

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

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MINERAL
DO BIOFILME SUPRAGENGIVAL PIGMENTADO
DE BOVINOS COM PERIODONTITE**

Júlia Rebecca Saraiva

Médica Veterinária

2019

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

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MINERAL
DO BIOFILME SUPRAGENGIVAL PIGMENTADO
DE BOVINOS COM PERIODONTITE**

Júlia Rebecca Saraiva

Orientador: Prof. Dr. Iveraldo S. Dutra

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

2019

S243c	Saraiva, Júlia Rebecca Caracterização estrutural e mineral do biofilme supragengival pigmentado de bovinos com periodontite / Júlia Rebecca Saraiva. -- Jaboticabal, 2019 57 f. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Iveraldo Santos Dutra 1. biofilme dentário. 2. bovinos. 3. espectroscopia de raios X por dispersão de energia. 4. microscopia eletrônica de varredura. 5. periodontite. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

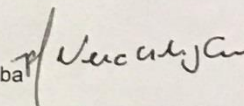
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MINERAL DO BIOFILME SUPRAGENGIVAL PIGMENTADO DE BOVINOS COM PERIODONTITE

AUTORA: JÚLIA REBECCA SARAIVA

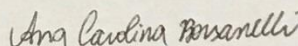
ORIENTADOR: IVERALDO DOS SANTOS DUTRA

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

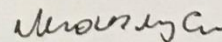
Prof. Dr. IVERALDO DOS SANTOS DUTRA (Videconferência)
Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal / FMVA/UNESP - Araçatuba



Pós-doutoranda ANA CAROLINA BORSANELLI
FMV / Unesp / Araçatuba/SP



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



Jaboticabal, 18 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Júlia Rebecca Saraiva – nascida em São José do Rio Preto, São Paulo, em 14 de março de 1994. Ingressou na Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMV) em 2012 e concluiu o curso pela mesma universidade em 2016. Realizou treinamento técnico nas áreas de Clínica Cirúrgica de Grandes Animais (2014), Enfermidades Infecciosas dos Animais (2015 e 2016), Análises de Alimentos de Origem Animal e Água (2016), Leptospirose (2016) e Zoonoses e Saúde Pública (2016). Possui Iniciação Científica com projeto intitulado “Caracterização da microbiota anaeróbia do sulco gengival de bovinos”, financiado pela FAPESP, Processo nº 2015/00058-4 sob orientação do Professor Titular Iveraldo Santos Dutra, finalizado em 2016.

“Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois a vida é construída nos sonhos e concretizada no amor” (Chico Xavier)

*Dedico esta dissertação
aos meus pais, Joviniano
Saraiva e Rosalva Pereira
Rosa Saraiva, por serem
as mãos, os braços e os
corações onde eu vivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades que me são concedidas diariamente, pela fé infinita, pelos planos que Ele tem para minha vida, pela certeza de que não caminho sozinha e pelo conforto em saber que tudo passa.

Gratidão ao meu orientador Professor Titular Iveraldo Santos Dutra, por pacientemente dedicar momentos de sua vida para ensinar, aconselhar e orientar na execução deste grandioso projeto. Minha imensa gratidão ao aprendizado que levarei sempre comigo. Obrigada!

Agradeço a Doutora Ana Carolina Borsanelli por auxiliar na minha evolução profissional e pessoal; por me acompanhar desde o início e sempre ajudar na realização de todas minhas conquistas. Carol, obrigada pela sua zelosa dedicação em tudo que se propõe a fazer.

Gratidão ao professor Elerson Gaetti-Jardim Júnior pela sua atenciosa contribuição com seus ensinamentos durante a elaboração do presente estudo.

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

Gratidão aos meus amados pais, por serem grandes incentivadores do conhecimento, pelo amor incondicional e por oferecerem o melhor de suas vidas em prol da realização dos meus sonhos. Nada sou, tudo nós, nós eternos.

Gratidão aos meus amados irmãos: Matheus Gabriel Saraiva, Vanessa Santos Saraiva e Rodrigo Santos Saraiva, pelo amor profundo que só os irmãos compartilham em essência.

Gratidão aos meus tios Rinaldo Miguel Martins e Lucimara Pereira Rosa, e aos meus primos Rodolfo Pereira Martins e Maria Eduarda Pereira Martins por serem abrigo e coração em todos os momentos.

Gratidão as grandes amigas e companheiras de equipe que a pós

graduação me trouxe: Juliana Vaccari, Natália Cristina de Souza, Thamiris Naiasha Minari Ramos. Vocês tornaram possível, mais branda e muito melhor esta caminhada.

Agradeço as queridas amigas que a vida colocou em meu caminho: Carolina Eugênia Facion, Paula Milena Venturin, Ana Paula Faria e Marcela Ambrogi. Obrigada por fazerem da nossa convivência um elo de eternas boas lembranças.

Agradeço ao Rafael Belentani, pela paciência, pelo carinho e pelo incentivo em todas as minhas escolhas. Obrigada pelo companheirismo.

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

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

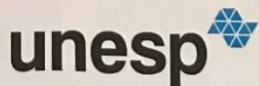
Por fim, agradeço a vida, por ser tão generosa em tantos momentos.

SUMÁRIO

Páginas

CERTIFICADO DE COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O BIOFILME DENTAL ASSOCIADO A PERIODONTITE EM BOVINOS E OUTRAS ESPÉCIES ANIMAIS.....	
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1 Biofilmes e cálculos dentais	3
2.2 Periodontite	7
2.3 Periodontite em humanos e outras espécies animais	8
2.4 Periodontite em bovinos	12
3. Referências	15
CAPÍTULO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DO BIOFILME SUPRAGENGIVAL PIGMENTADO DE BOVINOS COM PERIODONTITE	
Abstract	20
Resumo	21
Introdução	22
Material e Métodos	24
Resultados	26
Discussão	27
Conclusão	33
Agradecimentos	33
Declaração de conflito de interesse	33
Referências	34
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	42

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO

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

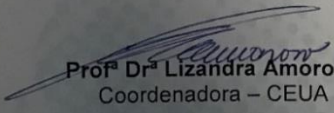
Microbiologia - PCR

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

Microscopia eletrônica de Varredura - Abatedouros

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

Jaboticabal, 05 de outubro de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
 tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MINERAL DO BIOFILME SUPRAGENGIVAL PIGMENTADO DE BOVINOS COM PERIODONTITE

RESUMO – A periodontite é uma infecção multifatorial já descrita em diferentes espécies, dentre elas os ruminantes domésticos. Em bovinos, a doença relaciona-se, dentre outros fatores, a uma microbiota potencialmente patogênica que, em sua maioria, encontra-se alojada no biofilme bucal destes animais. Biofilmes são estruturas organizadas, nas quais os constituintes convivem em cooperativismo metabólico e oferecem benefícios para a sobrevivência da microbiota local. Estas formações podem ser classificadas em supragengivais ou subgengivais, e quando mineralizadas, resultam na formação do cálculo. O cálculo supragengival em bovinos é visualizado como um depósito fortemente aderido ao dente, pigmentado de marrom ou preto que no ser humano e em outras espécies já foi descrito como um fator predisponente às doenças periodontais. O objetivo do presente estudo foi caracterizar estrutural e quimicamente o biofilme supragengival de bovinos utilizando-se das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de dispersão de energia (EDS), respectivamente, e relacionar os achados ao quadro clínico bucal dos animais (presença de periodontite). Foram coletados 11 dentes primeiro-molares de diferentes animais; cinco amostras sem pigmentação visível, e seis amostras pigmentadas de preto, que foram submetidas inicialmente a MEV, e posteriormente, foram selecionadas três áreas aleatórias para realização da EDS. Os resultados da MEV revelaram formações estruturais com presença de áreas irregulares, possivelmente oriundas de depósitos minerais. Os resultados da EDS apontaram associações entre a presença de ferro ($p < 0,014$) e magnésio ($p < 0,001$) com a ocorrência de periodontite. Com relação à pigmentação, carbono ($p < 0,039$), manganês ($p < 0,007$) e ferro ($p < 0,015$) foram os elementos estatisticamente significantes. Os resultados de associação entre os elementos, independente de condição periodontal ou pigmentação, demonstraram associações entre cálcio e fósforo, e entre ferro e silício. As associações

do elemento ferro com periodontite e pigmentação, sugerem possível presença de micro-organismos periodontopatogênicos nestas formações, uma vez que este elemento está intimamente relacionado ao metabolismo bacteriano. Os resultados inéditos do presente trabalho comprovam tratar-se de um biofilme verdadeiro os depósitos pigmentados que se formam na coroa dos dentes de bovinos, e indicam que a presença de biofilme pode atuar como um fator predisponente para etiologia das doenças periodontais.

Palavras-chave: biofilme dentário, bovinos, espectroscopia de raios X por dispersão de energia, microscopia eletrônica de varredura, periodontite.

STRUCTURAL AND MINERAL CHARACTERIZATION OF BLACK PIGMENTED SUPRAGINGIVAL BIOFILM OF BOVINES WITH PERIODONTITIS

ABSTRACT - Periodontitis is a multifactorial infection already existing in different species, among them domestic ruminants. In bovines, this disease is related, among other factors, to a potentially pathogenic microbiota that, for the most part, is housed in the oral biofilm of the animals. Biofilms are organized structures that favor the survival of the local microbiota. Biofilms can be classified as supragingival or subgingival, and when mineralized, they form the dental calculus. The supragingival calculus in bovines is visualized as pigmented brown or black deposit, already described in humans as a predisposing factor to periodontal diseases. The aim of this study was to characterize the structural and chemical the supragingival biofilm of bovines using scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS), respectively, and to relate them to the clinical status of the animals (periodontitis). Eleven premolars teeth were collected; five non-pigmented samples, and six black pigmented samples, were initially submitted to SEM and, subsequently, to EDS. SEM images revealed irregular structures similar to mineral deposits. The EDS results showed a relation between the presence of iron ($p < 0,014$) and magnesium

($p < 0,001$) with the occurrence of periodontitis. Regarding pigmentation, carbon ($p < 0,039$), manganese ($p < 0,007$) and iron ($p < 0,015$) were the statistically significant elements. The results of the comparison between the elements, regardless of the periodontal condition or pigmentation, demonstrated the combinations of calcium and phosphorus, and between iron and silicon dioxide. Associations of the iron element with periodontitis and pigmentation indicate the presence of periodontopathogenic microorganisms in these structures, since this element is closely related to bacterial metabolism. The unpublished results of the present work demonstrate that the biofilm is a true biofilm of the pigmented deposits that form in the crown of the teeth of cattle, and indicate that the presence of biofilm can act as a predisposing factor for the etiology of periodontal diseases.

Keywords: dental biofilm, bovine, energy dispersive X-ray spectroscopy, scanning electron microscopy, periodontitis

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais sobre o biofilme dental associado a periodontite em bovinos e outras espécies animais

1. Introdução

Biofilmes são estruturas heterogêneas formadas por inúmeras espécies microbianas que exibem propriedades benéficas a multiplicação e permanência dos micro-organismos colonizadores. Os constituintes dos biofilmes vivem intimamente associados entre si, exibem meios particulares de comunicação, e a sobrevivência é basicamente caracterizada por relações comensais. Além de beneficiar a permanência dos micro-organismos, os biofilmes também atuam como verdadeiros “escudos” protetores contra fatores ambientais, facilitando a absorção e troca de nutrientes e excreções de produtos metabólicos potencialmente danosos a esta estrutura microbiana.

Devido às características estruturais dos dentes, o acúmulo de biofilme supra e subgingival é um evento natural e sua ocorrência quando em equilíbrio, geralmente não causa danos ao hospedeiro. Entretanto, o acúmulo excessivo de biofilme já foi descrito como um fator predisponente às doenças periodontais nos seres humanos e em algumas espécies animais, uma vez que nos biofilmes bucais além dos micro-organismos comensais, habitam também micro-organismos potencialmente associados à etiologia das doenças periodontais.

A mineralização do biofilme resulta na formação do cálculo dental que é composto principalmente por componentes minerais, inorgânicos e orgânicos. O acúmulo de cálculo dental, é considerado um fator predisponente para etiologia da periodontite em humanos, e nesta espécie, a composição química e estrutural do cálculo dental já foi bem estabelecida. O cálculo dental também oferece informações sobre hábitos alimentares ou sobre o hábitat do indivíduo a partir dos componentes identificados em análises laboratoriais. Em bovinos, a composição do esmalte dental já foi descrita, entretanto a composição

do cálculo ou biofilme supragengival, e a sua relação com a periodontite ainda não foi bem caracterizada.

A periodontite é uma infecção multifatorial desencadeada por uma microbiota disbiótica complexa que resulta em perda dos ligamentos periodontais, reabsorção óssea e consequentemente perda da unidade dental resultante de uma exagerada resposta imune do hospedeiro, responsável por danificar os tecidos adjacentes. O desencadeamento da periodontite está relacionado, dentre outros fatores, a um biofilme disbiótico que atua como um agente iniciador e de permanência de espécies potencialmente periodontopatogênicas.

Nos bovinos, o cálculo/biofilme supragengival pode ser observado como um acúmulo visivelmente pigmentado de marrom ou preto, que se adere a estrutura da coroa clínica dental frequentemente encontrado durante o exame clínico da cavidade bucal dos animais. Em pequenos ruminantes, o biofilme supragengival pigmentado já foi observado em associação com a ocorrência de retração gengival, um dos sinais clínicos clássicos da periodontite, entretanto análises estruturais e químicas destas estruturas dinâmicas em ruminantes ainda não foram bem definidas.

Atualmente, pouco se conhece sobre a composição mineral e estrutural do biofilme supragengival nos animais, especialmente em bovinos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição estrutural e química do biofilme supragengival pigmentado de bovinos e as associações dos elementos encontrados com o quadro clínico destes animais por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de dispersão de energia, respectivamente. Compreender a relação e o papel desta complexa estrutura com a periodontite torna-se um elemento fundamental para elucidação da etiologia, patogênese, controle e profilaxia desta importante enfermidade nos ruminantes.

2. Revisão de literatura

2.1 Biofilmes e cálculos dentais

Biofilmes dentais são estruturas organizadas com capacidade de abrigar inúmeras espécies microbianas que convivem em constante simbiose. A maioria das bactérias possui habilidade em se agregar às estruturas da natureza. Iniciada esta ligação primária ao substrato, o processo de agrupamento de microcolônias é estimulado e uma estrutura organizada e elaborada começa a se formar. Estes complexos são caracterizados pelo arranjo estruturado no qual cada elemento proporciona benefícios em prol da sobrevivência e multiplicação das espécies colonizadoras (Nunes et al., 2007).

O órgão dental é composto por estruturas rígidas, fortemente mineralizadas que se fixam firmemente ao osso alveolar por intermédio da raiz dental e do ligamento periodontal (Gama, 2013). Pela sua estrutura dura e não-descamativa, os dentes oferecem condições ideais para a formação de depósitos bacterianos, que quando ocorrem na coroa clínica do dente, são classificados em biofilme supragengival, e subgengival quando presentes no sulco ou bolsa periodontal (Lang et al., 2010).

A cavidade bucal é composta por uma comunidade microbiana local característica, rica em diversidades e que em condições fisiológicas provém benefícios para o hospedeiro por oferecer os requisitos necessários para que os micro-organismos cresçam e desempenhem suas funções adequadamente. A formação dos biofilmes é consideravelmente rápida em sistemas fluidos, uma vez que fontes de nutrientes são fornecidas às bactérias facilitando a multiplicação e adesão das mesmas (Gristina, 1987; Marshal, 1992), e portanto, as características do ambiente bucal, como temperatura e umidade, possibilitam que uma ampla variedade de micro-organismos, como vírus, micoplasmas, bactérias, fungos e protozoários, consigam se instalar e se multiplicar conferindo um caráter heterogêneo a este ambiente complexo (Marsh et al., 2011).

Estruturalmente, os biofilmes são compostos por microcolônias de células bacterianas associadas a uma matriz delineada, cuja composição predominante é basicamente água e solutos aquosos. Os nutrientes são difundidos por meio de canais de água, sendo o material “seco” uma mistura de exopolissacarídeos (EPS), proteínas, sais e material celular. A vantagem dessa forma de crescimento é que o biofilme oferece às espécies colonizadoras proteção contra micro-organismos competitivos, fatores ambientais (como os mecanismos de defesa do hospedeiro) e substâncias tóxicas que podem estar presentes no meio, como substâncias químicas letais e antibióticos (Socransky e Haffajee, 2010), favorecendo a multiplicação e sobrevivência microbiana.

A superfície dental é revestida primariamente por um filme condicionante denominado película adquirida. A composição básica deste filme é formada por glicoproteínas salivares (mucinas) e anticorpos, e devido a propriedade de alterar a carga e energia livre de superfície, a película adquirida aumenta a eficiência de adesão bacteriana (Nunes et al., 2007). Inicialmente, a colonização é feita por cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, sendo *Streptococcus sanguis* o micro-organismo encontrado em maior número (Lang et al., 2010). Nesse momento, as interações físico-químicas são fracas e de longo alcance caracterizando a adesão reversível (Marsh et al., 2011).

A fase de adesão irreversível é caracterizada por interações entre moléculas específicas presentes nas superfícies de células microbianas e moléculas presentes na película do filme condicionante (Marsh et al., 2011). Bastonetes Gram-positivos gradualmente superam os estreptococos, sendo particularmente *Actinomyces* spp a espécie mais dominante. A partir de então, receptores de superfície presentes nos cocos e bastonetes Gram-positivos, possibilitam a agregação de micro-organismos Gram-negativos conferindo maior heterogeneidade e patogenicidade ao biofilme em formação (Lang et al., 2010).

Outra característica ligada aos biofilmes é a habilidade de comunicação entre as bactérias e microcolônias. O sensor de *quorum* é

realizado através do acúmulo de compostos sinalizadores que intercedem a comunicação intercelular (Prosser, 1999). Essa troca de informações possui potencial de intensificar o crescimento de bactérias benéficas, desestimulando, em contrapartida, o crescimento de espécies competidoras além de atribuir ao biofilme algumas propriedades específicas (Socransky e Haffajje, 2010).

Embora diversas bactérias presentes no biofilme não sejam efetivamente patogênicas, a interação entre elas influencia o processo da doença por oferecerem assistência aos micro-organismos patogênicos contidos no biofilme microbiano. O que se pode inferir a partir disso é que esses supostos micro-organismos “comensais” podem assegurar o potencial de virulência de outros micro-organismos justamente por oferecerem fatores defensivos e condições específicas para a permanência e multiplicação de bactérias periodontopatogênicas (Kinane et al., 2010a).

O processo de mineralização do biofilme resulta na formação do cálculo dental, que pode ser reconhecido como uma massa de coloração que varia do amarelo-acastanhado até o marrom (Figura 1), de dureza moderada, cuja formação depende não somente da quantidade de acúmulo bacteriano, mas também da secreção das glândulas salivares (Lang et al., 2010). Em ruminantes, essa pigmentação pode variar do acastanhado ao marrom esverdeado e negro. Geralmente, o cálculo dental é recoberto por uma camada de micro-organismos metabolicamente ativos que se acumulam tanto em dentes periodontalmente saudáveis, quanto doentes (Friskop e Hammarström, 1980), composto principalmente por componentes orgânicos e inorgânicos (Jin e Yip, 2002). Cálculos recentemente formados e cálculos maduros são constituídos por quatro formas diferentes de cristais de fosfatos de cálcio: bruxita, fosfatos octálcico, hidroxiapatita e fosfato de cálcio (Schroeder, 1969).

Cálcio, fósforo, magnésio, flúor e dióxido de carbono, são os principais componentes identificados no cálculo dental humano (Gron et

al., 1967). Outros elementos podem ser resultantes de outros fatores associados à dieta, ambiente, aos hábitos, grupos étnicos, entre outras condições (Fialová et al., 2017). Fialová et al. (2017) investigaram algumas hipóteses sobre a vida e os hábitos de sepultamento de indivíduos que viveram durante a época medieval (século IX d.C.), e provavelmente na guerra napoleônica (século XIX). Uma das amostras arqueológicas pertencia a um indivíduo que viveu no século IX d.C., provavelmente no início da era medieval. Magnésio, alumínio e silício foram identificados no cálculo dental, sendo estes os principais elementos presentes nas pedras de moagem que eram misturadas a farinha consumida por esta população. Os elementos identificados no cálculo dental podem fornecer informações importantes sobre os costumes e hábitos alimentares do indivíduo.

Estudos anteriores relataram a presença de depósitos pigmentados extremamente aderentes na superfície dental de bovinos. Os autores acreditaram tratar-se de uma placa mineralizada a qual o pigmento teria sido posteriormente incorporado (Miles e Grigson, 1990). Ingham (2001) avaliou as principais alterações odontológicas em vacas de descarte abatidas na Inglaterra. Uma das observações do autor foi o depósito de pigmento marrom ou preto em diferentes graus na maioria das coroas dos dentes mastigatórios, e ocasionalmente nos incisivos. Na ocasião, ainda pouco se conhecia sobre as propriedades destes achados.

O acúmulo de cálculo dental tem como consequência o início de um processo inflamatório nos tecidos moles alterando toda a ecologia local e promovendo ainda mais o crescimento de bactérias Gram-negativas. A disponibilidade de sangue e saliva do líquido gengival associados às interações e trocas de nutrientes entre as bactérias e seus metabólitos, demonstram a formação de uma típica comunidade em que o mutualismo beneficia a permanência, persistência e multiplicação desta microbiota, representando a formação de um biofilme verdadeiro (Lang et al., 2010).

Estudos experimentais (Waerhaug, 1955) e epidemiológicos (Lövdal et al., 1958) demonstraram forte associação entre a presença de cálculo e a periodontite em seres humanos, sendo que a presença de biofilme viável na superfície do cálculo é mais irritante aos tecidos adjacentes do que a própria superfície rugosa do cálculo dental (Socransky, 1970). Bactérias associadas a doença periodontal, encontram no cálculo/biofilme condições favoráveis para sua multiplicação e sobrevivência no ambiente bucal.

Normalmente a relação ecológica entre o hospedeiro e a microbiota bucal não apresenta distúrbios, entretanto um subgrupo de espécies bacterianas pode ser introduzido no local e após multiplicarem-se ou após exibirem novas propriedades, passam a lesionar e provocar a destruição do periodonto (Socransky e Haffajee, 2010). O processo inflamatório altera a homeostase local e estimula respostas imunes específicas do hospedeiro criando condições condescendentes para o crescimento e multiplicação bacteriana (Hajishengalis, 2015).



Figura 1. Cálculo supragengival pigmentado de marrom e preto, aderido aos incisivos de bovino criado extensivamente.

2.2 Periodontite

A periodontite é definida como uma infecção multifatorial causada por um complexo bacteriano geralmente residente no biofilme dental que

possui capacidade de interagir com tecidos e células hospedeiras, acarretando na liberação de uma série de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios responsáveis por causar destruição das estruturas periodontais (Holt e Ebersole, 2005). A enfermidade acomete o periodonto, composto pelos tecidos que suportam e protegem o dente: gengiva, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal (Kuo et al., 2008), e já foi descrita em diversas espécies (Agostinho, 2017; Campelo, 2017; Rober et al., 2008; Gaetti-Jardim Jr et al., 2012; Booij-Vrieling et al., 2010).

A presença de determinados periodontopatógenos, mesmo que em baixas quantidades, no biofilme dental, representa risco para o desenvolvimento de doenças periodontais devido à capacidade de provocar reações inflamatórias e reabsorção óssea mediadas por micro-organismos comensais potencialmente capazes de induzir a doença (Hajishengalis e Lamont, 2012). A transição do estado saúde para doença está associado a alterações de uma comunidade microbiana simbiótica, na sua maioria composta por bactérias facultativas como *Actinomyces* e *Streptococcus*, para uma comunidade disbiótica rica em fatores de virulência e adaptada a desenvolver-se em ambiente inflamatório (Hajishengalis, 2015).

2.3 Periodontite em humanos e outras espécies animais

A boca constitui um habitat rico em variedades microbianas, sendo as bactérias anaeróbias predominantes na microbiota humana e animal (Goldstein et al., 1984). Socransky et al. (1998) avaliaram mais de 13.000 amostras de biofilme subgengival de humanos utilizando a técnica de *checkerboard DNA-DNA hibridização* para demonstrar a presença de grupos microbianos específicos no biofilme dental. Foram reconhecidos seis grupos de espécies bacterianas intimamente relacionadas, sendo os micro-organismos compreendidos nos complexos laranja e vermelho considerados os principais agentes etiológicos das doenças periodontais.

Esses complexos basais possuem receptores com capacidade de gerar condições ecológicas para a inserção das bactérias do complexo laranja composto por *Streptococcus constellatus*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* e *Fusobacterium periodonticum*, envolvidas com a patogênese das doenças periodontais. O complexo laranja precede e cria condições para a implantação do complexo vermelho, formado por *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Os micro-organismos do complexo vermelho são apontados como os agentes etiológicos da periodontite crônica, sendo associados ao aumento de profundidade de bolsa e ao sangramento à sondagem (Socransky et al., 1998).

O acúmulo de biofilme dental induz a gengivite, que quando não tratada pode evoluir para a apresentação crônica da enfermidade. Na maioria dos casos a exposição prolongada ao biofilme e cálculo é um fator determinante para o desenvolvimento da forma crônica (Kinane et al., 2010b) que acomete aproximadamente 30% dos adultos. Destes, cerca de 7 a 13% apresentam a forma severa da doença (Nares, 2003).

Em indivíduos periodontalmente saudáveis, os micro-organismos Gram-positivos são predominantes no biofilme supragengival, em especial bactérias dos gêneros *Actinomyces* spp., *Streptococcus* spp., e *Capnocytophaga* spp. Bactérias Gram-negativas, como as pertencentes aos gêneros *Veillonella* spp. e *Prevotella* spp. *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* também são identificadas em sítios saudáveis, porém em menores quantidades (Darout, 2014). O acúmulo bacteriano sobre os dentes induz a uma resposta inflamatória nos tecidos moles, e sua remoção resulta no desaparecimento dos sinais clínicos (Socransky e Haffajee, 2002; Lang et al., 2010).

Em cães, os gêneros identificados na microbiota bucal são semelhantes aos encontrados nos humanos, porém com particularidades próprias da espécie (Elliot et al., 2005). Rober et al. (2008) avaliaram por

meio da técnica de hibridização DNA-DNA a composição da microbiota bucal em diferentes áreas da boca de cães com periodontite. Os resultados demonstraram que no habitat subgengival as proporções de *Prevotella intermedia*, *Streptococcus constellatus*, *Campylobacter rectus* e *Campylobacter showae* são significativamente maiores, enquanto que no biofilme supragengival, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* são mais prevalentes (Rober et al., 2008). O acúmulo de cálculo dental em cães é apontado como um fator predisponente ao desencadeamento da periodontite (Gawor et al., 2006; Marshal et al., 2014), e ainda, a interrupção de procedimentos de higiene bucal em algumas raças contribuem para o desenvolvimento de diferentes níveis da doença (Marshal et al., 2014).

Campello (2017) associou a ocorrência de periodontite à presença de biofilme supragengival e identificou os patógenos potenciais nas lesões periodontais de cabras leiteiras. Os resultados demonstraram forte correlação do grau do biofilme supragengival ao início e progressão da periodontite. No biofilme subgengival desses animais foram identificados *Fusobacterium nucleatum* (81,8%), *Tannerella forsythia* (63,0%), *Fusobacterium necrophorum* (63,0%), *Porphyromonas gingivalis* (18,0%), *Treponema denticola* (13,6%), *Prevotella melaninogenica* (9,0%), bem como outros potenciais periodontopatógenos comumente encontrados na microbiota bucal de humanos e animais.

As análises estatísticas do estudo de Campello (2017) demonstraram forte correlação entre o escore do biofilme supragengival e maior grau de recessão gengival, um dos principais sinais clínicos da periodontite, sendo mais frequente em dentes mastigatórios. Agostinho (2017) relatou as mesmas semelhanças entre presença de biofilme supragengival e retração gengival em ovinos (Figura 2). Na oportunidade, foi possível observar que animais mais velhos apresentaram maiores quantidades destes depósitos microbianos.

Em ovinos, estudos microbiológicos do biofilme bacteriano

presente em bolsas periodontais revelaram a presença de uma microbiota complexa com frequente isolamento de bactérias pigmentadas de preto, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum* e *Fusobacterium naviforme* (Friskén et al., 1989; McCourtie et al., 1990). Duncan et al. (2003) detectaram *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* em lesões de ovinos com periodontite. Assim, demonstrou-se que a microbiota bucal de ovinos com periodontite é compatível com a encontrada na periodontite humana (Friskén et al., 1989; Ismael et al., 1989; McCourtie et al., 1990).

Borsanelli et al. (2017) detectaram bactérias dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* em lesões de ovinos com periodontite pela técnica de reação em cadeia da polimerase. Em animais com periodontite, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella buccae*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* foram as espécies mais predominantes. Em animais saudáveis, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella oralis* foram os micro-organismos mais prevalentes. Bactérias anaeróbicas pigmentadas de preto, especialmente as dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* são frequentemente isoladas em humanos (Darout 2014), cães, (Riggio et al., 2011), e gatos com periodontite (Booij-Vrieling et al., 2010).



Figura 2. Cálculo supragengival em ovino com presença de retração gengival nas pinças e primeiros-médios, importante sinal clínico da periodontite.

Equinos são frequentemente acometidos por doenças periodontais, que se caracterizam pela condição dolorosa e comprometimento da mastigação e do bem-estar animal (Kennedy et al., 2016). A progressão da doença modifica a composição da microbiota bucal basicamente formada por cocos e bastonetes gram-positivos, para uma microbiota mista com aumento das populações de bactérias anaeróbias gram-negativas (Klug, 2006). Perfis microbianos distintos são observados no microbioma de equinos saudáveis e com periodontite. Os gêneros *Gemella* e *Actinobacillus* são mais detectados em cavalos saudáveis, enquanto que em equinos com quadros de periodontite *Prevotella* e *Veillonella* são os gêneros mais encontrados (Kennedy et al., 2016).

2.4 Periodontite em bovinos

A periodontite bovina ficou popularmente conhecida como “cara inchada” especialmente diante do cenário epidemiológico das décadas de 1970 e 1980, período marcado por grandes prejuízos econômicos decorrentes da enfermidade nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte do Brasil, na abertura de áreas com vegetação natural de mata e cerrado (Döbereiner et al., 2004). Bovinos com periodontite podem apresentar abaulamento facial decorrente de periostite crônica ossificante (Döbereiner et al., 2000), (fato este que justifica o termo “cara inchada”), e frequentemente animais em fase de dentição são os mais acometidos (Döbereiner et al., 1974). Atualmente, a expressão “cara inchada” vêm se tornando pouco utilizada e um modelo mais atual de caracterização desta enfermidade em bovinos está sendo gradualmente estabelecido.

A etiologia da periodontite em bovinos relaciona-se, dentre outros fatores, à presença de bactérias anaeróbias no biofilme dental dos animais e a um fator alimentar associado a abertura de novas áreas e reforma de pastagens (Döbereiner et al., 1974; Dutra et al., 1993). Caracteriza-se por ocorrer em episódios, declinando naturalmente em períodos variáveis de tempo, e reincide em determinadas áreas após a reforma de pastagem ou quando os animais são alimentados com

forrageiras cultivadas em locais anteriormente endêmicos para a doença (Dutra et al., 1993). Inicialmente a ideia equivocada de que a “cara inchada” era causada por deficiência ou desequilíbrio mineral foi amplamente difundida, entretanto não há evidências que relacione essa enfermidade com deficiência mineral (Döbereiner et al., 2004).

As lesões geralmente iniciam-se entre os segundos e terceiros pré-molares maxilares, resultando em formação de bolsa periodontal que acumulam restos alimentares e material untuoso de mau cheiro, característico do envolvimento de bactérias anaeróbias Gram-negativas que podem ser isoladas a partir destas lesões. A destruição dos alvéolos decorre do processo inflamatório na gengiva marginal, que leva ao afrouxamento e perda dos dentes. Em casos avançados, os animais podem apresentar mau estado nutricional devido a incapacidade de se alimentar adequadamente e podem morrer por inanição (Dutra et al., 1993).

Döbereiner et al. (1975) e Dutra et al. (2000) observaram que ao transferirem bovinos de diferentes idades com lesões periodontais para áreas consideradas livres da doença, os animais apresentavam desaparecimento dos sinais clínicos, com cicatrização das bolsas periodontais, desaparecimento do odor fétido bucal, regressão do abaulamento facial e recuperação do estado nutricional. Neste contexto, Dutra et al. (2000) avaliaram a modificação da microbiota anaeróbia de lesões periodontais de bezerros e após remissão da sintomatologia clínica da doença quando foram transferidos para áreas indenizadas. Nas bolsas periodontais, a porcentagem média de bactérias pigmentadas de preto foi de 71,3% da microbiota total cultivada em anaerobiose e em meio de cultura específico. Nos mesmos animais, após epitelização das lesões e cura clínica, a porcentagem reduziu para 1,7%. Baseado na modificação quantitativa dos possíveis periodontopatógenos, especialmente bactérias formadoras de colônias pigmentadas de preto e de suas particularidades epidemiológicas, os autores sugeriram tratar-se de uma enfermidade multifatorial.

Blobel et al. (1984) detectaram *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides bivius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Corynebacterium pyogenes* e *Actinomyces israeli* em lesões de periodontite bovina determinados pelas suas características bioquímicas e morfo-tintoriais utilizando-se de técnicas de cultivo.

Dentre os anaeróbios Gram-negativos pigmentados de preto, espécies dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* também foram identificadas em bovinos. Em animais com periodontite, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Prevotella intermedia* foram mais prevalentes nos sítios com lesões, enquanto que em sítios saudáveis *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella loescheii* são mais frequentes (Borsanelli et al., 2015a). Bactérias do gênero *Treponema* também foram identificadas em bovinos com periodontite. Assim, nos sítios com lesão periodontal, *Treponema amylovorum* (73%), *T. denticola* (42,3%) e *Treponema maltophilum* (54%), foram detectados, sendo os mesmos micro-organismos detectados em sítios saudáveis porém em frequência menor (Borsanelli et al., 2015b).

Na microbiota subgengival de bovinos saudáveis, *Gastranaerophilus*, *Planifilus*, *Burkholderia* e *Arcobacter* são as taxa mais prevalentes, enquanto que em animais com periodontite *Propionivibrio*, *Wolinella*, *Porphyromonas*, *Candidatus*, *Prevotella*, *Firmicutes* (não cultivável), *Bacteroides* e *Treponema* são as taxa mais prevalentes. Embora os perfis microbianos sejam diferentes segundo a condição clínica, animais com periodontite apresentam maiores diversidades ecológicas em sua composição (Borsanelli et al., 2018).

O ambiente subgengival é rico em mediadores imunes e inflamatórios e proporciona desafios e oportunidades únicas para as bactérias. A presença de determinados periodontopatógenos, mesmo que em baixas quantidades, representa risco para o desenvolvimento de doenças periodontais, devido à capacidade de provocar reações inflamatórias e reabsorção óssea mediadas por micro-organismos comensais potencialmente capazes de induzir a doença (Hajishengalis e

Lamont, 2012). Mesmo sabendo que as infecções bucais ocorrem de maneira similar nos animais e nos seres humanos, estudos sobre composição microbiológica, estrutural e química do biofilme dental supragengival de animais ainda não foram bem investigadas (Williams et al., 2011).

3. Referências

Agostinho SD (2017) **Periodontite e desgaste dentário em ovinos**. 78 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Blobel H, Döbereiner J, Lima FGF, Rosa IV (1984) Bacterial isolations from “cara inchada” lesions of cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 4:73-77.

Booij-Vrieling HE, Van Der Reijden WA, Houwers DJ, De Wit WEAJ, Bosch-Tijhof CF, Penning LC, Van Winkelhoff AJ, Hazewinkel HAW (2010) Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners. **Veterinary Microbiology** 144:147-152.

Borsanelli AC, Gaetti-Jardim Jr E, Döbereiner J, Dutra IS (2015b) *Treponema denticola* in microflora of bovine periodontitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 35:237-240.

Borsanelli AC, Gaetti-Jardim Jr E, Schweitzer CM, Döbereiner J, Dutra IS (2015a) Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 35:829-834.

Borsanelli AC, Gaetti-Jardim Jr E, Schweitzer CM, Viora L, Busin V, Riggio MP, Dutra IS (2017) Black-pigmented anaerobic bacteria associated with ovine periodontitis. **Veterinary Microbiology** 203:271-274.

Borsanelli AC, Lappin DF, Viora F, Bennett D, Dutra IS, Brandt BW, Riggio MP (2018) Microbiomes associated with bovine periodontitis and oral health. **Veterinary Microbiology** 218:1-6.

Campello PL (2017) **Periodontite e desgaste dentário em cabras leiteiras**. 111f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Darout IA (2014) Oral bacteria interactions in periodontal health and disease. **Journal of Dentistry and Oral Hygiene** 6:51-57.

Döbereiner J, Chaves JA, Rosa IV, Houser RH (1975) Efeito da transferência de bovinos com “cara inchada” (doença peridentária) para pastos de região indene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 10:99-103.

Döbereiner J, Dutra IS, Rosa IV (2004) A etiologia da “cara inchada”, uma periodontite enzoótica dos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 24:50-56.

Döbereiner J, Dutra IS, Rosa IV, Blobel H (2000) Cara inchada of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependant periodontitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 20:47-64.

Döbereiner J, Inada T, Tokarnia CH (1974) “Cara inchada”, doença peridentária em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 9:63-85.

Duncan WJ, Persson GR, Sims TJ, Braham P, Pack ARC, Page RC (2003) Ovine periodontitis as a potential model for periodontal studies. **Journal of Clinical Periodontology** 30:63-72.

Dutra IS, Botteon RCM, Döbereiner J (2000) Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerros transferidos para área indene. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 20:71-74.

Dutra IS, Matsumoto T, Döbereiner J (1993) Surtos de periodontite em bezerros (“cara inchada”) associados ao manejo do solo. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 13:1-4.

Elliot DR, Wilson M, Buckley MF, David AS (2005) Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **Journal of Clinical Microbiology** 43:5470-5476.

Fialová D, Skoupý R, Drozdová E, Paták A, Piños J, Sín L, Beňus R, Klíma B (2017) The application of scanning electron microscopy with energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX) in ancient dental calculus for the reconstruction of human habits. **Microscopy Microanalysis** 23:1207-1213.

Friskén KW, Laws AJ, Tagg JR, Orr MB (1989) Environmental influences on the progression of clinical and microbiological parameters of sheep periodontal disease. **Research Veterinary Sciences** 46:147-152.

Friskopp J, Hammarström L (1980) A comparative scanning electron microscopic study of supragingival and subgingival calculus. **Journal of Periodontology** 51:553-562.

Gaetti-Jardim Jr E, Monti LM, Ciesielski FIN, Gaetti-Jardim EC, Okamoto AC, Schweitzer CM, Avila-Campos MJ (2012) Subgingival microbiota from *Cebus paella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions. **Anaerobe** 18:263-269.

Gama P (2013) Trato digestivo. In.: Junqueira LCU, Carneiro J (Eds.) **Histologia básica: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 279-310.

Gawor JP, Reiter AM, Jodkowska K, Kurski G, Wojtacki MP, Kurek A (2006) Influence of diet on oral health in cats and dogs. **Journal of Nutrition** 136:20215-20235.

Goldstein EJC, Citron DM, Finegold SM (1984) Role of anaerobe bacteria in bite-wounds infection. **Reviews of Infectious Diseases** 6:177-183.

Gristina AG (1987) Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. **Science** 237:1588-1595.

Gron P, Van Campen GJ, Lindstrom I (1967) Human dental calculus. Inorganic chemical and crystallographic composition. **Archives Oral Biology** 12:829-837.

Hajishengalis G (2015) Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology** 15:30-44.

Hajishengalis G, Lamont RJ (2012) Beyond the red complex and into more complexity the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) modelo f periodontal disease etiology. **Molecular Oral Microbiology** 27:409-419.

Holt SC, Ebersole JL (2005) *Porphyromonas gingivalis*, *Treponem denticola* and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontology** 2000 38:72-122.

Ingham B (2001) Abbatoir survey of dental defects in cull cows. **Veterinary Research** 148:739-742.

Ismael MO, Greenman J, Morgan K, Glover MG, Rees AS, Scully C (1989) Periodontitis in sheep: a model for human periodontal disease. **Journal of Periodontology** 60:279-284.

Jin Y, Yip HK (2002) Supragingival calculus: formation and control. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine** 13:426-441.

Kennedy R, Lappin DF, Dixon PM, Buijs MJ, Zaura E, Crielaard W, O'Donnell L, Bennett D, Brandt BW, Riggio MP (2016) The microbiome associated with equine periodontitis and oral health. **Veterinary Research** 47:49.

Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J (2010a) Patogênese da periodontite, In.: Lindhe J, Lang NP, Karring T (Eds.) **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.271-291.

Kinane DF, Lindhe J, Trombelli J (2010b) Periodontite crônica. In.: Lindhe J, Lang NP, Karring T (Eds.) **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 402-409.

Klug DO (2006) A review of equine periodontal disease. **Dentistry, Surgery, and Lameness** 52:551-558.

Kuo L, Polson AM, Kang T (2008) Association between periodontal disease and systemic diseases: A review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. **Public Health** 122:417-433.

Lang NP, Mombelli A, Attström R (2010) Biofilmes e cálculos orais. In.: Lindhe J, Lang NP, Karring T (Eds.) **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 173-196.

Lövdal A, Arnö A, Waerhaug J (1958) Incidence of clinical manifestation of periodontal disease in light of oral hygiene and calculus formation. **Journal of the American Dental Association** 56:21-33.

Marsh PD, Moter A, Devine DA (2011) Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. **Periodontology** 2000 55:16-35.

Marshall KC (1992) Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. **American Society of Microbiology News** 58:202-207.

Marshall MD, Wallis CV, Milella L, Colyer A, Tweedie AD, Harris SA (2014) Longitudinal assessment of periodontal disease in 52 miniature schnauzers. **BMC Veterinary Research** 10:1-13.

McCourtie J, Poxton IR, Brown R, Whittaker CR, Spence JA, Aitchison GU (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.

Miles AEW, Grigson C (Eds.) (1990) Colyer's variation and diseases of the teeth of animals. Cambridge: Cambridge University Press, 672p.

Nares S (2003) The genetic relationship to periodontal disease. **Periodontology 2000** 32:36-49.

Nunes MCP, Casati MZ, Villalpando KT, Cirano FR (2007) Contribuição do estudo do biofilme dentário para o tratamento das doenças periodontais. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde** 25:55-61.

Prosser JL (1999) Quorum sensing in biofilms. In.: Newman HN, Wilson M (Eds.) **Dental Plaque Revisited** Cardiff: Bioline, p. 79-88.

Riggio MP, Lennon A, Taylor DJ, Bennet D (2011) Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary Microbiology** 150:394-400.

Rober M, Quirynen M, Haffajee AD, Schepers E, Teughels W (2008) Intra-oral microbial profiles of beagle dogs assessed by checkerboard DNA-DNA hybridization using human probes. **Veterinary Microbiology** 127:79-88.

Schroeder HE (1969) Formation and inhibition of dental calculus. **Journal of Periodontology** 40:643-646.

Socransky SS (1970) Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. **Journal of Dental Research** 49:203-222.

Socransky SS, Haffajee AD (2002) Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000** 28:12-55.

Socransky SS, Haffajee AD (2010) Infecções periodontais. In.: Lindhe J, Lang NP, Karring T (Eds.) **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 197-254.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology** 25:134-144.

Waerhaug J (1955) Microscopy demonstration of tissue reaction incident to removal of dental calculus. **Journal of Periodontology** 26:26-29.

Williams DW, Lewis MAO, Percival SL, Kuriyama T, Silva S, Riggio MP (2011) Role of biofilms in the oral health of animals. In.: Percival S, Knottenbelt D, Cochrane C (Eds.) **Biofilms and Veterinary Medicine**. Berlin: Springer, p. 129-142.

CAPÍTULO 2 - Composição química e estrutural do biofilme supragengival pigmentado de bovinos com periodontite¹

Júlia Rebecca Saraiva², Marcelle Marie Buso Ramos³, Ana Carolina Borsanelli⁴, Christiane M. Schweitzer⁵, Elerson Gaetti-Jardim Júnior⁶, José Francisco Höfling⁷, Thamiris Naiasha Minari Ramos², Iveraldo S. Dutra⁸

Abstract. – Saraiva J.R., Buso-Ramos M.M., Borsanelli A.C., Schweitzer C.M., Gaetti-Jardim Jr. E., Höfling J.F., Ramos T.N.M., Dutra I.S. **(Chemical and structural composition of bovine black pigmented supragingival biofilm with periodontitis).** Composição química e estrutural do biofilme supragengival pigmentado de bovinos com periodontite. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0): 00-00. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal. Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana 793, Cx. Postal 533, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil. E-mail: iveraldo.dutra@unesp.br

Bovine periodontitis is a multifactorial disease associated primarily with a potentially pathogenic microbiota housed in the oral biofilm of animals. Biofilms are organized structures, in which the constituents coexist in symbiosis, already described elsewhere as a predisposing factor to periodontitis. The objective of the present study was to characterize the structure and chemically the bovine black pigmented supragingival biofilm with the use of scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS), respectively, and its relation with bovine periodontitis. Eleven premolar teeth of different animals were evaluated; five samples no pigmented, and six samples with black pigmented biofilm, were initially submitted to SEM, and later, three areas were selected for EDS. The structure of the pigmented biofilm is more complex and irregular due to a higher content of mineral elements. The semi-quantitative EDS data indicated an association of iron ($p < 0,014$) and magnesium ($p < 0,001$) with the occurrence of periodontitis. Carbon, phosphorus, calcium, manganese, sodium and potassium are not associated with periodontitis. Regarding pigmentation, carbon ($p < 0,039$), manganese ($p < 0.007$) and iron ($p < 0.015$) were the statistically significant elements, whereas phosphorus, calcium and magnesium are not associated with pigmentation. Results of Spearman test showed correlation between the elements calcium and phosphorus, and iron and silicon. The strong association of iron in the pigmented supragingival biofilm and with the occurrence of periodontitis suggest the presence of microorganisms that use this element in its metabolism and which are associated with bovine periodontitis. The unpublished results of the present work suggest that the pigmented deposits that form in the crown

of the teeth of cattle are a true biofilm with the deposition of iron, and indicate that the presence of iron and magnesium in these formations may be involved in the metabolism of some microorganisms associated with the etiology of bovine periodontitis.

INDEX TERMS: supragingival biofilm, bovine, periodontitis, iron, magnesium, scanning electron microscopy, energy dispersive spectroscopy

RESUMO.- A periodontite bovina é uma infecção multifatorial associada primariamente à microbiota potencialmente patogênica presente no biofilme bucal. Biofilmes são estruturas organizadas, nas quais os constituintes convivem em simbiose, descritos em outras espécies como um fator predisponente à periodontite. O objetivo do presente estudo foi caracterizar estrutural e quimicamente o biofilme supragengival pigmentado de preto em bovinos, utilizando-se as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de dispersão de energia (EDS), respectivamente, correlacionando os elementos identificados à ocorrência de periodontite e pigmentação. Foram avaliados 11 dentes primeiro-molares; cinco amostras sem pigmentação visível e seis amostras com biofilme pigmentado de preto, que foram submetidas inicialmente à MEV; posteriormente foram selecionadas três áreas aleatórias de cada dente para realização da EDS. A estrutura do biofilme pigmentado revelou formações irregulares e mais complexas, provavelmente devido ao maior acúmulo de elementos minerais. Os resultados semi-quantitativos da EDS apontaram associações entre a presença de ferro ($p < 0,014$) e magnésio ($p < 0,001$) com a ocorrência de periodontite. Carbono, fósforo, cálcio, manganês, sódio e potássio não apresentaram associação com a periodontite. Em relação à pigmentação, carbono ($p < 0,039$), manganês ($p < 0,007$) e ferro ($p < 0,015$) foram os elementos estatisticamente significantes, enquanto fósforo, cálcio e magnésio não apresentaram associação com a pigmentação. O teste de correlação de Spearman demonstrou associações entre os elementos cálcio e fósforo, e ferro e silício. A forte associação do ferro presente no biofilme supragengival com a ocorrência de periodontite, sugere a presença de micro-organismos que utilizam este elemento em seu metabolismo e que possivelmente tenham envolvimento com o desenvolvimento da periodontite bovina. Os resultados inéditos do presente trabalho sugerem que os depósitos pigmentados que se formam na coroa dos dentes de bovinos tratam-se de um biofilme verdadeiro com deposição de ferro, e indicam que a presença de ferro e magnésio nestas formações podem estar envolvidos no metabolismo de alguns dos principais micro-organismos associados à etiologia da periodontite bovina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: biofilme supragengival, bovinos, periodontite, ferro, magnésio, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de dispersão de energia

INTRODUÇÃO

Biofilmes dentais são estruturas dinâmicas e complexas que se formam no esmalte dental por meio da colonização organizada de múltiplas espécies microbianas do ambiente bucal (Kolenbrander et al. 2002). Classificam-se quanto ao local em que se formam em biofilmes subgengivais, quando no sulco ou bolsa periodontal, e supragengivais, quando se formam sobre a coroa clínica dos dentes (Kolenbrander et al. 2010). Além de atuarem na manutenção da saúde bucal, algumas das espécies bacterianas constituintes dos biofilmes desempenham importante função na etiologia das doenças periodontais em humanos (Hojo et al. 2009; Akcali & Lang 2017) e animais (Elliot et al. 2008, Rober et al. 2008, Gaetti-Jardim Jr et al. 2012, Agostinho 2017, Campelo 2017).

As periodontites são infecções multifatoriais associadas a complexos bacterianos peculiares, capazes de interagir com tecidos e células hospedeiras, acarretando na liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios responsáveis por causar destruição das estruturas periodontais (Holt & Ebersole 2005, Hajishengalis 2015). Esses grupos microbianos são anfibióticos, estabelecendo diferentes tipos de relações ecológicas entre si (Marsh et al. 2011), e ocupando nichos ecológicos no sulco gengival saudável e bolsas periodontais (Bosshardt 2017). A interação entre esses grupos microbianos específicos, principalmente os bastonetes anaeróbios Gram-negativos, e as condições ambientais necessita de maiores esclarecimentos, uma vez que em bovinos, a periodontite é mais prevalente em animais que permanecem em áreas recém-formadas, ou que passaram por processo de reforma de pastagem (Dutra et al. 1986, Dutra & Döbereiner 2001). Em lesões periodontais de bezerros, a porcentagem média de bactérias pigmentadas de preto é consideravelmente maior quando comparada aos valores médios de porcentagem dos mesmos animais após serem transferidos para áreas indenes e apresentarem remissão de sintomatologia clínica da periodontite (Dutra et al. 2000). A enfermidade

não ocorre sem micro-organismos constituintes comuns da microbiota, que em sua maioria são encontrados no biofilme bucal destes animais.

No microbioma subgengival de bovinos saudáveis, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Actinobacteria* são os gêneros mais prevalentes, enquanto que em animais com periodontite bactérias dos gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Fusobacterium* são mais frequentes (Borsanelli et al. 2018). A diversidade do biofilme microbiano aumenta com a periodontite, mas não estão esclarecidos os fatores que levam às alterações teciduais e as possíveis características bioquímicas estruturais do biofilme bucal em animais com diferentes condições periodontais.

O processo de acúmulo e mineralização do biofilme dental resulta na formação do cálculo, e nos ruminantes geralmente é visualizado como um acúmulo com pigmentação que varia do castanho ao preto fortemente aderido à superfície dental. Em vacas, este cálculo foi descrito recobrendo extensões variadas dos dentes mastigatórios. Entretanto na ocasião pouco se conhecia sobre o papel desempenhado pelo cálculo dental no estabelecimento e progressão da periodontite (Ingham 2001). Em pequenos ruminantes, o cálculo supragengival pigmentado de preto foi descrito como um achado comum e associado à ocorrência de recessão gengival (Agostinho 2017, Campello 2017).

Em humanos, os principais componentes identificados no cálculo dental são cálcio, magnésio, flúor e dióxido de carbono (Gron et al. 1967, Fialová et al. 2017) que podem estar associados com outros compostos oriundos do ambiente, dieta e hábitos (Fialová et al. 2017). Em bovinos, as propriedades físico químicas do esmalte dental foram bem caracterizadas; oxigênio, cálcio e fósforo, aparecem em maiores concentrações, justamente os principais constituintes dos cristais de hidroxiapatita (Nogueira et al. 2014). Entretanto, estudos sobre a estrutura e composição química do biofilme supragengival em bovinos e sua correlação com a periodontite, são relativamente limitados.

Compreender a ecologia desta complexa estrutura e a sua relação com a periodontite é uma importante etapa para avanços no conhecimento sobre a etiologia, patogênese, controle e profilaxia desta enfermidade nos bovinos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar estrutural e quimicamente o biofilme supragengival pigmentado de preto e sua possível relação com quadros de periodontite em bovinos utilizando-se de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de dispersão de energia (EDS), respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras. Foram coletados 11 dentes primeiros molares superiores de diferentes bovinos; cinco sem pigmentação visível, e seis com biofilme visualmente pigmentado de preto (Figura 1). Os espécimes foram coletados de animais com idade média de 36 meses, provenientes de abatedouro da região de Araçatuba, São Paulo. Foram obtidas informações como sexo, local de origem, dieta, alterações dentárias e idade aproximada de cada animal. A condição periodontal foi estabelecida após sondagem da margem gengival de todos os dentes. Foram considerados animais com periodontite aqueles que apresentaram bolsa periodontal com profundidade superior a 5mm. Para extração dental, a área entre pré-molar e segundo molar foi isolada e posteriormente a mucosa gengival do primeiro-molar foi afastada com um destaca perióstio de Molt. Os dentes foram extraídos do osso alveolar com auxílio de cinzel de bixel simples e martelo de Mead. A coleta das amostras foi realizada até 30 minutos após o abate para preservar a estrutura do biofilme formado na superfície vestibular do primeiro molar superior.

Preparo das amostras. Após a extração, a raiz dental foi seccionada e a coroa clínica das amostras apresentavam largura máxima de 12mm, com altura e comprimento inferiores a 30mm. Em seguida, as amostras foram preparadas afim de retirar os debris de matéria orgânica.

Inicialmente, foram lavadas duas vezes com 300µL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) e em seguida, após a secção da raiz dos dentes, o biofilme das coroas foi fixado com 1mL de glutaraldeído a 2% por 30 minutos em temperatura ambiente. O biofilme da superfície das coroas dos dentes foi desidratado com banhos sequenciais de etanol (1mL), nas concentrações de 50%, 70%, 90% e etanol absoluto por 10 minutos em cada concentração. Após a desidratação e secagem, as amostras foram armazenadas em recipiente contendo sílica para controle de umidade (Santana et al. 2013, com modificações).

Caracterização estrutural pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise da composição mineral pela espectroscopia de dispersão de energia (EDS). Para a análise semi-quantitativa de composição mineral do biofilme de bovinos por EDS, as coroas dos primeiros molares foram fixadas com fita dupla-face de carbono em “stub” de resina acrílica incolor e receberam uma cobertura de carbono (Denton Vacuum Desk II). As imagens dos biofilmes com e sem pigmentação da região cervical da face vestibular dos primeiros molares foram capturadas pelo microscópio eletrônico de varredura JSM-5600 (Jeol, Tóquio, Japão) com aumentos de 100x e de 3000x. Com o ajuste de parâmetros do software da Jeol (Spot-size entre 28-32nm e PHA dead time ideal entre 20-25%) no aumento de 3000x, as imagens de MEV foram transferidas para a microanálise de EDS (Energy-dispersive X-ray analysis - Vantage, Noran Instruments, Middleton, WI, USA). Na imagem capturada com aumento de 3000x, foram selecionadas aleatoriamente três áreas de 81µm² cada da superfície cervical das amostras, as quais foram bombardeadas com elétrons de alta energia permitindo a detecção dos raios-X dispersivos e avaliação do perfil de absorção característico de cada elemento químico; possibilitando com isso uma análise semi-quantitativa. Cada espectro de absorção foi capturado durante 100 segundos a 15 kV de voltagem e distância de trabalho de 32 mm. Ao final, foram realizadas médias e desvio-padrão dos minerais registrados.

Análise estatística. Os valores semi-quantitativos dos elementos minerais foram correlacionados com a condição clínica (periodontite ou periodonto saudável), e com a presença de pigmentação pelos Teste-t de Student e o Teste de Mann-Whitney. As possíveis associações entre os diferentes elementos compostos presentes nas amostras foram avaliadas empregando-se o teste de correlações de Spearman. O valor de significância previsto foi de $p < 0,05$. As imagens da MEV foram avaliadas de maneira descritiva.

Comitê de ética. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária–UNESP, campus Jaboticabal, SP (Processo FCAV/Unesp nº 013966/17).

RESULTADOS

Microscopia eletrônica de varredura: Das 11 arcadas dentárias avaliadas, quatro apresentavam bolsa periodontal em um ou mais sítios. As imagens da microscopia eletrônica de varredura de ambos os grupos revelaram formações estruturais de um cálculo recoberto por biofilme, evidenciando a existência de áreas irregulares, com estruturas que se assemelham a deposição de óxidos e hidróxidos, como o hidróxido de cálcio, e outros elementos. Quando comparadas as imagens do cálculo e biofilme sem pigmentação com as estruturas pigmentadas de preto, observou-se que essas estruturas pigmentadas apresentaram maior complexidade estrutural, com superfície mais irregular e maior abundância dos depósitos (Figura 2 e Figura 3). Imagens irregulares, cocóides e bacilares, envoltas por matriz orgânica e inorgânica, sugestivas de conteúdo microbiano também puderam ser observadas.

Espectroscopia de dispersão de energia: Pela análise estatística do Teste-t constatou-se que os elementos ferro ($p < 0,014$) e magnésio ($p < 0,001$) estão associados com a ocorrência de periodontite nas arcadas dos animais avaliados (Quadro 1). Os mesmos resultados foram confirmados pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,025$ e $p < 0,001$,

respectivamente). Da mesma forma, o conteúdo de carbono presente no interior do cálculo e biofilme pigmentados foi superior ao observado nas amostras não pigmentadas (Teste-t $p < 0,039$). Outros elementos, como o manganês (teste de Mann-Whitney, $p < 0,007$) e ferro (teste de Mann-Whitney, $p < 0,015$) também estão associados com a presença de biofilme pigmentado (Quadro 2). O teste de correlações de Spearman evidenciou que um aumento no conteúdo de cálcio está associado à elevação nos níveis de fósforo, o mesmo ocorrendo entre os elementos ferro e silício, independentemente da presença de pigmentação no cálculo e biofilme dentais ou condição periodontal (Quadro 3).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento do biofilme microbiano constitui etapa relevante na implantação e evolução das periodontites em ruminantes (Borsanelli et al. 2015a, 2015b, Borsanelli et al. 2017, Agostinho 2017, Campello 2017). Embora sejam significativos os avanços atuais nos estudos microbiológicos desse complexo de doenças periodontais, pouco se conhece sobre a natureza, estrutura e composição do biofilme e das formações calcificadas a ele associadas, como o cálculo dental em bovinos.

O processo de formação e desenvolvimento do biofilme, como descrito em pacientes humanos (Marsh et al. 2011, Bosshardt 2017, Marsh & Zaura 2017), depende da interação inespecífica entre a superfície celular bacteriana e os componentes da película adquirida e da superfície dental (Marsh et al. 2011), criando condições para interações mais intensas e específicas, entre adesinas microbianas e seus receptores no hospedeiro (Socransky & Haffajee 2002, Marsh et al. 2011). Além desses componentes celulares microbianos e do hospedeiro, a composição do meio ambiente líquido também se mostra relevante (Malamud 1985) e as condições bucais implicam na composição salivar, que resulta da dieta (Kolenbrander et al. 2010, Fialová et al. 2017). É particularmente relevante destacar que em animais ruminantes o conteúdo químico e microbiano do rúmen interage

com suas contrapartes bucais (Myer et al. 2015). Dentre as adesinas microbianas merece destaque o papel desempenhado pelas fímbrias e outras estruturas apendiculadas (Marsh et al. 2011), principalmente entre os principais patógenos periodontais, como o gênero *Porphyromonas* (Socransky & Haffajee 2005, Nagano et al. 2018).

A absorção de cálcio e fosfato da saliva e consequente mineralização do biofilme, resulta na formação do cálculo supragengival, o qual se manifesta em camadas que se diferenciam entre si quanto ao conteúdo mineral presente (Friskopp & Isacsson 1984). Estruturalmente, os cálculos dentais são recobertos por uma camada de micro-organismos metabolicamente ativos que se acumulam tanto em dentes periodontalmente saudáveis, quanto doentes (Friskopp & Hammarström 1980) e em humanos, a associação do cálculo dental com as doenças periodontais está bem estabelecida (Akcali & Lang 2017).

O fosfato de cálcio pode ser considerado um dos componentes mais importantes de formação do tecido dental. A cristalização irregular destes constituintes inorgânicos em tecidos biológicos, reflete em condições patológicas como a formação do cálculo dental (Dorozhkin & Epple 2002). Além da taxa de fluxo salivar, a supersaturação salivar com sais de fosfato de cálcio são fatores que favorecem a formação do cálculo (Jin & Yip 2002). No presente estudo, cálcio e fósforo demonstraram correlação, independente da condição clínica dos animais ou presença de pigmentação, tal como observado entre os elementos ferro e silício (Quadro 3).

Em humanos, o silício é um elemento encontrado na saliva, biofilme e cálculo dental. Grande parte deste elemento encontra-se na forma de sílica nos alimentos (Jin & Yip 2002), e em concentrações de 0-2mg/mL atua como um fator estimulante da precipitação de fosfato de cálcio (Damen & Ten Cate 1989). Quando incorporado na dieta, a sílica pode aumentar a taxa de formação de cálculo dental (Gaare et al. 1989), provavelmente devido à capacidade de ligações de cálcio à ácidos silícicos e sílica (Jin & Yip 2002). O fator alimentar não foi avaliado no

presente estudo, e os achados associados a este elemento necessitam ser investigados.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura do cálculo supragengival em pacientes humanos são caracterizadas pela presença de conteúdo heterogêneo recoberto por micro-organismos filamentosos (Friskopp & Hammarström 1980). Em bovinos, as imagens do cálculo recoberto por biofilme supragengival (pigmentado e não pigmentado), indicaram presença de formações estruturais com áreas irregulares, possivelmente oriundas de depósitos minerais em semelhança com as descrições de Salles et al. (2012). Nas amostras pigmentadas estes depósitos irregulares aparecem em maior abundância. Também foi possível observar estruturas de morfologia cocoides e bacilares, sugestivas de presença de conteúdo microbiano recobrindo o cálculo supragengival.

Com o desenvolvimento inicial do biofilme, seu aumento de espessura e, acima de tudo, estabelecimento de redes de co-agregação microbiana e interconexões fisiológicas entre os componentes bacterianos do biofilme, independentemente da espécie hospedeira e mesmo em estudos “in vitro” (Sanguansermisri et al. 2018, Neiland et al. 2019), criam-se condições favoráveis para o estabelecimento de comunidades microbianas complexas (Lang et al. 2010). Segundo Jin & Yip (2002), a mineralização desse biofilme é consequência natural dos aspectos físico-químicos presentes na boca, em que a saliva e a dieta fornecem os elementos minerais, como o cálcio e o fósforo, que compõem grande parte do conteúdo mineral depositado, como pode ser observado no Quadro 2.

As análises semi-quantitativas da espectroscopia de dispersão de energia demonstraram forte correlação da presença de ferro e magnésio com a ocorrência da periodontite. O ferro é um elemento essencial para o crescimento e função metabólica da maioria dos organismos vivos, atuando em diferentes etapas do catabolismo e anabolismo celulares, como nas reações redox, transporte de radicais oxidativos, síntese de

DNA e mecanismos de eliminação de radicais livres (Lewis 2010). Entretanto, no enfoque do presente estudo, destaca-se o papel do ferro como elemento que controla a expressão de numerosos fatores de virulência microbianos, potencializando os danos aos tecidos do hospedeiro (Schaible & Kaufmann 2004). Nesse sentido, alguns dos principais micro-organismos bucais, como os gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*, acumulam o ferro derivado do sangramento gengival e periodontal na forma de compostos pouco solúveis em água, de pigmentação escura (Smalley et al. 2003), como também observado no biofilme microbiano bovino, especialmente nos animais com periodontite. Essa relação entre ferro, pigmentação do cálculo e biofilme bucal, e presença de perdas ósseas nos bovinos também foi observada no presente estudo (Quadro 1 e Quadro 2).

Com o estabelecimento do quadro inflamatório nos tecidos do periodonto de inserção, a quantidade de ferro ligado a proteínas sanguíneas presentes no fluido gengival aumenta significativamente, de forma que o sangramento relacionado à destruição periodontal disponibiliza hemina decorrente do processo de hemólise, podendo modificar a interação microbiota-hospedeiro (Lewis 2010) a atuar como molécula protetora no estresse oxidativo (Smalley 1998).

Desde que 76% do ferro disponível para os mamíferos estão armazenados na forma de grupos heme, em células transportadoras de oxigênio, como hemoglobina e mioglobina, os principais micro-organismos associados às infecções periodontais acabam por associar a expressão de proteases e peptidases à presença desse elemento (Lewis 2010, Byrne et al. 2013), bem como de receptores de superfície e proteínas de transporte (Shoji et al. 2010), constituindo estratégia para obtê-lo, além de adquirir os aminoácidos que serão utilizados no seu metabolismo fermentativo, o qual acaba por liberar diversos compostos tóxicos (Olczak et al. 2005), capazes de inibir a proliferação celular e o reparo tecidual, além de apresentarem ação tóxica direta sobre as células do hospedeiro (Lewis 2010).

Uma vez que o biofilme bucal de diferentes espécies hospedeiras apresenta gêneros capazes de intenso metabolismo proteolítico e de deposição de ferro, além de estarem envolvidos com a destruição periodontal (Lewis 2010, Byer 2013), pode-se supor que esses micro-organismos estejam envolvidos na formação desses depósitos e na destruição periodontal observada.

Estudos anteriores do mesmo grupo de pesquisa evidenciaram que as bactérias dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*, como *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella buccae*, que necessitam de suplementação de hemina para seu crescimento “in vitro”, estão entre os principais micro-organismos detectados de bolsas periodontais de bovinos e outros ruminantes (Dutra et al. 1986, Borsanelli et al. 2015a, Borsanelli et al. 2017, Borsanelli et al. 2018). Essa associação entre os gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* e a periodontite em bovinos vem sendo discutida, sendo que Borsanelli et al. (2015a) evidenciaram que a presença de *P. endodontalis*, *P. melaninogenica* e *Prevotella intermedia* era muito mais elevada em animais com perda óssea periodontal do que em animais periodontalmente saudáveis.

Além do ferro, as análises semi-quantitativas da espectroscopia de dispersão de energia revelaram associação do magnésio com a periodontite, já relatado como um dos elementos encontrados no cálculo dental humano (Fialová et al. 2017). O magnésio é um elemento essencial para o metabolismo bacteriano, o qual interfere diretamente nas taxas de multiplicação celular de uma grande variedade de espécies (Gadd 1992). A deficiência de magnésio pode acarretar na degradação do complexo de ribonucleoproteínas, além de estar associada à perda de viabilidade celular (Walker 1994). Entretanto, a atividade metabólica do magnésio no biofilme dental e a relação deste elemento com a periodontite em bovinos ainda é desconhecida.

Além da relação de ferro e magnésio com a periodontite, nas análises semi-quantitativas deste estudo, o carbono, manganês e ferro

apresentaram-se estatisticamente significativos quanto a pigmentação dos dentes. Grande parte das bactérias patogênicas são heterotróficas e utilizam como fonte de energia o carbono, presente em grandes variedades de substratos (Muñoz-Elías & McKinney 2006). É possível que os depósitos de ferro presentes nas amostras de cálculo e biofilme pigmentados estejam ligados a compostos orgânicos, ricos em carbono, o que justificaria a associação desses elementos, como descrito no presente estudo.

Assim como o ferro, o manganês é um oligoelemento importante no metabolismo bacteriano, atuando inclusive na proteção do estresse oxidativo. Além disto, este oligoelemento está envolvido em outras funções durante a infecção, por exemplo, na regulação da expressão de genes associados à virulência. Na sua forma não enzimática, é importante para manter a viabilidade bacteriana em ambientes de aerobiose, dentre outras atividades (Zaharik & Finaly 2004, Lewis 2010). Assim como o magnésio, a função do manganês no biofilme dental de bovinos e outras espécies é pouco conhecida.

Biofilme supragengival pigmentado de preto já foi associado a maior grau de recessão gengival em cabras leiteiras. Na ocasião, o local de maiores lesões encontrava-se nos dentes mastigatórios (Campello 2017). Agostinho (2017), relatou achados similares entre presença de biofilme supragengival e recessão gengival em ovinos. Na oportunidade, foi possível observar que animais mais velhos apresentaram maiores quantidades destes depósitos microbianos. Embora esses depósitos possam ocorrer também em animais jovens e nem sempre de forma linear, estas associações podem indicar que o acúmulo de biofilme supragengival atua como um importante fator de risco para o desenvolvimento e progressão da periodontite em pequenos ruminantes.

No biofilme subgengival de bovinos com periodontite, foi possível demonstrar semelhanças na identificação de alguns periodontopatógenos já reconhecidos na periodontite humana (Borsanelli et al. 2015a, 2015b, Borsanelli 2017). Pouco se conhece sobre a

composição microbiológica do biofilme supragengival de bovinos, mas as associações encontradas no presente estudo podem indicar importante papel da microbiota residente nestas formações e seus metabólitos químicos no desencadeamento e na patogênese desta enfermidade nos bovinos.

CONCLUSÃO

As estruturas que se formam na superfície dental de bovinos corroboram a existência de um biofilme de origem microbiana, que mineralizado se estrutura em um cálculo supragengival verdadeiro. A pigmentação escura encontrada na superfície dental de bovinos provavelmente decorre da deposição de ferro no biofilme supragengival destes animais, uma vez que, alguns micro-organismos bucais possuem seu metabolismo profundamente ligado ao metabolismo deste elemento. As associações entre a presença dos elementos ferro e magnésio no biofilme supragengival e a ocorrência da periodontite em bovinos podem indicar importante papel da microbiota supragengival e seus metabólitos na etiologia da periodontite bovina.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001; Ao técnico agropecuário Adão Ângelo Custódio, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp-Araçatuba, pelos serviços técnicos; Ao Professor Doutor Yuri Tani Utsunomya, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp-Araçatuba, pelo auxílio nas análises estatísticas; Ao supervisor Adriano Luis Martins, Centro de Microscopia e Imagens, Fop-Unicamp, pelos serviços técnicos.

Declaração de conflito de interesse. Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Akcali A. & Lang N.P. 2017. Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. *Periodontol.* 2000 76(1):109-115
- Agostinho S.D. 2017. Periodontite e desgaste dentário em ovinos. Tese de Doutorado, Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 78f.
- Borsanelli A.C. 2017. Genotipagem de bactérias anaeróbias associadas às lesões da periodontite bovina. Tese de Doutorado, Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP. 116f.
- Borsanelli A.C., Gaetti-Jardim Jr. E., Schweitzer C.M., Döbereiner J. & Dutra I.S. 2015a. Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. *Pesq. Vet. Bras.* 35(10):829-834.
- Borsanelli A.C., Gaetti-Jardim Jr. E., Döbereiner J. & Dutra I.S. 2015b. *Treponema denticola* in microflora of bovine periodontitis. *Pesq. Vet. Bras.* 35 (3): 237-240.
- Borsanelli A.C., Lappin D.F., Viora L., Bennett D., Dutra I.S., Brandt B.W. & Riggio M.P. 2018. Microbiomes associated with bovine periodontitis and oral health. *Vet. Microbiol.* 218:1-6.
- Borsanelli A.C., Gaetti-Jardim Jr. E., Schweitzer C.M., Viora L., Busin V., Riggio M.P. & Dutra I.S. 2017. Black-pigmented anaerobic bacteria associated with ovine periodontitis. *Vet. Microbiol.* 203:271-274.
- Bosshardt D.D. 2018. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. 2017. *Periodontol.* 2000. 76(1):43-50.
- Byrne D.P., Potempa J., Olczak T. & Smalley J.M. 2013. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. *Mol. Oral Microbiol.* 28:219-229.

- Campello P.L. 2017. Periodontite e desgaste dentário em cabras leiteiras. Tese de Doutorado, Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 111f.
- Damen J.J. & Ten Cate J.M. 1989. The effect of silic acid on calcium phosphate precipitation. J. Dent. Res. 68:1355-1359.
- Dorozhkin S.V & Epple M. 2002. Biological and medical significance of calcium phosphates. Reviews 41:3130-3146.
- 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. 20:71-74.
- Dutra I.S. & Döbereiner J. 2001. Cara inchada dos bovinos, p.397-401. In: Riet-Correa F. et al. (Eds). Doenças de Ruminantes de Equídeos. 2ª ed. Varela, São Paulo.
- 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):59-69.
- Elliot D.R, Wilson M, Buckley M.F. & David A.S. 2005. Cultivable oral microbiota of domestics dogs. J. Clin. Microbiol. 43:5470-5476.
- Fialová D., Skoupý R., Drozdová E., Paták A., Piños J., Sín L., Beňus R. & Klíma B. 2017. The application of scanning electron microscopy with energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX) in ancient dental calculus for the reconstruction of human habits. Microsc. Microanal. 23:1207-1213.
- Friskop J. & Isacson G. 1984. Mineral content of supragingival and subgingival dental calculus. A quantitative microradiographic study. Scand. J. Dent Res. 92:417-423.
- Friskopp J. & Hammström L. 1980. A comparative scanning electron microscopy study of supragingival and subgingival calculus. J. Periodontol. 51:553-562.

- Gaare D., Rolla G. & Van Der Ouderaa F. 1989. Comparison of the rate of formation of supragingival calculus in an Asian and a European population, p. 115-122. In: Ten Cate J.M. (Ed), Recent advances in the study of dental calculus. 1a e. Oxford University Press, Oxford.
- Gadd G.M. 1992. Metals and microorganisms: a problem of definition. FEMS Microbiol. Lett. 100:197-204
- 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 diferente periodontal conditions. Anaerobe 18:263-269.
- Gron P., Van Campen G. J. & Lindstrom I. 1967. Human dental calculus. Inorganic chemical and crystallographic composition. Arch Oral. Biol. 12:829-837.
- Hajishengalis G. 2015. Periodontitis: from microbial imune subversion to systemic inflammation. Nature 15:30-44.
- Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T. & Maeda N. 2009. Bacterial interactions in dental biofilm development. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 88(11):982-990.
- Holt S.C. & Ebersole J.L. 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol. 2000 38(1):72-122.
- Ingham B. 2001. Abbatoir survey of dental defects in cull cows. Vet. Rec. 148:739-742.
- Jin Y & Yip H.K. 2002. Supragingival calculus: formation and control. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 13(5):426-441.
- Kolenbrander P.E., Andersen R.N., Blehert D.S., Egland P.G., Foster J.S. & Palmer Jr R.J. 2002. Communication among oral bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:486-505.
- Kolenbrander P.E., Palmer Jr. R.J., Periasamy S. & Jakubovics N.S. 2010. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. Reviews 8:471-480.

- Lang N.P., Mombelli A. & Attström R. 2010. Biofilmes e cálculos orais, p.173-196. In: Lindhe J., Lang N.P & Karring T. (Eds), Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Lewis J.P. 2010. Metal uptake in host-pathogen interactions: role of iron in *Porphyromonas gingivalis* interactions with host organisms. Periodontol. 2000 52:94-116.
- Malamud D. 1985. Influence salivary proteins on the fate of oral bacteria, p.7-13. In: Mergenhagen S.E. & Rosan B. (Eds), Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion. ASM. Washington.
- Marsh P.D., Annete M. & Devine D.A. 2011. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. Periodontol. 2000 55:16-35.
- Marsh P.D. & Zaura E. 2017. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. J. Clin. Periodontol. 44(18):12-22.
- Myer P.R., Smith T.P.L., Wells J.E., Kuehn L.A. & Freerly H.C. 2015. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. Plos One 10(6):e0129174.
- Muñoz-Elías E.J. & McKinney J.D. 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. Cell. Microbiol. 8(1): 10-22.
- Nagano K., Hasegawa Y., Lijima Y., Kikuchi T. & Mitani A. 2018. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA and mfal fimbrial genotypes in subgingival plaques. Peer J. Disponível em: 6:e5581; DOI 10.7717/peerj.5581.
- Neiland J., Davies J.R., Bikker F.J. & Svensäter G. 2019. *Parvimonas micra* stimulates expression of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* in multi-species communities. Anaerobe 55:54-60.
- Nogueira B.C.L., Fernandes P.M., Paiva A.C.J., Fagundes N.C.F., Teixeira F.B. & Lima R.R. 2014. Avaliação comparativa da ultraestrutura e propriedades físicas do esmalte bovinos, bubalino e humano. Pes. Vet. Bras. 34(5):485-490.
- Olczak T., Simpson W., Liu X. & Genco C.A. 2005. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. Rev. 29:119-144.

- Rober M., Quirynem M., Haffajee A.D., Schepers E. & Teughels W. 2008. Intra-oral microbial profiles of beagle dogs assessed by checkerboard DNA-DNA hybridization using human probes. *Vet. Microbiol.* 127:79-88.
- Salles L.P., Gomes-Cornélio A.L., Guimarães F.C., Herrera B.S., Bao S.N., Rossa-Júnior C., Guerreiro-Tanomaru J.M. & Tanomaru-Filho M. 2012. Mineral Trioxide Aggregate- based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *Basic Res. Technol.* 38(7): 971-976.
- Sanguanserm Sri P., Nobbs A.H., Jenkinson H.F. & Surarit R. 2017. Inter-species dynamics among bacteria associated with canine periodontal disease. *Mol. Oral. Microbiol.* 33:59-67.
- Santana L.N.S., Barbosa L.V.M., Teixeira F.B., Costa A.M.P. Fernandes L.M.P & Lima R.R. 2013. Morphology of the dentin structure of sloths *Bradypus tridactylus*: a light and scanning electron microscopy investigation. *Anat. Histo. Embryol.* 46:410-414.
- Schaible U.E. & Kaufmann S.H.E. 2004. Iron and microbial infection. *Reviews* 2:946-953.
- Shoji M., Shibata Y., Shiroza T., Yukitake H., Peng B., Chen Y.Y., Sato K., Naito M., Abiko Y., Reynolds E.C., Nakayama K. 2010. Characterization on hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization. *BMC Microbiol.* 10(152):1471-2180.
- Smalley J.W., Silver J., Birss A., Witnall R. & Titler P.J. 2003. The haem pigment of the oral anaerobes *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* is composed of iron (III) protoporphyrin IX in the monomeric form. *Microbiol.* 149:1711-1718.
- Smalley J.W., Silver J., Marsh P.J. & Birss A.J. 1998. The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the mu-oxo dimeric form: an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. *Biochem J.* 331:681-685.

- Socransky S.S. & Haffajee A.D. 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000, 28:12-55.
- Socransky S.S. & Haffajee A.D. 2005. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. Dent. Res.* 49:203-222.
- Walker G.M. 1994. The roles of magnesium in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14(4):311-354.
- Zaharik M.L. & Finlay B.B. 2004. Mn^{+2} and bacterial pathogenesis. *Front. Biosci.* 9:1035-1042.

Quadro 1 Nível de significância (Teste-t) dos principais elementos químicos identificados pela técnica de espectroscopia de dispersão de energia no biofilme supragengival de bovinos com periodontite

Elemento	Média e desvio-padrão		Nível de significância
	Bovinos com periodontite	Bovinos sem periodontite	
C	37,0±13,92	34,02±14,36	0,643
P	18,14±3,87	19,59±5,61	0,438
Ca	35,55±15,29	47,25±16,88	0,057
Mn	1,67±0,87	6,38±17,17	0,517
Na	1,12±0,27	3,79±5,06	0,490
Fe*	28,7±24,22	6,64±9,09	0,014
Mg*	3,78±1,28	0,75±0,46	0
K	1,39±0,48	10,87±13,37	0,148

*Elementos estatisticamente significativos

Quadro 2 Nível de significância pelo teste de Mann-Whitney dos principais elementos químicos identificados pela técnica de espectroscopia de dispersão de energia nos dentes bovinos com biofilme supragengival pigmentado de preto

Elemento	Média		Nível de significância
	Dentes não pigmentados	Dentes pigmentados	
C*	122,00	88,00	0,039
P	244,00	284,00	0,895
Ca	297,00	264,00	0,129
Mn*	67,00	123,00	0,007
Fe*	8,00	163,00	0,015
Mg	33,00	87,00	0,194

*Elemento estatisticamente significativo

Quadro 3 Principais elementos químicos detectados pela técnica de espectroscopia de dispersão de energia no biofilme supragengival de bovinos e suas correlações entre si, calculadas pelo Teste de Correlação de Spearman

Elementos	C	P	Ca	Mn	Na	Fe	Mg	K	Si	Tl
C	1,00	-0,63	-0,63	0,13	0,31	-0,64	0,83	-0,37	-0,65	0,46
P	-0,63	1,00	1,00	-0,85	-0,93	-0,19	-0,96	-0,48	-0,18	-0,98
Ca	-0,63	1,00	1,00	-0,85	-0,93	-0,20	-0,96	-0,49	-0,18	-0,98
Mn	0,13	-0,85	-0,85	1,00	0,98	0,68	0,66	0,87	0,67	0,94
Na	0,31	-0,93	-0,93	0,98	1,00	0,53	0,79	0,77	0,52	0,99
Fe	-0,64	-0,20	-0,20	0,68	0,53	1,00	-0,10	0,95	1,00	0,39
Mg	0,83	-0,96	-0,96	0,66	0,79	0,10	1,00	0,21	-0,11	0,88
K	0,37	-0,48	-0,49	0,87	0,77	0,95	0,21	1,00	0,95	0,65
Si	0,65	0,18	-0,18	0,67	0,52	1,00	-0,11	0,95	1,00	0,38
Tl	0,46	-0,98	-0,98	0,94	0,99	0,39	0,88	0,65	0,38	1,00

Obs.: Correlação máxima = 1,00

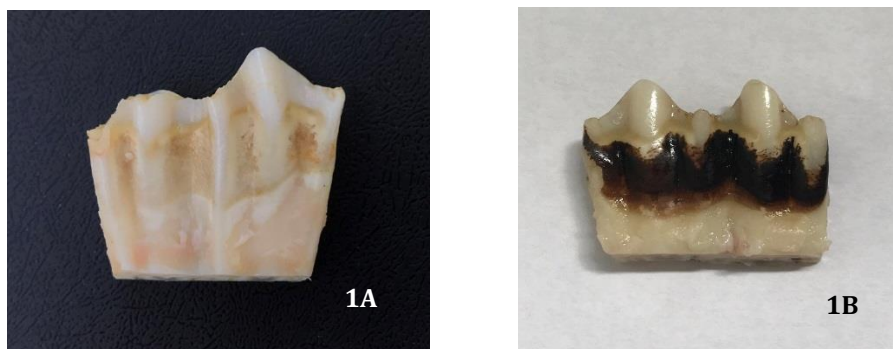


Fig.1. (A, B) A – Face vestibular de primeiro-molar superior de bovino sem pigmentação visível; B – Face vestibular de primeiro-molar superior de bovino com pigmentação escura.

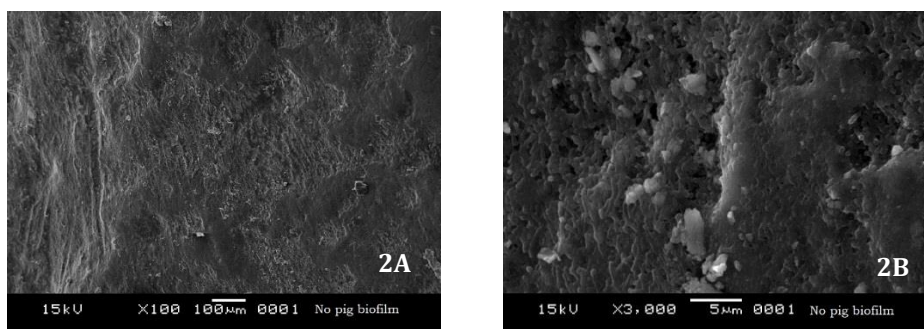


Fig.2. (A, B) A - Ultraestrutura do biofilme supragengival não pigmentado de bovinos em aumento de 100x; B - Estrutura superficial do biofilme com áreas irregulares semelhantes à deposição mineral (hidróxidos de cálcio e outros elementos) em aumento de 3000x.

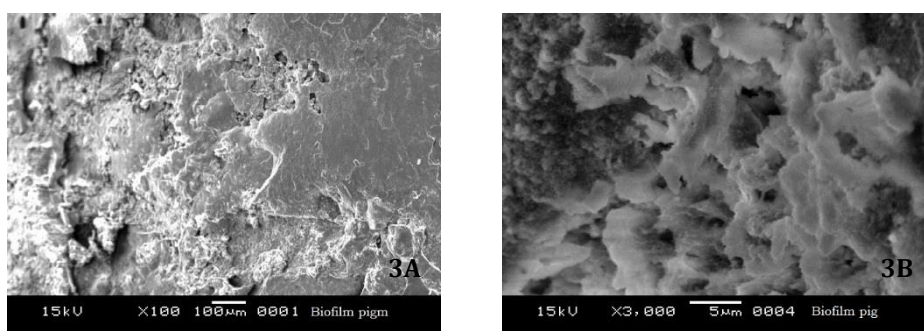


Fig.3. (A, B) A - Ultraestrutura do biofilme supragengival pigmentado de bovinos em aumento de 100x; B - Estrutura superficial do biofilme pigmentado com áreas mais irregulares, maior abundância mineral (hidróxidos de cálcio e outros elementos), e com maior complexidade estrutural em aumento de 3000x.

CAPÍTULO 3 – Considerações finais

Apesar de alguns estudos terem enfatizado a composição microbiológica do biofilme subgengival de bovinos, poucos relatos científicos são encontrados a respeito do biofilme supragengival nesta espécie, sua composição microbiológica, estrutural e química, e a sua relação com a periodontite. Neste contexto, o presente estudo inédito permite algumas inferências a respeito destas estruturas dinâmicas e o seu envolvimento no desencadeamento das doenças microbianas bucais nos ruminantes.

As imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitaram a visualização de estruturas irregulares semelhantes a deposição de minerais e estruturas com semelhanças a morfologias microbianas. Estas estruturas pareceram mais complexas à medida que a pigmentação estava presente. Este fato provavelmente decorre de maior deposição mineral nos dentes pigmentados, que nos dentes não pigmentados. As análises semi-quantitativas da espectroscopia de dispersão de energia (EDS), contribuíram para identificação de alguns dos principais elementos químicos presentes em biofilmes pigmentados de bovinos.

Dentre os elementos identificados, foram significativos para condição de periodontite, ferro e magnésio, e para pigmentação, carbono, manganês e ferro. Ainda, as análises de correlação evidenciaram relação entre os elementos cálcio e fósforo, e ferro e silício, independente da condição periodontal e do quadro clínico.

A correlação do ferro com a periodontite e pigmentação do biofilme supragengival de bovinos sugere possível presença de micro-organismos que acumulem pigmentação escura em sua superfície celular, já anteriormente encontrados em sítios subgengivais na mesma espécie. Bactérias bucais do gênero *Porphyromonas* e *Prevotella*, importantes agentes etiológicos das doenças periodontais, possuem seu metabolismo estreitamente associado a este elemento, e já foram identificadas em lesões periodontais de ruminantes.

A dieta também é um fator importante que necessita de maiores esclarecimentos, uma vez que a composição alimentar também pode influenciar na deposição mineral do cálculo/biofilme dental. Embora pouco se conheça sobre o papel dos outros elementos identificados no presente estudo, os resultados inéditos apontam a importância destas estruturas elaboradas e dinâmicas como um fator predisponente para o desencadeamento da periodontite nos bovinos.

A periodontite bovina é uma enfermidade de grande impacto econômico e de bem-estar animal, e deve ter seu diagnóstico integrado às doenças responsáveis por causarem queda na produção, reprodução e mortalidade. O exame da cavidade bucal costuma ser uma prática negligenciada na produção animal, fazendo com que a doença passe despercebida ou subdiagnosticada na grande maioria dos casos. As associações descritas no presente trabalho podem indicar que a enfermidade de etiologia multifatorial tem sua manifestação correlacionada ao biofilme supragengival que se forma facilmente na coroa clínica dos dentes dos bovinos. A composição microbiológica do biofilme supragengival de bovinos, e as mudanças ecológicas que sucedem o quadro de saúde para doença, ainda não são conhecidas.