periodontite ( $p < 0,001$ ). A variável sexo não se mostrou significativamente associada à periodontite ( $p = 0,887$ ). Em relação à aptidão racial, os animais de corte apresentaram 0,36 vezes chances de desenvolver periodontite do que animais de aptidão leiteira, mas sem significância estatística ( $p = 0,054$ ). A análise de regressão logística demonstrou que as lesões periodontais são mais prevalentes com o aumento da idade dos animais. Suspeita-se que o aumento da idade possa não representar um fator de risco direto para o desenvolvimento da periodontite bovina, mas possa simplesmente refletir a exposição cumulativa ao longo do tempo aos fatores de risco ambientais.

### **Introdução**

Periodontite é uma doença inflamatória resultante de uma disbiose na microbiota bacteriana, com impacto negativo na saúde sistêmica (Hajishengallis 2015). Como infecção polimicrobiana, a sua etiologia e patogênese estão associadas

à presença de biofilme subgengival e patógenos periodontais putativos (Genco & Borgnakke 2013). Geralmente de evolução crônica, é uma enfermidade multifatorial que compartilha fatores etiológicos comuns no homem (Albandar 2005) e em outros animais (Page & Schroeder 1982). Na bovinocultura a complexidade do seu diagnóstico nos rebanhos dificulta a realização de levantamentos epidemiológicos e avaliação dos possíveis fatores de risco envolvidos.

A periodontite acomete diversas espécies, incluindo cães (Peddle et al. 2009), gatos (Booij-Vrieling et al. 2010), ovinos (Friskén et al. 1989; Ismael et al. 1989; McCourtie et al. 1990; Riggio et al. 2013), equinos (Kennedy et al. 2016) e o homem (Albandar 2005).

Em bovinos criados extensivamente, a alta ocorrência da periodontite foi descrita em bezerros na década de 1960 no Brasil, associada à criação de bovinos em pastagens recém-formadas em áreas nativas de florestas e cerrado (Döbereiner et al. 1974; Döbereiner et al. 2000). Surtos com elevada prevalência ocorrem quando da reforma de pastos em áreas anteriormente endêmicas (Dutra et al. 1993; Dutra et al. 2000). Na Europa e nos Estados Unidos, a ocorrência de periodontite bovina foi relatada entre as patologias dentárias de animais de produção (Ingham 2001; Fadden et al. 2015).

Atenção significativa e recursos financeiros são investidos em eficiência reprodutiva, saúde podal, qualidade do leite e condição corporal em rebanhos bovinos, mas a saúde dental raramente é considerada. Isso é peculiar, considerando-se que a importância da mastigação e digestão para ganho de peso e produção de leite é bem conhecida e que a baixa produtividade é a principal causa de descarte de animais do rebanho (Bascom e Young, 1998). Apesar de provavelmente ser subestimada, a periodontite é uma condição crônica dolorosa que pode resultar na dificuldade de mastigação e ruminação, com reflexos negativos na eficiência produtiva do gado de leite e corte.

Nas doenças periodontais, os estudos epidemiológicos são conduzidos para descrever o status sanitário de populações, elucidar a etiologia das doenças, identificar os fatores de risco, prevenir a sua ocorrência e dar suporte às medidas de prevenção e controle (Albandar 2005). Nesse contexto, o presente estudo foi realizado

com objetivo de avaliar alguns possíveis fatores de risco associados à ocorrência de lesões periodontais em bovinos abatidos no oeste da Escócia.

### **Materiais e métodos**

De 250 bovinos examinados após o abate em um frigorífico no oeste da Escócia, no período de setembro a novembro de 2015, foram selecionadas 35 arcadas dentárias com lesões periodontais e 40 considerados periodontalmente saudáveis para efeitos do estudo. Lesão periodontal foi considerada quando da presença de recessão gengival evidente visualmente e/ou a existência de bolsa periodontal maior que 5 mm à sondagem (sonda universal) em pelo menos um dente incisivo ou mastigatório. Os dados relacionados às lesões periodontais foram anotados em odontograma desenvolvido para o estudo, assim como o sexo, a raça e a idade, presentes no passaporte dos animais.

A análise de regressão logística foi realizada de forma a investigar a associação entre variáveis independentes (idade, sexo e aptidão racial) e a presença de periodontite através do *software* Minitab 17. As taxas de probabilidade (*odds ratio*) com os limites inferior e superior de confiança de 95% (intervalo de confiança) também foram calculadas. Diferenças mostrando um nível de probabilidade com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

### **Resultados**

A idade média dos 75 bovinos considerados no presente estudo foi de 63,6 meses, com variação de 16 a 197 meses. A idade média dos animais com periodontite foi de 88,5 meses, com variação de 17,9 a 196 meses. Destes, 66 eram fêmeas e 9 machos (Tabela 1). Uma variada gama de raças foi identificada e as mais prevalentes foram Limousin, Holstein Friesian e Aberdeen Angus (Tabela 1). Para a análise estatística, os 75 animais foram agrupados em duas categorias, aptidão leiteira ( $n=20$ ) ou de corte ( $n=55$ ).

A maior frequência de lesões periodontais nos dentes incisivos e mastigatórios dos 35 bovinos foi observada entre o terceiro pré-molar e o primeiro molar mandibular esquerdo (Tabela 2 e Figura 1).

O grau de risco entre a variável dependente (periodontite) e os fatores suspeitos avaliados (idade, sexo e aptidão racial), analisado pela regressão logística,

indicou que a idade dos animais teve associação significativa com a presença de lesão periodontal. Assim, para cada ano de idade um bovino tem 1,53 vezes chances de desenvolver periodontite (Intervalo de confiança de 95%: 1,26 a 1,86;  $p < 0,001$ ).

A variável sexo não se mostrou significativamente associada à periodontite ( $p = 0,887$ ) e portanto, não pode ser considerada como um fator de risco para o desenvolvimento da enfermidade. Em relação à variável aptidão racial, os animais de corte têm 0,36 mais chances de desenvolver periodontite do que animais de aptidão leiteira. No entanto, como é pouco significativo ( $p = 0,054$ ), não pode ser considerado como um fator de risco para o desenvolvimento da periodontite.

## **Discussão**

Observa-se pela ocorrência de lesões em 35 animais abatidos que é equivocada a percepção comum de proprietários rurais e médicos veterinários de que a periodontite bovina seria um processo sem significado econômico e sanitário. Nesse contexto, levantamentos epidemiológicos de doenças periodontais nas populações humanas definem não somente o status populacional das enfermidades como também auxiliam no reconhecimento dos seus fatores de risco (Albandar 2002).

A ocorrência de problemas dentários em animais de produção, e entre eles as lesões periodontais, foi registrada em ovinos na Escócia (Aitchison & Spence 1984) e na Nova Zelândia (Bruère et al. 1979) e em bovinos no norte da Inglaterra (Ingham 2001), nos Estados Unidos (Fadden et al. 2015), no Brasil (Döbereiner et al. 2000) e no oeste da Escócia (Borsanelli et al. 2016). Nesse contexto, o presente estudo evidencia um problema de ocorrência natural em rebanhos bovinos de corte e leite, com o comprometimento uni ou bilateral dos dentes mastigatórios que pode afetar animais de ambos os sexos e diferentes idades. Embora não quantificados, certamente a ocorrência da periodontite interfere na produção e no bem-estar dos animais.

A periodontite bovina é um processo infeccioso purulento e progressivo que provoca alterações cumulativas possíveis de serem avaliadas em animais abatidos em frigoríficos. Assim, as lesões periodontais que se sucedem ao longo da vida produtiva dos animais podem ser caracterizadas pela formação de bolsa periodontal, recessão gengival, mobilidade, perda de inserção clínica e esfoliação prematura dos dentes. A ocorrência natural da enfermidade em rebanhos bovinos criados

extensivamente em biomas tropicais no Brasil tem efeitos dramáticos na saúde animal (Döbereiner et al. 2000), com a participação de patógenos periodontais potenciais (Blobel et al. 1987; Dutra et al. 2000; Borsanelli et al. 2015a, Borsanelli et al. 2015b).

Döbereiner et al. (1974) relataram que a lesão periodontal ocorre geralmente entre o segundo e terceiro pré-molares decíduos maxilares, quando os animais são jovens. Com a evolução do processo ocorre exposição da raiz, afrouxamento e até perda dos dentes. No presente estudo, a maior frequência de bolsas periodontais foi encontrada entre o terceiro pré-molar e o primeiro molar mandibular esquerdo (40%), entre o terceiro pré-molar e o primeiro molar maxilar direito (28,6%), no terceiro pré-molar maxilar esquerdo (28,6%) e no primeiro incisivo direito (28,6%). A diferença na localização das lesões pode ser explicada pela idade média dos animais (5,04 anos) neste estudo e outros possíveis fatores de risco não avaliados nesta oportunidade, como por exemplo a dieta dos animais.

As doenças periodontais destrutivas são o oposto de muitas outras doenças inflamatórias crônicas, pois a presença de agentes infecciosos por si só não é capaz de ocasionar a perda de tecidos periodontais. Em humanos, alguns estudos longitudinais em adolescentes e adultos confirmaram a existência de subgrupos com predisposições de risco à progressão da doença. Estas descobertas sugerem que a atividade da doença periodontal não é linearmente contínua e que há fatores que afetam a sua previsibilidade, e é preciso identificá-los (Albandar 2002).

Fatores de risco podem ser definidos como características distintivas ou exposições que aumentam a probabilidade de desenvolver periodontite, ou levar a uma mudança mensurável (prejuízo) no estado dos tecidos periodontais de suporte (Albandar 2002). Na periodontite humana são reconhecidos alguns fatores de risco como idade, sexo, raça/etnia, tabagismo, obesidade, diabetes e osteopenia/osteoporose. A etiopatogênese da periodontite bovina não é completamente elucidada e portanto os fatores de risco ainda são desconhecidos. O presente estudo teve como objetivo identificar possíveis fatores de risco associados ao desenvolvimento da periodontite bovina. Para avaliar a associação entre a periodontite e as variáveis independentes sexo, idade e aptidão racial utilizou-se a análise de regressão logística.

Não existe diferença estabelecida entre homens e mulheres na suscetibilidade à periodontite, embora homens tenham demonstrado pior saúde periodontal que as mulheres em vários estudos de diferentes populações (Okamoto et al. 1988, Albandar 2002). Essa diferença tem sido considerada como um reflexo de melhores práticas de higiene bucal e/ou aumento na utilização de serviços odontológicos entre as mulheres (Dunlop et al. 2002; Roberts-Thomson & Stewart, 2003).

Ao avaliar a relação entre gênero, peso e idade na evolução da doença periodontal em cães, Carreira et al. (2015) concluíram que não há diferenças estatisticamente significativas em relação ao gênero. O mesmo foi observado no presente estudo, no qual a variável sexo não se mostrou significativamente associada à periodontite ( $p=0,887$ ) e, portanto, não se classifica como um fator de risco para o desenvolvimento da enfermidade. Por outro lado, a periodontite é uma infecção bacteriana determinada em grande parte pela resposta imunoinflamatória do hospedeiro ao desafio bacteriano. Embora diferenças específicas entre os sexos nessas respostas ainda não tenham sido totalmente demonstradas, é biologicamente plausível que tais diferenças possam de fato existir.

Em nenhum estudo foi investigada a associação da aptidão racial (corte e leite) com a periodontite em bovinos ou outra espécie de ruminante. Na análise de regressão logística, essas variáveis apresentaram resultados pouco significativos ( $p=0,054$ ) e portanto, não podem ser considerados como um fator de risco para desenvolvimento da periodontite.

Os resultados mostraram que apenas a idade foi estatisticamente significativa ( $p<0,001$ ) na periodontite bovina. Assim, para cada ano de idade, um bovino tem 1,53 vezes chances de desenvolver periodontite (Intervalo de confiança de 95%: 1,26 a 1,86).

O efeito da idade sobre a ocorrência de periodontite, como neste estudo, foi observada por Carreira et al. (2015) em cães, onde os mais velhos apresentaram estágios mais avançados de periodontite. Em humanos, há evidências de que a prevalência e a gravidade da periodontite aumentam com a idade, sugerindo que esta possa ser um fator de risco para a enfermidade (Johnson 1989; Burt 1994). No entanto, o conceito de periodontite como uma consequência inevitável da idade tem

sido questionado, e o “efeito idade” provavelmente representa o efeito cumulativo da exposição prolongada a verdadeiros fatores de risco (Papapanou et al. 1991).

É provável que a periodontite bovina tenha um impacto significativo sobre o bem-estar dos animais afetados, já que pode ser uma condição dolorosa crônica, levando à dificuldade de alimentação, com a consequente perda de condição corporal e peso, aumento na susceptibilidade a doenças e diminuição da produtividade. A dor pode ter apenas efeitos sutis sobre o comportamento do gado, e assim, a enfermidade é facilmente ignorada ou negligenciada. No presente estudo, foi possível elucidar que a maior frequência de lesões periodontais em bovinos acontecem entre o terceiro pré-molar e o primeiro molar e portanto, para serem observadas faz-se necessário o exame da cavidade oral. Através da análise de regressão logística demonstrou-se que as lesões da periodontite estão mais presentes com a evolução da idade dos bovinos, mas suspeita-se que não a idade não constitui em fator de risco para o desenvolvimento da periodontite bovina.

## Referências

- Aitchison, G.U., Spence, J.A. 1984. Dental disease in hill sheep: an abattoir survey. *Journal of Comparative Pathology* 24, 285-300.
- Albandar, J.M., 2002. Global risks factors and risk indicators for periodontal disease. *Periodontology* 2000 29, 177-206.
- Albandar, J.M. 2005. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *The Dental Clinics of North America* 49, 517-532.
- Bascom, S.S., Young, A.J., 1998. A summary of the reasons why farmers cull cows. *Journal of Dairy Science* 81, 2299-2305.
- Blobel, H., Döbereiner, J., Rosa, I.V., Lima, F.G.F., Dutra, I.S., 1987. Bacterial investigations of a periodontal disease, Cara inchada in Brazilian cattle. *Tierärztliche Umschau* 42, 152-154.
- Booij-Vrieling, H.E., Van der Reijden, W.A., Houwers, D.J., de Wit, W.E., Bosch-Tijhof, C.J., Penning, L.C., Van Winkelhoff, A.J., Hazewinkel, H.A., 2010. Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners. *Veterinary Microbiology* 144(1-2):147-152.
- Borsanelli, A.C., Gaetti-Jardim Jr, E., Döbereiner, J., Dutra, I.S., 2015a. *Treponema denticola* in microflora of bovine periodontitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(3), 237-240.
- Borsanelli, A.C., Gaetti-Jardim Jr, E., Schweitzer, C.M., Döbereiner, J., Dutra, I.S., 2015b. Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(10), 829-834.
- Borsanelli, A.C., Viora, L., Lappin, D.F., Bennett, D., King, G., Dutra, I.S. 2016. Periodontal lesions in slaughtered cattle in the West of Scotand. *Veterinary Record* doi:10.1136/vr.103931.

- Bruère, A.N., West, D.M., Orr, M.B., O'Callaghan, M.W. 1979. A syndrome of dental abnormalities of sheep: I. Clinical aspects on a commercial sheep farm in the Wairarapa. *New Zealand Veterinary Journal* 27(8), 152-158.
- Burt, B.A. 1994. Periodontitis and aging: reviewing recent evidence. *Journal of the American Dental Association* 125, 273-279.
- Carreira, L.M., Dias, D., Azevedo P., 2015. Relationship between gender, age and weight and the serum ionized calcium variations in dog periodontal disease evolution. *Topics in companion animals medicine* 30, 51-56.
- Döbereiner, J., Dutra, I.S., Rosa, I.V., Blobel, H., 2000. Cara inchada of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependant periodontitis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20(2), 47-64.
- Döbereiner, J., Inada, T., Tokarnia, C.H., 1974. "Cara inchada", doença peridentária em bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 9(7), 63-85.
- Dunlop, D.D., Manheim, L.M., Song, J., Chang, R.W., 2002. Gender and ethnic/racial disparities in health care utilization among older adults. *The Journals of Gerontology*, 57, S221-233.
- Dutra, I.S., Botteon, R.C.M., Döbereiner, J., 2000. Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da "cara inchada" em bezerros transferidos para área indene. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20(2), 71-74.
- Dutra, I.S., Matsumoto, T., Döbereiner, J., 1993. Surtos de periodontite em bezerros ("cara inchada") associados ao manejo do solo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(1/2), 1-4.
- Fadden, A.N., Poulsen, K.P., Vanegas, J., Mecham, J., Bildfell, R., Stieger-Vanegas, S.M., 2015. Dental pathology in conventionally fed and pasture managed dairy cattle. *Veterinary Record* 178(1), 1-7.
- Friskien, K.W., Laws, A.J., Tagg, J.R., Orr, M.B., 1989. Environmental influences on the progression of clinical and microbiological parameters of sheep periodontal disease. *Research in Veterinary Science* 46, 147-152.
- Genco, R.J., Borgnakke, W.S. 2013. Risk factors for periodontal disease. *Periodontology* 2000 62, 59-94.
- Hajishengallis, G. 2015. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature* 15, 30-44.
- Ingham, B., 2001. Abattoir survey of dental defects in cull cows. *Veterinary Record* 148, 739-742.
- Ismael, M.O., Greenamn, J., Morgan, K., Glover, M.G., Rees, A.S., Scully, C., 1989. Periodontitis in sheep: a model for human periodontal disease. *Journal of Periodontology* 60, 279-284.
- Johnson, N.W. 1989. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. *International Dental Journal* 39, 33-47.
- Kennedy, R., Lappin, D.F., Dixon, P.M., Buijs, M.J., Zaura, E., Crielaard, W., O'Donnell, L., Bennett, D., Brandt, B.W., Riggio, M.P., 2016. The microbiome associated with equine periodontitis and oral health. *Veterinary Research* 47, 49-57.
- McCourtie, J., Poxton, I.R., Brown, R., Whittaker, C.R., Spence, J.A., Aitchison, G.U., 1990. A longitudinal study of the cultivable subgingival bacteria isolated from sheep during the development of broken mouth periodontitis. *Journal of Medical Microbiology* 31, 275-283.

- Okamoto, H., Yoneyama, T., Lindhe, J., Haffajee, A., Socransky, S., 1988. Methods of evaluating periodontal disease data in epidemiological research. *Journal of Clinical Periodontology* 15, 430-439.
- Page, R.C.; Schroeder, H.E. 1982. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Karger. Switzerland, 158-187.
- Papapanou, P.N., Lindhe, J., Sterret, J.D., Eneroth, L., 1991. Considerations on the contribution of gingivitis to loss of periodontal tissue support. *Journal of Clinical Periodontology* 18(8), 611-615.
- Peddle, G.D., Drobatz, K.J., Harvey, C.E., Adams, A., Sleeper, M.M., 2009. Association of periodontal disease, oral procedures, and other clinical findings with bacterial endocarditis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 234(1), 100-107.
- Riggio, P.M., Jonsson, N., Bennett, D., 2013. Culture-independent identification of bacteria associated with ovine 'broken mouth' periodontitis. *Veterinary Microbiology* 166, 664-669.
- Robert-Thomson, K.F., Stewart, J.F., 2003. Access to dental care by young South Australian adults. *Australian Dental Journal* 48, 169-174.

**Tabela 1**

Distribuição de raças e sexo de 75 bovinos com lesões periodontais (n=35) e periodontalmente considerados saudáveis (n=40) e selecionados dentre 250 abatidos em frigorífico no oeste da Escócia

Raça	Periodontite (n=35)		Sadios (n=40)		Total
	F	M	F	M	
Limousin	6	2	17	1	26
Holstein Friesian	7	0	4	0	11
Aberdeen Angus	5	0	4	2	11
British Friesian	6	0	2	0	8
Simmental	3	0	3	0	6
Shorthorn	1	1	1	0	3
Belgian Blue	2	0	0	0	2
British Blue	1	0	1	0	2
Charolais	0	0	1	1	2
Belted Galloway	0	1	0	0	1
Blonde D'Aquitaine	0	0	1	0	1
Highland	0	0	0	2	1
Luining	0	0	1	0	1

**Tabela 2**

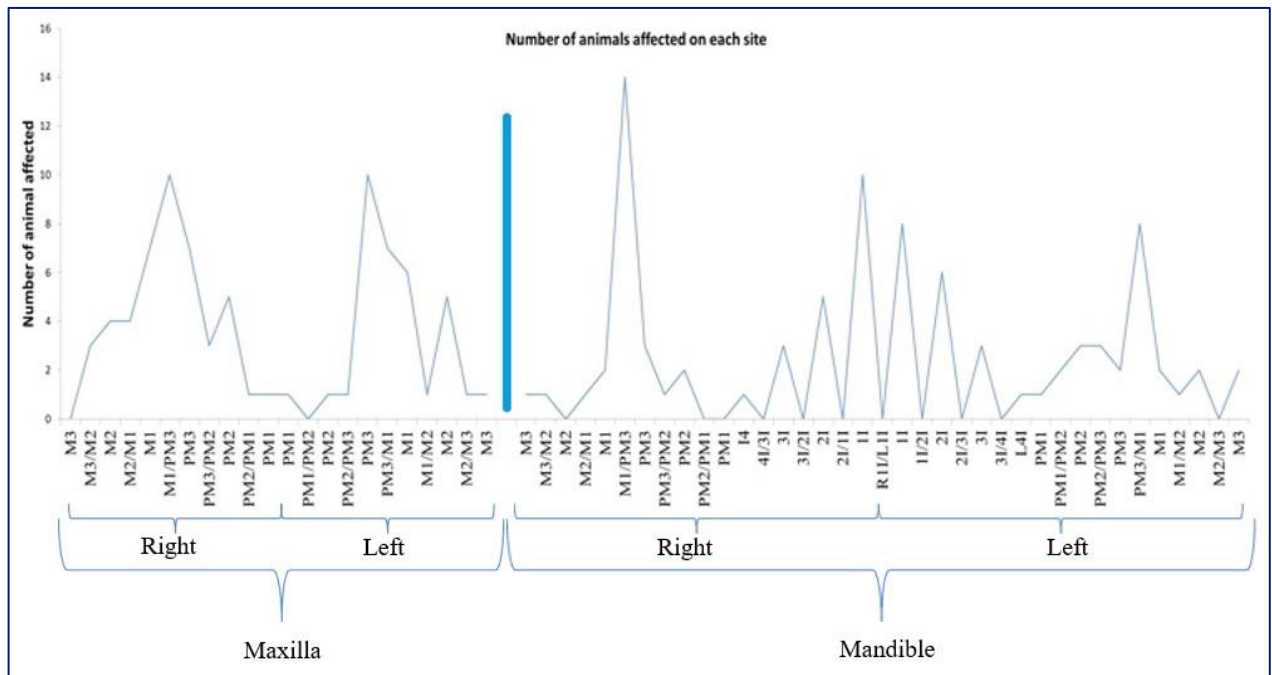
Localização das lesões periodontais nos dentes incisivos, pré-molares e molares de 35 bovinos de um total de 250 abatidos e examinados no oeste da Escócia

<b>Dentes</b>		<b>Maxilar</b>		<b>Mandíbula</b>	
		<b>Direita</b>	<b>Esquerda</b>	<b>Direita</b>	<b>Esquerda</b>
<b>Incisivos</b>	Primeiro incisivo	-	-	10	8
	Segundo incisivo	-	-	5	6
	Terceiro incisivo	-	-	3	3
	Quarto incisivo	-	-	1	1
<b>Pré-molares e molares*</b>	PM1	1	1	0	1
	PM1/PM2	1	0	0	2
	PM2	4	1	2	3
	PM2/PM3	3	1	1	3
	PM3	7	10	3	2
	PM3/M1	10	7	14	8
	M1	7	6	2	2
	M1/M2	4	1	1	1
	M2	4	5	0	2
	M2/M3	3	1	1	0
	M3	0	1	1	2

\*PM1 – primeiro pré-molar, PM2 – segundo pré-molar, PM3 – terceiro pré-molar, M1 – primeiro molar, M2 – segundo molar e M3 – terceiro molar

### Figura 1

Frequência e localização de lesões periodontais em 35 bovinos de diferentes raças e idades abatidos no oeste da Escócia



\*PM1 – primeiro pré-molar, PM2 – segundo pré-molar, PM3 – terceiro pré-molar, M1 – primeiro molar, M2 – segundo molar e M3 – terceiro molar, I1 – primeiro incisivo, I2 – segundo incisivo, I3 – terceiro incisivo, I4 – quarto incisivo.

## CAPÍTULO 7 - Microbioma associado à periodontite bovina

A. C. Borsanelli<sup>a</sup>, D. F. Lappin<sup>b</sup>, W. Crielaard<sup>c</sup>, L. Viora<sup>d</sup>, D. Bennett<sup>c</sup>, B. W. Brandt<sup>b</sup>, I. S. Dutra<sup>e</sup>, M. P. Riggio<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brazil.

<sup>b</sup> Academic Centre for Dentistry Amsterdam, University of Amsterdam and VU University Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

<sup>c</sup> Dental School, University of Glasgow, Glasgow, UK

<sup>d</sup> School of Veterinary Medicine, University of Glasgow, UK

<sup>e</sup> School of Veterinary Medicine, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brazil.

\*Corresponding author at: Postgraduate Program in Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Clovis Pestana Street, Araçatuba, 16050-680, Brazil. Tel: +55 18 36361357

E-mail address: [carol\\_borsanelli@yahoo.com.br](mailto:carol_borsanelli@yahoo.com.br) (A.C. Borsanelli).

E-mail for correspondence: [carol\\_borsanelli@yahoo.com.br](mailto:carol_borsanelli@yahoo.com.br)

### Resumo

A periodontite é uma enfermidade infecciosa que tem impacto na saúde, na produção e no bem-estar de ruminantes. Geralmente de curso crônico, é um processo infeccioso purulento e progressivo que provoca alterações cumulativas que se sucedem ao longo da vida dos animais. Bactérias são consideradas importantes agentes causadores da doença periodontal em humanos, cães e gatos, e é altamente provável que elas desempenhem um papel crucial na patogênese da periodontite bovina. O objetivo do presente estudo foi determinar os perfis microbianos associados à cavidade oral bovina saudável e à periodontite bovina pelo sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA bacteriano. Amostras de biofilme subgingival de 40 bovinos com periodontite e de 38 periodontalmente saudáveis foram coletadas. O DNA foi extraído das amostras, a região V3-V4 do gene 16S rRNA bacteriano amplificada por PCR e os amplicons sequenciados na plataforma Illumina MiSeq. Amostras de animais saudáveis mostraram menos variabilidade no número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) quando comparadas com as amostras de animais com periodontite. Em média, as amostras de bovinos saudáveis abrigaram 238 OTUs (desvio padrão 158, variação de 66-689), enquanto amostras de animais com periodontite continham 245 OTUs (desvio padrão 114, variação de 79-577). As taxa mais discriminativas nas amostras de animais saudáveis foram *Gastranaerophilus*, *Planifilus*, *Burkholderia* e *Arcobacter*. Já nos animais com periodontite, os micro-organismos mais prevalentes foram *Elusimicrobia*, *Synergista*, *Propionivibrio*, *Fusobacteria*, *Wolinella*, *Porphyromonas*, *Candidatus*, *Prevotella*, *Firmicutes* (não cultivável), *Bacteroides* e *Treponema*. Em conclusão, os dois grupos de bovinos avaliados abrigaram perfis microbianos distintos, sendo que as amostras de bovinos afetados periodontalmente foram mais diversas em micro-organismos do que as de bovinos

sadios. Nesse contexto, os componentes principais da homeostase bacteriana no biofilme de sítios sadios e a disbiose nas lesões periodontais fornecem indicadores inéditos para a evolução do conhecimento sobre a periodontite bovina.

Palavras-chave: doença periodontal, bovinos, sequenciamento de alto rendimento

## **Introdução**

A periodontite é uma enfermidade infecciosa que tem impacto na saúde, na produção e no bem-estar de ruminantes. Geralmente de curso crônico, é um processo infeccioso purulento e progressivo que provoca alterações cumulativas que se sucedem ao longo da vida dos animais e podem ser caracterizadas por formação de bolsa periodontal, recessão gengival, mobilidade, perda de inserção clínica e esfoliação prematura dos dentes (Page e Schroeder 1976, Döbereiner et al. 2000).

A ocorrência natural de lesões periodontais em ovinos e bovinos foi registrada na Escócia (Aitchison & Spence 1984), na Nova Zelândia (Bruère et al. 1979), na Inglaterra (Ingham 2001), nos Estados Unidos (Fadden et al. 2015), na Escócia (Borsanelli et al. 2016) e no Brasil (Döbereiner et al. 2000).

Bactérias são consideradas importantes na patogênese da doença periodontal em humanos, cães e gatos, e é altamente provável que elas desempenham um papel crucial na patogênese da periodontite bovina. A ocorrência natural da enfermidade em rebanhos bovinos criados extensivamente em biomas tropicais no Brasil tem efeitos dramáticos na saúde animal (Döbereiner et al. 2000) e a participação de alguns patógenos periodontais potenciais nas lesões da doença é reconhecida (Blobel et al. 1987; Dutra et al. 2000; Borsanelli et al. 2015a, Borsanelli et al. 2015b).

Uma etapa essencial para a compreensão sobre a participação de bactérias na periodontite é a determinação da sua composição qualitativa e quantitativa no sulco gengival e na bolsa periodontal. Estudos em humanos e outras espécies animais estimaram que cerca de 50% das bactérias não podem ser cultivadas por abordagens convencionais devido às suas exigências nutricionais para crescimento *in vitro*, portanto, o número e a variedade de espécies bacterianas presentes no microbioma oral seriam subestimados (Socransky e Haffajee 2005).

Na atualidade, é possível determinar quase toda a comunidade de bactérias, tanto comensais quanto as potencialmente patogênicas, que habitam a cavidade oral bovina, tanto na saúde quanto na periodontite, utilizando-se de métodos

independentes de cultura. Nesse sentido, na maioria dos estudos têm-se utilizado o sequenciamento de Sanger para determinar as sequências de genes de 16S rRNA bacteriano. Isso permite detectar não só as espécies cultiváveis mas também bactérias incultiváveis e também novas espécies que podem ser importantes na patogênese da doença. Este método já foi utilizado para determinar as espécies bacterianas presentes em lesões periodontais em ovinos (Riggio et al. 2013), cães (Riggio et al. 2011) e equinos (Kennedy et al. 2016).

O objetivo do presente estudo foi determinar os perfis microbianos associados à cavidade oral bovina saudável e à periodontite bovina pelo sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA bacteriano. Esta abordagem proporciona precisão e sensibilidade muito maiores e profundas do que a oferecida pelo sequenciamento de Sanger na avaliação da composição de comunidades microbianas complexas.

## **Materiais e métodos**

### **Colheita das amostras**

As amostras de biofilme subgingival foram coletadas em abatedouro próximo a Glasgow, Escócia, no período de setembro a novembro de 2015. Foram examinadas 200 arcadas dentárias de bovinos, e o critério para o diagnóstico da periodontite foi a presença de retração gengival e a existência de bolsa periodontal maior que 5 mm de profundidade. O biofilme subgingival foi coletado da bolsa periodontal de 40 bovinos com periodontite e do sulco subgingival de 38 bovinos periodontalmente saudáveis com o auxílio de uma cureta estéril. Todas as amostras foram armazenadas em *ependorf* contendo 250  $\mu$ L de RNA Later e mantidas à temperatura de -20 °C até o processamento.

### **Processamento das amostras e extração de DNA**

As amostras de biofilme subgingival foram homogeneizadas por 30 segundos, e um extrato de DNA bruto foi preparado de cada amostra por digestão com proteinase K (100  $\mu$ g/mL) a 60 °C por 60 minutos, seguido de fervura por 10 minutos. A purificação adicional de DNA foi realizada por meio da adição de 150  $\mu$ L de cada amostra com 200  $\mu$ L de fenol saturado com Tris-HCL (pH 8.0), 250  $\mu$ L de contas de vidro (0,1 mm) suspensas em TE *buffer* e 200  $\mu$ L de lise *buffer*. As amostras foram acondicionadas

em um BioSpec Mini-Beadbeater por 2 minutos a 2.100 oscilações por minuto, e o DNA foi extraído com o AGOWA mag Mini DNA Isolation Kit (AGOWA, Berlim, Alemanha).

### **Sequenciamento de alto rendimento**

Para cada amostra, a região V3-V4 (que fornece uma boa cobertura e resolução taxonômica) do gene 16S rRNA bacteriano foi gerada por PCR com iniciadores 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). Os iniciadores continham adaptadores Illumina e uma chave de sequência de índice de amostra única de 8 nucleotídeos. As bibliotecas de amplicons foram reunidas em quantidades equimolares e purificadas utilizando o Illustra™ GFX™ PCR DNA e o Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Eindhoven, Holanda). A qualidade e o tamanho do amplicon foram analisados em Agilent 2100 Bioanalyzer (Santa Clara, CA, USA). A sequência de amplicons foi realizada na plataforma Illumina MiSeq usando o v3 kit generating 2x 301 nucleotide reads (Illumina, San Diego, USA).

### **Análise estatística**

A diversidade (Índice de diversidade de Shannon, Estimativa Chao-1 da riqueza total de espécies) e as diferenças entre os perfis microbianos dos dois grupos pela PERMANOVA, foram analisadas por meio do *software* Paleontological Statistics (PAST; v3.02). A diferença na diversidade dos gêneros detectados nos animais doentes e saudáveis foi comparada e analisada estatisticamente utilizando-se o teste de Mann-Whitney U em SPSS (versão 21.0).

### **Resultados**

As análises dos principais componentes revelaram claras diferenças entre o microbioma oral de bovinos com periodontite e o dos periodontalmente saudáveis. Amostras de animais saudáveis mostraram menos variabilidade no número de OTUs quando comparadas com as amostras de animais com periodontite. Os perfis microbianos dos bovinos saudáveis foram estatisticamente menos diversos, tanto pela riqueza de espécies reais (número de OTUs, Figura 1A), quanto pela riqueza de

espécies estimadas ou Chao-1 (Figura 1B) e pelo Index de diversidade de Shannon (Figura 1C).

Em média, as amostras de bovinos sadios abrigaram 238 OTUs (Desvio padrão 158, variação de 66-689), enquanto amostras de animais com periodontite continham 245 OTUs (Desvio padrão 114, variação de 79-577).

As taxa mais discriminativas nas amostras de animais sadios foram *Gastranaerophilus*, *Planifilus*, *Burkholderia*, *Arcobacter*, bactérias não cultiváveis do rúmen, *Escherichia-Shigella*, *Pseudomonas* e *Actinobacteria*. Já nos animais com periodontite, os micro-organismos mais prevalentes foram Elusimicrobia, Synergista, *Propionivibrio*, Fusobacteria, *Wolinella*, *Porphyromonas*, *Candidatus*, *Prevotella*, *Firmicutes* (não cultivável), *Bacteroides* e *Treponema* (Gráfico 1).

## Discussão

A periodontite é uma infecção multifatorial provocada por um complexo de espécies bacterianas que interagem com os tecidos e as células do hospedeiro e causam a liberação de uma ampla gama de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios, alguns dos quais levam à destruição das estruturas periodontais, incluindo os tecidos de suporte do dente, o osso alveolar e o ligamento periodontal (Holt e Ebersole 2005).

A cavidade oral abriga uma população microbiana complexa, diversa e abundante que possui um papel crítico na saúde e na doença. Até o presente momento, aproximadamente 700 espécies foram descritas na cavidade oral humana, das quais aproximadamente 32% ainda não foram cultivadas (Chen et al. 2010).

Dewhirst et al. (2010) identificaram, por meio do sequenciamento 16S rRNA, 1.179 sequências em amostras de biofilme subgengival de pacientes com periodontite e periodontalmente sadios. Spirochaetes, Synergistetes e Bacteroidetes foram os filos mais abundantes em pacientes humanos com periodontite, enquanto o filo Proteobacteria foi encontrado em maior nível em pacientes sadios (Griffen et al., 2012). Apesar de o *Human Oral Microbiom Database* conter representantes de 13 filos bacterianos, 96% dos filotipos em nível de espécies pertencem aos seis seguintes filos: Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes e Fusobacteria (Dewhirst et al., 2010).

Kennedy et al. (2015) identificaram 1.308 unidades taxonômicas operacionais no microbioma oral de equinos. Os gêneros *Gemella* e *Actinobacillus* foram os mais abundantes nas amostras de animais periodontalmente saudáveis, enquanto, no grupo de animais com periodontite predominaram os gêneros *Prevotella* e *Veillonella*. Em cães periodontalmente saudáveis, Dewhirst et al. (2012) identificaram 353 taxa microbianas que foram divididas em 14 filos, 23 classes, 37 ordens e 148 gêneros. Em um estudo mais recente, Holcombe et al. (2014) avaliaram a colonização da superfície supragengival de dentes de cães e identificaram um total de 134 unidades taxonômicas operacionais em nível de espécie, que foram distribuídas entre os seguintes filos: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Fusobacteria.

Em gatos, Sturgeon et al. (2014) identificaram 10.177 unidades taxonômicas operacionais no microbioma oral de animais saudáveis, representando 18 filos, dos quais os mais prevalentes foram Proteobacteria (75,2%), Bacteroidetes (9,3%), Firmicutes (6,7%), Spirochaetes (1,8%), Fusobacteria (1,3%) e Actinobacteria (0,6%). Dentre os gêneros, se destacaram: *Moraxella* (10,9%), *Thermomonas* (6,9%), *Neisseria* (4,9%) e *Pasteurella* (4,3%).

O presente estudo é o primeiro a utilizar sequenciamento de alto rendimento do 16S rRNA para comparar as populações bacterianas presentes na saúde oral e na periodontite bovina e revelou uma dissimilaridade estatisticamente significativa entre as populações bacterianas encontradas nos animais periodontalmente saudáveis e nos animais com periodontite. Nesse enfoque, representa um avanço considerável sobre o que foi anteriormente documentado para a comunidade microbiana oral de bovinos.

Em animais saudáveis, os gêneros *Gastranaerophilus*, *Planifilus*, *Burkholderia* e *Arcobacter* foram os mais prevalentes, enquanto *Elusimicrobia*, *Synergista* e *Propionivibrio* foram mais frequentes na microbiota oral de bovinos com periodontite. No entanto, há pouco conhecimento científico sobre esses micro-organismos. Fusobacteria, *Wolinella*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Treponema* também apresentaram alta prevalência nas lesões periodontais de bovinos (Gráfico 1).

O filo Fusobacteria, do qual são representantes micro-organismos do gênero *Fusobacterium*, é reconhecido como parte da microbiota subgengival há mais de 100 anos. Em bovinos, *Fusobacterium nucleatum* foi detectado em cultivos de lesões da

periodontite, identificado na ocasião por meio de suas características morfo-tintoriais e bioquímicas (Blobel et al., 1982; Botteon et al., 1993). *Fusobacterium naviforme*, *Fusobacterium necrophorum* e *F. nucleatum* já foram identificados em ovinos com quadro de 'broken mouth' (McCourtie et al., 1989) e *F. necrophorum* em cabras com periodontite (Suzuki et al. 2006).

O gênero *Fusobacterium* é um dos principais constituintes da microbiota oral normal de gatos (Love et al. 1990), e diversas espécies do gênero, como *F. alocis* (Hardham et al. 2005), *Fusobacterium russi*, *Fusobacterium canifelinum* (Dahlen et al. 2011) e *F. nucleatum* (Nishiyama et al. 2007), foram detectadas em cães com e sem periodontite.

O gênero *Wolinella* é composto por micro-organismos normalmente presentes no líquido ruminal de bovinos e já foi identificado na cavidade oral de cães e gatos.

Os micro-organismos pigmentados de preto dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* são patógenos reconhecidos na periodontite humana e de animais. Diversas espécies de *Prevotella* e *Porphyromonas* já foram detectadas em casos de periodontite crônica e no biofilme associado a gengivite e osteomielite em humanos (Ashimoto et al. 1996, Mayanagi et al. 2004, Gaetti-Jardim Jr. et al. 2010). Diferentes espécies de ambos os gêneros foram identificadas em cães com periodontite, entre elas *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas cangingivalis*, *Porphyromonas denticanis*, *Porphyromonas salivosa*, *Prevotella intermedia* (Hardham et al. 2005, Nishiyama et al. 2007, Riggio et al. 2011), enquanto *Porphyromonas* spp. e *P. gulae* (Booij-Vrieling et al. 2010) foram identificadas em gatos com doença periodontal. *P. gingivalis* e *P. intermedia* estão frequentemente presentes em ovinos com periodontite (Duncan et al. 2003), além de *Porphyromonas asaccharolytica* e *Prevotella buccae* (McCourtie et al. 1989).

Em bovinos, esses dois gêneros parecem predominar nas lesões de animais com periodontite (Blobel et al., 1987, Botteon et al. 1993, Dutra et al. 1986, 2000). Ao avaliar a presença de espécies de *Prevotella* e *Porphyromonas* na microbiota de bovinos com e sem periodontite, Borsanelli et al. (2015a) constataram que a ocorrência de *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. buccae*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *P. oralis* está associada à periodontite bovina.

Há uma variedade de estudos quantitativos e qualitativos que avaliaram as espécies de *Treponema* envolvidas na periodontite humana ou em sítios sadios (Willis et al. 1999, Sato e Kuramitsu 2000, Asai et al. 2002), assim como em cães com periodontite (Riviere et al. 1996, Nordhoff et al. 2008). *Treponema amylovorum*, *Treponema denticola*, *Treponema maltophilum*, *Treponema medium* e *Treponema pectinovorum* foram identificadas em lesões de ovinos com periodontite (Borsanelli et al. 2016). Em bovinos, *T. amylovorum*, *T. maltophilum* e *T. denticola* foram detectadas na microbiota de animais com periodontite. Este gênero também foi encontrado em altos níveis em equinos com periodontite (Kennedy et al. 2016).

Dado que nenhum estudo anterior caracterizou a microbiota oral bovina em tal detalhe, é altamente provável que bactérias novas ou anteriormente não caracterizadas estejam presentes tanto na saúde oral como na periodontite. Em conclusão, os dois grupos de bovinos avaliados abrigaram perfis microbianos distintos, sendo que as amostras de bovinos afetados periodontalmente foram mais diversas em micro-organismos do que as de bovinos sadios. Nesse contexto, os componentes principais da homeostase bacteriana no biofilme de sítios sadios e a disbiose nas lesões periodontais fornecem indicadores inéditos para a evolução do conhecimento sobre a periodontite bovina.

## Referências

- AITCHISON, G. U. & SPENCE, J. A. (1984) Dental disease in hill sheep: an abattoir survey. *Journal of Comparative Pathology* **24**, 285-300.
- ASAI, Y., JINNO T., IGARASHI H. & OGAWA T. (2002) Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **40(9)**, 3334-3340.
- ASHIMOTO, A., CHEN, C., BAKKER, I. & SLOTS, J. (1996) Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiology and Immunity* **11**, 266-273.
- BLOBEL, H., DÖBEREINER, J., ROSA, I. V., LIMA, F. G. F. & DUTRA, I. S. (1987) Bacterial investigations of a periodontal disease, Cara inchada in Brazilian cattle. *Tierärztliche Umschau* **42**, 152-154.
- BOOIJ-VRIELING, H. E., VAN DER REIJDEN, W. A., HOUWERS, D. J., DE WIT, W. E., BOSCH-TIJHOF, C. J., PENNING, L. C., VAN WINKELHOFF, A. J. & HAZEWINKEL, H. A. (2010) Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners. *Veterinary Microbiology* **144(1-2)**, 147-152.

- BORSANELLI, A. C., GAETTI-JARDIM JR, E., DÖBEREINER, J. & DUTRA, I. S. (2015a) *Treponema denticola* in microflora of bovine periodontitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **35**, 237–240.
- BORSANELLI, A. C., GAETTI-JARDIM JR, E., SCHWEITZER, C. M., DÖBEREINER, J. & DUTRA, I. S. (2015b) Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **35**, 829–834.
- BORSANELLI, A. C., VIORA, L., LAPPIN, D. F., BENNETT, D., KING, G., DUTRA, I.S. & RIGGIO, M. P. (2016a). Periodontal lesions in slaughtered cattle in the West of Scotand. *Veterinary Record* doi:10.1136/vr.103931.
- BORSANELLI, A. C., RAMOS, T. N. M., GAETTI-JARDIM JR., E., SCHWEITZER, C. M. & DUTRA, I. S. (2016b) *Treponema* species in the subgingival microflora of ovine periodontitis. *Veterinary Record*, doi:10.1136/vr.103946.
- BOTTEON, R. M., DUTRA, I. S., DÖBEREINER, J. & BLOBEL, H. (1993) Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **13(3/4)**, 51-55.
- BRUÈRE, A. N., WEST, D. M., ORR, M. B. & O’CALLAGHAN, M. W. (1979) A syndrome of dental abnormalities of sheep: I. Clinical aspects on a commercial sheep farm in the Wairarapa. *New Zealand Veterinary Journal* **27(8)**, 152-158.
- CHEN, T., YU, W. H., IZARD, J., BARANOVA, O. V., LAKSHMANAN, A. & DEWHIRST, F. E. (2010) The human oral microbiome database: a web accessible resource for investigation oral microbe taxonomic and genomic information. Database (Oxford). 2010; 2010: baq013. Doi:10.1093/database/baq013.
- DAHLÉN, G., CLAEISSON, R., ABERG, C. H., HAUBEK, D., JOHANSSON, A., & KWAMIN, F. (2014) Subgingival bacteria in Ghanaian adolescents with or without progression of attachments loss. *Journal of Oral Microbiology* **6**, 1-6.
- DEWHIRST, F. E., CHEN, T. & IZARD, J. (2010) The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology* **192(19)**, 5002-5017.
- DEWHIRST, F. E., KLEIN, E. A., BENNETT, M. L., CROFT, J. M., HARRIS, S. J. & MARSHALL-JONES, Z. V. (2015) The feline oral microbiome: a provisional 16S rRNA genes based taxonomy with full-length reference sequences. *Veterinary Microbiology* **175**, 294-303.
- DEWHIRST, F. E., KLEIN, E. A., THOMPSON, E. C., CHEN, T., MILELLA, L., BUCKLEY, C. M. F., DAVIS, I. A., BENNETT, M. L. & MARSHALL-JONES, Z. V. (2012) The canine oral microbiome. *Plos One* **6(4)**, 1-12.
- DÖBEREINER, J., DUTRA, I. S., ROSA, I. V. & BLOBEL, H. (2000) Cara inchada of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependant periodontitis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **20(2)**, 47-64.

- DUNCAN, W. J., PERSSON, G. R., SIMS, T. J., BRAHAM, P., PACK, A. R. C. & PAGE, R. C. (2003) Ovine periodontitis as a potential model for periodontal studies. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 63-72.
- DUTRA, I. S., BOTTEON, R. C. M. & DÖBEREINER, J. (2000). Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerros transferidos para área indene. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **20(2)**, 71-74.
- DUTRA, I. S., KANOE, M. & BLOBEL, H. (1986) Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **6(2)**, 59-63.
- FADDEN, A. N., POULSEN, K. P., VANEGAS, J., MECHAM, J., BILDFELL, R., STIEGER-VANEGAS, S. M. (2015) . Dental pathology in conventionally fed and pasture managed dairy cattle. *Veterinary Record* **178(1)**: 1-7.
- GAETTI-JARDIM JR, E., FARDIN, A. C., GAETTI-JARDIM, E. C., CASTRO, A. L., SCHWEITZER, C. M. & AVILA-CAMPOS, M. J. (2010) Microbiota associated with chronic osteomyelitis of the jaws. *Brazilian Journal of Microbiology* **41**, 1056-1064.
- GRIFFEN, A. L., BEALL, C. J., CAMPBELL, J. H. & FIRESTONE, N. D. (2012) Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *International Society for Microbial Ecology Journal* **6**, 1176-1185.
- HARDAM, J., DREIER, K., WONG, J., SFINTESCU, C. & EVANS, R.T. (2005) Pigmented- anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *Veterinary Microbiology* **106**, 119-128.
- HOLCOMBE, L. J., PATEL, N., COLYER, A., DEUSCH, O., O’FLYNN, C., HARRIS, S. (2014) Early canine plaque biofilms: characterization of key bacterial interactions involved in initial colonization of enamel. *Plos One* **9(12)**: e113744.
- HOLT, S. C. & EBERSOLE, J. L. (2005) *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the ‘red complex’, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000* **38**, 72–122.
- INGHAM, B. (2001) Abattoir survey of dental defects in cull cows. *Veterinary Record* **148**, 739-742.
- KENNEDY, R., LAPPIN, D. F., DIXON, P. M., BUIJS, M. J., ZAURA, E., CRIELAARD, W., O’DONNELL, L., BENNETT, D., BRANDT, B. W. & RIGGIO, M. P. (2016) The microbiome associated with equine periodontitis and oral health. *Veterinary Research* **47**, 49.
- LOVE, D. N., VEKSELSTEIN, R. & COLLINGS, S. (1990) The obligate and facultatively anaerobic bacteria of normal flora of the normal feline gingival margin. *Veterinary Microbiology* **22**, 267-275.

- MAYANAGI, G., SATO, T., SHIMAUCHI, H. & TAKAHASHI, N. (2004) Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiology and Immunity* **19**, 379-385.
- MCCOURTIE, J., POXTON, I. R., SPENCE, J. A. & AITCHISON, G. U. (1989) Preliminary study of the anaerobic bacteria isolated from subgingival plaque from sheep. *Veterinary Microbiology* **21**, 139-146.
- NISHIYAMA, S. A. B., SENHORINHO, G. N. A., GIOSO, M. A. & AVILA-CAMPOS, M. J. (2007) Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens of dogs. *Brazilian Journal of Microbiology* **38**, 23-28.
- NORDHOFF, M., RÜHE, B., KELLERMEIER, C., MOTER, A., SCHMITZ, R., BRUNNBERG, L. & WIELER, L. H. (2008) Association of *Treponema* spp. with canine periodontitis. *Veterinary Microbiology* **27**, 334-342.
- PAGE, R.C. & SCHROEDER, H.E. (1976) Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. *Laboratory Investigation* **33**, 235-249.
- RIGGIO, M. P., LENNON, A., TAYLOR, D. J & BENNETT, D. (2011) Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. *Veterinary Microbiology* **150**, 394-400.
- RIGGIO, P. M., JONSSON, N. & BENNETT, D. (2013) Culture-independent identification of bacteria associated with ovine 'broken mouth' periodontitis. *Veterinary Microbiology* **166**, 664-669.
- RIVIERE, G. R., THOMPSON, A. J., BRANNAN, R. D., MCCOY, D. E. & SIMONSON, L. G. (1996) Detection of pathogen-related oral spirochetes, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii* in dental plaque from dogs. *Journal of Veterinary Dentistry* **13**, 135-138.
- SATO, T. & KURAMITSU, H. K. (2000) Polymerase chain reaction for the detection of *flaA-1* genes of oral spirochetes in human advanced periodontal pockets. *Archives of Oral Biology* **45**, 921-925.
- SOCRANSKY, S.S. & HAFFAJEE, A.D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**, 135-187.
- STURGEON, A., PINDER, S.L., COSTA, M.C. & WEESE, J.S. (2014). Characterization of the oral microbiota of healthy cats using next-generation sequencing. *Veterinary Journal* **201**, 223-229.
- SUZUKI, S., MITANI, A., KOYASU, K., ODA, S. I., YOSHINARI, N., FUKUDA, M., HANAMURA, H., NAKAGAKI, H. & NOGUCHI, T. (2006) A model of spontaneous periodontitis in the miniature goat. *Journal of Periodontology* **77(5)**, 847-855.
- WILLIS, S. G., SMITH, K. S., DUNN, V. L., GAPTER, L. A., RIVIERE, K. H. & RIVIERE, G. R. (1999) Identification of seven *Treponema* species in health and disease-associated dental plaque by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **37(3)**, 867-869.

Figura 1. Análise da diversidade de perfis microbianos bovinos na saúde e na doença periodontal. A: Riqueza observada de espécies ou número de OTUs/amostra. B: Riqueza de espécies estimada ou Chao-1. C: Índice de diversidade de Shannon

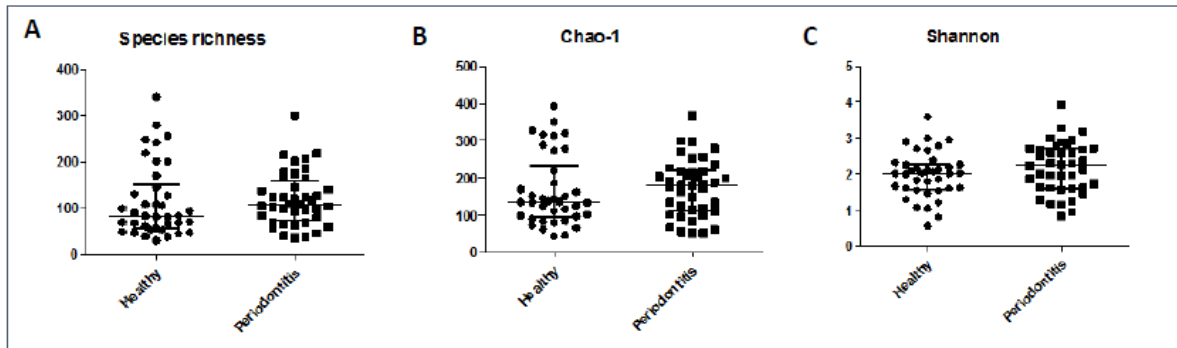
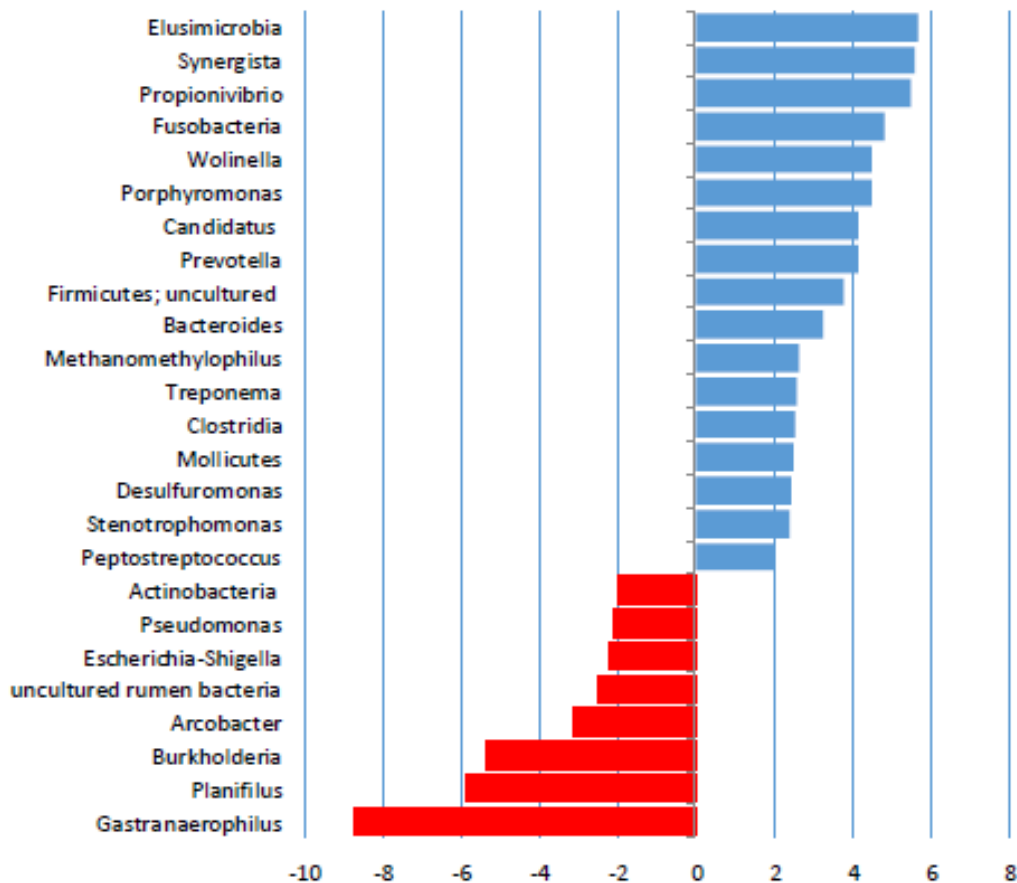


Gráfico 1. Visualização das mais significativas taxa (gênero ou nível maior) que apresentaram diferenças significativas entre o microbioma de bovinos saudios (vermelho) e com periodontite (azul)



## CAPÍTULO 8 – Considerações finais

Embora os bovinos tenham uma importância econômica mundial na indústria de carne e leite, sua dentição não foi tão profundamente investigada como em outras espécies e a doença periodontal tem sido quase que negligenciada por médicos veterinários e cientistas.

Atenção significativa e recursos financeiros são investidos em eficiência reprodutiva, saúde podal, qualidade do leite e condição corporal em rebanhos bovinos, mas a saúde dental raramente é considerada. Isso é peculiar, considerando-se que a importância da mastigação e digestão para ganho de peso e produção de leite é bem conhecida e que a baixa produtividade é a principal causa de descarte de animais do rebanho. Apesar de provavelmente ser subestimada, a periodontite é uma condição crônica dolorosa que pode resultar na dificuldade de mastigação e ruminação, com reflexos negativos na eficiência produtiva do gado de leite e corte. A dor oral pode ter apenas efeitos sutis no comportamento dos bovinos, e assim a doença dental é facilmente ignorada ou não notada.

Estudos anteriores baseados no cultivo microbiológico evidenciaram a presença de grupos específicos de bactérias Gram-negativas não esporuladas, com predominância de *Bacteroides* spp. pigmentados de preto e marrom, sacarolíticos e não sacarolíticos, de *Bacteroides* spp. não pigmentados e fermentativos e de *Fusobacterium nucleatum*. No entanto, os autores relataram a dificuldade de classificar os micro-organismos em nível de espécie, a de manutenção de amostras como cultura pura e o fato de que, muitos dos isolados não apresentaram os perfis microbiológicos semelhantes aos das espécies descritas na literatura.

O presente estudo foi realizado em duas etapas complementares: uma no Brasil e outra na Escócia. Na proposta original foi possível verificar pela PCR que a ocorrência de determinados periodontopatógenos reconhecidos na periodontite humana estão associados com a periodontite bovina, dentre eles algumas espécies de pigmentados de preto dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* e espiroquetas do gênero *Treponema*. Assim, a presença de *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecium*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*,

*Prevotella oralis*, *Treponema denticola* e *Treponema pectinovorum* mostrou associação com as lesões periodontais.

Em estudo realizado na Escócia para verificar a ocorrência de lesões periodontais em animais abatidos, foram examinadas 200 arcadas dentárias, das quais 24 (12%) apresentaram lesões periodontais nos dentes incisivos ou mastigatórios. Os dados deste estudo sugerem que a periodontite pode ser a causa de perda financeira e uma razão para descarte de animais na Escócia.

Do ponto de vista veterinário, o exame dos dentes de bovinos é uma parte essencial de qualquer investigação clínica, seja para estimar idade, seja como possível causa de baixa produtividade. Dentes funcionais são essenciais para a saúde bovina e a otimização da produtividade. Doenças dentárias devem sempre ser consideradas com sinais clínicos como perda de peso ou reduzido ganho de peso, salivação ou perda de conteúdo ruminal e impactação de alimento na bochecha.

Na oportunidade, os fatores de risco associados à doença foram avaliados em um universo de 250 animais abatidos, dos quais 35 apresentavam lesões periodontais e 40 eram periodontalmente sadios. Pela análise de regressão logística foi avaliada a associação entre as variáveis independentes, sexo, idade e raça com periodontite. A idade dos animais foi significativamente associada à presença de lesões periodontais. Para cada ano de idade, um bovino tem 1,53 vezes chances de desenvolver periodontite ( $p < 0,001$ ). A variável sexo não se mostrou significativamente associada à periodontite ( $p = 0,887$ ), enquanto os animais de corte têm 0,36 vezes a chance de desenvolver a doença quando comparados com os de aptidão leiteira.

A análise de regressão logística demonstrou que as lesões periodontais são mais prevalentes com o aumento da idade dos animais. No entanto, suspeita-se que o aumento da idade possa não representar um fator de risco direto para o desenvolvimento da periodontite bovina, mas possa simplesmente refletir a exposição cumulativa ao longo do tempo aos fatores de risco ambientais.

Uma etapa essencial para a compreensão sobre a participação de bactérias na periodontite é a determinação da sua composição qualitativa e quantitativa no sulco gengival e na bolsa periodontal. Na atualidade, é possível determinar quase toda a comunidade de bactérias, tanto comensais quanto potencialmente patogênicas, que

habitam a cavidade oral bovina, tanto na saúde quanto na periodontite, utilizando-se de métodos independentes de cultura.

Na Escócia, amostras de biofilme subgengival de 40 bovinos com periodontite e de 38 periodontalmente sadios foram coletadas e realizou-se o sequenciamento do gene 16S rRNA. O presente estudo é o primeiro a utilizar o sequenciamento para comparar as populações bacterianas presentes na saúde oral e na periodontite bovina e revelou uma dissimilaridade estatisticamente significativa entre as populações bacterianas encontradas nos animais periodontalmente sadios e nos animais com periodontite. Nesse enfoque, representa um avanço considerável sobre o que foi anteriormente documentado para a comunidade microbiana oral de bovinos.

Em animais sadios, os gêneros *Gastranaerophilus*, *Planifilus*, *Burkholderia* e *Arcobacter* foram os mais prevalentes, enquanto *Elusimicrobia*, *Synergista* e *Propionivibrio* foram mais frequentes na microbiota oral de bovinos com periodontite.

Em conclusão, os grupos bovinos avaliados abrigaram perfis microbianos distintos, sendo que as amostras de bovinos afetados periodontalmente foram mais diversas em micro-organismos do que as de bovinos sadios. Nesse contexto, os componentes principais da homeostase bacteriana no biofilme de sítios sadios e a disbiose nas lesões periodontais fornecem indicadores inéditos para a evolução do conhecimento sobre a periodontite bovina.