

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 06/12/2023.

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

**PROTEOMA SALIVAR E MICROBIOMAS DENTAL
E RUMINAL DE BOVINOS MANTIDOS EM DIETA
COM SUPLEMENTO PROTEICO**

Júlia Rebecca Saraiva

Médica Veterinária

2022

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

**PROTEOMA SALIVAR E MICROBIOMAS DENTAL
E RUMINAL DE BOVINOS MANTIDOS EM DIETA
COM SUPLEMENTO PROTEICO**

Júlia Rebecca Saraiva

**Orientador: Prof. Tit. Iveraldo dos Santos Dutra
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ana Carolina Borsanelli**

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

2022

S243p

Saraiva, Júlia Rebecca

Proteoma salivar e microbiomas dental e ruminal de bovinos mantidos em dieta com suplemento proteico / Júlia Rebecca Saraiva. -- Jaboticabal, 2022

126 p. : il., tabs.

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

Orientador: Iveraldo dos Santos Dutra

Coorientadora: Ana Carolina Borsanelli

1. Bovinos. 2. Dieta. 3. Periodontal diseases. 4. Proteomics. 5. High-Throughput Nucleotide Sequencing. 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

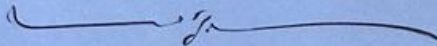
TÍTULO DA TESE: PROTEOMA SALIVAR E MICROBIOMAS DENTAL E RUMINAL DE BOVINOS
MANTIDOS EM DIETA COM SUPLEMENTO PROTEICO

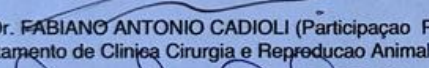
AUTORA: JÚLIA REBECCA SARAIVA

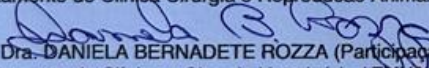
ORIENTADOR: IVERALDO DOS SANTOS DUTRA

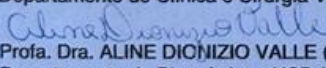
COORIENTADORA: ANA CAROLINA BORSANELLI

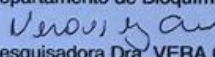
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Medicina Veterinária,
área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:


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


Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI (Participação Presencial)
Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal / FMVA UNESP Araçatuba/SP


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


Profa. Dra. ALINE DIONIZIO VALLE (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica - USP / Faculdade de Odontologia - Bauru/SP


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

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Júlia Rebecca Saraiva – nascida em São José do Rio Preto, São Paulo, em 14 de março de 1994. Ingressou na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba pela Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (FMV-UNESP) em 2012 e concluiu o curso pela mesma universidade em 2016. Durante a graduação realizou Iniciação Científica com projeto financiado pela FAPESP, Processo nº 2015/00058-4 finalizado em 2016. Obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária em 2019 (com ênfase em Medicina Veterinária Preventiva) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (FCAV-UNESP), campus de Jaboticabal sob orientação do Professor Titular Iveraldo Santos Dutra. Em março de 2019, iniciou o Doutorado na mesma instituição (FCAV-UNESP) pelo programa de Medicina Veterinária também sob orientação do Professor Titular Iveraldo dos Santos Dutra.

*“Caminhante, são tuas pegadas
O caminho e nada mais;
Caminhante não há caminho,
Se faz caminho ao andar...”
Antonio Machado*

*Dedico esta Tese aos
meus orientadores Prof.
Iveraldo Santos Dutra e
Prof. Ana Carolina
Borsanelli por acreditarem
na minha capacidade de
também construir um
pedacinho dessa história.*

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus por essa existência, pelo amparo incondicional e por cada oportunidade de aprendizado em todas as esferas da minha vida.

Gratidão desmedida aos meus amados pais Joviniano Saraiva e Rosalva Pereira Rosa Saraiva pela vida, pelo amor, incentivo, compreensão, acolhimento e por me proporcionarem todas as condições de seguir o caminho que meu coração escolheu. Essa vitória é nossa!

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

Gratidão ao meu orientador Professor Titular Iveraldo Santos Dutra por me ceder a honra de aprender o caminho do conhecimento, do entusiasmo e da nobreza dos valores humanos sob sua orientação.

Agradeço a minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Carolina Borsanelli por compartilhar tudo que sabe e conduzir com zelo, competência e leveza minha vida acadêmica por todos esses anos.

Agradeço a equipe do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), especialmente a Dra. Aline Dionizio Valle a quem estimo tanto pela paciência e disponibilidade em sempre nos auxiliar na construção desse trabalho.

Agradeço ao Professor Cecílio Viegas S. Filho pela colaboração no desenvolvimento da nossa pesquisa.

Agradeço a Dra. Flávia Regina Florêncio Athayde por toda contribuição no processamento e análises dos dados e pelo auxílio essencial à nossa equipe.

Agradeço a convivência e amizade das minhas companheiras de equipe: Juliana Vaccari, Natália Cristina de Souza, Thamiris Naiasha Minari Ramos. Para vocês dedico minhas melhores intenções e minha profunda gratidão.

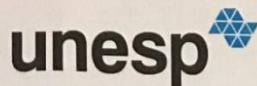
Gratidão imensa por todo auxílio e apoio dos funcionários Adão Ângelo Custódio e Alexandre José Teixeira. Levarei com carinho os

momentos que compartilhamos ao longo desses anos e toda ajuda de vocês.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Unesp, por instruir e transformar a vida de tantas pessoas, especialmente a Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMV/UNESP) que me possibilitou infinitas experiências de crescimento.

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

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



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.

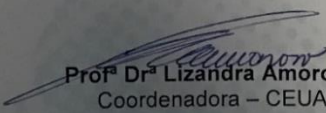
Microbiologia - PCR

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.


Profª Drª 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

PROTEOMA SALIVAR E MICROBIOMAS DENTAL E RUMINAL DE BOVINOS MANTIDOS EM DIETA COM SUPLEMENTO PROTEICO

RESUMO –

A boca é um ambiente ecologicamente dinâmico composto por elementos estruturais que lhe conferem uma identidade fisiológica específica, como a deposição de biofilmes dentais e a expressão de proteínas salivares associadas a processos locais e sistêmicos. As doenças periodontais afetam bovinos e outros ruminantes causando impactos na produção e bem-estar animal, e acredita-se que sua etiologia esteja associada ao manejo alimentar dos animais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de dieta suplementar proteica e feno de *Panicum* cultivado em áreas recém-reformadas no proteoma salivar e integridade periodontal, e microbioma dental e ruminal de bezerros em fase de dentição decídua. Foram utilizados 12 bovinos divididos aleatoriamente em dois grupos: dieta base feno (F) e dieta suplementar proteica (SP) durante 60 dias. A saliva foi coletada aos 20 e 60 dias para análise proteômica por espectrometria de massas nanoAcquity UPLC-Xevo QTof MS, software ProteinLynx Global Server (PLGS) e o número de acesso as proteínas foi fornecido pelo banco de dados UniProt para espécie *Bos taurus*. O exame clínico bucal foi realizado semanalmente pela inspeção da cavidade bucal e sondagem periodontal dos incisivos. Já para o sequenciamento, coletou-se biofilme subgengival e 15mL de conteúdo ruminal no início e término do experimento (0 e 60 dias) para análise de sequenciamento de última geração do gene 16S rRNA. A análise de interação entre tempo e dieta demonstrou significância na incidência de episódios de gengivite entre os dois grupos aos 20 dias e aos 60 e 20 dias da dieta exclusiva de feno. Aos 60 dias da experimentação, mais processos biológicos (9) e imunológicos (11) estiveram alterados na saliva dos bovinos. Proteínas com múltiplas funções foram detectadas na saliva dos animais, principalmente de função antimicrobiana e anti-inflamatória. No microbioma dental, Filos já reconhecidos em bovinos foram identificados, como Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria. Os gêneros *Moraxella*, *Neisseria* e *Lautropia* destacaram-se em ambos os momentos. No rúmen, Filos considerados centrais dentro desse ambiente como Bacteroidetes e

Firmicutes foram os mais representativos. Não foram observadas diferenças significativas de riqueza e diversidade do microbioma bucal e ruminal dos animais, entretanto houve dissimilaridade na composição do microbioma bucal dos bovinos que receberam dieta base feno entre período inicial e final ($p= 0.007$), e no microbioma ruminal no grupo dieta base feno ($p= 0.004$) e nos bovinos do grupo dieta suplementar proteica (comparações entre os períodos inicial e final, $p= 0.004$) bem como entre as duas dietas no momento final ($p= 0.005$). Aparentemente, dietas com suplemento proteico estimulam a expressão de proteínas salivares com papel protetivo em bovinos, e interferem na modulação dos microbiomas (que ocorre inicialmente no rúmen) e provavelmente refletirá na boca dos animais.

Palavras-chave: bovinos, dieta, doenças periodontais, proteômica, sequenciamento

SALIVARY PROTEOMA AND DENTAL AND RUMINAL MICROBIOMES OF CATTLE FED ON DIET WITH PROTEIN SUPPLEMENT

ABSTRACT –

The mouth is an ecologically dynamic environment composed of structural elements that confer a specific physiological identity to this location, such as the deposition of dental biofilms and the expression of salivary proteins associated with local and systemic processes. Periodontal diseases affect cattle and other ruminants causing impacts on animal production and welfare, and its etiology is believed to be associated with the feeding management of animals. The aim of the present study was to evaluate the effect of supplemental protein diet and Panicum hay grown in newly reformed areas on the salivary proteome and periodontal integrity, and dental and ruminal microbiome of calves in the deciduous phase. Twelve cattle were randomly divided into two groups: hay-based diet (F) and protein supplemental diet (SP) for 60 days. Saliva was collected at 20 and 60 days for proteomic analysis by nanoAcquity UPLC-Xevo QToF MS mass spectrometry, ProteinLynx Global Server (PLGS) software and the protein accession number was provided by the UniProt database for *Bos taurus* species. The oral clinical examination was performed weekly by inspection of the oral cavity and periodontal probing of the incisors. For sequencing, subgingival biofilm and 15mL of rumen content were collected at the beginning and end of the experiment for analysis of next-generation sequencing of the 16S rRNA gene. The analysis of interaction between time and diet showed a significance in the incidence of gingivitis episodes between the two groups at 20 days and at 60 and 20 days of the hay-only diet. At 60 days of experimentation, more biological (9) and immunological (11) processes were altered in bovine saliva. Proteins with multiple functions were detected in the animals' saliva, mainly with antimicrobial and anti-inflammatory functions. In the dental microbiome, phyla already recognized in cattle were identified, such as Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, and at the genus level *Moraxella*, *Neisseria* and *Lautropia* stood out in both moments. In the rumen, phyla considered central within this environment such as Bacteroidetes and Firmicutes were the most representative. In the rumen, phyla

considered central within this environment such as Bacteroidetes and Firmicutes were the most representative. There were no significant differences in the richness and diversity of the oral and ruminal microbiome of the animals, however there was dissimilarity in the composition of the oral microbiome of cattle that received a hay-based diet between the initial and final period ($p= 0.007$), and in the ruminal microbiome in the diet group hay base ($p= 0.004$) and in the cattle of the supplementary protein diet group (comparisons between the initial and final periods, $p= 0.004$) as well as between the two diets at the final moment ($p= 0.005$). Apparently, protein-supplemented diets stimulate the expression of salivary proteins with a protective role in cattle, and interfere with the modulation of microbiomes (which initially occurs in the rumen) and will probably be reflected in the animals' mouths.

Keywords: cattle, diet, periodontal diseases, proteomics, sequencing

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais: Avanços da era “Ômica” na compreensão dos aspectos modificadores relacionados ao ambiente bucal de ruminantes

1. Introdução

O ecossistema bucal é um ambiente rico composto por grupos microbianos diversos que coexistem em simbiose com funções específicas para manutenção da saúde bucal. O pleno funcionamento dos dentes na preensão, mastigação e ruminação são requisitos mínimos para um bom desempenho e para saúde geral de bovinos e outros ruminantes. Dentição saudável garante assim a eficiência alimentar, a condição para vida produtiva e reprodutiva e o bem-estar. Nesse contexto, a problemática associada ao diagnóstico, caracterização e controle de doenças endógenas bucais de natureza infecciosa representa uma preocupação importante na bovinocultura.

Dentre as diferentes manifestações clínicas do complexo doenças periodontais, as gengivites e periodontites são consideradas as formas clínicas mais comumente diagnosticadas em bovinos criados sob diferentes sistemas de produção. Essas manifestações estão associadas a fatores intrínsecos e extrínsecos do indivíduo, destacando-se primariamente a disbiose do biofilme dental e possivelmente a algumas composições dietéticas utilizadas no manejo alimentar de ruminantes.

Evidências científicas apontam uma série de fatores bióticos e abióticos envolvidos na composição dos diferentes nichos ecológicos bucais. Esses fatores interferem, sobretudo, na formação dos biofilmes microbianos da boca, bem como na composição proteica da saliva e na resposta imunológica do hospedeiro. De um modo geral, as relações ecológicas entre biofilmes e hospedeiro são simbióticas, porém sabe-se que o desequilíbrio dessa microbiota está intimamente associado à ocorrência das doenças periodontais.

Nos ruminantes, o processo digestivo é bastante dinâmico e a boca comunica-se de forma bidirecional com o rúmen e com o meio

ambiente. A diversidade do microbioma ruminal pode ser apontada como uma das principais características inerentes aos animais ruminantes. As relações sinérgicas presentes nesse ambiente possibilita a fermentação contínua do conteúdo alimentar suprindo de maneira efetiva as necessidades biológicas do hospedeiro. Embora seja reconhecido que estratégias nutricionais possam criar microbiomas únicos e específicos em decorrência da natureza adaptativa desse ambiente, poucos estudos buscaram relacionar mudanças ecológicas que ocorrem nos microbiomas dental e ruminal quando animais são expostos ao mesmo desafio alimentar.

Historicamente, é possível observar um avanço significativo com relação ao conhecimento sobre os aspectos modificadores associados às afecções dentárias dos ruminantes. As investigações microbiológicas iniciais realizadas nas décadas de 1980 e 1990 possibilitaram a caracterização das bactérias presentes em lesões periodontais por meio das propriedades de cultivo bacteriano e de provas bioquímicas específicas, permitindo reconhecimento inicial sobre possíveis patógenos envolvidos nessas doenças.

O advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) consagra um marco científico importante na detecção de espécies bacterianas de difícil cultivo em meios de cultura anaeróbicos padrão e que estão associadas a ocorrência dessas doenças em bovinos e pequenos ruminantes. Sob esse enfoque, bactérias potencialmente patogênicas como *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* entre outras, foram associadas com as gengivites e periodontites bovina, revelando a natureza polimicrobiana relacionada a essas enfermidades.

Atualmente, ferramentas de investigação mais modernas como o uso do sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA alavancou o campo de análises dessas comunidades microbianas e

possibilitou a identificação e o reconhecimento da grande diversidade do microbioma dental de ruminantes sob diferentes condições clínicas periodontais. Interações microbianas distintas são observadas em animais saudáveis e doentes destacando-se, nesse contexto, a importância de microrganismos chaves na etiologia dessas doenças. Além disso, as perspectivas apontam que o aperfeiçoamento tecnológico com uso da metagenômica possibilitará o desenvolvimento de condutas preventivas e terapêuticas em diversos processos infecciosos que acometem os animais, incluindo em um futuro próximo, as gengivites e periodontites.

Por outro lado, pesquisas científicas sobre a expressão proteica de diferentes tecidos e fluídos corporais por meio da proteômica pela espectrometria de massas vêm ganhando espaço na medicina veterinária com a finalidade de se esclarecer sobre processos normais e patológicos que ocorrem nas diferentes espécies. Nesse universo complexo que compõe a boca, a saliva representa um importante componente para compreender diversos aspectos relacionados à saúde bucal, bem como na identificação de biomarcadores que possam servir no monitoramento da saúde geral do indivíduo e no diagnóstico precoce de diversas doenças, incluindo as doenças periodontais e outras enfermidades bucais.

Nos bovinos, devido a ausência de funções secretoras no rúmen, a saliva atua no trânsito da ingesta e no tamponamento ruminal. Aparentemente, o proteoma salivar de ruminantes é bastante variável e rico em diversidade proteica. Nesse contexto, os componentes salivares desempenham funções biológicas específicas e as mudanças alimentares relacionam-se com a formação de complexos proteicos que podem modificar a saúde bucal e geral. Assim, pouco se conhece sobre o efeito de diferentes dietas sobre o proteoma salivar de bovinos e outros ruminantes e seus reflexos no ecossistema bucal.

Estudos anteriores sugerem influência do manejo alimentar, principalmente associado à reforma de pastagem e abertura de novas

áreas, como um dos fatores envolvidos na gênese das periodontopatias nos ruminantes. Com efeito, quando se retira bovinos jovens com periodontite manifestada por abaulamento facial (“cara inchada”) dessas pastagens, ocorre uma remissão considerável de grande parte dos sinais clínicos e melhora da condição corporal dos animais.

Os desafios nutricionais aos quais os animais são submetidos, com objetivo de se aumentar os índices produtivos e reduzir os custos da atividade, raramente consideram as consequências dessas dietas na saúde bucal. Com isso, pode-se inferir que protocolos alimentares poderiam representar fator de risco ao desencadeamento dessas doenças nos ruminantes. A questão é complexa, e poucos estudos buscaram se aprofundar nos mecanismos relacionados aos eventuais distúrbios causados pelas “melhores dietas” utilizadas na bovinocultura.

Diante da importância das doenças periodontais no comprometimento da saúde, bem-estar e produção animal, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o microbioma dental e ruminal de doze bovinos utilizando o sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA mantidos em dieta com suplemento proteico e feno de *Panicum maximun cv. massai* e *Panicum maximun cv. Mombaça* durante o período de 60 dias; bem como avaliar de maneira descritiva o proteoma salivar desses mesmos animais por meio da técnica de espectrometria de massas e os possíveis efeitos dessas dietas no periodonto desses animais.

Conclusão

O rúmen é um ambiente dinâmico e achados dessa natureza permitem inferir que provavelmente as primeiras consequências de modificações dietéticas ocorrem no rúmen dos animais, e com o decorrer

do tempo, passam a refletir na composição do microbioma dental de bovinos jovens.

Financiamento

This work was supported by the USAID and the National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine of the United States (NAS) for funding our research under PEER project 4-299, USAID agreement AID0AA-A-11-00012. Any opinions, findings, conclusions, or recommendations expressed here are those of the authors alone, and do not necessarily reflect the views of USAID or the NAS.

Declaração de conflito de interesse

Todos os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Referências

Borsanelli A.C., Athayde F.R.F., Riggio M.P., Brandt B.W., Rocha F.I., Jesus E.C., Gaetti-Jardim E. Jr, Schweitzer C.M., Dutra I.S. 2022 Dysbiosis and predicted function of dental and ruminal microbiome associated with bovine periodontitis. *Front Microbiol.* Aug 12;13:936021. doi: 10.3389/fmicb.2022.936021. PMID: 36033883; PMCID: PMC9412940

Borsanelli A.C., Athayde F.R.F., Agostinho S.D., Riggio M.P., Dutra I.S. 2021. Dental biofilm and its ecological interrelationships in ovine periodontitis. *J Med. Microbiol.* 70:1396. doi: 10.1099/jmm.0.001396

Borsanelli A.C., Gaetti-Jardim Jr E., Schweitzer C.M., Döbereiner J., Dutra I.S. 2015. Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. *Pesqui. Vet. Bras.* 35:829–834. doi: 10.1590/S0100-736X2015001000002

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. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.03.032

Borsanelli A.C., Lappin D.F., Viora L., Bennett D., Dutra I.S., Brandt B.W., Riggio M.P. 2018a. Microbiomes associated with bovine periodontitis and oral health. *Vet. Microbiol.* 218, 1–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.016

Borsanelli A.C., Viora L., Lappin D.F., Bennett D., King G., Dutra I.S., Riggio M.P. 2016. Periodontal lesions in slaughtered cattle in the west of Scotland. *Vet. Rec.* 179:652. doi: 10.1136/vr.103931

Borsanelli A.C., Athayde F.R.F., Saraiva J.R., Riggio M.P., Dutra I.S. 2022b. Dysbiosis and Predicted Functions of the Dental Biofilm of Dairy Goats with Periodontitis. *Microbial Ecology*. doi:10.1007/s00248-022-02062-0. Epub ahead of print. PMID: 35780192

Borsanelli A.C., Gaetti-Jardim Jr. E., Schweitzer C.M., Döbereiner J., Dutra I.S. 2015. Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. *Pesq. Vet. Bras.* 35(10):829-834.

Braga C.A.S.B., Carvalho M.A.R. 2005. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. *Ciência Rural* 35(2):385-390.

Braun U., Zürger S., Hässig M. 2015. Evaluation of eating and rumination behaviour in 300 cows of three different breeds using a noseband pressure sensor. *BMC Vet. Res.* 11:231–236. doi: 10.1186/s12917-015-0549-8

Campello P.L., Borsanelli A.C., Agostinho S.D., Schweitzer C.M., Gaetti-Jardim Jr. E., Döbereiner J., Dutra I.S. 2019. Occurrence of periodontitis and dental wear in dairy goats. *Small Rum. Res.* 175:133-141.

Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman, F.D., Costello E.K., 2010. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 7:335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303

Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., et al. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6:1621–1624. doi: 10.1038/ismej.2012.8

Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C. A., Turnbaugh P.J., et al. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:4516–4522.

Clemmons B.A., Martino C., Powers J.B., Campagna S.R., Voy B.H., Donohoe D.R., Gaffney J., Embree M.M., Myer P.R. 2019. Rumen bacteria and serum metabolites predictive of feed efficiency phenotypes in beef cattle. *Sci. Rep.* 9:19265. doi.org/10.1038/s41598-019-55978-y

Deusch S., Camarinha-Silva A., Conrad J., Beifuss U., Rodehutschord M., Seifert, J. 2017. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. *Front. Microbiol.* 8:1–21. doi:10.3389/fmicb.2017.01605

Dutra I.S., Borsanelli A.C. 2022 Saúde Bucal de Ruminantes. Jaboticabal: FUNEP. 164 p.

Fernando S.C., Purvis H.T., Najar F.Z., Sukharnikov L.O., Krehbiel C.R., Nagaraja T.G., Roe B.A., Desilva U. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl Environ. Microbiol.* 76(22):7482-7490.

Floyd M.R. 1993. The modified Triadan system: nomenclature for veterinary dentistry. *J. Vet. Dent.* 8:18-19.

Friedman J., Alm E.J. 2012. Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Comput. Biol.* 8:1–11. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002687

Golder H.M., Thomson J.M., Denman S.E., McSweeney C.S., Lean I.J. 2018. Genetic Markers Are Associated with the Ruminal Microbiome and Metabolome in Grain and Sugar Challenged Dairy Heifers. *Front Genet.* 27:(9)62. doi: 10.3389/fgene.2018.00062.

Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Young W., Janssen P.H. 2015. Rumen microbial Community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5:567. doi:10.1038/srep14567

Holcombe L.J., Patel N., Colyer A., Deusch O., O'Flynn C., Harris S. 2014. Early canine plaque biofilms: characterization of key bacterial interactions involved in initial colonization of enamel. *PLoS One* 9:e113744. doi: 10.1371/journal.pone.0113744

Kim M., Morrison M., Yu Z. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol Ecol.* 76(1):49-63.

Menezes A.B., Lewis E., O'Donovan M., O'Neill B.F., Clipson N., Doyle E.M. 2011. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiol Ecol.* 78(2):256-265. doi: 10.1111/j.1574-

6941.2011.01151.x. Epub 2011 Jul 11. PMID: 21671962.

Mizrahi I., Wallace R.J., Moraïs S. 2021. The rumen microbiome: balancing food security and environmental impacts. *Nat Rev Microbiol.* 2021. 19(9):553-566. doi: 10.1038/s41579-021-00543-6. Epub 2021 May 12. PMID: 33981031.

Nagaraja T.G. 2016. "Microbiology of the rumen," in Ruminology eds. DD Millen, M.B. Arrigoni RDL Pacheco (Switzerland: Springer International Publishing), 39–61.

Nagaraja T.G., Titgemeyer E.C. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J Dairy Sci.* 90(Suppl 1):E17-38. doi: 10.3168/jds.2006-478. PMID: 17517750.

Newbold C., Ramos-Morales E. 2020. Review: Ruminal microbiome and microbial metabolome: Effects os diet and ruminant host. *Animal* 14(S1):S78-S86. doi: 10.1017/S1751731119003252.

Puniya A.K., Singh R., Kamra D.N. 2015. Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution. New Delhi:Springer India.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41:590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219

Ramos T.N..M., Borsanelli A.C., Saraiva J.R., Vaccari J., Schweitzer C.M., Gaetti-Jardim Jr. E., Dutra I.S. Efficacy of virginiamycin for the control of periodontal disease in calves. 2019. *Pesq. Vet. Bras.* 39(2):112-122.

R Core Team (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.

Rey M., Enjalbert F., Combes S., Cauquil L., Bouchez O., Monteils V. 2013. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *J. Appl. Microbiol.* 116(2):245–57.

Riggio P.M., Jonsson N., Bennet D. 2013. Culture-independent identification of bacteria associated with ovine ‘broken mouth’ periodontitis. *Vet. Microbiol.* 166:664-669.

Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. 1997. The rumen bacteria. *The Rumen Microbial Ecosystem* (Hobson PN & Stewart CS, eds) Chapman & Hall, London. pp.10–72.

Sturgeon A., Stull J.W., Costa M.C., Weese J.S. 2013. Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet. Microbiol.* 162:891–898. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.018