

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

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

Juliana Vaccari

Médica Veterinária

2023

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

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

Juliana Vaccari

Orientador: Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra

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

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

2023

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

REGISTRO DE IMPACTO

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

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

IMPACT RECORD

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

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

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JULIANA VACCARI

ORIENTADOR: IVERALDO DOS SANTOS DUTRA

COORIENTADOR: ELERSON GAETTI JARDIM JUNIOR

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

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

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

Documento assinado digitalmente

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

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

gov.br

Documento assinado digitalmente

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

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

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

Jaboticabal, 02 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

	Páginas
CERTIFICADO DE COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS: AVANÇOS SOBRE CONHECIMENTO DOS MICROBIOMAS NO AMBIENTE BUCAL DE RUMINANTES ASSOCIADO AS DOENÇAS	
PERIODONTAIS.....	1
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1 Definições, classificação e etiopatogênese das doenças periodontais..	4
2.2 Doenças periodontais em ruminantes.....	9
2.3 Ecologia microbiana bucal de ruminantes.....	13
3. Referências	18
CAPÍTULO 2 – MICROBIOTA ASSOCIADA A GENGIVITE E PERIODONTITE EM SÍTIOS DENTÁRIOS DE BOVINOS JOVENS	28
Abstract	29
Resumo	30
Introdução	32
Material e Metodos	33
Resultados	37
Discussão	46
Conclusão	50
Financiamento	50
Declaração de conflito de interesse	51
Comissão de ética em pesquisa	51
Referências	51
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

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

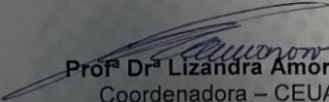
Microbiologia - PCR

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

Microscopia eletrônica de Varredura - Abatedouros

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

Jaboticabal, 05 de outubro de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

MICROBIOTA DENTAL ASSOCIADA À GENGIVITE E PERIODONTITE EM BOVINOS JOVENS

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

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

DENTAL MICROBIOTA ASSOCIATED WITH GINGIVITIS AND PERIODONTITIS IN YOUNG BOVINE

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

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

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

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

As gengivites e as periodontites apresentam ocorrência através de

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Revisão de literatura

2.1 Definições, classificações e etiopatogênese das doenças periodontais

As doenças periodontais são enfermidades de etiologia complexa e multifatorial, associadas à microbiota do ecossistema bucal, fatores comportamentais no homem, ambientais, genéticos e suscetibilidade individual (Hajishengalis, 2015; Dutra e Borsanelli 2022).

As doenças periodontais já foram descritas em cabras (Campello et al., 2019), bovinos (Borsanelli et al., 2018), equinos (Klugh, 2006) burros (Takada et al., 2010, e outros animais da flora como macacos (Gaetti - Jardim Jr et al., 2012), onças (Rossi Junior, et al., 2007) e cervos do pantanal (Borsanelli et al., 2022c).

As comunidades microbianas no ambiente bucal se organizam em biofilmes; estruturas que favorecem a comunicação entre as bactérias e microcolônias, 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).

Algumas espécies bacterianas após multiplicarem-se passam a exibir novas propriedades como, lesionar e provocar a destruição do periodonto (Socransky e Haffajee, 2010). A alteração da homeostase local também estimula no hospedeiro respostas imunes específicas, as quais contribuem para o crescimento e multiplicação bacteriana (Hajishengalis, 2015).

Essa transição do estado saúde para doença nas periodontopatias esta associada a alterações desta comunidade microbiana simbiótica, na sua maioria composta por bactérias facultativas, para uma comunidade disbiótica rica em fatores de virulência e adaptada a desenvolver-se em ambiente inflamatório (Hajishengalis, 2015).

Alteração de cor dos bordos gengivais, presença de sangramento espontâneo ou a sondagem e edema quando generalizado caracterizam o processo como gengivite (Lang et al., 2009).

Outros fatores podem ser causas de gengivite além do biofilme, dentre esses destacam-se, as desordens genéticas ou do desenvolvimento, infecções de origem bacterianas, virais ou fúngicas, além de condições inflamatórias e imunes, processos reacionais, neoplasias, doenças endócrinas, nutricionais, metabólicas e pigmentação gengival (Caton et al., 2018; Holmstrup et al., 2018, Steffens e Marcantonio 2018).

A nova classificação das doenças periodontais é baseada na extensão da doença, determinando-se intervalos de porcentagens de sítios envolvidos para cada nível da gengivite (leve, moderada e severa) ou grau (Steffens e Marcantonio 2018).

Em estudos epidemiológicos, a gengivite pode ser classificada quanto à sua extensão em localizada (10-30% dos sítios com sangramento à sondagem) ou generalizada (> 30% dos sítios). Os sítios dentários com sinais clínicos de inflamação devem ser definidos como “com inflamação gengival” em vez de “com gengivite”, pois o termo “gengivite” se refere ao diagnóstico do paciente, e não do sítio/dente (Steffens e Marcantonio 2018).

Os processos de gengivite podem regredir ou evoluir para a periodontite definida como “doença inflamatória crônica multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental”, enquadrando-se como uma das principais e mais graves manifestações clínicas em humanos (Kuo et al., 2008).

Na classificação atual a periodontite é classificada de acordo com seu Estágio em I, II, III e IV e seu Grau A (progressão lenta), B (progressão moderada) e C (progressão rápida). A classificação de estágios está relacionada com a severidade da doença (Tonetti et al., 2018; Albandar et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018).

Os Estágios da periodontite devem ser primariamente definidos pela perda clínica de inserção, denominada como “característica determinante”. Em sua ausência, utiliza-se perda óssea radiográfica,

assim quanto maior a perda de inserção ou o tamanho da bolsa em mm, ou ainda a perda óssea, maior é o estágio que a enfermidade se encontra (Tonetti et al., 2018; Albandar et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018).

O Estágio I é o mais brando e apresenta como característica determinante: 1-2 mm de perda de inserção interproximal no pior sítio ou perda radiográfica no terço coronal (< 15%), e as características secundárias são: profundidade de sondagem de até 4 mm, sem perda dental devido à periodontite e padrão de perda óssea horizontal (Tonetti et al., 2018; Albandar et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018).

Já o Estágio II apresenta como característica determinante: 3-4 mm de perda de inserção interproximal no pior sítio ou perda radiográfica no terço coronal (15-33%); o Estágio III tem como característica determinante: 5 mm ou mais de perda de inserção interproximal no pior sítio ou perda óssea radiográfica, se estendendo à metade ou ao terço apical da raiz (Tonetti et al., 2018; Albandar et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018).

O Estágio IV, considerado o mais grave apresenta como característica determinante: 5 mm ou mais de perda de inserção interproximal no pior sítio ou perda óssea radiográfica se estendendo à metade ou ao terço apical da raiz, ainda pode ocorrer disfunção mastigatória, trauma oclusal secundário (mobilidade grau 2 ou 3), e problemas mastigatórios (Tonetti et al., 2018; Albandar et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018).

Caso haja “fatores de complexidade” (por exemplo, lesões de furca ou mobilidades avançadas), sobe-se o estágio ao pior cenário encontrado. Para todos os estágios, deve-se classificar ainda quanto à extensão em: localizada (até 30% dos dentes afetados), generalizada (30% dos dentes ou mais) ou padrão molar/incisivo (Tonetti et al., 2018; Albandar et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018).

Já as condições de periodontite necrosante são caracterizadas por processo inflamatório do periodonto, caracterizado por necrose/ulceração da papila interdental, sangramento gengival, halitose, dor e perda óssea

rápida; outros sinais/sintomas associados podem incluir formação de pseudomembrana, linfadenopatia e febre (Caton et al., 2018; Herrera et al., 2018; Papapanou et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018).

As outras doenças periodontais necrosantes (gingivite necrosante e estomatite necrosante) são reportadas na nova classificação das doenças periodontais de 2018 (Caton et al., 2018; Herrera et al., 2018; Papapanou et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018) juntamente no tópico de periodontite necrosante.

Gingivite necrosante é definida pelo processo inflamatório agudo do tecido gengival, caracterizado pela presença de necrose/ulceração das papilas interdentais, sangramento gengival e dor ou ainda presença de halitose, pseudomembranas, linfadenopatia regional, febre e sialorreia (em crianças) (Caton et al., 2018; Herrera et al., 2018; Papapanou et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018).

Já a estomatite necrosante é definida pela condição inflamatória severa do periodonto e da cavidade bucal, em que a necrose dos tecidos moles se estende além da gengiva, e a desnudação óssea pode ocorrer por meio da mucosa alveolar, com áreas aumentadas de osteíte e formação de sequestro ósseo; ocorrendo em pacientes severamente comprometidos (Caton et al., 2018; Herrera et al., 2018; Papapanou et al., 2018; Steffens e Marcantonio 2018).

Em humanos além das periodontites serem enfermidades locais da boca, estas estão associadas a distúrbios sistêmicos e metabólicos como: doenças osteoarticulares, afecções cardiorrespiratórias e diabetes (Kuo et al., 2008). Além disso, há evidências que sugerem que a síndrome metabólica e o diabetes podem alterar o microbioma bucal, e que indivíduos com síndrome metabólica têm 38% mais chances de ter periodontite (Daudt et al., 2018 ; Pirih et al., 2021).

Assim como ocorre em humanos, bovinos e outros ruminantes podem apresentar as principais formas de doenças periodontais em diferentes condições de manejo (Silva et al., 2016), contextos epidemiológicos (Dutra et al., 1993), dietas (Saraiva et al., 2023; Souza et

al., 2023; Vaccari et al., 2023) e regiões geográficas (Borsanelli et al., 2018; Ramos et al., 2019).

Contudo, o reconhecimento dessas apresentações nos animais (no que se refere ao diagnóstico clássico - a partir da sondagem gengival) são recentes, visto que os critérios empregados nos estudos iniciais baseavam-se primariamente, na frequência de ocorrência das lesões (Dutra e Borsanelli 2022) e nas adaptações feitas para o exame clínico bucal baseadas nas classificações das doenças periodontais em humanos, pois em medicina veterinária não há classificações específicas e consensuais, que contemplem os animais de produção em especial os ruminantes.

Outra enfermidade de etiologia distinta, mas que coocorre com as doenças periodontais é o desgaste dentário (Campello et al., 2019), uma enfermidade bucal descrita como a perda lenta e irreversível da coroa dental, acometendo a todas as superfícies expostas, com predomínio de bordas incisais e faces oclusais (Dyer et al., 2000; McGregor, 2011), e que compromete a oclusão dentária.

Em humanos o desgaste dentário foi associado a fatores de origem física, mecânica, como a atrição e abrasão, perda de estrutura mineral pelo processo de quelação e exposição do dente a substâncias ácidas, que ocorre na erosão (Imfeld, 1996; Huysmans et al., 2011).

Algumas proteínas de dentro da película salivar adquirida demonstraram ter a função de proteção do esmalte dental, como a histatina e a estaterina, impedindo os processos de erosão dental, porém estas são suscetíveis à degradação bacteriana na saliva (Cleaver et al., 2023).

Quantidades significativamente reduzidas de proteínas da película em indivíduos com erosão dentária foram observada em comparação com controles saudáveis, com destaque para a redução na estaterina (Carpenter et al., 2014; Mutahar et al., 2017), o que novamente sugere a presença de proteases afetando a película, assim uma vez que as bactérias bucais podem degradar proteínas salivares por atividade de

protease e peptidase, estas produzem ácidos orgânicos a partir da fermentação de aminoácidos, corroborando de maneira indireta para o processo de erosão dentária e cocorrência com as doenças periodontais.

Dentro dos múltiplos fatores envolvidos na ocorrência das doenças periodontais, classificar através de critérios objetivos, caracterizando a enfermidade nas populações animais, como é realizado em humanos é ponto chave para elucidar os aspectos sob a etiopatogênese, associações com outras enfermidades locais e sistêmicas, além do desgaste dentário, garantindo assim formas mais precisas de diagnóstico e controle para as doenças periodontais em ruminantes como realizado em humanos.

2.2 Doenças periodontais em ruminantes

As populações de ruminantes atualmente utilizadas para a produção animal foram domesticadas à 10.000 anos, e neste processo as doenças bucais já faziam parte de muitas realidades geográficas, dietéticas e genéticas desde a mais rudimentar produção (Bruford et al., 2003 ; Ajmone-Marsan et al., 2010; MacHugh et al., 2017; Holmes et al., 2021) até a mais tecnificada (Souza et al., 2023).

Nos períodos que compreendem as décadas de 1970 e 1980, no Brasil, um importante capítulo sobre os primeiros relatos de uma enfermidade peculiar, denominada “cara inchada” devido ao abaulamento facial decorrente de periostite crônica ossificante dos bovinos puderam ser escritos (Dobereiner et al., 1974, Dutra et al., 1993).

Na primeira manifestação observada de uma doença periodontal, uma periodontite agressiva e de progressão rápida, foi observada e tornou-se uma das mais importantes do período, pois sua origem era desconhecida, e os prejuízos econômicos estimados eram altos em função da alta prevalência da doença, nas diversas regiões do país principalmente em bovinos jovens em fase de dentição (Döbereiner et al., 1974; Dutra et al., 1993, Timns et al., 1992).

Os animais apresentavam baixo escore corporal, devido a

incapacidade de se alimentar e muitos morriam por inanição (Dutra et al., 1993).

As lesões da “cara inchada” geralmente começavam entre os segundos e terceiros pré-molares maxilares, resultando em formação de bolsa periodontal com acúmulo de restos alimentares e mau cheiro, característico do envolvimento de bactérias anaeróbias Gram-negativas, que foram isoladas a partir destas lesões em cultivo microbiano (Blobel et al., 1984; Botteon et al., 1993).

A recuperação clínica com a melhora e até possível remissão da doença, ocorria quando os animais eram transferidos para áreas consideradas “livres” da enfermidade (Döbereiner et al., 1975; Döbereiner e Dutra, 2000), como áreas de pastagens mais velhas ou que não tivessem passado por nenhum processo de reforma, porém a etiopatogênese da enfermidade não estava esclarecida.

Algumas informações sem embasamento científico associaram a “cara inchada” dos bovinos a deficiência ou desequilíbrio mineral, ou ainda ligada a estreptomicina do solo, que estaria presentes nas plantas e seria a causadora da enfermidade, porém ambas as hipóteses não tiveram respaldo científico ao longo dos anos, e foi observado que a etiopatogênese da doença periodontal era mais ampla (Moraes et al., 1994; Rosa e Döbereiner, 1994; Döbereiner et al., 2004).

Após o declínio natural da “cara inchada”, a doença pareceu estar controlada, porém as outras manifestações clínicas das doenças periodontais foram novamente objeto de estudo, sendo observados casos de periodontite bovina em diferentes contextos epidemiológicos (Ingham, 2001; Borsanelli et al., 2016).

Após quase 3 décadas, com o declínio da observação de “cara inchada” dos bovinos; em ovinos no Pará surtos de periodontite ovina foram descritos após os animais estabilados serem alimentados com forrageiras cultivadas em áreas recém reformadas (Silva et al., 2016).

Lesões de abaulamento facial, formação de abscessos, fístulas, destruição óssea e dificuldade a mastigação foram observadas em sua maioria em dentes mastigatórios, assim as características epidemiológicas e clínico-patológicas se assemelhavam bastante à epidemiologia da periodontite bovina (“cara inchada”), com diferença para a idade dos animais que não foi critério para o aparecimento das lesões, como ocorreu na “cara inchada” (Silva et al., 2016).

A presença de lesões periodontais foi observada em arcadas dentárias de 200 bovinos na Escócia no momento do abate em frigoríficos, e as maiores prevalências foram observadas nos dentes mastigatórios. O exame clínico dos dentes mastigatórios nos ruminantes somente é realizado pos morte, pois a contenção dos animais com sedativo torna a prática inviável e somente os dentes incisivos são examinados com os animais em tronco de contenção (Borsanelli et al., 2016).

Nos pequenos ruminantes de maneira peculiar nos ovinos, uma forma natural de periodontite também já foi descrita em países como: Reino Unido, Austrália e Nova Zelândia, recebendo a denominação de “broken mouth”, ou boca quebrada. Essa enfermidade acomete principalmente os incisivos de animais adultos provocando afrouxamento e perda dos dentes, o que acarreta em diminuição do desempenho e descarte precoce de animais antes do término da sua vida produtiva e reprodutiva (Andrews, 1960; Cannon et al., 1971; Spence et al., 1988).

Apesar da complexidade da etiopatogenia, acredita-se que espécies bacterianas potencialmente patogênicas induzam a uma resposta imunológica exagerada no hospedeiro, resultando nesta destruição do periodonto (Riggio et al., 2013).

No Brasil em ovinos também foi observada a ocorrência de recessão gengival em 58% de 129 ovelhas examinadas, das quais 16% apresentaram lesão nos incisivos e 53% nos dentes mastigatórios, também foi observado biofilme pigmentado aderido à superfície dos dentes. O sistema de criação dos ovinos era semi-extensivo e de

pastagens de *Panicum maximun cv. Massai* e *Urochloa brizantha*, além de serem suplementos com mistura mineral e silagem no período da seca (Agostinho et al., 2017).

Nos caprinos, a prevalência de enfermidades bucais em um estudo realizado por Campello et al., (2019), com 150 cabras em lactação de rebanhos estabulados, detectaram a ocorrência de lesão periodontal, através da avaliação da recessão gengival em 70,66% dos 150 animais avaliados, das quais 28% apresentaram lesões em dentes incisivos e 62% em dentes mastigatórios; biofilme supragengival pigmentado nos dentes também esteve presente em todos os animais.

A presença de lesões periodontais que incluíram gengivite e gengivite necrosante em bovinos jovens, manejados em áreas recém reformadas de pastagens experimentalmente foram observadas, neste estudo a virginiamicina via oral, foi utilizada e foi observado que o grupo que recebeu o antibiótico apresentou menos episódios de gengivite (128 episódios) quando comparados ao grupo controle (267 episódios) (Ramos et al., 2019).

Assim a doença periodontal em ruminantes pode ser observada em animais manejados em áreas recém reformadas, mas também criados em diferentes dietas (Fadden et al., 2015; Campello et al., 2019).

Em um estudo retrospectivo de cervos mantidos em centro de conservação ao longo de 30 anos, 49 (18,77%) cervos-do-pantanal (31 fêmeas (63,27%) e 18 machos (36,73%)) apresentaram afecções clínicas bucais como, aumento de volume facial (65,3%), acúmulo de alimentos na boca (36,7%), perda dentária (22,4%), fístulas (22,4%), lesões nas mucosas ou palatinas (22,4%), desgaste dentário (20,4%) e exposição de raiz (18,3%) (Borsanelli et al., 2022 c).

Campello et al., (2019) também associaram a ocorrência de periodontite a presença de biofilme supragengival pigmentado nas cabras leiteiras confinadas e ao desgaste dentário excessivo. A presença de desgaste dentário também já foi observada coocorrendo em ovinos com lesões periodontais (Agostinho et al., 2017).

O processo de co-ocorrência do desgaste e periodontite exacerba significativamente a perda em produtividade e desempenho dos animais que, apesar de possuírem etiologias aparentemente distintas, fatores comuns podem estar associados ao desenvolvimento ou agravamento de ambas (Campello et al., 2019).

A composição bioquímica proteica da saliva foi associada à etiopatogênese do desgaste dentário em ruminantes, atuando como um fator biológico neutralizador e tamponante essencial para proteção da estrutura dental, além de afetar diretamente os fenômenos de remineralização dental (Hara e Zero, 2014), constituindo um dos principais fatores observados quando a perda de estrutura mineral e dentária em humanos.

Em análises recentes do proteoma da saliva de bovinos jovens confinados, proteínas com funções antimicrobianas e anti-inflamatórias foram encontradas no proteoma salivar, com um maior número de processos biológicos e imunológicos alterados na saliva após 60 dias de experimento, com duas dietas sendo capazes de induzir episódios de gengivite (Saraiva et al., 2023).

Dado a importância das doenças periodontais no comprometimento das condições bucais e sistêmicas de ruminantes, faz-se necessário o conhecimento dessas enfermidades e seus diferentes fatores predisponentes, como as diferentes dietas utilizadas na produção animal, estudos nas forrageiras que servem de alimento aos animais, enfatizando nutrição e biodisponibilidade de nutrientes da planta por exemplo, uma vez que a dieta e disbiose do ambiente bucal são, reconhecidamente, fatores primários no desencadeamento de doenças bucais nos ruminantes.

2.3. Ecologia microbiana bucal de ruminantes

Fatores como idade, hospedeiro, ambiente, hábitat e a maturação do biofilme estão entre os principais fatores e suas respectivas variáveis que determinam a composição da microbiota no complexo ecossistema bucal (Rosier et al., 2018).

A diversidade da microbiota bucal muda com a idade (tempo) do hospedeiro, com a erupção do dente, com a transferência horizontal de microorganismos, mudanças hormonais e no sistema imunológico, além do ambiente (dieta) no qual o hospedeiro está inserido, e os habitats da cavidade bucal se diferem também em condições ambientais, nos níveis de oxigênio, ph e nutrição (Dutra e Borsanelli 2022).

Neste contexto o binômio saúde e doença dentro das doenças periodontais apresenta como um dos fatores iniciadores as modificações da comunidade microbiana simbiótica, primariamente composta por bactérias facultativas como *Actinomyces* e *Streptococcus*, para uma comunidade disbiótica diversa nos nichos periodontais, favorecida por fatores de virulência em um ambiente já inflamatório, que em conjunto com a reposta desregulada e ineficaz do hospedeiro, que não debela o processo infeccioso (Hajishengalis e Lamont, 2012; Hajishengalis, 2014; Hajishengalis, 2015).

Como fatores precursores iniciais das doenças periodontais enquadra-se a própria estrutura dentária, por ser não descamativa e apresentar um ambiente propício para a formação de biofilmes, que favorecem um ambiente de saúde bucal, mais também podem ser fatores chaves iniciadores na ocorrência e progressão das periodontopatias (Lang et al., 2010; Socransky e Haffajje, 2010).

As estruturas bacterianas que compõem o biofilme dental juntamente com as secreções das glândulas salivares podem favorecer após um período a mineralização do cálculo dentário (Ackali e Lang, 2018; Lang et al., 2010).

A junção entre o acúmulo de cálculo dental e o metabolismo bacteriano podem ter como consequência o início do processo inflamatório dos tecidos moles alterando a ecologia local e promovendo o crescimento exacerbado das bactérias Gram-negativas (Dutra e Borsanelli 2022).

Nos ruminantes, em especial os bovinos, o cálculo dental supragengival pode ser visualizado como uma estrutura pigmentada de

coloração escura e aderida aos dentes e sua composição está associada à presença de alguns elementos importantes como ferro, manganês e carbono (Saraiva et al., 2019).

Em ovinos e cabras o cálculo supragengival já foi correlacionado à retração gengival, um sinal clínico clássico do processo de evolução para a ocorrência da periodontite (Agostinho, 2017; Campello et al., 2019).

Anteriormente devido à superestimação dos métodos de diagnósticos baseados em cultura, utilizados com o objetivo de definir os agentes etiológicos da doença e pelo fato de grande parte dos microrganismos presentes na mucosa bucal ser de difícil cultivo, esse paradigma perdurou até os avanços das técnicas moleculares independentes de cultivo, as quais sugeriram que a etiologia das doenças periodontais envolvia sinergia polimicrobiana e disbiose (Hajishengallis, 2014; Darveau, 2010).

Em ruminantes o estudo para o entendimento sobre a microbiologia da ecologia bucal de ruminantes obteve então um salto em conhecimento com as técnicas moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR).

As análises iniciais do biofilme dental bovino demonstraram a presença de alguns patógenos já reconhecidos na etiopatogênese das doenças periodontais em humanos, como as bactérias dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* (Hajishengallis, 2014; Hajishengallis, 2015; Borsanelli et al., 2015; Borsanelli et al., 2017).

Já em bovinos com periodontite *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Prevotella intermedia* (61,5%) são as espécies mais prevalentes (Borsanelli et al., 2015).

Nos ovinos com lesões de periodontite, alguns grupos de microrganismos foram observados destacando-se: *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella buccae* e *Prevotella melaninogenica* (Borsanelli et al., 2017).

Quanto a composição bacteriana dental de ovinos com bolsas periodontais, alguns outros patógenos foram identificados como: *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum* e *Tannerella*

forsythia (Agostinho, 2017).

Campello et al. (2019) no biofilme subgengival de cabras identificaram *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 outros animais.

Em bovinos com quadros de gengivite e gengivite necrosante, a identificação de algumas espécies microbianas potencialmente patogênicas foi realizada e resultou na observação de patógenos como *Fusobacterium nucleatum*, classe *Mollicutes*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis* e *Treponema denticola* (Ramos et al., 2019).

A utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) pode apresentar algumas limitações quando comparada ao sequenciamento de alto rendimento, porém as análises de PCR fundamentaram os conceitos sobre os patógenos presentes em lesões periodontais de ruminantes (Ramos et al., 2019), e corroboraram no entendimento dos efeitos da disbiose possivelmente relacionada à etiologia multifatorial dessas infecções.

Com o entendimento da microbiota diversa nos diferentes nichos bucais, caracterizar o microbioma de lesões periodontais de bovinos, e comparar com a microbiota encontrada, utilizando técnicas de sequenciamento do gene 16S rRNA, transforma o entendimento com diferentes abordagens, dentre as quais se destacam: anotação taxonômica, estudo da diversidade, riqueza microbiana e anotação funcional.

A mudança dos perfis microbianos associados à disbiose do biofilme bucal bovino foi verificada pelas diferenças significativas entre a microbiota dental de sítios dentários de bovinos com periodontite e saudáveis, na microbiota subgengival de bovinos sadios, *Gastranaerophilus*, *Planifilus*, *Burkholderiae* e *Arcobacter* foram os táxons

mais prevalentes, enquanto que em animais com periodontite *Propionivibrio*, *Wolinella*, *Porphyromonas*, *Candidatus*, *Prevotella*, *Firmicutes*, *Bacteroides* e *Treponema* foram os táxons mais predominantes (Borsanelli et al., 2018).

Nas análises de diferentes condições clínicas bucais de ovinos, incluindo sítios dentários saudáveis e com periodontite, o microbioma dental de sítios dentários com periodontite é mais rico e diverso que o o microbioma dental de ovinos clinicamente saudáveis, com presença de interações sinérgicas e antagônicas entre os microorganismos (Borsanelli et al., 2021).

Nos ovinos com periodontite os gêneros mais prevalentes encontrados são *Petrimonas*, *Acinetobacter*, *Porphyromonas* e *Aerococcus* e em animais clinicamente saudáveis, os gêneros mais significativos são classificados em *Pasteurellaceae*, *Pseudomonas* e *Neisseria* (Borsanelli et al., 2021).

Bactérias do gênero *Fusobacterium* são detectadas em alta prevalência em ambos os grupos, e juntamente com *Petrimonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella* são indicados como possíveis patógenos-chave da comunidade disbiótica de ovinos com periodontites (Borsanelli et al., 2021).

Borsanelli et al. (2022a) evidenciaram maior modularidade no biofilme de cabras saudáveis e maior número de interações negativas no biofilme de cabras com periodontite.

A partir das inter-relações, pode-se inferir que bactérias do gênero *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Prevotella* estão associadas ao processo de periodontite em caprinos, e nas análises de predição as proteínas ligadas a tradução citoplasmática e processamento de rRNA estão em maior abundância na microbiota dental de caprinos com periodontite, assim essas análises complementam as análises microbiológicas (Borsanelli et al., 2022c).

Na Amazônia brasileira com a finalidade de identificar possíveis patógenos e proteínas chaves associados à doença periodontal, a

microbiota dental e ruminal de bovinos criados em novas áreas de pecuária extensiva foram analisadas e pôde-se observar que os microbiomas de incisivos dentários e de fluido ruminal são compostas por bactérias dos Filos Firmicutes e Bacteroidetes (Borsanelli et al., 2022b).

Famílias de proteínas relacionadas à resposta inflamatória, morte celular, patogênese de micro-organismos e superantígenos foram preditas no microbioma dental e ruminal de bovinos com periodontite com os patógenos chaves que estiveram presentes tanto no microbioma do rúmen, quanto no microbioma dental os dos gêneros: *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Actinomyces*, já observados em outros estudos como patógenos periodontais (Borsanelli et al., 2022b).

A compreensão da etiopatogênese das doenças periodontais em ruminantes foi bem elucidada do ponto de vista dos microorganismos presentes nos diferentes nichos dentários de animais adultos, porém se observa que uma parcela significativa das bactérias bucais é de difícil cultivo.

Nesse sentido, a análise metagenômica da microbiota bucal por técnica de sequenciamento de última geração (NGS) pode proporcionar uma visão mais abrangente do microambiente bucal auxiliando na determinação de genes de origem bacteriana potencialmente envolvidos na doença periodontal, bem como na identificação de espécies cultiváveis e não-cultiváveis.

Os resultados do estudo podem, em última instância, contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos etiológicos da periodontite, bem como para a definição de marcadores moleculares para estudos futuros, quando se observa diferentes condições clínicas bucais em diferentes categorias animais.

Referências

Akcali A, Lang NP (2018) Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. *Periodontol* 2000 76:109-115.

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

Ajmone-Marsan P, Garcia J F, Lenstra JA (2010) On the origin of cattle: How aurochs became cattle and colonized the world. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews* 19:148–157.

Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. (2018) Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol* 45 Suppl 20: S171-S189.

Andrews AH (1960) Acquired diseases of the teeth and mouth in ruminants. In.: Saunders WB. *Veterinary Dentistry Philadelphia*, p. 256-271.

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

Botteon RM, Dutra IS, Döbereiner J, Blobel H (1993) Characterization of anaerobic bacteria isolated from periodontal lesions of bovine “swollen face”. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13: 51-55.

Borsanelli AC, Gaetti-Jardim Jr E, Schweitzer CM, Döbereiner J, Dutra IS (2015) 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, Saraiva JR, Pádua DB, Athayde FR, Vaccari J, Zanetti ES, Dutra IS (2022c) Oral affections in an *ex situ* population of marsh deer (*Blastocerus dichotomus*): a retrospective study (1990-2020). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 42.

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.

Borsanelli AC, Athayde FRF, Agostinho SD, Riggio MP, Dutra IS (2021) Dental biofilm and its ecological interrelationships in ovine periodontitis. *Journal of Medical Microbiology* 70(7):doi:10.1099/jmm.0.001396. PMID: 34313584.

Borsanelli AC, Viora L, Lappin DF, Bennett D, King G, Dutra IS, Riggio MP (2016) Periodontal lesions in slaughtered cattle in the west of Scotland. *Veterinary Record* 179(25):652. doi: 10.1136/vr.103931. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27780900.

Borsanelli AC, Athayde FRF, Saraiva JR, Riggio MP, Dutra IS (2022a) 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 AC, Athayde FRF, Riggio MP, Brandt BW, Rocha FI, Jesus EC, Gaetti-Jardim E Jr, Schweitzer CM, Dutra IS. (2022b). Dysbiosis and predicted function of dental and ruminal microbiome associated with bovine periodontitis. *Front Microbiol.*

Bruere AN, West DM, Orr MB, O'callaghan MWA (1979) Syndrome of

dental abnormalities of sheep. 1. Clinical aspects on a commercial sheep farm in the Wairarapa. *New Zealand Veterinary Journal* 47:152-158.

Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 4:900-910.

Campello P, Borsanelli AC, Agostinho S, Schweitzer CM, Gaetti-Jardim Jr E, Döbereiner J, Dutra IS (2019) Occurrence of periodontitis and dental wear in dairy goats. *Small Ruminant Research* 175:133-41.

Cannon DJ, Napier K, Hanrahan PD (1971) Some sheep-wheat men could reduce costs. *Agricultural Journal of Victoria* 69:154-156.

Carpenter G, Cotroneo E, Moazzez R, Rojas-Serrano M, Donaldson N, Austin R, Zaidel L, Bartlett D, Proctor G (2014) Composition of enamel pellicle from dental erosion patients. *Caries Research* 48:361-367.

Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS (2018) A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*. 45 Suppl 20: S1-S8.

Cleaver, LM, Carda-Diéguez M, Moazzez R, Carpenter GH (2023) Novel bacterial proteolytic and metabolic activity associated with dental erosion-induced oral dysbiosis. *Microbiome* 11: 69.

Daudt LD, Musskopf ML, Mendez M, Remonti LLR, Leitão CB, Gross JL, Weidlich P, Oppermann RV (2018) Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Brazilian Oral Research* 32:e35.

Darveau RP (2010) Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 8: 481-490.

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.

Dutra IS, Borsanelli AC (2022) *Saúde Bucal de Ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP. 164 p.

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.

Dyer D, Addy M, Newcombe RG (2000) Studies in vitro of abrasion by different manual toothbrush heads and a standard toothpaste. *Journal of Clinical Periodontology* 27:99-103.

Fadden AN, Poulsen KP, Vanegas J, et al. (2015) Dental pathology in conventionally fed and pasture managed dairy cattle. *Veterinary Record* 2:1-7.

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.

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

Hajishengalis G (2014) Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobiontes and host response. *Trends in Immunology* 35(1):3-11.

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

Hara AT, Zero DT (2014) The potential of saliva in protecting against dental erosion. *Monographs in oral science* 25:197-205.

Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M (2018) Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *Journal of Clinical Periodontology*. 45 Suppl 20: S78-S94.

Holmes M, Thomas R, Hamerow H (2021) Periodontal disease in sheep and cattle: Understanding dental health in past animal populations. *International Journal of Paleopathology* 33:43-54.

Holmstrup P, Plemons J, Meyle J (2018) Non-plaque-induced gingival diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 45 Suppl 20: S28-S43.

Huysmans MCDNJM, Chew HP, Ellwood RP (2011) Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Research* 45:60-68.

Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links (1996) *European Journal of Oral Sciences* 104(2):151-155.

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

Klugh 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, Attstrom 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, 173-196.

Lang NP, Schätzle MA, Loe H (2009) Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 36(10):3-8.

MacHugh DE, Larson G, Orlando L (2017). Taming the Past: Ancient DNA and the Study of Animal Domestication. *Annual Review of Animal Biosciences* 5: 329–351.

McGregor BA (2011) Incisor development, wear and loss in sheep and their impact on ewe production, longevity and economics: a review. *Small Ruminant Res* 95:79-87.

Moraes SS, Silva GN, Döbereiner J (1994) Microelementos minerais e a "cara inchada" dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 14(1):25-33.

Mutahar M, O'Toole S, Carpenter G, Bartlett D, Andiappan M, Moazzez R (2017) Reduced statherin in acquired enamel pellicle on eroded teeth compared to healthy teeth in the same subjects: An in-vivo study. *PLoS One* 12: e0183660.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kerschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS (2018) Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*. 89 Suppl 1: S173-S182.

Pirih FQ, Monajemzadeh S, Singh N, Sinicola RS, Shin JM, Chen T, Fenno JC, Kamarajan P, Rickard AH, Travan S, Paster BJ, Kapila Y (2021) Association between metabolic syndrome and periodontitis: The role of lipids, inflammatory cytokines, altered host response, and the microbiome. *Periodontol 2000* 87(1):50-75.

Ramos TNM, Borsanelli AC, Saraiva JR, Vaccari J, Schweitzer CM, Gaetti-Jardim Jr E, Dutra IS (2019) Efficacy of virginiamycin for the control of periodontal disease in calves. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 39(2):112-122.

Riggio PM, Jonsson N, Bennett D (2013) Culture-independent identification of bacteria associated with ovine 'broken mouth' periodontitis. *Veterinary Microbiology* 166:664-669.

Rosa IV, Döbereiner J (1994) "Cara inchada" dos bovinos e deficiências minerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 14(1):43-48.

Rosier BT, Marsh PD, Mira A (2018). Resilience of the oral microbiota in health: mechanisms that prevent dysbiosis. *Journal of Dental Research* 97 (4): 371-380.

Rossi Junior, JL, Gioso MA, Domingues-Falqueiro LM (2007) Estudo Comparativo sobre Prevalência de Doença Periodontal em Panthera onça mantida em cativeiro e em indivíduos de natureza. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(5):209-214.

Saraiva JR, Ramos TNM, Borsanelli AC, Schweitzer CM, Gaetti-Jardim Jr, Hofling JF, Ramos TNM, Dutra IS (2019) Chemical and structural composition of black pigmented supragingival biofilm of bovines with periodontitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 39: 933-941.

Saraiva JR, Dionizio A, Borsanelli AC, Ventura TMS, Thomassian LTG, Athayde FRF, Vaccari J, Ramos TNM, Souza NC, Buzalaf MAR, Dutra IS (2023) Gingivitis in cattle and supplemental protein diet: Insights from proteomic analysis. *Journal of Proteomics* 104913.

Silva NS, Silveira JAS, Lima DHS, Bomjardim HA, Brito MF, Borsanelli AC, Dutra IS, Barbosa JD (2016) Epidemiological, clinical and pathological aspects of an outbreak of periodontitis in sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(1):1075-1080.

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.

Souza NC, Ramos TNM, Borsanelli AC, Saraiva JR, Ferreira EM,

Schweitzer CM, Gaetti-Jardim Jr E, Dutra IS (2023) Monitoring periodontal lesions and their effects during pregnancy: microbiological aspects of the oral cavity and amniotic fluid in pregnant ewes. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 43:e07160.

Spence JA, Aitchinson GU, Fraser J (1988) Development of periodontal disease in a single flock of sheep: clinical signs, morphology of antimicrobial agents. *Research in Veterinary Science* 45:323-331.

Steffens JP, Marcantonio RAC (2018) Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. *Revista de Odontologia da UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho* 47(4):189-197.

Takada K, Hayashi K, Sato Y, Hirasawa M (2010) *Prevotella dentasini* sp. nov., a black pigmented species isolated from the oral cavity of donkeys. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:1637-1639.

Tims FM, Dutra IS, Matsumoto T, Döbereiner J (1992) Eficiência da virginamicina na recuperação de bezerros com a doença peridentária "cara inchada". *Pesquisa Veterinária Brasileira* 12:77-80.

Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS (2018) Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Clinical Periodontology* 45 Suppl 20: S149-S161.

Vaccari J, Ramos TNM, Gaetti-Jardim Jr E, Chaves-Neto AH, Borsanelli AC, Saraiva JR, Souza NC, Bomfim SRM, Schweitzer CM, Dutra IS (2023) Gingivitis in calves: longitudinal hematological and metabolic profiles-and salivary buffering capacity in animals treated with virginiamycin. *Ciência Rural* 53: e20240475.

Artigo nas normas da revista Research in Veterinary Science

CAPÍTULO 2 – Microbiota associada a gengivite e periodontite em sítios dentários de bovinos jovens

Juliana Vaccari^a, Ana C. Borsanelli^b, Flávia R.F. Athayde^c, Júlia R. Saraiva^a,
Thamiris N. M. Ramos^a, Iveraldo S. Dutra^{c*}

^a Programa de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), via de Acesso Prof Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. E-mail: juliana_vaccari@hotmail.com; julia_becca@hotmail.com; thami.naiasha@gmail.com

^b Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG), Rodovia Goiânia - Nova Veneza, km 8, Campus Samambaia, Goiânia, GO 74690-900, Brasil. E- mail: anaborsanelli@ufg.br

^c Departamento de Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), Rua Clóvis Pestana, 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil. E-mail: f flavia.athayde@gmail.com

*Autor correspondente

Iveraldo dos Santos Dutra (iveraldo.dutra@unesp.br)

Destaques

- A microbiota de sítios dentários com periodontite é mais diversa do que a de sítios dentários com gengivite

- O filo Actobacteriota foi o mais abundante em sítios dentários saudáveis, com gengivite e periodontite
- O filo Fusobacteriota representou 27,6% de abundância nos sítios dentários com periodontite
- O gênero *Moraxella* está associado aos sítios dentários saudáveis, com gengivite e periodontite e exerce papel crucial no binômio saúde *versus* doença
- O gênero *Caviibacter* é o mais prevalentes nos sítios dentários com periodontite

Abstract

Periodontal diseases are common oral disorders in ruminants, associated with dental biofilm dysbiosis caused by bacteria, which cause damage to animal health and welfare. A significant portion of the oral microbiota cannot be detected by laboratory cultivation, so research based on molecular techniques can provide important information. In the present study, we evaluated the microbiota of dental sites of young cattle that presented gingivitis (n=5), periodontitis (n=5) and that were clinically healthy (n=5), using 16S rRNA gene sequencing and analysis of co-occurrence network. In the dental microbiome, the analyzes in “amplicon sequence variance” - ASVs, were classified by species in the different analyzes carried out at different dental sites, with emphasis on *Caviibacter* abscesses, *Mannheimia haemolytica* and *Fusobacterium nucleatum*. In the analysis of abundance, the phylum Proteobacteria was the most abundant in healthy dental sites and with gingivitis and periodontitis, and the phylum Fusobacteriota represented 27.6% of abundance in dental sites with periodontitis. *Moraxella* (21.11%), *Neisseria* (13.16%) and *Lautropia* (7.69%) were the most

abundant genera in healthy dental sites, whereas *Neisseria* (23.65%), *Moraxella* (18.95%) and *Conchiformibius* (10.79%) were the most abundant genera in dental sites with gingivitis and *Caviibacter* (19.78%), *Moraxella* (16.13%) and *Fusobacterium* (7.56%) were the most prevalent in sites teeth with periodontitis. In the analyzes of richness and dissimilarity, differences between the dental sites were not observed, however there was a significant difference between the dental sites with gingivitis and periodontitis ($p=0.04$), in the analysis of diversity by the Shannon index. In the comparisons between the ASVs, the dental sites with periodontitis, when compared to both healthy dental sites and dental sites with gingivitis, present different ASVs of *Moraxella*. The co-occurrence networks showed significant differences between the hub phyla of different dental sites and positive interactions were demonstrated in greater numbers in dental sites with periodontitis. In this study that investigated the microbiota of different dental sites of young cattle, using the 16S rRNA gene sequencing technique, dental sites with periodontitis proved to be more diverse than dental sites with gingivitis. The genus *Caviibacter* in dental sites with periodontitis was the most prevalent and the genus *Moraxella* was observed in all evaluated clinical conditions, playing a crucial role within the symbiotic and dysbiotic niches in periodontal diseases.

Keywords: Calf, gingivitis, microbiota, periodontitis

Resumo

As doenças periodontais são distúrbios bucais comuns em ruminantes, associadas a disbiose do biofilme dentário causado pelas bactérias, as quais acarretam danos à saúde e bem-estar animal. Uma parcela significativa da microbiota bucal não pode ser detectada pelo cultivo em laboratório, assim pesquisas baseadas em técnicas

moleculares podem trazer informações importantes. No presente estudo, avaliou-se a microbiota de sítios dentários de bovinos jovens que apresentavam gengivite (n=5), periodontite (n=5) e que estavam clinicamente saudáveis (n=5), utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA e análise de rede de coocorrência. No microbioma dental as análises em “*amplicon sequence variance*” - ASVs, foram classificadas em espécie nas diferentes análises realizadas dos diferentes sítios dentários, com destaque para *Caviibacter abscessus*, *Mannheimia haemolytica* e *Fusobacterium nucleatum*. Nas análises de abundância o filo Proteobacteria, foi o mais abundante em sítios dentários saudáveis e com gengivite e periodontite e o filo Fusobacteriota representou 27,6% de abundância em sítios dentários com periodontite. *Moraxella* (21,11%), *Neisseria* (13,16%) e *Lautropia* (7,69%), foram os gêneros mais abundantes nos sítios dentários saudáveis, já *Neisseria* (23,65%), *Moraxella* (18,95%) e *Conchiformibius* (10,79%), foram os gêneros mais abundantes nos sítios dentários com gengivite e *Caviibacter* (19,78%), *Moraxella* (16,13%) e *Fusobacterium* (7,56%), foram os mais prevalentes nos sítios dentários com periodontite. Nas análises de riqueza e dissimilaridade, diferenças entre os sítios dentários não foi observada, no entanto na análise de diversidade pelo índice de Shannon houve diferença significativa entre os sítios dentários com gengivite e periodontite ($p=0,04$),. Nas comparações entre as ASVs os sítios dentários com periodontite quando comparados tanto a sítios dentários saudáveis e sítios dentários com gengivite, apresentam diferentes ASVs de *Moraxella*. As redes de coocorrência demonstraram diferenças expressivas entre os filios hub dos diferentes sítios dentários, e interações positivas foram demonstradas em maior número nos sítios dentários com periodontite. Neste estudo que investigou a microbiota de diferentes

sítios dentários de bovinos jovens, pelo uso da técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA, os sítios dentários com periodontite demonstraram ser mais diversos do que os sítios dentários com gengivite. O gênero *Caviibacter* em sítios dentários com periodontite foi o mais prevalente e o gênero *Moraxella* foi observado em todas as condições clínicas avaliadas, exercendo um papel crucial dentro dos nichos simbióticos e disbióticos nas doenças periodontais.

Palavras-chave: Bezerro, gengivite, microbiota, periodontite

1. Introdução

A boca representa um complexo microbioma, composto em sua ecologia principalmente, por uma ampla variedade de espécies bacterianas, tanto comensais, quanto patogênicas (Dewhirst et al. 2010; Jenkinson e Lamont, 2005).

As interações entre a microbiota dinâmica, associadas a disbiose do biofilme bucal (Hajishengallis, 2015; Saraiva et al., 2019;), a resposta inflamatória do hospedeiro (Socransky et al., 1998; Ai et al., 2017; Borsanelli et al., 2018a) e à dieta, (Dutra et al., 1993; Ramos et al., 2019); podem desencadear em ruminantes afeções periodontais (Borsanelli et al., 2022a).

Na dinâmica do biofilme bucal, este forma-se devido a capacidade dos microorganismos se agruparem e interagirem de forma complexa dentro das comunidades microbianas (Darveau, 2010; Hajishengallis, 2015).

Os biofilmes podem permanecer em harmonia com o hospedeiro, porém um aumento em quantidade de bactérias gram-negativas anaeróbias específicas ou seus produtos tóxicos, muitas vezes causada por uma disbiose provocada por variações ambientais pode induzir um processo inflamatório levando a doenças periodontais,

como gengivites e periodontites (Hajishengallis, 2015; Ramos et al., 2019; Borsanelli et al., 2021a; Borsanelli et al., 2022b).

Da microbiota já identificada em biofilmes de ruminantes, os filos Proteobacteria, Fusobacteria e Bacteroides já foram descritos na riqueza dos microbiomas de bovinos adultos com doença periodontal na Amazônia (Borsanelli et al., 2022b). Em bezerros com quadros de gengivite e gengivite necrosante também já foram identificadas algumas espécies microbianas como *Fusobacterium nucleatum*, e espécies do gênero *Porphyromonas* (Ramos et al., 2019).

Entretanto, ainda pouco se conhece sobre as mudanças ecológicas e interações que ocorrem na microbiota dental de bovinos jovens com diferentes condições clínicas periodontais e em fase de dentição; assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a microbiota associada as diferentes condições clínicas bucais de incisivos de bovinos jovens, em fase de dentição decídua, utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA e descrever as redes de coocorrência para verificar interações entre comunidades microbianas neste biofilme dentário.

2. Material e métodos

2.1. Bezerros e manejo alimentar

Foram avaliadas amostras de biofilme de sítios dentários em incisivos de 12 bovinos machos jovens da raça Jersey e em fase de dentição decídua. Os animais estavam em um grupo único, que pastejava a 90 dias uma em área de pastejo semelhante ao utilizado na pecuária convencional, com capim *Panicum maximum* cv. *massai* e *Panicum maximum* cv. *Mombaça*. Todos os animais receberam sal comum (NaCl) e água *ad libitum*.

2.2. *Exame clínico intra-bucal*

A caracterização clínica bucal foi determinada pelo aspecto visível da arcada dentária e periodonto, utilizando como parâmetro a sondagem da margem gengival com sonda periodontal Williams nos oito dentes incisivos dos 12 bovinos, totalizando 96 exames de sítios dentários. A sonda foi levemente introduzida no sulco gengival e posicionada paralelamente ao eixo do dente na face labial, percorrendo toda a margem dos dentes incisivos de maneira uniforme, conforme descrito por Borsanelli et al. (2021a).

Foram considerados sítios dentários saudáveis os que não apresentaram qualquer tipo de alteração inflamatória nos bordos gengivais ou qualquer outro sinal clínico de inflamação no periodonto. Presença de alterações inflamatórias nos bordos gengivais como edema, alteração de cor e sangramento espontâneo ou à sondagem, foram considerados indicativos de gengivite (Ramos et al., 2019); sítios dentários que apresentavam supuração, presença de bolsa periodontal e ressecção gengival foram classificados como sítios dentários com periodontite.

2.3. *Coleta de biofilme dentário dos incisivos*

Observando a premissa que os sítios dentários são individualizados, foram selecionados dos 96 sítios dentários avaliados em um mesmo exame clínico; 15 amostras de biofilme dentário obtido da face vestibular mesial dos incisivos, divididos igualmente, em 5 amostras de biofilme de sítios dentários saudáveis (HPS), 5 amostras de biofilme de sítios dentários com gengivite (GPS) e 5 amostras de biofilme de sítios dentários com periodontite (SPS). A coleta de biofilme foi realizada utilizando-

se cureta Gracey e gaze estéreis. As amostras foram posteriormente mantidas em 250µl de RNALater - R0901 (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido), e armazenadas a -80°C até serem processadas (Borsanelli et al. 2018b).

2.4. *Extração de DNA*

A extração de DNA das amostras do biofilme dentário foi realizada com Kit *GenElute Mammalian Genomic DNA Minipret* de acordo com as instruções do fabricante (Sigma, EUA).

2.5. *Processamento do sequenciamento*

O sequenciamento genético e as bibliotecas das amostras foram feitas usando um conjunto de primers e código de barras adaptados para a plataforma Illumina HiSeq2000 e MiSeq que tem como alvo a região V4 do rRNA 16S gene (517F-806R) (Caporaso et al., 2011; Borsanelli et al., 2022a). Os amplicons foram sequenciados em uma corrida MiSeq de 151pb x 12pb x 151pb utilizando-se primers e procedimentos de sequenciamento personalizados (Caporaso et al., 2012).

2.6. *Análise das sequências do sequenciamento*

Os “reads” da região V4 do gene 16S foram processados e implementados com o programa R (DADA2 (v.1.22)) na linguagem R (Callahan et al., 2016). Foi utilizado o “*pipeline*” completo implementado ao programa, que transforma os “reads” do sequenciamento em amostras com atribuição taxonômica. A identificação taxonômica foi feita classificando sequências biológicas únicas, ASV, do inglês “*Amplicon Sequence Variant*”, pelo método do classificador bayesiano implementado pelo Pacote R (DADA2), com o banco de referências do Silva (v138) (Quast et al., 2012).

As análises foram realizadas no ambiente R 4.1.2 (R Team, 2021).

2.7. Análise estatística

As ASVs foram alocadas em tabela gerada pelo programa DADA2 do Pacote R, em seguida foram subamostradas de maneira aleatória de acordo com a profundidade de leitura das amostras de cada sítio dentário avaliado; em seguida, todas as ASVs agrupadas com menos de 5 leituras em cada condição clínica foram removidas manualmente.

A estas ASVs foi aplicado cálculos de diversidade alfa e beta e os índices de diversidade alfa foram estimados para determinar a riqueza com a contagem de ASVs por amostra, e a riqueza e uniformidade de ASVs foram calculados com o índice de Shannon pelo Pacote R “vegan” (Dixon, 2003).

A tabela da diversidade alfa foi comparada usando análise de variância (ANOVA) implementada no programa base do R. A diversidade beta foi calculada para comparar a composição da microbiota entre as condições clínicas, usando dissimilaridade de Bray-Curtis e análise de coordenadas principais (PCoA), as diferenças entre os perfis microbianos das condições clínicas foram realizadas com análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) da função adonis no pacote R “vegan”.

Para análise de abundância diferencial as contagens de ASVs de cada condição clínica foram importadas para o programa DESeq2 (Love et al. 2014) e um pacote do “R/Bioconductor” (Gentleman et al., 2004), onde os dados são baseados na distribuição binomial negativa foi utilizado.

2.8. Redes de coocorrência

As abundâncias das ASVs classificadas com a taxonomia de mesmo filo foram

somadas, para a construção de uma tabela referente aos filamentos em cada sítio dentário. Essa tabela foi usada na construção de uma matriz de correlação e valor de p entre os filamentos a partir dos sítios dentários de cada condição clínica, as matrizes foram geradas com o algoritmo SparCC (Friedman e Alm, 2012) implementado no Mothur (Schloss et al., 2009) e filtradas com um valor absoluto de correlação de 0,5 e $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Saída de sequenciamento

O sequenciamento genético das 15 amostras de biofilme dentário gerou 449.597 reads. Ao remover os erros de sequenciamento e as sequências indesejáveis, restaram 92% das sequências (413.493). Destas, foram identificadas e removidas 12.753 (3%) sequências consideradas “chimeras”. Com os 400.740 restantes realizou-se o alinhamento contra o banco de dados SILVA e 394 amplicon sequence variants (ASVs) foram atribuídas.

Para normalização dos dados nas contagens de ASVs por amostra, realizou-se uma *subsampling* em 8.690 reads nos dados processados (374 ASVs), com a remoção das ASVs inferiores a 5, assim restaram 291 ASVs, destas 5 ASVs pertencem ao domínio Archaea.

3.2. Abundância das ASVs nos filamentos do biofilme dentário

As 291 ASVs representaram 18 filamentos, mas somente cinco deles apresentaram abundância superior a 1%. Proteobacteria representou mais de 80% da abundância relativa dos sítios dentários saudáveis e com gengivite e foi o mais abundante nas três condições clínicas avaliadas. O filo Fusobacteriota que possui uma pequena representatividade nos sítios dentários saudáveis e com gengivite (< 2%), representou

27,6% dos filos identificados nos sítios dentários com periodontite. (Fig. 1).

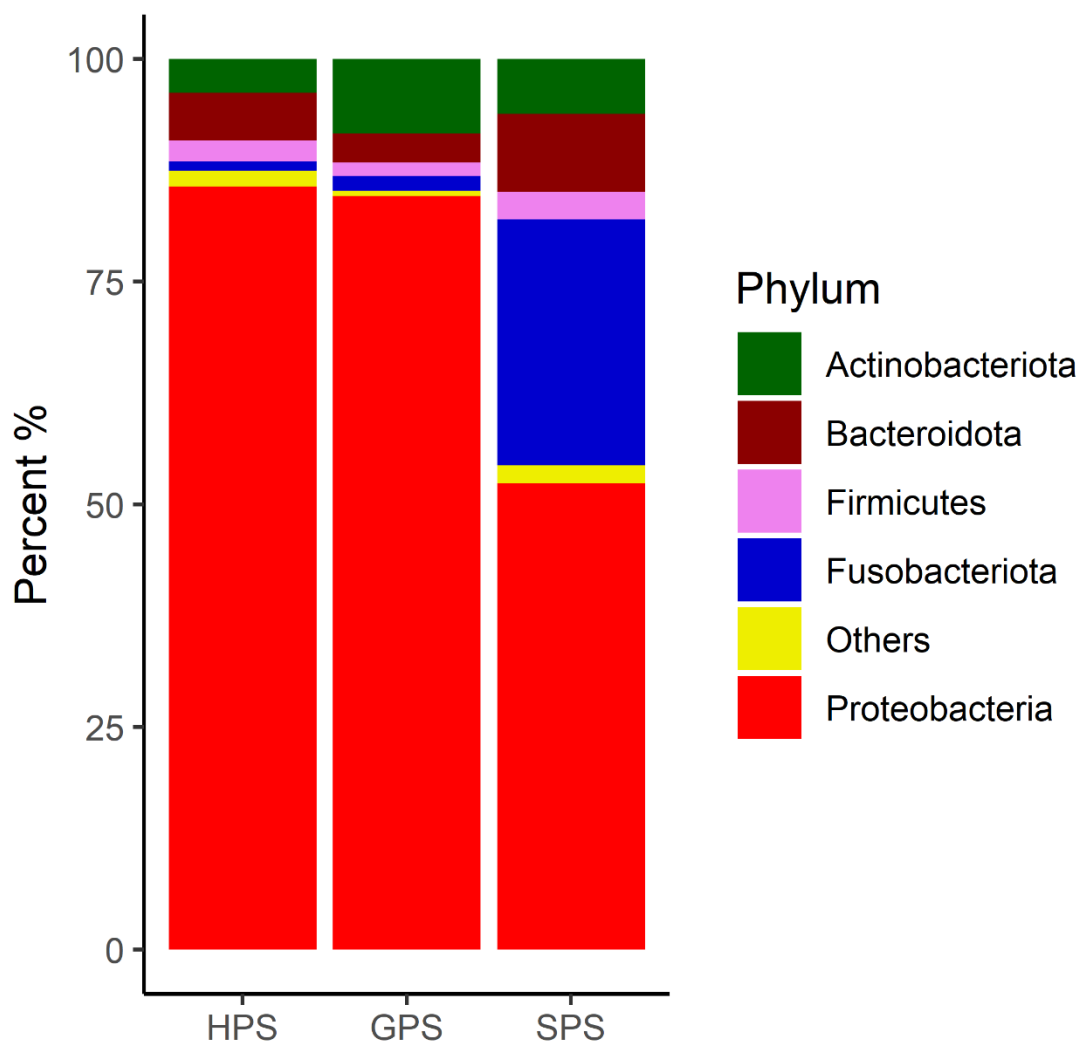


Fig.1. Abundância relativa (>1%) de filos bacterianos identificados na microbiota dentária de sítios dentários saudáveis (HPS), sítios dentários com gengivite (GPS) e sítios dentários com periodontite (SPS) de bovinos jovens.

3.3. Abundância das ASVs nos gêneros do biofilme dentário

Foram identificados 108 gêneros no microbioma dos sítios dentários avaliados e destes, 20 gêneros apresentaram abundância relativa igual ou superior a 1%. Os sítios dentários com periodontite apresentaram a maior abundância de gêneros seguidos dos sítios dentários saudáveis e com gengivite.

Os gêneros mais prevalentes no biofilme dos sítios dentários saudáveis foram *Moraxella* (21,11%), *Neisseria* (13,16%) e *Lautropia* (7,69%). Nos sítios com gengivite, os gêneros mais prevalentes foram *Neisseria* (23,65%), *Moraxella* (18,95%), *Conchiformibius* (10,79%) e *Actinomyces* (6,18) e nos sítios dentários com periodontite, *Caviibacter* (19,78%), *Moraxella* (16,13%), unclassified (14,92%) e *Fusobacterium* (7,56%) foram os gêneros mais prevalentes (Fig. 2).

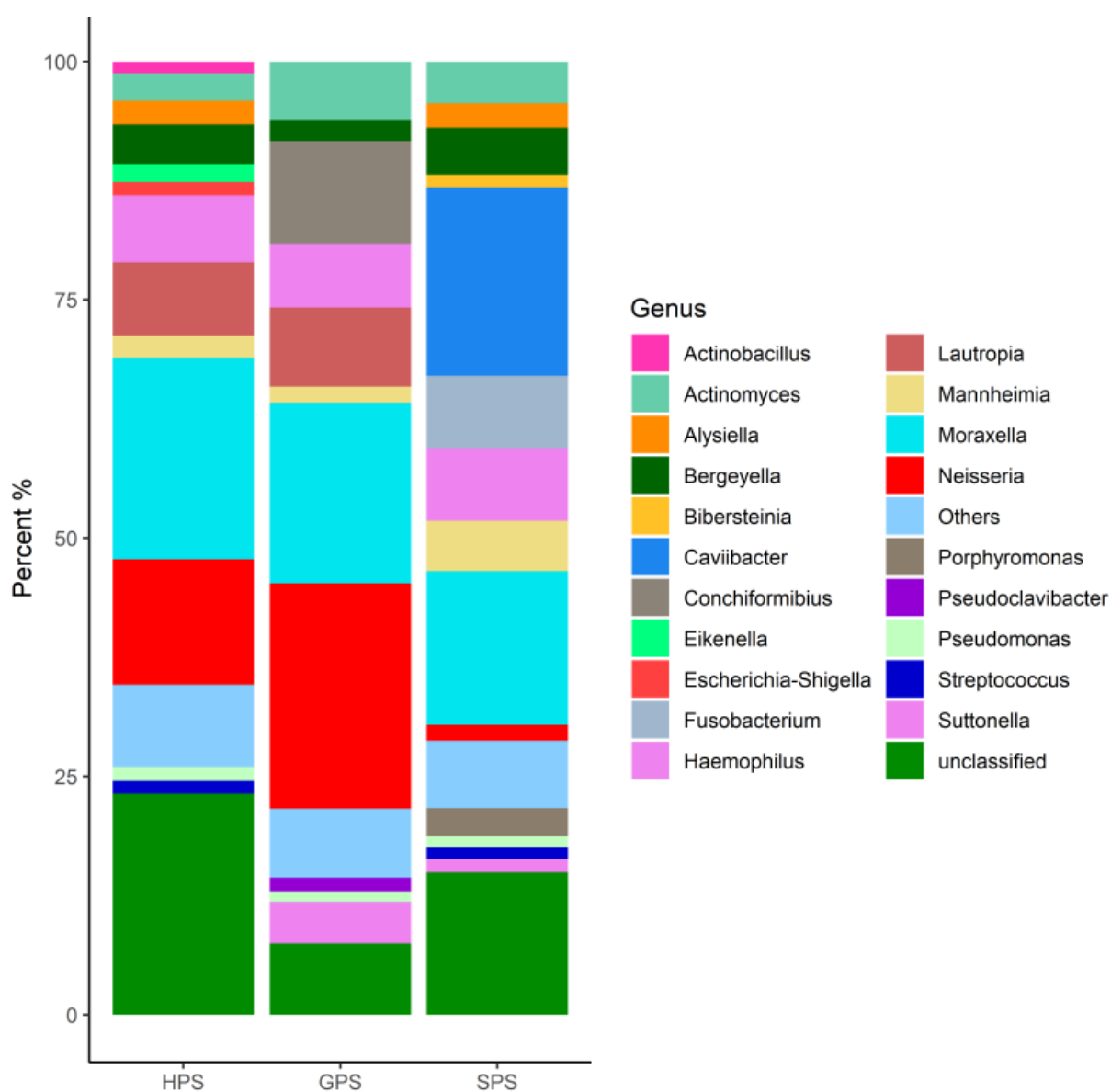


Fig. 2. Abundância relativa (>1%) de gêneros bacterianos identificados na microbiota

dentária de sítios dentários saudáveis (HPS), sítios dentários com gengivite (GPS) e sítios dentários com periodontite (SPS) de bovinos jovens.

3.4. Espécies comuns e únicas

Das 291 ASVs identificadas, 41 ASVs foram compartilhadas, entre as diferentes condições clínicas dos sítios dentários e destas, três foram identificadas até espécie, *Parvimonas micra*, *Caviibacter abscessus* e *Mannheimia haemolytica*. Quinze ASVs foram compartilhadas entre os sítios dentários saudáveis e com gengivite, com somente uma classificação chegando à espécie, *Neisseria denteia*, enquanto entre os sítios dentários saudáveis e com periodontite, 25 ASVs foram compartilhadas, com duas destas ASVs apresentando classificação até espécie, *Bergeriella denitrificans* e *Actinomyces bovis*.

Doze ASVs foram compartilhadas entre os sítios dentários com gengivite e periodontite, com destaque para *Fusobacterium necrophorum*. Os sítios dentários com gengivite apresentaram mais ASVs únicas chegando a 82 ASVs, seguidos pelos sítios dentários saudáveis e com periodontite com 64 e 52 ASVs, respectivamente (Fig. 3). As ASVs únicas identificadas nos sítios dentários saudáveis (HPS), com gengivite (GPS) e periodontite (SPS), que chegaram com determinação de espécie estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1

ASVs únicas classificadas em espécie nos sítios dentários saudáveis (HPS), nos sítios dentários com gengivite (GPS) e nos sítios dentários com periodontite (SPS)

Sítios Dentários	ASVs	Gêneros e espécies
GPS	ASV205	<i>Quadrisphaera granulorum</i>

GPS	ASV165	<i>Porphyromonas gulae</i>
GPS	ASV272	<i>Cardiobacterium hominis</i>
GPS	ASV197	<i>Glutamicibacter creatinolyticus</i>
GPS	ASV257	<i>Acinetobacter iwoffii</i>
GPS	ASV181	<i>Desulfovibrio alcoholivorans</i>
GPS	ASV106	<i>Corynebacterium maris</i>
GPS	ASV111	<i>Corynebacterium efficiens</i>
HPS	ASV85	<i>Noviherbaspirillum suwonense</i>
HPS	ASV138	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>
HPS	ASV222	<i>Luteimonas composti</i>
HPS	ASV104	<i>Brachymonas denitrificans</i>
HPS	ASV129	<i>Adhaeribacter aerolatus</i>
HPS	ASV150	<i>Histophilus somni</i>
HPS	ASV127	<i>Sporacetigenium mesophilum</i>
HPS	ASV270	<i>Streptococcus henryi</i>
SPS	ASV145	<i>Terrisporobacter mayombeii</i>
SPS	ASV133	<i>Mycoplasma haemobos</i>
SPS	ASV71	<i>Streptococcus minor</i>
SPS	ASV124	<i>Porphyromonas katsikii</i>

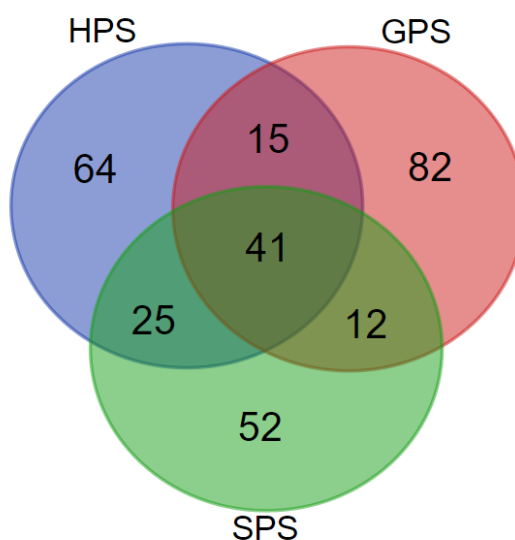


Fig. 3. Distribuição de espécies bacterianas identificadas nos sítios dentários saudáveis (HPS), nos sítios dentários com gengivite (GPS) e nos sítios dentários com periodontite (SPS), de bovinos representadas pelo Diagrama de Venn.

3.5. Diversidade alfa

No índice de Shannon, que avalia diversidade, uma diferença significativa entre os sítios dentários com gengivite e periodontite foi observada com $p= 0.04$, nos sítios dentários com periodontite a média no índice de Shannon foi de 2.72 (min 2.6 – max 2.9, SD 0.15), e nos sítios dentários com gengivite foi de 2.45 (min 1.5 – max 2.7, SD 0.34), nos sítios dentários saudáveis a média obtida foi de 2 (min 1.9 – max 2.8, SD 0.5) (Fig. 4).

Nas análises de riqueza não houve diferença significativa entre os grupos avaliados apesar dos valores de média de riqueza dos sítios dentários com periodontite apresentarem maiores valores 51.6 (min 47 – max 56, SD 4.51), seguido pelos sítios dentários com gengivite com média de 46.2 (min 27 – max 80, SD 20.5) e sítios dentários saudáveis, com 45.4 de média (min 25 – max 58, SD 13.32).

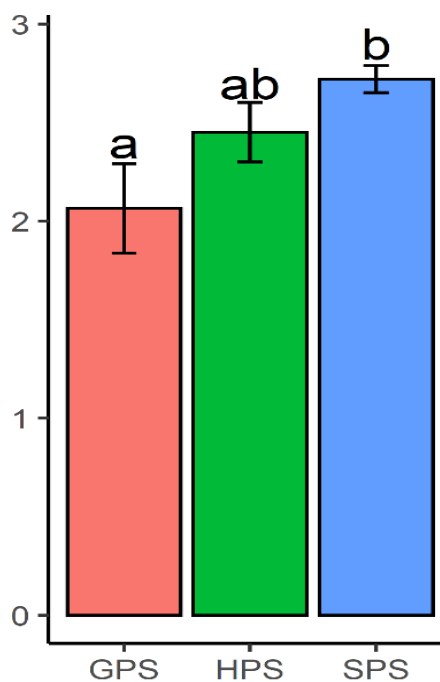


Fig. 4. Diversidade alfa (índice de Shannon) das comunidades bacterianas no biofilme dentário de sítios dentários saudáveis (HPS), com gengivite (GPS) e com periodontite (SPS) com ênfase na diversidade de Shannon com diferença significativa entre os sítios dentários com gengivite e periodontite ($p = 0.04$).

3.6. *Diversidade beta (Composição do microbioma)*

A composição dos microbiomas e as análises realizadas com a construção da matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis, entre as diversas condições clínicas analisadas nos sítios dentários não apresentaram diferenças significativas. O biofilme dos sítios dentários com periodontite apresentou média de 75% de dissimilaridade (min 41% - max 92%); nos sítios dentários com gengivite a média chegou a 78% de

dissimilaridade (min 50% - max 93%) e nos sítios dentários saudáveis com maior média, a dissimilaridade foi de 83% (min 51% - max 99%).

3.7. Comparação da abundância pelas ASVs (DESeq2)

Ao comparar a diferença das 291 ASVs do biofilme dentário com as diferentes condições clínicas dentárias na análise DESeq2, diferença significativa entre os sítios dentários saudáveis e sítios dentários com gengivite não foram observadas. Ao avaliar os sítios dentários saudáveis e sítios dentários com periodontite, associações entre o biofilme destas condições clínicas foram observadas (Fig. 5A), assim como ao comparar o biofilme dos sítios dentários com gengivite e periodontite foi possível observar associações (Fig. 5B).

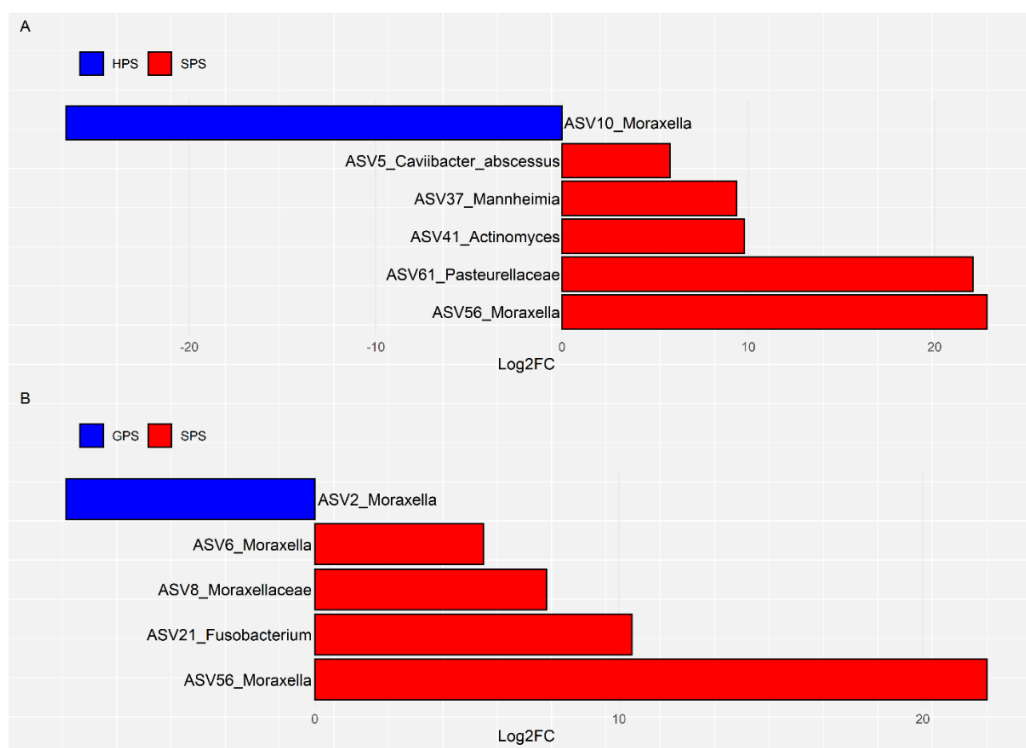


Fig. 5. Comparações entre as ASVs associadas com sítios dentários dos bovinos em diferentes condições clínicas (DESeq2) ($\text{Log}_2\text{FoldChange} > 2$). Fig. 5. A. Diferenças

entre os sítios dentários saudáveis (HPS) e com periodontite (SPS). Fig. 5. B. Diferenças entre os sítios dentários com gengivite (GPS) e periodontite (SPS).

3.8. Redes de coocorrência entre filós

As 291 ASVs do biofilme dentário foram classificadas em 18 filós, os quais, foram usados na construção das redes de coocorrência. Nos sítios dentários saudáveis foram identificados 14 filós (nodes) com 13 interações (edges), sendo 53.8% positivas e 46.2% negativas; e os filós hub foram Desulfobacterota, Chloroflexi, Euryarchaeota e Fusobacteriota (Fig.6.A).

Nos sítios dentários com gengivite, 16 interações (edges) entre 11 filós (nodes), com 81.2% de interações positivas e 18.8% negativas, foram observadas e os filós hubs foram Chloroflexi, Desulfobacterota, Crenarchaeota e Verrucomicrobiota (Fig. 6.B). Já nos sítios dentários com periodontite as interações chegaram a 17 em 13 filós (nodes); destas, 88.2% foram positivas e 11.8% negativas com os principais filós sendo Campylobacterota, Actinobacteriota, Cyanobacteria e Euryarchaeota (Fig. 6.C).

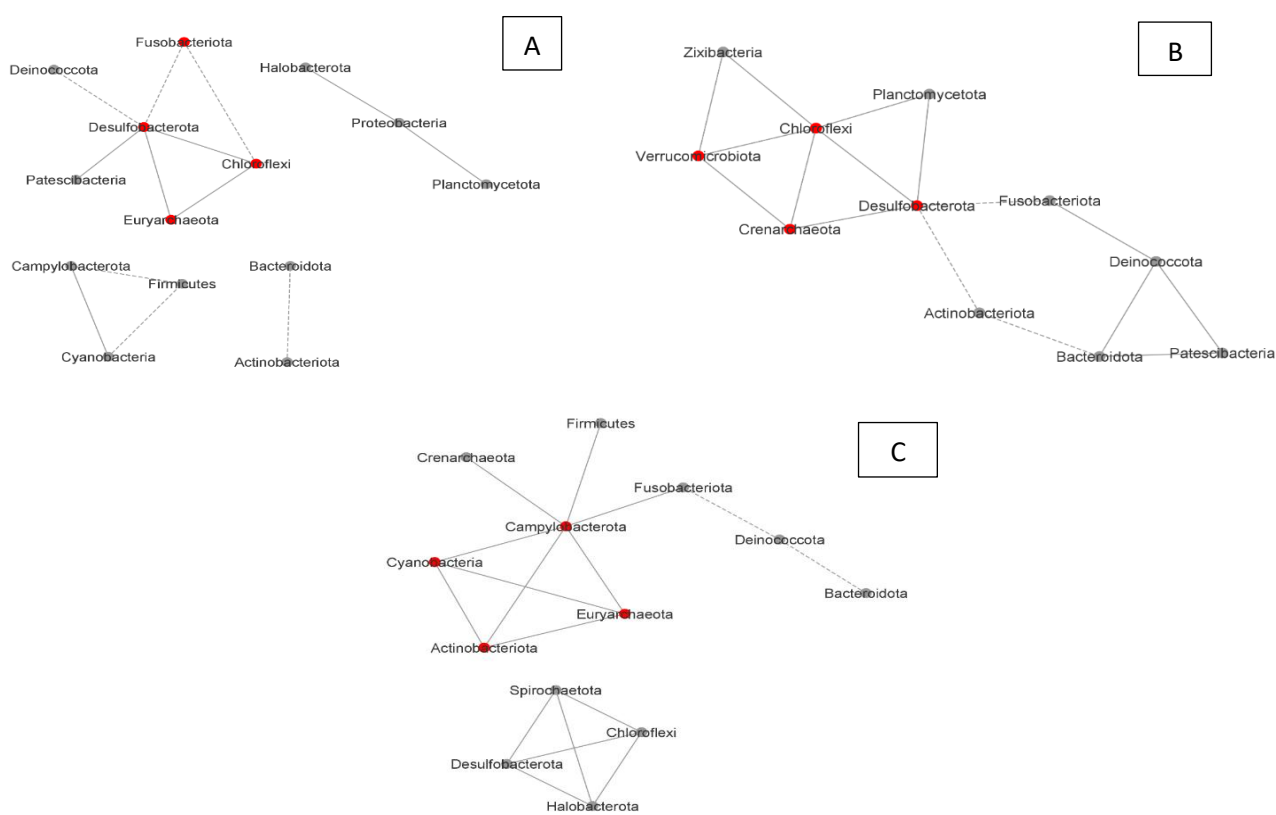


Fig. 6. Rede de coocorrência entre os 18 filós das 291 ASVs dos sítios dentários dos bezerros analisados (p -valor < 0.05 e $Cor \geq |0.5|$), na qual os traços representam interações positivas e as linhas pontilhadas interações negativas. Fig. 6. A. Sítios dentários saudáveis Fig. 6. B. Sítios dentários com gengivite. Fig. 6. C. Sítios dentários com periodontite.

4. Discussão

O emprego do sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA possibilitou a caracterização dos biofilmes dentários de bovinos com dentição decídua e mantido sob pastejo em três fenótipos distintos: saudável, gengivite e periodontite.

A composição da microbiota dentária de bovinos jovens em fase de dentição altera-se em termos de diversidade, quando se compara os sítios dentários com gengivite e com periodontite, e se observa que os sítios dentários com periodontite são mais diversos que os sítios dentários com gengivite (Fig. 4).

Assim o número de microrganismos envolvidos nas diferentes manifestações clínicas é bem semelhante, mas há diferenças nos gêneros envolvidos na gengivite e na periodontite, com destaque para o gênero *Fusobacterium*, do filo Fusobacteriota nos sítios dentários com periodontite (Fig. 1).

No biofilme de sítios dentários de bovinos jovens, Proteobacteria foi o filo com maior representatividade nas análises de abundância de todas as condições clínicas bucais avaliadas, porém o filo Fusobacteriota foi abundante em 27,6% dos sítios dentários com periodontite. Esses filós também se destacaram entre os mais prevalentes no microbioma bucal de ovinos, caprinos e bovinos com periodontite e clinicamente saudáveis (Borsanelli et al., 2018a; Borsanelli et al., 2021a; Borsanelli et

al., 2022a; Borsanelli et al., 2022b).

O gênero *Cavibacter*, foi o mais abundante nos sítios dentários com periodontite (Fig. 2) e quando se comparou o biofilme de sítios dentários clinicamente saudáveis e com periodontite, *Cavibacter abscessus* mostrou associação com a periodontite (Fig. 5.A). Até o momento, este microorganismo foi relatado apenas em abscesso cervical de cobaias (Bemis et al., 2016).

Outro gênero representativo nos sítios dentários com periodontite foi o *Fusobacterium* (Fig. 2) e quando se comparou as ASVs dos sítios dentários com periodontite e gengivite este mostrou associação com os sítios dentários com periodontite (Fig.5.B), este é considerado um microorganismo que atua na co-agregação com outros microorganismos para o desenvolvimento da doença periodontal (Borsanelli et al.,2022b).

Fusobacterium também já foi identificado no biofilme de bovinos jovens com gengivite (Ramos et al., 2019) e na microbiota bucal de caprinos, bovinos e ovinos (Borsanelli et al., 2018b; Borsanelli et al., 2021a; Campello et al., 2019; Silva et al., 2019)

Os sítios dentários com gengivite e os sítios dentários com periodontite compartilharam entre si a espécie *Fusobacterium necrophorum*, que em animais é frequentemente isolado de abscessos, como descrito em ovinos (Emery et al., 1985) e bovinos (Tadepalli et al., 2009) e tem sido sugerido como o principal patógeno na necrobacilose oral em cangurus (Antiabong et al., 2013).

Fusobacterium necrophorum juntamente com *Dichelobacter nodosus* são os causadores da enfermidade denominada footrot; uma doença contagiosa de bovinos, ovinos e caprinos, e possivelmente de outros ruminantes, embora a gravidade clínica

nesses animais seja muito menor do que em ovinos (Fesseha, 2021).

Em humanos *Fusobacterium necrophorum* também foi correlacionado a presença de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*; outros importantes patógenos descritos na ocorrência de doenças periodontais (Jacinto et al., 2008).

Outro gênero com destaque na abundância e nas comparações entre as ASVs nas diferentes manifestações clínicas avaliadas é o gênero *Moraxella*, (Fig. 5). Este gênero já foi identificado e é conhecido por fazer parte do ecossistema bucal de bovinos, ovinos, caprinos e equinos em diferentes condições clínicas (Borsanelli et al., 2021a; Borsanelli et al., 2022a; Borsanelli et al., 2021b; Gao et al., 2016; Riggio e Bennett, 2013).

Assim pode-se sugerir que o gênero *Moraxella* está envolvido nos processos de disbiose e simbiose na doença periodontal, exercendo um papel crucial no binômio de transição da saúde para o processo doença, dentro das periodontopatias.

Um patógeno-chave frequentemente associado a microbiota comensal nasofaríngea de bovinos e envolvido em doenças respiratórias é o gênero *Mannheimia* (Rice et al., 2007) este foi observado nas análises descritivas de abundância e apresentou associação com os sítios dentários com periodontite quando se comparou as ASVs com os sítios dentários saudáveis (Fig. 5.A), porém esta associação e papel deste patógeno nas periodontopatias é pouco conhecida na literatura.

Descrito em humanos com doenças periodontais (Kaplan et al., 2009), e animais (Borsanelli et al., 2022b), o gênero, o *Actinomyces* apresentou associação nos sítios dentários com periodontite quando comparados com os sítios dentários

saudáveis (Fig. 5.A). *Actinomyces spp* são bactérias observadas em diferentes condições clínicas, no tecido periodontal com inflamação, na formação de abscessos e em condições saudáveis (Socransky e Haffajee, 2002), assim como em cálculos, bolsas periodontais e dentes (Kaplan et al., 2009).

Quando se comparou os sítios dentários com periodontite aos sítios dentários saudáveis a espécie *Actinomyces bovis* foi compartilhada. Em bovinos este patógeno é descrito em lesões de actinomicose (Massand et al., 2015). Em humanos associações entre lesões actinomicóticas após infecções dentárias já foram descritas (Finley e Beeson, 2010), com as infecções cervicofaciais (cabeça e pescoço) se apresentando nas formas mais prevalentes (Boyanova et al., 2015; Gajdács et al., 2019).

Microrganismos importantes podem ser identificados e considerados centrais dentro das redes de coocorrência. Assim é possível observar que não há um padrão de repetição entre os filos mais importantes dentro de cada condição clínica nos sítios dentários avaliados, demonstrando interações muito variáveis, principalmente na microbiota de animais com gengivite e periodontite quando comparados ao fenótipo saudável.

Nas análises de rede de coocorrência ao avaliar as interações nas diferentes situações clínicas, os sítios dentários com gengivite e periodontite apresentaram maior número de interações positivas, diferentemente dos resultados de maior número de interações negativas observados em redes de biofilme de ovelhas, cabras e bovinos com periodontite (Borsanelli et al., 2021a; Borsanelli et al., 2022a; Borsanelli et al., 2022b).

A rede de sítios dentários saudáveis com menor número de interações positivas

se assemelha aos estudos anteriores em cabras com processos ativos de periodontite, as quais apresentaram mais interações nas redes de animais com periodontite do que nas redes dos animais clinicamente saudáveis (Borsanelli et al., 2022a).

Redes com muitas interações positivas tendem a indicar cooperação entre os membros deste nicho, podendo exercer a premissa de serem complementares ou dependentes, os quais representam um possível grupo central essencial de microorganismos para que o ambiente prospere mesmo em condições desfavoráveis ao hospedeiro (Fernandez et al., 2015).

5. Conclusão

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

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

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

Financiamento

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

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

Financiamento 001.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Comissão de Ética em Pesquisa

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

Referências

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 3 – Considerações finais

Os estudos sobre a composição da microbiota bucal e dos biofilmes dentários de ruminantes que englobam desde as análises de cultivo microbiano até as técnicas de biologia molecular de PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA, revelam a complexidade envolvida na elucidação dos fenômenos etiopatológicos relacionados às doenças de etiologias multifatoriais, como são as doenças periodontais.

Nas análises de diversidade, riqueza e composição microbiana do ecossistema bucal, alguns fatores se destacam como o estado fisiológico do hospedeiro, e, adicionalmente, a disbiose dessas comunidades microbianas que desencadeiam doenças periodontais as quais comprometem a saúde e bem-estar dos animais, com perdas produtivas e reprodutivas.

No microbioma dental da categoria de bovinos jovens, ficaram evidenciadas as diversas manifestações clínicas bucais, que incluíram desde sítios dentários saudáveis a doentes, com condições de gengivite e periodontite. Nas análises de diversidade dessa microbiota os sítios dentários com periodontite, quando comparados a sítios dentários com gengivite, apresentarem-se muito mais diversos.

Foram classificadas em todas as condições clínicas avaliadas as espécies *Caviibacter abscessus*, *Mannheimia haemolytica*, *Fusobacterium nucleatum*, e observados nas análises de abundância e nas comparações entre diferentes ASVs nos sítios dentários com periodontite o filo Fusobacteriota representando 27,6% e o gênero *Caviibacter* representando 19,78%.

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

As doenças periodontais são enfermidades multifatoriais e a dieta atua como um dos fatores relacionados ao seu desenvolvimento, principalmente quando os animais são submetidos ao pastejo em áreas

reformadas, porém outras dietas já foram relacionadas às periodontopatias.

Em um futuro próximo, as condutas preventivas, diagnósticas e terapêuticas poderão ser otimizadas se levarem em consideração todos os aspectos envolvidos nas doenças periodontais em ruminantes. O processo deve considerar a padronização dos critérios clínicos de classificação das doenças periodontais, avaliação objetiva da saúde bucal, estabelecimento de diretrizes para este diagnóstico e o seu controle nos bovinos.