UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Júlia Rebecca Saraiva

Médica Veterinária

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Júlia Rebecca Saraiva

Orientador: Prof. Tit. Iveraldo dos Santos Dutra

Co-orientadora: Profª. Dra. Ana Carolina Borsanelli

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

2022

S243p

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

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Iveraldo dos Santos Dutra
Coorientadora: Ana Carolina Borsanelli

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JÚLIA REBECCA SARAIVA
ORIENTADOR: IVERALDO DOS SANTOS DUTRA
COORIENTADORA: ANA CAROLINA BORSANELLI

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

Prof. Dr. IVERALDO DOS SANTOS DUTRA (Participaçao Presencial)
Departamento de Apoio Producao e Saude Animal / FMVA UNESP Aracatuba

Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI (Participaçao Presencial)
Departamento de Clinica Cirurgia e Reproducao Animal / FMVA UNESP Araçatuba/SP

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

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

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

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

Páginas

CERTIFICADO DE COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS ii
RESUMO iii
ABSTRACT iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS: AVANÇOS DA ERA “ÔMICA” NA COMPREENSÃO DOS ASPECTOS MODIFICADORES RELACIONADOS AO AMBIENTE BUCAL DE RUMINANTES.....1
1. Introdução 1
2. Revisão de Literatura 4
2.1 Definição e etiopatogênese das doenças periodontais..... 4
2.2 Afecções dentárias em ruminantes domésticos.....7
2.3 Composição microbiana do ecossistema bucal de ruminantes.....12
2.4 Composição microbiana do ecossistema ruminal.....16
2.5 Proteoma salivar em animais de produção.....18
3. Referências 21
CAPÍTULO 2 – GENGIVITE EM BOVINOS E DIETA SUPLEMENTAR PROTEICA: *INSIGHTS* DE PROTEÔMICA..... 34
Resumo Gráfico.....34
Resumo 35
Significância..... 36
Introdução 36
Material e Metodos 37
Resultados 41
Discussão 44
Conclusão 53
Agradecimentos 54
Declaração de conflito de interesse 54
Referências 54

CAPÍTULO 3 - DIETAS DE FENO E SUPLEMENTO PROTEICO MODIFICAM A MICROBIOTA RUMINAL E DENTAL DE BEZERROS 75
Resumo 75
Introdução 76
Material e Metodos 77
Resultados 81
Discussão 97
Conclusão 102
Declaração de conflito de interesse 103
Referências 103
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS 109

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

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

unesp Jaboticabal

CERTIFICADO

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

Microbiologia - PCR

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

Microscopia eletrônica de Varredura - Abatedouros

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

Jaboticabal, 05 de outubro de 2017.

Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

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

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

RESUMO –

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

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

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

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

ABSTRACT –

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

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

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

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

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Revisão de literatura

2.1 Definição e etiopatogênese das doenças periodontais

Doenças periodontais compreendem um conjunto de enfermidades multifatoriais reconhecidas em diversas espécies animais (Klugh, 2006; Rossi Junior, et al., 2007; Takada et al., 2010; Gaetti-Jardim Jr et al., 2012; Borsanelli et al., 2018; Campello et al., 2019) e diretamente associadas a fatores de risco intrínsecos e extrínsecos ao hospedeiro (Preshal et al., 2012).

No entendimento atual a gênese das alterações periodontais, notadamente em seus componentes inflamatórios, deriva de disbiose no biofilme microbiano bucal (Kinane et al., 2017), manifestando-se inicialmente como gengivite, que pode adquirir características necrosantes em alguns animais (Logan et al., 1995; Lyon, 2005; Ramos et al., 2019), progredindo para o comprometimento do periodonto de inserção, resultando na perda de osso alveolar e ligamento periodontal, condição essa conhecida como “periodontite” (Hajishengalis, 2015; Shaw et al., 2016).

Inicialmente, as manifestações clínicas do tecido gengival afetado caracterizam-se por quadros inflamatórios locais, alteração de coloração dos bordos gengivais, presença de edema e sangramento que pode ocorrer espontaneamente ou à sondagem (Lang et al., 2009). A presença de processo inflamatório agudo gengival com necrose/ulcerações das papilas interdentais acompanhados de sangramento, sialorreia e dor caracterizam uma forma de apresentação reconhecida como gengivite necrosante que tipicamente ocorre em pacientes com comprometimento severo da saúde sistêmica (Steffens e Marcantonio, 2018), e já descrita em bovinos jovens mantidos em pastagem reformada (Ramos et al., 2019).

O acúmulo de biofilmes (visíveis ou não) é um achado comum nas gengivites (Kistler, 2013), e à medida que a lesão evolui, esse biofilme disbiótico e o infiltrado inflamatório propagam-se no sentido apical, formando um ambiente vantajoso à nichos microbianos anaeróbicos específicos para o desencadeamento das periodontites (Holt e Ebersole, 2005).

A periodontite enquadra-se em uma das apresentações mais graves das doenças periodontais e uma das principais manifestações clínicas de humanos (Kuo et al., 2008). Associações entre periodontite e distúrbios sistêmicos e metabólicos como afecções cardiorrespiratórias, osteoarticulares e diabetes estão estabelecidas em pacientes humanos (Kuo et al., 2008), e inclusive, pacientes com diferentes alterações

patológicas, incluindo a periodontite, também apresentaram diferenças nos perfis proteicos salivares (Tang et al., 2003; Anil et al., 1995).

Geralmente as lesões causadas pela periodontite são irreversíveis, cumulativas e de progressão lenta (Dutra e Borsanelli, 2022). Os achados clínicos incluem perda óssea, recessão gengival, formação de bolsa periodontal, destruição de ligamento periodontal, supuração e, eventualmente, perda do dente (Steffens e Marcantonio, 2018). A combinação de fatores bacterianos e alguns eventos moleculares mantêm uma condição ideal para o desencadeamento das periodontites, principalmente através das interações imuno-inflamatórias que ocorrem entre a microbiota diversa que compõe o biofilme dental e células de defesa do hospedeiro, estimulando a liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios responsáveis pela destruição do tecido periodontal e eventual esfoliação dental (Holt e Ebersole, 2005).

Classicamente, podem ser categorizadas de acordo com sua manifestação em três formas clínicas principais: agressiva, crônica e necrosante. A periodontite agressiva possui progressão rápida com perda de inserção e destruição óssea acentuada e geralmente é relatada em pacientes humanos jovens (Toneti e Mombelli, 2010). Quadros semelhantes à forma agressiva são descritos em rebanhos de ovinos, caprinos e bovinos (Dutra e Borsanelli, 2022).

A periodontite crônica é caracterizada por progressão lenta e moderada e ocorre de forma não linear nos diferentes grupos dentários, ou seja, é possível observar quadros de destruição severa do tecido periodontal concomitante a ausência de sinais de perda óssea no mesmo indivíduo (Socransky et al., 1984; Kinane et al., 2010a; Kinane et al., 2010b). Já a periodontite necrosante, é marcada pelo caráter agudo de infecção com tamanha destruição tecidual tal que, não raramente, não se observa formação de bolsas periodontais como nas outras formas de periodontites, mas sim uma recessão gengival severa com exposição de raiz (Klokkevold e Carranza, 2012).

Em semelhança ao que ocorre em humanos e diversas espécies

animais (Klugh, 2006; Rossi Junior et al., 2007; Takada et al., 2010; Gaetti-Jardim Jr et al., 2012; Borsanelli et al., 2018; Campello et al., 2019), bovinos e outros ruminantes podem apresentar as principais formas de doenças periodontais em diferentes condições de manejo, contextos epidemiológicos e regiões geográficas (Dutra et al., 1993; Silva et al., 2016; 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).

2.2 Afecções dentárias em ruminantes domésticos

Afecções dentárias são registradas em populações bovinas e ovinas desde a era medieval (500 e 1300d.C) (Homes et al., 2021), e até mesmo em arcadas de ovinos de sítios arqueológicos que datam do período neolítico (Bartosiewicz, 2008). Os dentes contam a história evolutiva das civilizações humanas e dos animais, de modo que as lesões encontradas na arcada de ruminantes de épocas remotas revelam uma relação estreita com o processo de domesticação e diversos fatores relacionados aos tipos de criação animal, dietas, fatores genéticos, idade e localizações geográficas (Homes et al., 2021).

No Brasil, a história natural das doenças periodontais em bovinos está documentada na literatura a partir da ocorrência de surtos de periodontite agressiva em rebanhos, principalmente bezerros em fase de dentição, introduzidos em áreas de abertura (após a derrubada de florestas ou do cerrado) e áreas recém-reformadas (Döbereiner et al., 1974; Dutra et al., 1993; Ramos et al., 2019). Popularmente conhecida durante as décadas de 1970 e 1980 como “cara inchada” dos bovinos (devido ao abaulamento facial decorrente de periostite crônica ossificante que alguns animais apresentavam), essa enfermidade de caráter multifatorial tornou-se uma das mais importantes doenças infecciosas do

Brasil, causando impactos econômicos importantes para pecuária principalmente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte do país (Döbereiner et al., 2004).

Os registros relatam que as lesões geralmente iniciavam-se entre os segundos e terceiros pré-molares maxilares, resultando em formação de bolsa periodontal com acúmulo de restos alimentares e material untuoso de mau cheiro, característico do envolvimento de bactérias anaeróbias Gram-negativas que, posteriormente, foram isoladas a partir destas lesões (Blobel et al., 1984; Botteon et al., 1993). Era comum observar animais com mau estado nutricional e que, devido a incapacidade de se alimentarem adequadamente, morriam por inanição ou formavam “fundos” de lotes (Dutra et al., 1993).

A hipótese equivocada de que a “cara inchada” dos bovinos estava associada a deficiência ou desequilíbrio mineral foi amplamente difundida na ocasião, sendo cientificamente refutadas por diversos pesquisadores (Moraes et al., 1994; Rosa e Döbereiner, 1994; Döbereiner et al., 2004). Outra observação importante que advém dos estudos iniciais, refere-se a remissão da doença e recuperação clínica dos animais quando eram transferidos para áreas consideradas “livres” da enfermidade (Döbereiner et al., 1975; Dutra et al., 1999). Hoje, sabe-se que ruminantes mantidos sob diferentes dietas também podem apresentar quadros de doenças periodontais (Fadden et al., 2015; Campello et al., 2019) e que, embora a expressão “cara inchada” dos bovinos esteja em desuso, a doença ocorre em diferentes manifestações clínicas, segundo os avanços mais recentes dos estudos na área (Dutra e Borsanelli, 2022).

A periodontite bovina também é registrada em diferentes contextos epidemiológicos (Ingham, 2001; Borsanelli et al., 2016). Borsanelli et al. (2016) investigaram a presença de lesões periodontais em arcadas dentárias de 200 bovinos na Escócia. Maiores prevalências de lesões foram observadas entre terceiro pré-molar e primeiro molar mandibular (58,3%), terceiro pré-molar maxilar (50%), entre terceiro pré-molar e primeiro molar maxilar (45,8%), primeiro incisivo (41,3%) e primeiro molar

maxilar (37,5%). O exame clínico minuncioso dos dentes mastigatórios nos ruminantes somente é realizado *pos mortem*. A partir disso, e considerando os diferentes contextos epidemiológicos de um país com dimensões continentais como o Brasil, é plausível questionar: qual a real prevalência de lesões periodontais em rebanhos bovinos brasileiros em seus diferentes sistemas de produção?

Em ovinos, uma forma peculiar e natural de periodontite ocorre em países como Reino Unido, Austrália e Nova Zelândia. Reconhecida como “broken mouth”, 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 reprodutiva (Andrews, 1960; Canno 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 na destruição periodontal de ovinos com “broken mouth” (Riggio et al., 2013).

No Brasil, surtos de periodontite ovina foram descritos no Pará após os animais serem alimentados com forrageiras cultivadas em áreas recém reformadas (Silva et al., 2016). Lesões periodontais severas como abaulamento facial, formação de abscessos, fístulas, destruição óssea e dificuldade a mastigação foram registradas. Os dentes mastigatórios foram os mais afetados tanto em animais jovens, quanto nos adultos, sendo que as características epidemiológicas e clínico-patológicas assemelhavam-se bastante à epidemiologia da periodontite bovina (“cara inchada”).

Agostinho et al. (2017) avaliaram a ocorrência de enfermidades bucais em rebanhos ovinos com sistema de produção semi-extensivo onde os animais eram alimentados com pastagens de *Panicum maximun cv. Massai* e *Brachiaria brizantha*, suplemento com mistura mineral e silagem no período da seca. A ocorrência de recessão gengival foi observada em 58% das 129 ovelhas examinadas, das quais 16%

apresentaram lesão nos incisivos e 53% nos dentes mastigatórios. Todos os animais avaliados apresentaram algum grau de biofilme pigmentados aderido à superfície dos dentes. Outro achado importante desse estudo foi a presença de desgaste dentário em 100% dos dentes mastigatórios e 88% dos incisivos (em diferentes graus).

O desgaste dentário, enfermidade bucal que eventualmente co-ocorre com as doenças periodontais em pequenos ruminantes (Agostinho 2017; Campello et al., 2019), pode ser descrito como a perda lenta e irreversível da coroa dental, sem envolvimento bacteriano aparente, acometendo a todas as superfícies expostas, embora observa-se predomínio do envolvimento de bordas incisais e faces oclusais (Dyer et al., 2000). A severidade de destruição coronária desses elementos dentais provoca sensibilidade dentinária (Levitch et al., 1994; Imfeld, 1996), além de comprometer a eficiência do processo mastigação-ruminação e a própria oclusão dentária, com severas consequências à sobrevida animal (McGregor, 2011).

Estudos em humanos evidenciam que o desgaste dentário pode estar ligado a fatores de origem física ou mecânica, como a atrição e abrasão, exposição do dente a substâncias ácidas, que ocorre na erosão (Imfeld, 1996; Huysmans et al., 2011), além da perda de estrutura mineral pelo processo de quelação com componentes salivares ou de outras origens, o que poderia ocorrer mesmo em pH próximo do neutro (Michael et al., 2010). Nesse sentido, a saliva atuaria como um fator biológico neutralizador e tamponante essencial para proteção da estrutura dental, além de afetar diretamente os fenômenos de remineralização dental (Harae & Zero, 2014), constituindo um dos principais fatores avaliados quando a perda de estrutura mineral e dentária estão presentes em humanos.

A co-ocorrência do desgaste e periodontite constitui evento que exacerba significativamente os danos ao aparelho estomatognático dos animais, com a característica perda de produtividade e desempenho, demonstrando que, apesar de possuírem etiologias aparentemente

distintas, fatores comuns podem estar associados ao desenvolvimento ou agravamento de ambas, de forma que um conhecimento mais aprofundado desses fenômenos se faz necessário para mudanças no manejo e como forma de prevenção e controle dessas enfermidades.

Apesar da causa do desgaste dentário excessivo em ruminantes ainda permanecer sem o adequado esclarecimento, raros estudos com ovinos realizados nas décadas de 1950 a 1980 (Healy e Ludwig, 1965; Healy et al., 1967; Barnicoat, 1957; Bruere, 1979; Mcgregor, 2011) sugeriram a participação da ação abrasiva do solo, pastagem e ácidos na patogênese dessa condição. É provável que outros fatores mais complexos, inclusive a composição bioquímica proteica da saliva (pouco investigada nos animais), estejam associados à etiopatogênese do desgaste dentário em ruminantes.

Em caprinos, relatos científicos sobre a prevalência de enfermidades bucais bem como os impactos econômicos que elas ocasionam nas criações são escassos na literatura. Campello et al., (2019), em um estudo realizado com 150 cabras em lactação de rebanhos estabulados, detectaram a ocorrência de lesão periodontal (avaliada pela recessão gengival) em 70,66% (106) dos 150 animais, das quais 28% (42/150) apresentaram lesões em dentes incisivos e 62% (93/150) em dentes mastigatórios. Biofilme supragengival pigmentado também esteve presentes em todos os animais indicando possível fator de risco para o desencadeamento das periodontites, bem como presença de desgaste dentário nos mastigatórios e incisivos desses animais. Alterações bucodentárias são encontradas em caprinos de diferentes regiões continentais (Saldanha, 2006; Suzuki et al., 2006), e indicam que o problema existe, mas provavelmente é subdiagnosticado na espécie.

Dado a importância das doenças periodontais e do desgaste dentários no comprometimento das condições bucais e sistêmicas de ruminantes, faz-se necessário o conhecimento dessas enfermidades em seus diferentes fatores predisponentes e mesmo modificadores, uma vez que a dieta e a disbiose do ambiente bucal são, reconhecidamente,

fatores primários no desencadeamento de doenças bucais nos ruminantes.

2.3 Composição microbiana do ecossistema bucal de ruminantes

O acúmulo de biofilme dental representa um fator determinante na etiologia e progressão das doenças periodontais e o dente oferece condições estruturais ideais para a deposição destas formações (Lang et al., 2010). Os biofilmes são estruturas dinâmicas que favorecem a permanência e multiplicação de inúmeros micro-organismos promovendo um ambiente ideal às bactérias envolvidas tanto na saúde bucal, quanto na etiologia das doenças periodontais (Socransky e Haffajje, 2010). Estas bactérias têm capacidade de estimular reações inflamatórias e reabsorção óssea (Hajishengalis e Lamont, 2012), provocando uma resposta imunológica desregulada e incapaz de conter o processo infeccioso (Hajishengalis, 2014).

A mineralização do biofilme acarreta na formação do cálculo dental, reconhecido como um fator importante para o desenvolvimento das doenças periodontais em humanos (Ackali e Lang, 2017) e outras espécies (Marshal et al., 2014; Agostinho, 2017; Campello et al., 2019). Nos bovinos, o cálculo dental supragengival pode ser visualizado como uma estrutura pigmentada de coloração escura fortemente aderida à coroa clínica dos dentes e está associado à presença de alguns elementos importantes como ferro, manganês e carbono (Saraiva et al., 2019). Em pequenos ruminantes o cálculo supragengival também já foi correlacionado à retração gengival, sinal clínico clássico da periodontite (Agostinho, 2017; Campello et al., 2019), entretanto pouco se conhece sobre a sua composição estrutural e química e sua correlação com a doença periodontal nessas espécies.

A transição do status de saúde para doença relaciona-se a uma importante modificação da comunidade microbiana simbiótica, primariamente composta por bactérias facultativas como *Actinomyces* e *Streptococcus*, para uma comunidade disbiótica rica em fatores de

virulência e adaptada a desenvolver-se em ambiente inflamatório (Hajishengalis, 2015).

Estudos microbiológicos no biofilme subgengival de ruminantes demonstraram presença de alguns patógenos já reconhecidos na etiopatogênese das doenças periodontais em humanos, como as bactérias dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* (Hjishengalis, 2014; Hajishengalis, 2015; Borsanelli et al., 2015; Borsanelli et al., 2017). Em lesões periodontais de ovinos com periodontite, particularmente *Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella buccae* e *Prevotella melaninogenica* (Borsanelli et al., 2017) são mais prevalentes, enquanto que em bovinos com periodontite *Porphyromonas endodontalis* (80,7%), *Prevotella melaninogenica* (73,1%) e *Prevotella intermedia* (61,5%) são as espécies mais prevalentes (Borsanelli et al., 2015). A presença desses patógenos em lesões periodontais de bovinos indica os efeitos da disbiose possivelmente relacionada à etiologia multifatorial dessas infecções.

Em bovinos com quadros de gengivite e gengivite necrosante, a PCR possibilitou a identificação de algumas espécies microbianas potencialmente patogênicas, como *Fusobacterium nucleatum*, classe *Mollicutes*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis* e *Treponema denticola* (Ramos et al., 2019). Apesar dos resultados desses estudos serem reconhecidamente essenciais, a metodologia da PCR pode apresentar algumas limitações quando comparada com técnicas mais apropriadas como sequenciamento de alto rendimento.

A caracterização do microbioma de lesões periodontais de bovinos é marcada pela presença de uma microbiota diversa com maior variabilidade no número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) quando comparadas aos sítios periodontais sadios. Na microbiota subgengival de bovinos sadios, *Gastranaerophilus, Planifilus, Burkholderia*e e *Arcobacter* foram as *taxa* mais prevalentes, enquanto que em animais com periodontite *Propionivibrio, Wolinella,*

Porphyromonas, Candidatus, Prevotella, Firmicutes (não cultivável), *Bacteroides* e *Treponema* foram as taxa mais predominantes (Borsanelli et al., 2018). Nesse presente estudo, pôde-se caracterizar a mudança dos perfis microbianos associados à disbiose do biofilme bucal bovino e ainda evidencia diferenças significativas entre a microbiota dental de sítios dentários de bovinos com periodontite e saudáveis.

Recentemente, Borsanelli et al. (2022) utilizando-se da técnica de sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA e análise de rede e funções preditas investigaram a microbiota dental e ruminal de bovinos criados em novas áreas de pecuária extensiva na Amazônia brasileira com finalidade de identificar possíveis patógenos e proteínas chave associados à doença periodontal. Dentre os patógenos que estiveram presentes tanto no microbioma do rúmen, quanto no microbioma dental, destacaram-se os gêneros *Fusobacterium, Prevotella, Porphyromonas* e *Actinomyces,* reconhecidos patógenos periodontais. Basicamente, pôde-se observar que os microbiomas de incisivos dentários e de fluido ruminal são compostas por bactérias dos Filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, e ainda, 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.

Na composição bacteriana dental de ruminantes, *Fusobacterium necrophorum, Fusobacterium nucleatum* e *Tannerella forsythia* também já foram identificadas em bolsas periodontais de ovinos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Agostinho, 2017). Riggio et al. (2013), utilizando o *sequenciamento do gene 16S rRNA* de biofilme de ovinos, verificaram em animais com periodontite 24 Filotipos, sendo *Mannheimia ruminalis* (28,4%) e *Moraxella caprae* (13,5%*)* as espécies mais prevalentes. Pela primeira vez o patógeno oportunista *M. ruminalis* foi identificado na cavidade bucal de ovinos com periodontite, sugerindo possível papel deste microorganismo na gênese da enfermidade. No grupo de animais sadios, os sítios eram frequentemente colonizados por

Enterobacter hormaechei (21,3%) e *Hafnia alvei (21,3%).*

Os gêneros mais prevalentes encontrados na microbiota dental de ovinos com periodontite são *Petrimonas, Acinetobacter, Porphyromonas* e *Aerococcus* (Borsanelli et al., 2021). Em animais clinicamente saudáveis, os gêneros mais significativos são *não classificados, Pasteurellaceae, Pseudomonas* e *Neisseria*. 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. As evidências desse estudo revelaram que o microbioma dental de ovinos com periodontie é mais rico e diverso que o o microbioma dental de ovinos clinicamente saudáveis, com presença de interações sinérgicas e antagônicas entre os microorganismos desses biofilmes.

Utilizando-se da técnica de PCR, Campello et al. (2019) associaram a ocorrência de periodontite, desgaste dentário excessivo e presença de biofilme supragengival pigmentado em cabras leiteiras confinadas. Além de forte correlação de biofilme supragengival pigmentado com início e progressão das periodontites, no biofilme subgengival desses animais foram identificados *Fusobacterium nucleatum* (81,8%)*, Tannerella forsythia* (63,0%), *Fusobacterium necrophorum* (63,0%), *Porphyromonas gingivalis* (18,0%), *Treponema denticola* (13,6%), *Prevotella melaninogenica* (9,0%)*,* bem como outros potenciais periodontopatógenos comumente encontrados na microbiota bucal de humanos e outros animais.

Borsanelli et al. (2022) 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. Complementando esses achados, análises preditas demonstram que proteínas ligadas a tradução, tradução citoplasmática e processamento

de rRNA parecem estar mais abundante na microbiota dental de caprinos com periodontite.

De um modo geral, esses estudos contribuem de forma substancial na compreensão da etiopatogênese das doenças periodontais em ruminantes. Entretanto, outros possíveis fatores modificadores como alterações dos biofilmes microbianos associados as diferentes dietas utilizadas na produção animal necessitam ainda ser mais profundamente investigados.

2.4 Composição microbiana do ecossistema ruminal

Os ruminantes evoluíram no seu processo digestivo de fibras vegetais por meio da sua associação com uma rica e diversa microbiota bacteriana ruminal e ainda com a presença vital de archaea, protozoários e fungos (Kozloski, 2011).

Diversos fatores podem interferir na composição microbiana ruminal, incluindo variações metabólicas do organismo, práticas agrícolas, raça e principalmente a dieta dos animais (Brulc et al., 2009; Henderson et al., 2015). Outros fatores que também interferem na população microbiana do rúmem relacionam-se ao processo de mastigação e ruminação e as características químicas da saliva (Arcuri et al., 2006). Sendo assim, a boca e o rúmen comunicam-se de forma bidirecional (Borsanelli et al., 2022), e a saliva compõe diretamente parte do processo de digestão dos alimentos nos ruminantes.

O manejo alimentar dos animais atua diretamente na microbiota e no ecossistema ruminal, tal que a manipulação dessas populações têm sido investigadas a fim de favorecer a produção (Morgavi et al., 2013). De um modo geral, as interações e inter-relações simbióticas dos micro-organismos ruminais podem afetar diretamente o hospedeiro, principalmente quando nos referimos a digestibilidade e aproveitamento de nutrientes (Dehority, 1998). Isso pode ser observado, por exemplo, através das interações relacionadas ao suprimento de nutrientes, bem como em atividades antimicrobianas dessas populações (Wright et al.,

2004; Kamra, 2005).

As bactérias ruminais compreendem o grupo de maior abundância e diversificação do ambiente ruminal que pode conter de $1,0x10^{10}$ a $1,0x10^{11}$ bactérias/mL (Cheng et al., 1979). Além de atividades fermentativas, essas bactérias também desempenham atividades enzimáticas (como as amilases, celulases, proteases e lipases) que auxiliam no processo digestivo dos alimentos e estão intimamente associadas às populações bacterianas (Huws et al., 2018).

Bactérias fibrolíticas como *Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus, Fibrobacter succinogenes* e *Butyrrivibrio fibrisolvens* são encontradas no rúmen de animais alimentados com dietas ricas em forragens, enquanto que em dietas ricas em grãos bactérias amilolíticas como *Ruminobacter amylophilus, Prevotella ruminicola, Streptococcus bovis* são mais predominantes (Nagaraja et al., 2007).

Além das bactérias, os protozoários podem representar até 50% da biomassa ruminal total e acredita-se que podem atuar por ¼ a 1/3 da digestão de fibras do rúmen. A quantidade de bactérias ruminais varia de forma inversamente proporcional a quantidade de protozoários, uma vez que os protozoários são predadores naturais de bactérias ruminais justificando essa oscilação (Newbold et al., 2015). Já os fungos representam a menor população do rúmen (Rezaeian et al., 2004), no entanto são extremamente importantes no processo de digestão de forragens de baixa qualidade (Krause et al., 2003).

O grupo de microorganismos metanogênicos são responsáveis pela produção de metano no rúmen e compreendem populações quantitativamente menos expressivas nas comunidades microbianas (Leng, 2014). A emissão de metano tem impactos negativos tanto do ponto de vista ambiental, quanto para o hospedeiro, pois representa uma perda energética considerável para o organismo dos animais (Leng, 2014) e, por isso, alguns estudos têm buscado investigar mecanismos de interferir na composição microbiana ruminal a fim de beneficiar a

crescente demanda agrícola global (Johnson e Johnson, 1995; IPCC, 2006).

Borsanelli et al. (2022) utlizando a técnica de sequenciamento de alto rendimento, análise de rede e funções preditas investigaram microbiota dental e ruminal de bovinos criados em novas áreas da Amazônia. Os resultados desse estudo evidenciaram 93 gêneros em comum ao microbioma dental e de fluido ruminal, inclusive bactérias dos gêneros *Fusobacterium, Prevotella, Porphyromonas* e *Actinomyces*, patógenos reconhecidamente envolvidos em doenças periodontais de ruminantes (Borsanelli et al., 2015; Borsanelli et al., 2017; Ramos et al., 2019). Esse estudo inédito avaliou a composição do microbioma ruminal de bovinos com periodontite, tal que animais saudáveis apresentavam redes bacterianas mais conectadas, enquanto que uma comunidade disbiótica e um ambiente inflamatório ocorreu no biofilme ruminal de bovinos com periodontite.

Apesar dos recentes avanços das investigações científicas para compreensão da ecologia do ambiente ruminal, informações sobre interações entre a boca e o rúmen, bem como os efeitos de manejos controlados de dietas de alto desempenho nas populações bovinas são objeto ainda de investigação.

2.5 Proteoma salivar em animais de produção

Os bovinos secretam aproximadamente 200 litros de saliva por dia (Bailey e Balch, 1961) cuja composição reflete as mudanças que ocorrem frente aos estímulos químicos e mecânicos aos quais os indivíduos são expostos (Edgar, 1992). De um modo geral, a produção salivar está relacionada a três pares de glândulas principais: parótidas, submandibulares e sublinguais, entre outras glândulas menores presentes na mucosa bucal (Bailey e Balch, 1961), sendo o sistema nervoso autônomo o responsável pelo controle de secreção salivar (Lamy et al., 2017).

Investigações sobre a caracterização do proteoma salivar vem

sendo aplicadas na medicina e na odontologia humana (Amado et al., 2005), mas abordagens proteômicas em modelos experimentais envolvendo animais de produção são relativamente recentes, especialmente estudos que investiguem associações entre saliva e doenças bucais em bovinos.

O proteoma salivar é altamente variável aos estímulos alimentares (inclusive a própria função secretora das glândulas salivares), e em bovinos, a saliva desempenha papel importante no processo da digestão alimentar atuando como uma ferramenta interessante nas investigações sobre fisiologia, nutrição e enfermidades nos animais (Lamy e Mau, 2012).

No proteoma salivar de bovinos, Ang et al. (2011) identificaram um total de 402 proteínas e 45 glicoproteínas ligadas a nitrogênio (N) utilizando três estratégias metodológicas distintas que em conjunto permitiram reconhecer o perfil global do proteoma salivar da espécie. Parte das glicoproteínas ligadas a N podem estar relacionadas a funções de defesa ou ligação a nutrientes, e com identificação de proteínas relacionadas a processos moleculares com maiores percentuais associados a ligação proteica, não caracterizadas, atividades de hidrolase, atividade inibitória enzimática, entre outros.

O comportamento de pastoreio e a fisiologia digestiva estão relacionados com as funções e tamanhos das glândulas salivares de ruminantes (Hofmann, 1989). Nessas circunstâncias, achados de aumento na concentração de proteína total na saliva da parótida de caprinos e ovinos foram observados quando os animais são expostos a dietas enriquecidas com tanino (Lamy et al., 2010a), podendo interferir no tamanho das glândulas desses animais (Shimada, 2006).

A distribuição de proteínas salivares de pequenos ruminantes assemelha-se em abundância com a saliva humana, com algumas diferenças importantes como ausência de amilase (Lamy e Mau, 2012), e aumento nos níveis de expressão de actina citoplasmática e anexina A1 em ovinos e caprinos alimentados com dietas ricas em tanino (Lamy

et al., 2011).

Com efeito, investigações sobre os impactos relacionados a nutrição nos processos secretores das glândulas salivares são descritos em humanos (Joahnsson et al., 1994a), ratos (Glijer et al., 1985; Johansson et al., 1994b) e cobaias (Sawiris e Enwonwu, 2000). Achados dessa natureza permitem inferir a respeito da possível dependência nutricional exigida por determinadas proteínas salivares, indicando que a saliva possa atuar como uma ferramenta no monitoramento de possíveis deficiências nutricionais em animais de produção (Lamy e Mau, 2012).

Um contraponto importante que deve ser considerado é a variabilidade individual das características salivares, que pode modular a percepção alimentar e a taxa de fluxo de salivar (Spielman, 1990; Salles et al., 2011). A composição proteico salivar e as preferências alimentares relacionam-se com a espécie (Lamy et al., 2008; Lamy et al., 2009), entretanto, Ang et al. (2011), apontam a necessidade de desenvolvimento de metodologias “universais” para identificar e quantificar componentes de amostras de proteínas complexas.

Informações sobre os perfis proteico salivares de pacientes humanos com gengivite revelam que a inflamação gengival está associada a um aumento na quantidade de proteínas sanguíneas como albumina sérica e hemoglobina, peptídeos de imunoglobulinas e queratinas (Gonçalves et al., 2011). Em pacientes com periodontite, as proteínas hemopexina, plasminogênio e α-fibrinogênio relacionam-se a doença quando comparado a pacientes saudáveis, podendo atuar como biomarcadores para enfermidade nos humanos (Mertens et al., 2018). Nos limites das investigações científicas sobre o proteoma salivar de bovinos com doenças periodontais, inexistem informações que caracterizem a relação entre proteoma e condição clínica dos animais, principalmente quando dietas consideradas de alto desempenho pelos modelos aplicados atualmente na bovinocultura são utilizadas. Apesar da relevância dos desafios retratados anteriormente, a proteômica estabelece um marco na fronteira da pesquisa nas periodontopatias e,

sua aplicabilidade na produção animal é crescente e promissora.

3. Referências

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

Amado FM, Vitorino RM, Domingues PM, Lobo MJ, Duarte JA (2005) Analysis of the human saliva proteome. **Expert Review of Proteomics** 4:521-539.

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

Arcuri PB, Lopes FCF, Carneiro JC (2006) Microbiologia do rúmen. In.: Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG, **Nutrição de Ruminantes, Jaboticabal,** Funep, p.111-116.

Bailey CB, Balch CC (1961) Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. The British Journal of Nutrition 15:383-402.

Barnicoat CR (1957) Wear in sheep's teeth. **New Zealand Journal of Science and Technology** 38:583-632.

Bartosiewicz L (2008) Environmental stress in early domestic sheep In.: Miklíková Z, Thomas R (Eds.) **Current Research in Animal Palaeopathology: Proceedings of the Second ICAZ Animal Palaeopathology Working Group Conference,** British Archaeological Reports, p. 3-13

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

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

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

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

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

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 (2022) 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. Dysbiosis and predicted function of dental and ruminal microbiome associated with bovine periodontitis. Front Microbiol. 2022

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.

Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller ME, et al. (2009) Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 106(6):1948-1953.

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.

Cheng KJ, McCowan RP, Costerton JW (1979) Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. The **American Journal of Clinical Nutrition** 32(1):139-48.

Dehority BA (1998) Microbial interactions in the rumen. **Revista De La Facultad De Agronomía De La Universidad Del Zulia** 15:69-86.

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

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

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.

Edgar WM (1992) Saliva: its secretion, composition and functions. **Brazilian Dental Journal** 1172:305–312.

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.

Glijer B, Peterfy C, Tenenhouse A (1985) The effect of vitamin D deficiency on secretion of saliva by rat parotid gland in vivo. **Journal of Physiology** 363:323-334.

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

Gonçalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia CHS, Camisasca DR, Domont G, Feitosa ACR, Pereira DA, Zingali RB, Alves G (2011) Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. Journal of Periodontal Research 46:599-606.

Hajishengalis G (2015) Periodontitis: from microbial imune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immmunology** 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) modelo f 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.

Healy WB, Cutress TW, Michie C (1967) Wear of sheep´s teeth. IV. Reduction of soil ingestion and tooth wear by supplementary feeding. **New Zealand Journal of Agricultural Research** 10:201-209.

Healy WB, Ludwig TG (1965) Wear of sheep´s teeth. 1. The role of ingested soil. **New Zealand Journal of Agricultural Research** 8:737-752.

Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Global Rumen Census Collaborator, Janssen PH (2015) Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports** 5:14567, doi:10.1038/srep14567.

Hofmann RR (1989) Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. **Oecologia** 78:443–457.

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.

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

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

IPCC (Ed.) (2006) Guidelines for National Greenhouse Inventories, vol 4. Agriculture, forestry and other land use. Japan, Institute for Global Environmental Strategies (IGES)

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

Johansson I, Lenander-Lumikari M, Saellström A-K (1994) Saliva composition in Indian children with chronic protein-energy malnutrition. Journal of Dental Research 73:11–19.

Johansson I, Fagernäs C (1994) Effect of iron-deficiency anaemia on saliva secretion rate and composition in the rat. **Archives of Oral Biology** 39:51–56.

Johnson KA, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. Journal Animal Science 73:2483-2492.

Kamra DN (2005) Rumen microbial ecosystem. **Current Science** 9(1):124-134.

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

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

Kinane DF, Staphopoulou PG, Papanou PN (2017) Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease *Primers*** 3(17038):1-14. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38

Kistler JO, Booth V, Bradshaw DJ, Wade WG (2013) Bacterial community development in experimental gingivitis. **PlosOne** 8(8):doi:10.1371/jornal.pone.0071227.

Klokkevold PR, Carranza FA (2012) Acute Gingival Infections. In.: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA (Ed) **Carranza's Clinical Periodontology.** Missouri, Elsevier, p. 97-103.

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

Kozloski GV (2011) Bioquímica dos ruminantes (Ed) UFSM, Santa Maria, p. 212.

Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS (2003) Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews** 27(5):663-693.

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

Lamy E, Mau M (2012) Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. Journaçl of Proteomics 75:4251-4258.

Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela e Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales Baptista E (2009) Sheep and goat saliva proteome analysis: a useful tool for ingestive behavior research? Physiology Behavior 98:393-401.

Lamy E, da Costa G, Capela e Silva F, Potes J, Coelho AV, Baptista ES (2008) Comparison of electrophoretic protein profiles from sheep and goat parotid saliva. Journal of Chemical Ecology 34:388-397.

Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela e Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales-Baptista E (2011) Effect of condensed tannin ingestion in sheep and goat parotid saliva proteome. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 95:304–312.

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

Leng RA (2014) Interactions between microbial consortial in biofilms: a paradigma shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. **Animal Protuction Science** 54(5):519-543.

Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, Heymann HO (1994) Non-carious cervical lesions. **Journal of Dentistry** 22(4)195-207.

Logan EI, Maseman D, Irvine G, Finney O, Boyce E, Kruckenberg S, Hefferren JJ (1995) Canine Gingivitis and Diet. **Journal of Dental Research** 74(544):79.

Lyon KF (2005) Gingivostomatitis. **Veterinary Clinics Small Animal Pratice** 35:891-911.

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

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.

Mertens B, Orti V, Vialaret J, Gibert P, Relaño-Ginés A, Lehmann S, Deville de Périère D, Hirtz C (2018) Assessing a multiplex-targeted proteomics approach for the clinical diagnosis of periodontitis using saliva samples. **Bioanalysis** 10(1):35-45.

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

Morgavi DP, Kelly WJ, Janssen PH, Attwood GT (2013) Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production. **Animal** 7(1):184–201.

Nagaraja TG, Titgemeyer EC (2007) Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science** 90Suppl1:E17-38. doi: 10.3168/jds.2006-478. PMID: 17517750.

Newbold CJ, De la Fuente G, Belanche A, Ramos-Morales E, McEwan NR (2015) The role of ciliate protozoa in the rumen. **Frontiers in Microbiology** 6:1313.

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R (2012) Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. **Diabetologia** 55:21-31.

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.

Rezaeian M, Beakes GW, Parker DS (2004) Distribution and estimation of anaerobic zoosporic fungi along the digestive tracts of sheep. Mycological Research 108(Pt 10):1227-1233.

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.

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.

Salles C, Chagnon MC, Feron G, Guichard E, Laboure H, Morzel M, et al. (2011) In-mouth mechanisms leading to flavor release and perception. **Critical Reviews in Food Science Nutrition** 51:67–90.

Shaw L, Harjunma AU et al. (2016) Distiguishing the signals of gingivitis and periodontitis in supragengival plaque: a Cross-Sectional Cohort study in Malawi. **Applied an Environmental Microbiology** 82(19):6057-6067.

Sawiris PG, Enwonwu CO (2000) Ascorbate deficiency impairs the muscarinic-cholinergic and b-adrenergic receptor signaling systems in the guinea pig submandibular salivary gland. **Journal of Nutrition** 130:2876–2882.

Shimada T (2006) Salivary proteins as a defense against dietary tannins. **Journal of Chemical Ecology** 32:1149–1163.

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.

Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. (1984) New concepts of destructive periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology** 11:21-31.

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.

Spielman AI (1990) Interaction of saliva and taste. **Journal of Dental Research** 69:838–843.

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.

Wright ADG, Kennedy P, O'Neill CJ, Toovey AF, Popovski S, Rea SM, Pimm CL, Klein L (2004) Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. **Vaccine** 22(29-30):3976-3985.

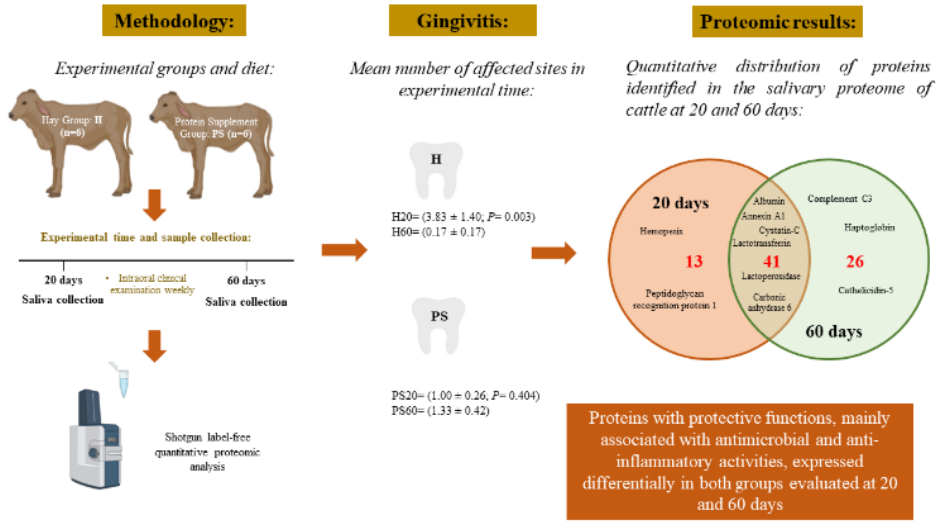
Artigo formatado conforme normas para submissão à revista Journal of Proteomics

CAPÍTULO 2 – Gengivite em bovinos e dieta suplementar proteica: *insights* de análise proteômica

Júlia Rebecca Saraiva[a], Aline Dionizio[b], Ana Carolina Borsanelli[c], Talita Mendes Silva Ventura[b], Larissa Tercilia Grizzo Thomassian[b], Flávia Regina Athayde[d], Juliana Vaccari[a], Thamiris Naiasha Minari Ramos[a], Natália Cristina de Souza[e], Marília Afonso Rabelo Buzalaf[b], Iveraldo S. Dutra[d*]

[a] Postgraduate Program in Veterinary Sciences, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences of Jaboticabal, UNESP Univ Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil
[b] Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of Sao Paulo, Bauru, Brazil
[c] Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil
[d] Department of Production and Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine of Araçatuba, UNESP Univ Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana 793, 16050-680 Araçatuba, SP, Brazil
[e]Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Anhanguera de Anápolis, FAA, Anápolis, GO, Brasil

Resumo gráfico:



Resumo

As proteínas salivares auxiliam na manutenção da homeostase bucal e podem refletir desde em processos sistêmicos, até em localizados, como as gengivites. Em populações bovinas, suspeita-se que a dieta possa estar associada ao aumento da incidência de gengivite e gengivite necrosante. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil proteômico salivar de 12 bovinos alimentados em comum com feno de gramínea cultivada em área reformada (112.19g/kg de proteína bruta), sendo 6 desses animais também alimentados com suplemento proteico (SP; n=6), e o efeito dessa dieta na saúde gengival dos animais. O proteoma da saliva total dos dois grupos foi avaliado aos 20 e 60 dias de confinamento. Na avaliação clínica periodontal, pelo monitoramento e sondagem dos dentes incisivos, ambos os grupos apresentaram episódios de gengivite, porém a média de sítios afetados nos animais da dieta com suplemento proteico aos 60 dias tendeu à superioridade com relação ao mesmo grupo aos 20 dias; já os animais da dieta exclusivamente de feno, quando avaliados aos 60 dias, apresentaram uma média inferior de sítios gengivais afetados, quando comparados aos 20 dias. Na análise de interação entre tempo e dieta, houve significância na incidência de episódios de gengivite entre os dois grupos aos 20 dias e aos 60 e 20 dias da dieta exclusiva de feno. Aos 60 dias da experimentação, mais processos biológicos (9) e imunológicos (11) estiveram alterados na saliva dos bovinos. Proteínas com múltiplas funções foram detectadas na saliva dos animais, porém com diferenças de expressão entre as dietas e os períodos. É provável que dietas com suplemento proteico estimulem a expressão de proteínas salivares com papel protetivo em bovinos capazes de atuar perante processos infecto-inflamatórios, como as gengivites. Entretanto, é plausível considerar que com o decorrer do tempo os bovinos se adaptem a essas dietas e passem a ficar mais vulneráveis ao desencadeamento de gengivites.

Palavras-chave: bovinos, dieta, gengivite, proteômica, saliva

Significância: Em populações bovinas, teoriza-se a relação entre dieta e aumento da incidência de gengivite. Os resultados do presente estudo piloto, ambas as dietas causaram episódios de gengivite na dentição decídua de bovinos e, aparentemente, dietas com suplementação proteica estimulam a expressão de proteínas salivares com papel protetor em bovinos que podem atuar contra processos infeccioso-inflamatórios, como as gengivite. No entanto, é plausível que, com o tempo, o gado se adapte a essas dietas e se torne mais vulnerável à gengivite.

1. Introdução

A saliva é um fluido complexo que interage de maneira multifuncional com toda a cavidade bucal. A sua composição rica em eletrólitos, hormônios e principalmente o proteoma salivar, revela informações sobre diversos aspectos relacionados às necessidades nutricionais, adaptações a dietas e ao ambiente, bem como o estado geral de saúde de ruminantes [1,2]. Além disso, a saliva também possibilita a leitura de proteínas expressas em momentos e circunstâncias peculiares atuando como uma ferramenta relevante em termos de diagnóstico e pesquisa de biomarcadores [3].

Os bovinos secretam até aproximadamente 200 litros de saliva por dia [4]. Em virtude da ausência de funções secretoras do rúmen, a saliva atua no trânsito da ingesta durante a mastigação e a regurgitação e no tamponamento do fluido ruminal [1]. Alguns pesquisadores buscaram caracterizar as proteínas salivares de bovinos em condições saudáveis a fim de estabelecer parâmetros fisiológicos que possam contribuir na rastreabilidade precoce de doenças [1]. Nos limites do nosso conhecimento, são raros os estudos direcionados à caracterização do perfil proteico salivar de ruminantes e sua relação com afecções bucais, bem como o efeito da dieta no desencadeamento dessas enfermidades.

As gengivites e as periodontites são doenças periodontais comuns em ruminantes [5,6]. Resultantes de processos infecto-inflamatórios, essas enfermidades são ocasionadas pela disbiose do biofilme dental e por uma combinação de fatores imunológicos [6,7], metabólicos e ambientais complexos e variados. Em bovinos, as lesões ocorrem em contextos epidemiológicos distintos, diferentes distribuições geográficas [8-11] e nos diversos manejos de produção [5,12,13].

Dietas compostas por pastagens recém-reformadas são apontadas possivelmente como um dos fatores relacionados à gênese das periodontopatias em ruminantes criados extensivamente [5,12,13]. Recentemente, Ramos et al., 2019 monitoraram, em um estudo longitudinal, episódios de gengivite e gengivite necrosante na dentição decídua de bezerros alimentados com forragem cultivada em áreas recém-reformadas [5]. Contudo, ruminantes mantidos em sistemas intensivos ou suplementados com concentrado também podem ser acometidos por doenças bucais [10,11,14]. Com efeito, é razoável considerar que o comportamento ingestivo atua diretamente na composição salivar de diferentes espécies [15-17], inclusive no tamanho e função das glândulas salivares de ruminantes [18]. Considerando-se que o processo digestivo inicia-se na cavidade bucal, e que a saliva refletiria as condições locais e sistêmicas do indivíduo, o presente estudo buscou avaliar de maneira descritiva o proteoma salivar de bovinos confinados, alimentados com dieta composta por feno de *Panicum* e suplemento proteico, e seus efeitos na ocorrência das gengivites.

2. Material e métodos

2.1. Comissão de ética em pesquisa

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

2.2. Grupos experimentais e dieta

Foram utilizados 12 bovinos machos da raça Jersey com idade entre 10 e 18 meses. Os animais permaneceram confinados em baias individuais por 60 dias e foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=6). Ao primeiro grupo foi ofertado feno de *Panicum maximun cv. massai* e *Panicum maximun cv. mombaça* duas vezes ao dia (grupo dieta feno: F). O feno utilizado foi cultivado em solo recém-reformado de acordo com as práticas agrícolas convencionais de análise, calagem e adubação do solo [5]. A composição química bromatológica e de nutrientes totais estimados do feno foi basicamente 952.1g/kg de matéria seca, 47.9g/kg de umidade, 112.2g/kg de proteína bruta, 337.3g/kg de fibra bruta, 677.1g/kg de fibra em detergente neutro (FDN), 396.1g/kg de fibra em detergente ácido (FDA) e 80.7g/kg de matéria mineral (descrição completa; Tabela Suplementar 1). Ao segundo grupo, além da dieta composta pelo mesmo feno, foi acrescentado suplemento proteico uma vez ao dia (grupo dieta com suplemento proteico: SP) ajustado de acordo com as necessidades de pesagem individual e composto basicamente por farelo de algodão 38-41% (7.9%), milho (65.7%) e ureia (1.1%). Ambos os grupos receberam sal comum (NaCl) e água *ad libitum.* Posteriormente, os grupos foram classificados de acordo com o tempo de administração da dieta, para a coleta de saliva aos 20 dias (SP20 e F20) e após 60 dias de experimentação (SP60 e F60). Todos os animais foram pesados quinzenalmente, sempre no período da manhã e após jejum alimentar de aproximadamente 15 horas no dia anterior para verificar ganho de peso.

2.3. Exame clínico intra-bucal

O status clínico dos doze bovinos foi estabelecido após exame intra-bucal e avaliação periodontal dos oito incisivos (decíduos) realizados semanalmente, totalizando nove exames ao longo do experimento: Grupo dieta suplemento proteico do tempo 1 ao tempo 9; e grupo dieta feno do tempo 1 ao tempo 9 (SPT1 a SPT9 e FT1 a FT9), resultando na avaliação de 864 incisivos ao longo do período experimental. Os indicadores para caracterização das lesões foram

estabelecidos a partir do aspecto visível dos dentes em conjunto com a realização de sondagem da margem gengival com sonda periodontal Williams. A sonda foi levemente introduzida no sulco gengival, posicionada paralelamente ao eixo do dente na face labial percorrendo toda a margem dos incisivos de maneira uniforme, conforme descrito por Borsanelli et al., 2021 [6]. Presença de alterações inflamatórias nos bordos gengivais de um ou mais sítios como edema, alteração de cor, sangramento espontâneo ou à sondagem, foram considerados indicativos de gengivite [5]. Foram considerados saudáveis os sítios periodontais que não apresentaram qualquer tipo de alteração inflamatória nos bordos gengivais ou qualquer outro sinal clínico de alterações periodontais.

2.4. Coleta e processamento da saliva

A saliva total foi coletada diretamente da cavidade bucal dos bovinos no período da manhã (entre 8:00 e 10:00 horas) utilizando-se micropipeta de 1.000µL e ponteira estéril. O exame visual das amostras foi realizado para garantir que o conteúdo não apresentasse nenhum sinal de trauma na cavidade bucal (sangue) ou de conteúdo alimentar que pudesse interferir na leitura de proteínas não salivares. O volume de coleta foi de aproximadamente 2,5mL divididos em alíquotas de 500µL. Foram realizadas duas coletas para análise sendo a primeira após 20 dias de administração da dieta (Grupos: SP20 e F20) e a segunda aproximadamente aos 60 dias de confinamento (Grupos: SP60 e F60). Após a coleta, as amostras foram mantidas em caixa isotérmica com gelo e centrifugadas a 10.000*g* por 15 minutos a 4ºC para remoção de debris celulares. Em seguida, foram armazenadas a -80ºC para posterior análise proteômica.

2.5. Análise proteômica

A análise proteômica foi realizada como descrito por Ventura et al., 2018 [19]. A extração proteica das amostras de saliva foi realizada individualmente utilizando-se solução composta por 6M de ureia e 2M de thioureia em 50mM de NH_4HCO_3 com pH 7,8, vórtexadas, sonicadas e

centrifugadas. Em seguida, as amostras foram concentradas, reduzidas com 5 mM de ditiotreitol (DTT), alquiladas com 10 mM de iodoacetamida (IAA) e digeridas com tripsina 2% (Promega®, Madison, EUA). Após esse período, foi adicionado ácido fórmico a 5% e as amostras foram purificadas e dessalinizadas nas colunas C18 Spin (Thermo Scientific®, Rockford, Illinois, EUA), seguindo para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (Bio-Rad®, Hercules, Califórnia, EUA) [20]. As amostras foram ressuspensas com acetonitrila 3% e ácido fórmico 0,1%, identificadas e submetidas ao nanoAcquity UPLC-Xevo QTof MS/MS (Waters, Manchester, New Hampshire, UK) [19].

2.6. Shotgun label-free quantitative proteomic analysis

A aquisição de dados foi realizada por espectrômetro de massa Xevo Q-TOF G2-S acoplado ao sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Manchester, Reino Unido) controlado por MassLynx v.4.1 (Waters, Manchester, Reino Unido). Os dados obtidos foram processados através do software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.03 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados foram buscados no banco de dados da espécie *Bos taurus* baixado do catálogo do UniProtKB (Universal Protein Resource - www.uniprot.org)[21] (incluindo-se apenas as proteínas revisadas), no período de março de 2021.

2.7. Análise de bioinformática

Para análise de bioinformática foi utilizado o software Cytoscape® 3.7.2. e a ontologia genética foi avaliada de acordo com os pluggins ClueGo® para processos biológicos e imunes afetados.

2.8. Análise estatística

A análise estatística dos dados clínicos foi realizada com base nos registros clínicos individuais durante todo o experimento. As diferenças entre as interações dos grupos (F *vs* SP) pontualmente (20 e 60 dias) e ao longo do tempo do início ao final do experimento (T1 a T9) para a

presença de gengivite, foram analisadas usando modelos lineares mistos com medidas repetidas. Os modelos foram construídos separadamente no software R [22] com a função LME do pacote NLME (v.3.1-152) e o valor de *p* sofreu correção de múltiplos testes pela abordagem de Benjamin-Hochberg, o *False Discovery Rate* (FDR). As suposições de distribuição normal dos dados foram verificadas no R pelo teste de Shapiro-Wilk. A média e o erro padrão da média dos sítios afetados foram calculados para os dois grupos aos 20 e aos 60 dias. As diferenças individuais entre os animais de ambos os grupos considerando-se os 9 exames (T1 a T9) foram realizadas utilizando-se ANOVA seguida de Teste de Tukey. Para análise de ganho de peso utilizou-se o programa GraphPad Prism V6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). As variáveis foram testadas quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação dos dados dentro dos grupos foi utilizado o teste de Wilcoxon e para comparação dos dados entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney demonstrados pela média e erro padrão da média considerando-se diferença significativa quando $p<0.05$. Para análise protêomica a diferença de expressão das proteínas entre os grupos foi realizada pelo teste t com valor de p <0,05.

3.Resultados

Os bovinos de ambos os grupos apresentaram episódios de gengivite, sendo que no grupo alimentado com dieta exclusiva de feno a média de sítios afetados foi inferior aos 60 dias (0.17 ± 0.17), comparado com os 20 dias (3.83 ± 1.40; *P*= 0.003); enquanto que no grupo dieta com suplemento proteico a média de sítios afetados tendeu a superioridade aos 60 dias (1.33 ± 0.42) quando comparado aos 20 dias (1.00 ± 0.26; *P*= 0.404). Os resultados de interação entre dieta e tempo para a presença de gengivite apresentaram significância para o período de 20 dias (SP20 *vs* F20; P= 0.022); e para os momentos F60 *vs* F20 (*P*= 0.003) e SP60 *vs* F20 (*P*= 0.036) (Tabela 1). Ao longo do tempo (tempo 1 ao tempo 9; T1 a T9), os exames não apresentaram diferenças

significativas para a ocorrência de gengivite entre os grupos dieta feno e dieta com suplemento proteico. Somente o momento T4, que corresponde exatamente aos 20 dias de adaptação, diferiu de todos os outros momentos para o grupo dieta feno e de alguns momentos no grupo dieta com suplemento proteico (Tabela 1). Os animais de ambos os grupos apresentaram diferenças individuais independente da dieta a qual foram expostos (Tabela 2). Outras alterações clínicas como, bolsa periodontal e gengivite necrosante também foram registradas, porém não apresentaram significância estatística. Todos os bovinos avaliados no presente estudo ganharam peso ao longo do experimento, entretanto, embora a média tenha sido superior no grupo dieta com suplemento proteico (271.5±39.4 Kg p.v.) em comparação ao grupo dieta feno (238.3±16.4 Kg p.v.), não foi observada diferença estatisticamente significante para ganho de peso entre os dois grupos (P=0.571).

As alterações proteômicas identificadas nas análises quantitativas e qualitativas do software PLGS estão descritas nas Tabelas 3 e 4. Na comparação entre a saliva dos animais dos grupos dieta feno aos 20 dias e dieta com suplemento proteico aos 20 dias, foram identificadas um total de 54 proteínas. Destas, 35 foram exclusivamente identificadas na saliva dos animais do grupo dieta com suplemento proteico e 6 nos animais do grupo dieta feno. Em adição, 13 proteínas apresentaram diferenças de expressão significativa, sendo a maior parte delas reduzidas na saliva dos animais do grupo dieta com suplemento proteico (9 proteínas) (Tabela 3). Aos 60 dias, na comparação entre a saliva dos animais de ambos os grupos (SP60 *vs* F60) foram identificadas um total de 67 proteínas. Destas, 2 proteínas foram identificadas exclusivamente na saliva dos animais do grupo dieta com suplemento proteico e 46 proteínas exclusivas na saliva dos animais do grupo dieta feno. Foram identificadas 19 proteínas com diferença de expressão significativa, das quais, a maioria encontrava-se aumentada na saliva dos animais do grupo dieta com suplemento proteico (14 proteínas) (Tabela 4).

A classificação funcional de acordo com o Gene Ontology dos processos biológicos com o termo mais significativo na saliva de ambos os grupos aos 20 e 60 dias de dieta está ilustrada na Fig 1. Para a comparação após 20 dias de à dieta (SP20 *vs* F20), foram identificados sete processos alterados na saliva dos bovinos. Dentre eles, as categorias com os maiores percentuais de genes foram: constituinte estrutural do citoesqueleto (27%), resposta humoral antimicrobiana (19%), detecção de estímulo químico envolvendo percepção sensorial de sabor amargo (15%) e migração do mesênquima (15%). Em adição, o termo de genes associados à coagulação sanguínea e formação de coágulo de fibrina (8%), destacaram-se-se devido à sua importância neste estudo. Aos 60 dias (SP60 *vs* F60), nove processos biológicos afetados foram identificados na saliva bovina. Dentre eles, as maiores porcentagens referiram-se aos processos: constituinte estrutural do citoesqueleto (20%), detecção de estímulo químico envolvendo percepção sensorial de sabor amargo (20%), resposta humoral antimicrobiana (14%), resposta inflamatória aguda (11%), resposta imune de mucosa (9%) e coagulação sanguínea e formação de coágulo de fibrina (6%) (Fig 1).

A Fig 2 ilustra os processos imunológicos afetados detectados na saliva de todos os bovinos durante o experimento. Aos 20 dias de dieta (SP20 *vs* F20), foram identificados oito processos imunológicos alterados na saliva destes animais. As categorias com maiores percentuais de genes afetados referiram-se aos seguintes processos: processo do sistema imune (48%), resposta imune humoral (21%), regulação negativa da diferenciação de leucócitos (10%) e resposta imune de mucosa (7%). Aos 60 dias (SP60 *vs* F60), 11 processos imunológicos foram identificados. Destes, os processos imunológicos mais afetados foram: processo do sistema imune (46%), resposta imune humoral (15%), resposta imune adaptativa (10%) e resposta imune de mucosa (8%) (Fig 2).

4. Discussão

As gengivites são reações inflamatórias e imunológicas que ocorrem nos tecidos gengivais como forma de proteção do hospedeiro ao desequilíbrio do biofilme dentário e de seus metabólitos [7,25]. Em bovinos, esse processo polimicrobiano possui natureza dinâmica e ocorre em episódios curtos intercalados entre exacerbação e remissão da doença [5]. As observações clínicas do presente estudo revelaram que a interação tempo e dieta foi um fator determinante no desencadeamento de gengivite nos animais de ambos os grupos, com diferenças individuais marcantes inclusive em bovinos do mesmo grupo de dieta (Tabela 3). Essa variabilidade pode decorrer de diferenças na resposta individual frente a composição microbiana estabelecida em diferentes desafios nutricionais, como já observado por Vach et al., 2020 em pacientes humanos [26].

Por outro lado, a média de sítios com gengivite dos animais do grupo dieta com suplemento proteico tendeu a um aumento aos 60 dias, diferentemente do grupo feno que apresentou menor média de sítios gengivais afetados aos 60 dias (F60) quando comprado com F20. Em adição, a análise de interação entre dieta e tempo para ambos os grupos no período de 20 dias (SP20 *vs* F20; P= 0.022) e no grupo dieta feno pontualmente aos 20 e 60 dias (F60 vs F20; P= 0.003), apresentou significância para ocorrência de gengivite (Tabela 2). Tal observação corrobora com os achados estatísticos ao longo do tempo, destacando-se o momento T4 do grupo feno (FT4) período correspondente aos 20 dias de dieta, o qual observou-se pela análise de interação entre dieta e tempo diferenças estatísticas para ocorrência de gengivite dos demais momentos entre ambos os grupos (Tabela 2). É importante ressaltar que a metodologia de inspeção clínica gengival utilizada neste trabalho restringiu-se à observação dos dentes incisivos desconsiderando-se possíveis processos patológicos que possam ter ocorrido nos dentes mastigatórios. De fato, a impossibilidade do exame clínico intrabucal de todos os dentes da arcada dentária pelos meios convencionais é um fator limitante dos estudos em ruminantes.

Além disso, o feno de *Panicum maximum cv.massai* e *Panicum maximun cv. mombaça* utilizado como base na dieta dos dois grupos foi produzido em área recém-reformada, e, estudos preliminares em ruminantes, sugerem que o manejo alimentar associado à oferta de pastagens cultivadas em solos recém-reformados ou locais de abertura de novas áreas pode contribuir para o desencadeamento das periodontopatias [5,12-14]. Em humanos, dietas consideradas “anti-inflamatórias” podem reduzir quadros de gengivites em faixas clinicamente relevantes [27]. Em ruminantes, suspeita-se que a dieta seja um fator predisponente a doenças bucais, mas o mecanismo de como isso ocorre ainda permanece desconhecido. No presente estudo, foi possível observar que os animais do grupo dieta feno apresentaram maior média de sítios afetados inicialmente com tendência a diminuição com o passar do tempo. O oposto pôde ser observado nos bovinos do grupo dieta com suplemento proteico. Corroborando com esses achados, diferenças estatísticas para gengivite foram encontradas aos 20 dias entre os dois grupos (SP20 *vs* F20, P=0.022), o qual apresentava menos sítios periodontais afetados no grupo dieta com suplemento proteico.

A composição salivar e o microbioma bucal são altamente variáveis a estímulos alimentares. Nesse contexto, o presente estudo contribui para a compreensão dos aspectos modificadores que ocorrem no proteoma salivar e a integridade gengival dos incisivos de bovinos quando mantidos em condições controladas de manejo. Pela análise proteômica, foi possível observar uma mudança na quantidade de proteínas encontradas na saliva dos animais em ambos os grupos nos diferentes períodos avaliados (Tabela 4 e 5) com maior abundância de proteínas expressas aos 60 dias (Tabela 5). Isso pode decorrer de processos adaptativos dos animais às diferentes dietas, ou até mesmo de modificações nas atividades secretoras das glândulas salivares, como já observado em outros ruminantes mantidos sob diferentes composições alimentares [15].

Estudos anteriores buscaram investigar o proteoma salivar de ruminantes [1,2,28], porém devido à grande variabilidade da composição salivar inter e intra-individual, estabelecer perfis de normalidade para uma única espécie torna-se difícil [2]. Ang et al., 2011 utilizando-se de estratégias metodológicas diferentes, identificaram um total de 402 proteínas salivares em bovinos, incluindo uma grande quantidade de proteínas não caracterizadas e 45 glicoproteínas ligadas a nitrogênio [1]. Já em pequenos ruminantes, observou-se que a distribuição de proteínas salivares assemelha-se em abundância com a saliva humana, com algumas diferenças importantes como a ausência de amilase [2], também observada no presente estudo (Tabela 4 e 5). Nesse contexto, a espectrometria de massas (MS) representa, atualmente, um método promissor e bastante sensível na detecção e progressão de vários distúrbios [29], incluindo o complexo de doenças periodontais e desgaste dentário [30-32].

Alterações quantitativas e qualitativas da dieta afetam diretamente a atividade metabólica dos animais [2,15]. Nesse contexto, a saliva possui uma capacidade importante em se adaptar a essas mudanças composicionais, podendo atuar como um mecanismo de defesa contra potenciais efeitos negativos presentes na alimentação, como já observado em ovinos e caprinos mantidos em dietas enriquecidas com tanino [15]. Em humanos, padrões dietéticos específicos parecem estar associados a proteínas salivares como a amilase salivar e as cistatinas do tipo S, que possuem ligação com a percepção alimentar [33]. Em bovinos, proteínas envolvidas no processo biológico de *Detection of chemical stimulus involved in sensory perception of bitter taste* (Fig 1), como *lactoperoxidase* (P80025), *zinc-alpha-2-glycoprotein* (Q3ZCH5), *polymeric immunoglobulin receptor* (P81265) e *carbonic anhydrase 6* (P18915), foram expressas diferentemente no proteoma salivar desses animais (Tabela 4 e 5), o que pode indicar as mudanças que ocorrem na composição salivar em resposta aos estímulos alimentares de sabor ao qual foram submetidos.

Os bovinos do grupo dieta com suplemento proteico, quando comparado ao grupo de animais dieta feno no seu respectivo período de adaptação, demonstraram maior quantidade de proteínas salivares *up regulated* (14 proteínas) aos 60 dias do que aos 20 dias (4 proteínas). Aos 20 dias, devido as alterações acarretadas pela dieta, pode ocorrer uma inibição da sintese proteíca, enquanto que aos 60 dias provavelmente o organismo dos animais se adaptou frente as alterações. Proteínas com função de ligação e transporte (*hemoglobin subunit beta* – P02070, e *hemoglobina fetal subunit beta* – P02081); diferenciação de células epiteliais (*Keratin type II cytoskeletal 5* – Q5XQN5) e processos imunes de células epiteliais de mucosa (*Polymeric immunoglobulin receptor* – P81265) [21] estiveram *up regulated* na saliva dos animais do grupo dieta com suplemento proteico aos 20 dias (SP20) (Tabela 4). Enquanto que aos 60 dias (SP60), destacaram-se proteínas que atuam na resposta humoral antibacteriana desempenhando atividade "antibiótica", como as *lactotransferrin* (P24627) e *lactoperoxidase* (P80025) (Tabela 5) [21], já anteriormente identificadas no proteoma salivar de bovinos por Ang et al., 2011 [1]. A C*ystatin-C* (P01035), um importante inibidor de cisteínas proteinases com papel protetor e regulador em condições inflamatórias também esteve presente exclusivamente no grupo SP20 e *up regulated* no grupo SP60 (Tabela 4 e 5). Em humanos, os níveis de cystatina-C aumentam com a progressão da doença periodontal para tentar prevenir maiores danos teciduais e regridem quando a homeostase metabólica óssea é reestabelecida [34]. Esses achados somados às alterações clínicas presentes no periodonto de ambos os grupos podem indicar que a saliva dos bovinos do grupo dieta com suplemento proteico expressou proteínas potencialmente envolvidas em diferentes estágios da patogênese das doenças periodontais, principalmente com o passar do tempo (60 dias). Porém as vias subjacentes a esses processos necessitam de maiores investigações.

A *albumin* (P02679), uma importante proteína de função transportadora já detectada no proteoma salivar de cães com cálculo dentário [31] e de bovinos [1,2], esteve *down-regulated* na saliva dos animais do grupo dieta com suplemento proteico aos 20 e aos 60 dias quando comparado com o grupo dieta feno nos respectivos períodos de alimentação de adaptação (Tabelas 4 e 5). O aumento na quantidade de proteínas sanguíneas como albumina sérica e hemoglobina na saliva e fluido gengival, foi relatado em pacientes humanos com gengivite [35,36] e periodontite [37-39], o que é consistente com os achados do presente estudo, uma vez que ambos os grupos desenvolveram gengivite e a albumina esteve presente na saliva de todos bovinos. Além da sua identificação no proteoma salivar das duas comparações dos grupos avaliados, a albumina também esteve envolvida nos principais processos imunológicos afetados na saliva dos bovinos: *immune system process* and *humoral immune response* (Fig 2).

Além da albumina, a *carbonic anhydrase VI* (P18915; CA-VI) também esteve *down-regulated* na saliva dos animais do grupo dieta com suplemento proteico aos 20 e aos 60 dias quando comparado com o grupo dieta feno (Tabelas 4 e 5). Essa proteína já foi detectada nas secreções salivares de ovinos [40], caprinos [41,42], e bovinos [43,44]. Em humanos, achados preliminares detectaram fragmentos de CA-VI em pacientes com gengivite [35]. Portadores de distúrbios metabólicos como a diabetes mellitus tipo 2 e periodontite apresentam menores níveis de CA-VI, o que pode indicar maior risco para o desenvolvimento de periodontopatias [45]. Em bovinos, o papel da CA-VI salivar ainda é pouco conhecido, entretanto as anidrases carbônicas atuam em diversos processos basais, como regulação de pH bucal, transporte de bicarbonato e equilíbrio eletrolítico [46,47]. No presente estudo, a redução na expressão de CA-VI na saliva dos animais do grupo dieta com suplemento proteico em conjunto com os achados clínicos nos incisivos dos animais pode indicar provável atuação dessa proteína na ocorrência de gengivites em bovinos. Contudo, é importante considerar a

necessidade de avaliações por períodos mais prolongados de animais mantidos nessas mesmas condições experimentais, bem como os possíveis distúrbios metabólicos que possam estar associados à utilização de dietas proteicas no manejo alimentar de ruminantes.

O suplemento proteico utilizado no presente estudo foi formulado com objetivo de simular protocolos de alto rendimento frequentemente aplicados na bovinocultura para ganho de peso, mas que raramente levam em consideração os efeitos na saúde bucal dos animais. A ausência de diferenças estatisticamente significantes para ganho de peso entre os grupos avaliados (P= 0.571) pode decorrer do tamanho da amostra utilizada no presente estudo, entretanto os animais do grupo dieta com suplemento proteico apresentaram média de ganho de peso (271.5±39.4) superior ao grupo dieta feno (238.3±16.4), o que corrobora o efeito desejável delineado inicialmente.

Nessas condições, porcentagens de proteínas envolvidas em processos biológicos afetados de resposta humoral antimicrobiana (*Fibrinogen beta chain* (P02676), *Lactoperoxidase* (P80025), *Lactotransferrin* (P24627), *Peptidoglycan recognition protein 1* (Q8SPP7), *Albumin* (P02769)); e processo de coagulação sanguínea e formação de coágulo de fibrina (*fibrinogen alpha chain* (P02672) e *fibrinogen beta chain)* destacaram-se no contexto das periodontopatias avaliadas no presente estudo, sendo esse conjunto de proteínas registradas aos 20 dias (Figura 1: a) exclusivamente no grupo dieta com suplemento proteico, exceto a albumina que esteve *down regulated* nesses bovinos em relação ao grupo dieta feno (Tabela 4). Embora as modificações microbiológicas bucais não tenham sido objeto do presente estudo, é provável que mudanças nas relações ecológicas microbianas do biofilme bucal desses animais possam ter refletido na expressão dessas proteínas em grande maioria exclusivamente nos bovinos do grupo dieta com suplemento proteico aos 20 dias de adaptação à dieta

(Tabela 4), possivelmente justificando a menor ocorrência de sítios gengivais afetados nesse grupo durante esse período.

Aos 60 dias de dieta, dos nove processos biológicos afetados na saliva dos animais de ambos os grupos (Fig 1: (b), proteínas com múltiplas funções, como ação antimicrobiana (*Cathelicidin-5* - P54229), mediadoras de processos inflamatórios locais (*Complement C3* - Q2UVX4), função apoptótica (*Deoxyribonuclease-1*-P00639), ação antioxidante (*Haptoglobina* – Q2TBU0), papel na imunidade inata da boca (*BPI fold-containing Family B member 1* – Q8SPF8) [21], além das proteínas *fibrinogen alpha chain* e *fibrinogen beta chain* (anteriormente encontradas aos 20 dias exclusivamente na saliva dos animais do grupo dieta com suplemento proteico), foram encontradas apenas no grupo dieta feno (Tabela 5). Pôde-se observar que os animais do grupo feno expressaram uma série de proteínas de resposta imune ou de proteção bucal com o passar do tempo, particularmente relacionadas a processos de maior destaque no enfoque do presente estudo: *antimicrobial humoral response*, *acute inflamatory response*, *mucosal immune response* e *blood coagulation*, *fibrina clot formation* (Figura 1:b). Esses achados podem ser atribuídos em resposta a algum desafio local pelo qual os bovinos estiveram sujeitos durante o período experimental, incluindo as gengivites e outras doenças bucais.

A boca apresenta uma grande diversidade de nichos ecológicos [48-51] moldados de acordo com a disponibilidade de nutrientes dietéticos. Apesar de cada sítio diferir quanto à composição de microbiomas e capacidade imunológica do hospedeiro, as proteínas salivares e os constituintes nutricionais da dieta “alimentam” biofilmes específicos desse ecossistema [52], exercendo impactos na saúde do periodonto e atuando como potencial fator de risco para as doenças periodontais [53-55]. Marcadores potenciais que envolvem proteínas inflamatórias, de quebra de colágeno, remodelação óssea ou proteínas de defesa do hospedeiro estão bem estabelecidos na literatura humana.

Dentre eles destacam-se as proteínas e os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que agem rapidamente no combate à invasão e à infecção microbiana afetando a progressão da doença periodontal e ainda atuando como “alarmes” do sistema imunológico [56]. O presente estudo demonstrou que as proteínas envolvidas nos processos imunológicos alterados na saliva desses animais, em grande parte são as mesmas identificadas nos processos biológicos.

Aos 20 dias de dieta, somente os bovinos do grupo dieta feno expressaram proteínas *hemopexin* (Q3SV7) (Tabela 4). A hemopexina relaciona-se a processos inflamatórios [57] e a periodontite crônica em humanos [58]. A sua presença exclusivamente na saliva dos bovinos desse grupo em conjunto com os achados do exame clínico revela pistas sobre os processos iniciais da infecção periodontal principalmente em resposta às modificações que biofilmes multiespecíficos exercem nas células e tecidos do hospedeiro. Curiosamente, aos 60 dias a hemopexina não foi detectada em nenhum dos grupos. Entretanto, a *haptoglobin* (Q2TBU0) esteve presente exclusivamente na saliva dos bovinos do grupo dieta com suplemento proteico aos 60 dias (Tabela 5), momento em que esses tenderam a apresentar maior média de sítios afetados. Bactérias consideradas periodontopatogênicas, como *Porphyromonas gingivalis*, utilizam hemoglobina ligada à haptoglobina e heme complexada com hemopexina como fonte de heme [59], o que contribui para o seu crescimento em bolsas periodontais. Além disso, bactérias do gênero *Porphyromonas* são reconhecidamente relacionadas às condições inflamatórias periodontais em bovinos [56].

Ademais, *Peptidoglycan recognition protein 1* (Q8SPP7) foi identificada exclusivamente na saliva dos bovinos do grupo dieta com suplemento proteico aos 20 dias de adaptação (Tabela 4) associado principalmente ao processo imune de resposta humoral. Essa proteína relaciona-se com a imunidade inata e desempenha papel bactericida contra micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras [21]. Em humanos, é considerado um importante AMPs secretado por

neutrófilos recrutados para sítios com lesões [56], e a partir disso, é possível inferir que o suplemento proteico, inicialmente, pode ter estimulado a expressão dessa proteína com papel básico de aumentar a resposta imune desses animais.

Proteínas *Complement C3* (Q2UVX4), *Cathelicidin-3* (P19661) e *Cathelicidin-5* (P54229) que estão envolvidas na resposta imune inata estiveram presentes exclusivamente na saliva do grupo dieta feno aos 60 dias (Tabela 5); e elas atuam diretamente como resposta do hospedeiro a desafios microbianos e processos inflamatórios. Complement C3 é uma proteína chave na ativação do sistema complemento com papel direto em inflamações locais [21], e em humanos é considerada um possível marcador salivar para doenças periodontais [61,62]. Apesar de uma diminuição na média de sítios gengivais afetados no grupo dieta feno aos 60 dias, os animais ainda apresentaram comprometimento periodontal nesse mesmo período.

A coexistência entre processos imunes e biológicos alterados, como o processo de *mucosal immune response* foi observado no proteoma salivar dos bovinos, provavelmente devido a alguns processos imunes também desempenharem atividades celulares e, portanto, atuarem como processos biológicos (Figura 1: b, Figura 2). Constatou-se também que o transcorrer do tempo investigado no presente estudo pareceu estimular maior quantidade de processos biológicos e imunes afetados na saliva dos bovinos mantidos nessas condições dietéticas (Figura 1 e Figura 2), isso vai ao encontro da ocorrência de episódios de gengivite nos animais de ambos os grupos. Entretanto, é importante considerar que a saliva é um fluido de composição bastante variável a estímulos intrínsecos e extrínsecos do indivíduo, o que pode levar a consideráveis diferenças entre animais da mesma espécie mantidos em condições similares, possivelmente justificando as diferenças clínico-bucais encontradas entre os bovinos de ambas as dietas (Tabela 3).

Outras proteínas envolvidas em diversos processos celulares e imunológicos como *annexin-A1* (P46193), *actin, keratin, tubulin e*

histones (Tabelas 4 e 5) também estiveram expressas no proteoma salivar de bovinos, assemelhando-se aos achados no proteoma salivar de humanos [39,63]. De um modo geral, os resultados obtidos no presente estudo revelaram que ambas as dietas utilizadas favoreceram a ocorrência de gengivites nos incisivos de bovinos, bem como a expressão de proteínas salivares que complementam as alterações clínicas detectadas em ambos os grupos. Contudo, os grupos dieta com suplemento proteico e dieta feno diferiram quanto às proteínas identificadas nos diferentes momentos avaliados, aos 20 e 60 dias (Tabela 4 e 5). Para tanto, é importante considerar que o presente estudo não buscou estudar o proteoma salivar total da espécie bovina, mas avaliar de forma preliminar proteínas expressas diferencialmente em animais mantidos em dietas de alto teor proteico e sua possível relação com a ocorrência de quadros patológicos bucais quando comparados a animais mantidos exclusivamente com feno.

5. Conclusão

Considerando a complexidade das doenças periodontais e a riqueza de compostos proteicos presentes na saliva, os resultados inéditos do presente estudo indicam que o perfil proteico salivar de bovinos modifica-se quando os animais são submetidos a dietas proteicas e é marcado por uma grande variedade de proteínas com funções protetoras associadas principalmente a atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Provavelmente, os bovinos do grupo dieta com suplemento proteico adaptaram-se a dieta, pois aparentemente ficaram mais vulneráveis a ocorrência de maior média de episódios de gengivites nos incisivos ao longo do tempo. Contudo, ressalta-se a importância em se considerar a variabilidade da resposta individual que ocorre no periodonto e na saliva de bovinos frente ao mesmo desafio alimentar e mesmas condições de manejo.

6. Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) pela parceria

7. Declaração de conflito de interesse

Todos os autores declaram não haver conflitos de interesses.

8. Financiamento

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

9. Contribuição dos autores

Conceptualization: Saraiva JR, Borsanelli AC, Dutra IS. Data curation: Saraiva JR, Athayde FRF, Dionizio A. Formal analysis: Saraiva JR, Athayde FRF, Dionizio A. Investigation: Saraiva JR, Borsanelli AC, Vaccari J, Ramos TNM, Souza NC, Dutra IS. Methodology: Saraiva JR, Borsanelli AC, Vaccari J, Ramos TNM, Souza NC, Dutra IS, Ventura TMS, Thomassian LTG. Project administration: Dutra IS, Buzalaf MAR. Supervision: Dutra IS. All authors contributed to the writing and editing of the manuscript.

11. Referências

[1] Ang CS, Binos S, Knight MI, Moate PJ, Cocks BG, McDonagh MB. Global survey of the bovine salivary proteome: integrating multidimensional prefractionation, targeted, and glycocapture strategies, J. Proteome Res 2011;10:5059-69.

[2] Lamy E, Mau M. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. J Proteomics 2012;75:4251-8.

[3] Uchida H, Ovitt CE. Novel impacts of saliva with regard to oral health. J Prosthet Dent 2021;127:383-91.

[4] Bailey CB, Balch CC. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. Br J Nutr 1961;15:383-402.

[5] Ramos TNM, Borsanelli AC, Saraiva JR, Vaccari J, Schweitzer CM, Gaetti-Jardim Jr E, Dutra IS. Efficacy of virginiamycin for the control of periodontal disease in calves. Pesq Vet Bras 2019;39:112-22.

[6]. Borsanelli AC, Viora L, Parkin T, Lappin DF, Bennett D, King G, Dutra IS, Riggio MP. Risk factors for bovine periodontal disease - a preliminary study. Animal 2021;15:100-21.

[7] Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature 2015;15:30-44.

[8] Döbereiner J, Dutra IS, Rosa IV, Blobel H. “Cara inchada” of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependent periodontitis in Brazil. Pesq Vet Bras 2000;20:47–64.

[9] Ingham B. Abbatoir survey of dental defects in cull cows. Vet Rec 2011;148:739-42.

[10] Fadden AN, Poulsen KP, Vanegas J, Mecham J, Bildfell J, Stieger-Vanegas SM. Dental pathology in conventionally fed and pasture managed dairy cattle. Vet Rec 2015;2:1-7.

[11] Borsanelli AC, Viora L, Lappin DF, Bennett D, King G, Dutra IS, Riggio MP. Periodontal lesions in slaughtered cattle in the west of Scotland. Vet Rec 2016;179(25):652.

[12] Dutra IS, Matsumoto T, Döbereiner J. Surtos de periodontite em bezerros (“cara inchada”) associados ao manejo do solo. Pesq Vet Bras 1993;13:1–4.

[13] Borsanelli AC, Lappin DF, Viora L, Bennett D, Dutra IS, Brandt BW, Riggio MP. Microbiomes associated with bovine periodontitis and oral health. Vet Microbiol 2018;218:1-6.

[14] Campello P, Borsanelli AC, Agostinho S, Schweitzer CM, Gaetti-Jardim Jr E, Döbereiner J, Dutra IS. Occurrence of periodontitis and dental wear in dairy goats. Small Rumin Res 2019;175:133-41.

[15] Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela e Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales Baptista E. Effect of condensed tannin ingestion in sheep and goat parotid saliva proteome. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2010a;95:304-12.

[16] Lamy E, Graça G, da Costa G, Franco C, Capela e Silva F, Baptista ES, Celho AV. Changes in mouse whole saliva soluble proteome induced by tannin-enriched diet. Proteome Sci 2010b;8:3-12.

[17] Mau M, de Almeida AM, Coelho AV, Südekum KH. First identification of tannin-binding proteins in saliva of Papio hamadryas using MS/MS mass spectrometry. Am J Primatol 2011;73:896–902.

[18] Hofmann RR. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. Oecologia 1989;78:443-57.

[19] Ventura TMS, Ribeiro NR, Dionizio AS, Sabino IT, Buzalaf MAR. Standardization of a protocol for shotgun proteomic analysis of saliva. J Appl Oral Sci 2018;26:e20170561.

[20] Ventura TMS, Cassiano LPS, Souza E Silva CM, Taira EA, Leite AL, Rios D, Buzalaf MAR. The proteomic profile of the acquired enamel pellicle according to its location in the dental arches. Arch Oral Biol 2017;79:20-29.

[21] UniProtKB. Universal Protein Resource. 2021. www.uniprot.org (acessed in March 2021).

[22] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2019;Vienna Austria.

[23] Bindea G, Bernhard M, Hubert H, Pornpimol C, Marie T, Amos K, Wolf-Herman F, Franck P, Zlatko T, Bindea G, Galon J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics 2009;25:1091-3.

[24] Bindea G, Galon J, Mlecnik B. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. Bioinformatics 2013;29:661-3.

[25] Kistler JO, Booth V, Bradshaw DJ, Wade WG. Bacterial community development in experimental gingivitis. PloS One 2013;8:e71227.

[26] Vach K, Al-Ahmad A, Anderson A, Karygianni L, Wittmer A, Hellwig E. Analysing the relationship between nutrition and the microbial composition of the oral biofilm-insights from the analysis of individual variability. Antibiotics 2020;10.3390/antibiotics9080479.

[27] Woelber JP, Gärtner M, Breuninger L, Anderson A, König D, Hellwig E, Al-Ahmad A, Vach K, Dötsch A, Ratka-Krüger P, Tennert C. The influence of an anti-inflammatory diet on gingivitis. A randomized controlled trial. J Clin Periodontol 2019;46:481-90.

[28] Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela e Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales Baptista E. Sheep and goat saliva proteome analysis: a useful tool for ingestive behavior research? Physiol Behav 2009;98:393-401.

[29] Tsuchida S, Satoh M, Takiwaki M, Nomura F. Current status of proteomic technologies for discovering and identifying gingival crevicular fluid biomarkers for periodontal disease. Int J Mol Sci 2018;20(1):86.

[30] Martini T, Rios D, Cassiano LPS, Silva CMS, Taira EA, Ventura TMS, Pereira HABS, Magalhães AC, Carvalho TS, Baumann T, Lussi A, Oliveira RB, Palma-Dibb RG, Buzalaf MAR. Proteomics of acquired pellicle in gastroesophageal reflux disease patients with or without erosive tooth wear. J Dent 2019;81:64-69.

[31] Bringel M, Jorge PK, Francisco PA, Lowe C, Sabino-Silva R, Colombini-Ishikiriama BLC, Machado MAAM, Siqueira WL. Salivary proteomic profile of dogs with and without dental calculus. BMC Vet Res 2020; 10.1186/s12917-020-02514-0

[32] Hartenbach FARR, Velasquez É, Nogueira FCS, Domont GB, Ferreira E, Colombo APV. Proteomic analysis of whole saliva in chronic periodontitis. J Proteomics 2020;10.1016/j.jprot.2019.103602 (Epub ahead of print).

[33] Louro T, Simões C, Lima W, Carreira L, Castelo PM, Luis H, Moreira P, Lamy E. Salivary Protein Profile and Food Intake: A Dietary Pattern Analysis. J Nutr Metab 2021;10.1155/2021/6629951.

[34] Sharma A, Pradeep AR, Raghavendra NM, Arjun P, Kathariya R. Gingival crevicular fluid and serum cystatin C levels in periodontal health and disease. Dis Markers 2012;32:101-7.

[35] Gonçalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia CHS, Camisasca DR, Domont G, Feitosa ACR, Pereira DA, Zingali RB, Alves G. Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. J Periodontal Res 2011;46:599-606.

[36] Bostanci N, Ramberg P, Wahlander Å, Grossman J, Jönsson D, Barnes VM, Papapanou PN. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in experimental gingivitis. J Proteome Res 2013;12:657-78.

[37] Gonçalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, Feitosa AC, Pereira Dde A, Zingali RB, Alves G. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. J Proteomics 2010;73:1334-41.

[38] Carneiro LG, Nouh H, Salih E. Quantitative gingival crevicular fluid proteome in health and periodontal disease using stable isotope chemistries and mass spectrometry. J Clin Periodontol 2014;41:733-47.

[39] Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Tanaka M, Rayo C, Xiao Y, Siqueira WL. Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. *PLoS One* 2013;8:e75898.

[40] Fernley RT, Coghlan JP, Wright RD, Rayo C, Xiao Y, Siqueira WL. Purification and characterization of a high-Mr carbonic anhydrase from sheep parotid gland. Biochem J 1988;249:201-07.

[41] Lamy E, da Costa G, Capela e Silva F, Potes J, Coelho AV, Baptista ES. Comparison of electrophoretic protein profiles from sheep and goat parotid saliva. J Chem Ecol 2008;34:388-97.

[42] Mau M, Kaiser TM, Südekum KH. Evidence for the presence of carbonic anhydrase 29-kDa-isoenzyme in salivar secretions of three ruminating species and the gelada baboon. Arch Oral Biol 2009;54:354-60.

[43] Asari M, Miura K, Ichihara N, Nishita T, Amasaki H. Distribution of carbonic anhydrase isozyme VI in the developing bovine parotid gland. Cells Tissues Organs 2000;167:18-24.

[44] Mau M, Müller C, Langbein J, Rehfeldt C, Hildebrandt JP, Kaiser TM. Adhesion of bovine and goat salivary proteins to dental enamel and silicate. Arch Anim Breed 2006;49:439-46.

[45] Chan HH, Rahim ZH, Jessie K, Hashim OH, Taiyeb-Ali TB. Salivary proteins associated with periodontitis in patients with Type 2 diabetes mellitus. Int J Mol Sci 2012;13:4642-54.

[46] Parkkila S, Parkkila AK. Carbonic anhydrase in the alimentary tract. Roles of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. Scand J Gastroenterol 1996;31:305-17.

[47] Kimoto M, Kishino M, Yura Y, Ogawa Y. A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. Arch Oral Biol 2006;51:117-22.

[48] Borsanelli AC, Athayde FRF, Agostinho SD, Riggio MP, Dutra IS. Dental biofilm and its ecological interrelationships in ovine periodontitis. J Med Microbiol 2021;10.1099/jmm.0.001396.

[49] Borsanelli AC, Athayde FRF, Saraiva JR, Riggio MP, Dutra IS. Dysbiosis and predicted functions of the dental biofilm of dairy goats with periodontitis. Microb Ecol 2022;10.1007/s00248-022-02062-0.

[50] Borsanelli AC, Athayde FRF, Riggio MP, Brandt BW, Rocha FI, Jesus EC, Gaetti-Jardim Jr E, Schweitzer CM, Dutra IS. Dysbiosis and predicted functions of the dental and ruminal microbiome associated with bovine periodontitis. Front Microbiol 2022;10.3389/fmicb.2022.936021.

[51] Dutra IS, Borsanelli AC (Eds). Ecossistema bucal, biofilmes e microbiota periodontal. In: Saúde bucal de ruminantes: Atlas para o reconhecimento de doenças periodontais, Funep, 2022, pp. 19-33.

[52] Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. Immunol Lett 2014;162:22-38.

[53] Moynihan PJ. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. Bull World Health Organ 2005;83:694-99.

[54] Kato I, Vasquez A, Moyerbrailean G, Land S, Djuric Z, Sun J, Lin HS, Ram JL. Nutritional Correlates of Human Oral Microbiome. J Am Coll Nutr 2017;36:88-98.

[55] Martinon P, Fraticelli L, Giboreau A, Dussart C, Bourgeouis D, Carrouel F. Nutrition as a key modifiable factor for periodontitis and main chronic diseases. J Clin Med 2021 Jan 7;10(2):197.

[56] Gorr SU. Antimicrobial peptides in periodontal innate defense. Front Oral Biol 2012;15:84-98.

[57] Lin T, Maita D, Thundivalappil SR, Riley FE, Hambsch J, Van Marter LJ, Christou HA, Berra L, Fagan S, Christiani DC, Warren HS. Hemopexin in severe inflammation and infection: mouse models and human diseases. Crit Care 2015;19:166.

[58] Mertens B, Orti V, Vialaret J, Gibert P, Relaño-Ginés A, Lehmann S, Deville de Périère D, Hirtz C. Assessing a multiplex-targeted proteomics approach for the clinical diagnosis of periodontitis using saliva samples. Bioanalysis 2018;10:35-45.

[59] Sroka A, Sztukowska M, Potempa J, Travis J, Genco CA. Degradation of host heme proteins by lysine- and arginine-specific cysteine proteinases (gingipains) of *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol 2001;183:5609–16.

[60] Borsanelli AC, Gaetti-Jardim Jr E, Schweitzer CM, Döbereiner J, Dutra IS. Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. Pesq Vet Bras 2015;35:829–34.

[61] Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. Clin Chim Acta 2004;343:1-16.

[62] Salazar MG, Jehmlich N, Murr A, Dhople VM, Holtfreter B, Hammer E, Völker U, Kocher T. Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. J Clin Periodontol 2013;40:825-32.

[63] Baliban RC, Sakellari D, Li Z, DiMaggio PA, Garcia BA, Floudas CA. Novel protein identification methods for biomarker discovery via a

proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. J Clin Periodontol 2012;39:203-12.

TABELA 1 Número total de incisivos examinados e incisivos com gengivite nos doze bovinos avaliados durante o período experimental (T1 a T9)

Grupos e tempo experimental	Incisivos examinados	Incisivos com gengivite
FT1	48	0
FT2	48	2
FT3	48	5
FT4	48	23
FT5	48	4
FT6	48	4
FT7	48	2
FT8	48	5
FT9	48	1
SPT1	48	2
SPT2	48	4
SPT3	48	9
SPT4	48	6
SPT5	48	0
SPT6	48	4
SPT7	48	13
SPT8	48	8
SPT9	48	8
Total	864	100

Legenda: FT= bovinos do grupo dieta feno no período experimental avaliado
SPT= bovinos do grupo dieta com suplemento proteico no período avaliado

TABELA 2 Interações entre dieta e tempo utilizando modelo linear misto para ocorrência de gengivite aos 20 e 60 dias (comparação pontual) e ao longo do tempo (T1 a T9)

Gengivites	Interações ou Grupos	P value (FDR)
Comparação Pontual	SP20:F20	0.022*
	F60:F20	0.003*
	SP60:F20	0.036*
	F60:SP20	0.516
	SP60:SP20	0.752
	SP60:F60	0.404
Comparação ao longo do tempo (T1 a T9)	FT4:FT1	0.000*
	FT4:FT2	0.000*
	FT4:FT3	0.003*
	FT5:FT4	0.002*
	FT6:FT4	0.002*
	FT7:FT4	0.000*
	FT8:FT4	0.003*
	FT9:FT4	0.000*

	FT4:SPT1	0.003*
	FT4:SPT2	0.012*
	SPT4:FT4	0.036*
	SPT5:FT5	0.001*
	SPT6:FT4	0.012*
	SPT8:FT4	0.086
	SPT9:FT4	0.086
	SPT7:SPT5	0.084

Legenda: T= Tempos experimental do exame clínico; FT= bovinos do grupo dieta feno no período experimental avaliado; SPT= bovinos do grupo dieta com suplemento proteico no período experimental avaliado

* valores estatisticamente significantes

TABELA 3 Diferenças individuais para ocorrência de gengivite entre bovinos de ambos os grupos de dietas ao longo do tempo (considerando-se apenas os valores próximos a significância)

Identificação animal	Valor de p
5SP *vs* 5F	0.002*
6SP *vs* 5SP	0.011*
1F *vs* 5SP	0.006
1SP *vs* 5SP	0.011*
2SP *vs* 5SP	0.043*
3F *vs* 5SP	0.043*
3SP *vs* 5SP	0.043*
4F *vs* 5SP	0.043*
2F *vs* 5F	0.06
4SP *vs* 5SP	0.06

Legenda: F= bovinos do grupo dieta feno; SP= bovinos do grupo dieta com suplemento proteico; * valores estatisticamente significantes

TABELA 4 Classificação das proteínas identificas na saliva bovina 20 dias após a dieta (Grupo SP20 *vs* Grupo F20)

[a]Número de acesso	Nome da proteína	*PLGS Score*	[b]*Ratio* SP20 *vs.* F20
Q5XQN5	Keratin_type II cytoskeletal 5	105	2.08
P02081	Hemoglobin fetal subunit beta	788	1.27
P81265	Polymeric immunoglobulin receptor	165	1.15
P02070	Hemoglobin subunit beta	964	1.11
P02769	Albumin	711	0.80
Q3SZR3	Alpha-1-acid glycoprotein	684	0.76
P60712	Actin_cytoplasmic 1	288	0.76
P63258	Actin_cytoplasmic 2	276	0.76
P68138	Actin_alpha skeletal muscle	260	0.70
P62739	Actin_aortic smooth muscle	266	0.70
Q3ZC07	Actin_alpha cardiac muscle 1	260	0.70
Q5E9B5	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	260	0.70
P18915	Carbonic anhydrase 6	84	0.59
P46193	Annexin A1	466	SP20 group*
P01035	Cystatin-C	614	SP20 group
P00639	Deoxyribonuclease-1	542	SP20 group
Q2KJD6	Endosome-associated-trafficking regulator 1	74	SP20 group
Q32LN0	ETS homologous factor	88	SP20 group
A5D785	Exportin-2	76	SP20 group
P48035	Fatty acid-binding protein_adipocyte	281	SP20 group
P02672	Fibrinogen alpha chain	84	SP20 group
P02676	Fibrinogen beta chain	59	SP20 group
P19120	Heat shock cognate 71 kDa protein	41	SP20 group

P0C0S9	Histone H2A type 1	124	SP20 group
A1A4R1	Histone H2A type 2-C	124	SP20 group
Q3ZBX9	Histone H2A.J	124	SP20 group
Q32LA7	Histone H2A.V	124	SP20 group
P0C0S4	Histone H2A.Z	124	SP20 group
P68432	Histone H3.1	75	SP20 group
P84227	Histone H3.2	75	SP20 group
Q5E9F8	Histone H3.3	75	SP20 group
A5PK61	Histone H3.3C	56	SP20 group
P62803	Histone H4	269	SP20 group
Q8SPJ1	Junction plakoglobin	81	SP20 group
A1L595	Keratin_type I cytoskeletal 17	78	SP20 group
Q29S21	Keratin_type II cytoskeletal 7	93	SP20 group
Q08D91	Keratin_type II cytoskeletal 75	93	SP20 group
P80025	Lactoperoxidase	104	SP20 group
P24627	Lactotransferrin	70	SP20 group
Q8SPP7	Peptidoglycan recognition protein 1	112	SP20 group
A0JNP2	Secretoglobin family 1D member	525	SP20 group
Q29443	Serotransferrin	84	SP20 group
Q6B856	Tubulin beta-2B chain	108	SP20 group
Q2T9S0	Tubulin beta-3 chain	52	SP20 group
Q3ZBU7	Tubulin beta-4A chain	75	SP20 group
Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	75	SP20 group
Q2KJD0	Tubulin beta-5 chain	108	SP20 group
Q3ZCH5	Zinc-alpha-2-glycoprotein	101	SP20 group
P28801	Glutathione S-transferase P	75	F20 group**
Q3SZV7	Hemopexin	72	F20 group
Q29RH3	2NAD-capped RNA hydrolase NUDT12	66	F20 group

P45478	Palmitoyl-protein thioesterase 1	77	F20 group
Q2KI09	Transcription elongation factor A protein 3	79	F20 group
P17289	Tyrosine 3-monooxygenase	59	F20 group

Legenda: [a] Identificação das proteínas (somente as revisadas) da base de dados do Uniprot (http://www.uniprot.org/); [b] Proteínas com expressão significativamente alterada são organizadas de acordo com a proporção (*ratio*); *Indica proteínas exclusivas de cada grupo em ordem alfabética

TABELA 5 Classificação das proteínas identificas na saliva bovina 60 dias após a dieta (Grupo SP60 *vs* Grupo F60)

[a]Número de acesso	Nome da proteína	PLGS Score	[b]Ratio PS60 *vs.* H60
P02081	Hemoglobin fetal subunit beta	1107	8.50
P02070	Hemoglobin subunit beta	1265	7.85
P01966	Hemoglobin subunit alpha	3734	7.24
P79125	Short palate_lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2B	682	5.10
P01035	Cystatin-C	229	4.76
P24627	Lactotransferrin	1013	2.18
P80025	Lactoperoxidase	178	1.80
P62739	Actin_aortic smooth muscle	101	1.73
P68138	Actin_alpha skeletal muscle	82	1.70
Q3ZC07	Actin_alpha cardiac muscle 1	82	1.70
Q5E9B5	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	82	1.70

A0JNP2	Secretoglobin family 1D member	1110	1.68
P63258	Actin_cytoplasmic 2	82	1.67
P60712	Actin_cytoplasmic 1	82	1.63
P18915	Carbonic anhydrase 6	198	0.73
P02769	Albumin	147	0.70
P79124	Short palate_lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2A	2381	0.58
Q3SZR3	Alpha-1-acid glycoprotein	2950	0.41
P81265	Polymeric immunoglobulin receptor	126	0.35
Q2KHT9	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 4	80	PS60 group*
A7E3S5	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase non-catalytic subunit WDR4	62	PS60 group
Q7SIH1	Alpha-2-macroglobulin	126	H60 group
P46193	Annexin A1	200	H60 group
Q8SPF8	BPI fold-containing family B member 1	669	H60 group
P19661	Cathelicidin-3	991	H60 group
P54229	Cathelicidin-5	868	H60 group
Q2UVX4	Complement C3	260	H60 group
P00639	Deoxyribonuclease-1	1923	H60 group
Q03763	Desmoglein-1	206	H60 group
Q2T9X1	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC8	90	H60 group
Q2NL22	Eukaryotic initiation factor 4A-III	76	H60 group
P02672	Fibrinogen alpha chain	93	H60 group

P02676	Fibrinogen beta chain	210	H60 group
A6QLU3	GRB2-associated-binding protein 1	120	H60 group
Q2TBU0	Haptoglobin	516	H60 group
P0C0S9	Histone H2A type 1	798	H60 group
A1A4R1	Histone H2A type 2-C	798	H60 group**
Q3ZBX9	Histone H2A.J	798	H60 group
Q32LA7	Histone H2A.V	638	H60 group
P0C0S4	Histone H2A.Z	638	H60 group
P62808	Histone H2B type 1	3009	H60 group
Q2M2T1	Histone H2B type 1-K	3009	H60 group
Q32L48	Histone H2B type 1-N	2755	H60 group
P68432	Histone H3.1	288	H60 group
P84227	Histone H3.2	288	H60 group
Q5E9F8	Histone H3.3	288	H60 group
A5PK61	Histone H3.3C	223	H60 group
P62803	Histone H4	1032	H60 group
A1L595	Keratin_type I cytoskeletal 17	119	H60 group
Q5XQN5	Keratin_type II cytoskeletal 5	1263	H60 group
Q29S21	Keratin_type II cytoskeletal 7	195	H60 group
Q08D91	Keratin_type II cytoskeletal 75	170	H60 group
A6QNX5	Keratin_type II cytoskeletal 78	156	H60 group
Q32KP2	Leucine-rich repeat-containing protein 23	169	H60 group
Q3SZE5	Myosin regulatory light chain 2_ ventricular/cardiac	190	H60 group

	muscle isoform		
Q0V898	Negative elongation factor E	88	H60 group
P60986	Prolactin-inducible protein homolog	2133	H60 group
Q0IIG7	Ras-related protein Rab-5A	69	H60 group
Q29443	Serotransferrin	285	H60 group
Q5EA86	Transmembrane protein 183	80	H60 group
Q6B856	Tubulin beta-2B chain	187	H60 group
Q2T9S0	Tubulin beta-3 chain	93	H60 group
Q3ZBU7	Tubulin beta-4A chain	136	H60 group
Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	136	H60 group
Q2KJD0	Tubulin beta-5 chain	205	H60 group
A6QQM4	Zinc finger protein 474	122	H60 group
Q3ZCH5	Zinc-alpha-2-glycoprotein	72	H60 group

Legenda: [a] Identificação das proteínas (somente as revisadas) da base de dados do Uniprot (http://www.uniprot.org/); [b] Proteínas com expressão significativamente alterada são organizadas de acordo com a proporção (*ratio*); *Indica proteínas exclusivas de cada grupo em ordem alfabética

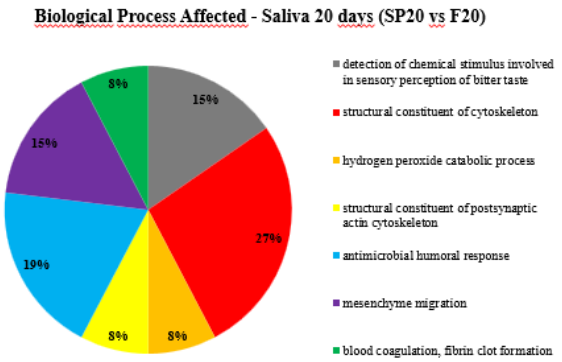


Fig. 1A

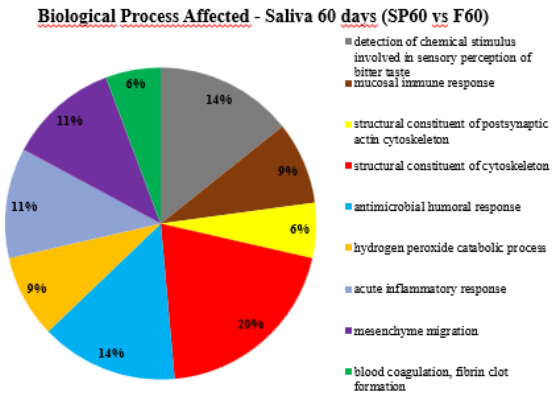


Fig. 1B

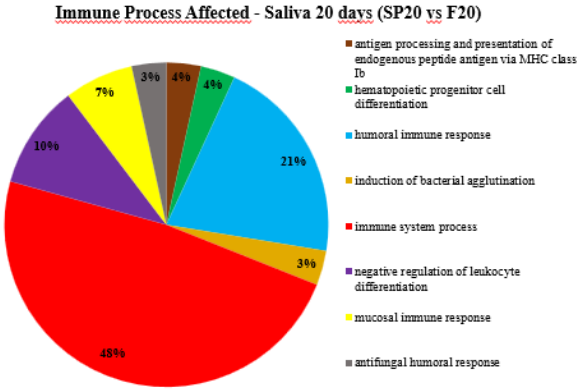


Fig. 2A

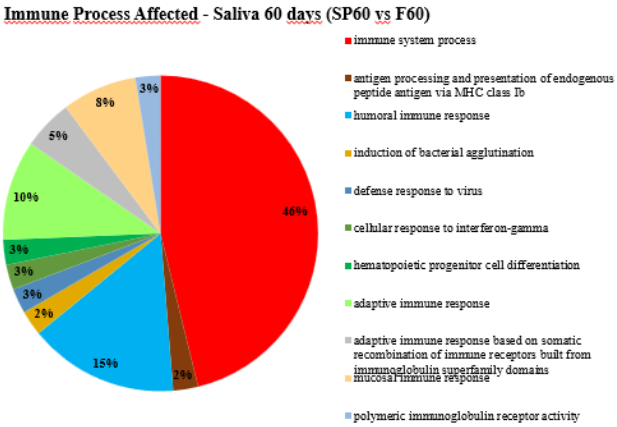


Fig. 2B

Figura 1A. Processos biológicos afetados pela saliva de bovinos após 20 dias de dieta, grupo SP20 vs. grupo F20. Categorias de proteínas baseadas no Processo Biológico GO. Termos significativos (Kappa= 0,04) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O número de acessos proteicos foi fornecido pelo UNIPROT. A ontologia genética foi verificada de acordo com o plugin ClueGo® do software Cytoscape® 3.7.2. [23,24]

Figura 1B. Processos biológicos afetados pela saliva de bovinos e após 60 dias de confinamento, grupo SP60 vs. grupo F60. Categorias de proteínas baseadas no Processo Biológico GO. Termos significativos (Kappa = 0,04) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O número de acessos

proteicos foi fornecido pelo UNIPROT. A ontologia genética foi verificada de acordo com o plugin ClueGo® do software Cytoscape® 3.7.2. [23,24]

Figura 2A. Processos imunológicos afetados pela saliva de bovinos após 20 dias de dieta, grupo SP20 vs. grupo F20. Categorias de proteínas baseadas no Processo Biológico GO. Termos significativos (Kappa = 0,04) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O número de acessos proteicos foi fornecido pelo UNIPROT. A ontologia genética foi verificada de acordo com o plugin ClueGo® do software Cytoscape® 3.7.2. [23,24]

Figura 2B. Processos imunológicos afetados pela saliva de bovinos após 60 dias de confinamento, grupo SP60 vs. grupo F60. Categorias de proteínas baseadas no Processo Biológico GO. Termos significativos (Kappa = 0,04) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O número de acessos proteicos foi fornecido pelo UNIPROT. A ontologia genética foi verificada de acordo com o plugin ClueGo® do software Cytoscape® 3.7.2. [23,24]

Artigo formatado conforme normas para submissão à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

CAPÍTULO 3 – Dietas de feno e suplemento proteico modificam a microbiota ruminal e dental de bezerros

Saraiva JR[a], Borsanelli AC[b], Athayde FRF[c], Vaccari J[a], Ramos TNM[a], Souza NC[d], Dutra IS[c]

[a]Postgraduate Program in Veterinary Sciences, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences of Jaboticabal, UNESP Univ Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

[b] Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil

[c] Department of Production and Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine of Araçatuba, UNESP Univ Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana 793, 16050-680 Araçatuba, SP, Brazil

[d] Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Anhanguera de Anápolis, FAA, Anápolis, GO, Brasil

Resumo

Boca e rúmen são dois ecossistemas distintos que se comunicam de forma bidirecional nos ruminantes. O presente estudo piloto teve como propósito verificar os efeitos da dieta proteica suplementar sobre a microbiota ruminal e dental de bovinos jovens. Bezerros com idade entre 10 e 18 meses (n=10) foram confinados e receberam por 60 dias consecutivos uma dieta volumosa de feno de *Panicum* produzido em área recém-reformada. Um grupo (n=5) desses animais recebeu uma dieta suplementar proteica composta basicamente por farelo de algodão, milho e ureia. Amostras do conteúdo ruminal e do biofilme dental dos incisivos dos bezerros foram avaliadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA no início e aos 60 dias do experimento. No microbioma dental, os Filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, e os gêneros Moraxella, Neisseria e Lautropia foram abundantes em ambos os momentos e grupos. No rúmen, o Filos considerados centrais ou mais representativos foram Bacteroidetes e Firmicutes no início e aos 60 dias do experimento. Não foram observadas diferenças significativas de riqueza e diversidade do microbioma bucal e ruminal dos animais. No

entanto, aos 60 dias pode-se evidenciar dissimilaridade da microbiota dental (p=0.007) e ruminal (p= 0.004) dos bezerros alimentados somente com feno quando comparado ao início do experimento; da mesma forma, bovinos do grupo feno (p= 0.002) e bovinos alimentados com a dieta proteica suplementar (p= 0.004), bem como entre as duas dietas (p= 0.005) apresentaram diferenças significativas quando comparados ao início do experimento. As redes de co-ocorrência demonstraram mais interações positivas na boca e no rúmen aos 60 dias em ambos os grupos. Os achados preliminares indicam que dietas compostas por feno e suplemento proteico interferem na microbiota ruminal e bucal de bovinos.

Palavras-chave: bovinos, dieta, microbioma dental, microbioma ruminal, sequenciamento

Introdução

O ecossistema bucal de ruminantes tem perfis distintos em termos de diversidade e riqueza que se relacionam de forma simbiótica ou antagônica de acordo com o status de saúde bucal (Borsanelli et al. 2018; Borsanelli et al. 2021; Borsanelli et al. 2022a; Borsanelli et al. 2022b). A habilidade de processamento dos alimentos está intimamente ligada as comunidades microbianas estabelecidas no trato gastrointestinal, especialmente a microbiota que reside no compartimento ruminal que codifica funções ligadas a digestão e processamento das fibras vegetais (Mizhari et al. 2021).

Interações simbióticas da complexa microbiota que coexiste nesse ambiente variam de acordo com fatores individuais, genéticos, ambientais e alimentares (Stewart et al. 1997; Henderson et al. 2015; Fernando et al. 2010; Menezes et al. 2011). Nesse contexto, a dieta reflete diretamente na composição e na diversidade de populações microbianas do rúmen (Fernando et al. 2010; Henderson et al. 2015), como observado pela proliferação de bactérias fibrolíticas em bovinos alimentados com dietas ricas em folhagens; ou pela predominância de

bactérias amilolíticas em bovinos alimentados com dietas ricas em grãos (Nagaraja et al. 2007).

Os bovinos realizam cerca de 17.000 movimentos mastigatórios por dia. Os dentes são subdivididos de acordo com a função e características relacionadas a preensão, mastigação e ruminação dos alimentos (Dutra & Borsanelli 2022). Sendo assim, a boca comunica-se repetidamente com o rúmen de forma bidirecional durante toda vida desses animais (Borsanelli et al. 2022).

Em ruminantes, a hipótese de que a dieta atue no desencadeamento de enfermidades bucais é reconhecida por diversos estudos (Dutra et al. 1993; Ramos et al. 2019). Nos últimos anos, a problemática relacionada a produção de proteína animal de forma eficiente e com menor impacto ambiental têm sido pauta de pesquisas empregando abordagens metagenômicas e/ou metatranscriptômicas (Fernando et al. 2010; Henderson et al. 2015; Clemmons et al., 2019).

De fato, a compreensão dos mecanismos relacionados a ecologia do microbioma ruminal é um dos pilares fundamentais no que se refere a sustentabilidade na produção. Apesar da notória importância da saúde bucal no desempenho animal, poucos estudos buscaram investigar as interações ecológicas que ocorrem no binômio boca-rúmen, especialmente em animais mantidos em dietas de alto rendimento utilizando-se suplementação proteica.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a composição e as possíveis conexões entre microbiomas dental e ruminal de bezerros alimentados com dieta composta por feno de *Panicum* produzido em área recém-reformada e suplemento proteico durante 60 dias de confinamento.

Material e Métodos

Comissão de Ética em Pesquisa. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus Jaboticabal / SP (Processo

FCAV-Unesp nº 013966/17).

Dieta. O feno utilizado foi cultivado em solo recém-reformado de acordo com as práticas agrícolas convencionais de análise, calagem e adubação do solo (Ramos et al. 2019). A composição química bromatológica e de nutrientes totais estimados do feno foi basicamente 952.1g/kg de matéria seca, 47.9g/kg de umidade, 112.2g/kg de proteína bruta, 337.3g/kg de fibra bruta, 677.1g/kg de fibra em detergente neutro (FDN), 396.1g/kg de fibra em detergente ácido (FDA) e 80.7g/kg de matéria mineral. O concentrado proteico foi ajustado de acordo com as necessidades de pesagem individual e composto basicamente por farelo de algodão 38-41% (7.9%), milho (65.7%) e ureia (1.1%).

Grupos experimentais: Foram utilizados 10 bovinos machos da raça Jersey com idade entre 10 e 18 meses que permaneceram confinados em baias individuais por 60 dias. Os bovinos foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo o grupo controle alimentado com feno de *Panicum maximun cv. massai* e *Panicum maximun cv. mombaça* (C; n=5); e ao segundo grupo, além do mesmo feno, foi acrescentado o suplemento proteico uma vez ao dia fornecido de acordo com as necessidades individuais dos bovinos (P; n=5). Todos os animais receberam sal comum (NaCl) e água *ad libitum.*

Coleta de biofilme dental. Foram realizadas três coletas do biofilme subgengival dos animais: ao início do experimento (dia 0), após 20 dias de adaptação a dieta (dia 20) e ao término do experimento (dia 60). Entretanto, as amostras do dia 20 não apresentaram material genético suficiente para análise de sequenciamento. Portanto, foram analisadas 20 amostras de biofilme subgengival dos animais: 10 amostras do dia 0 (5 amostras/grupo) e 10 amostras do dia 60 (5 amostras/grupo). A coleta foi realizada na face vestibular medial dos dentes 401 por ser o incisivo mais antigo do animal e consequentemente com maior acúmulo de biofilme. Para coleta utilizou-se cureta Gracey e gaze estéreis. Posteriormente, as amostras foram transferidas para 250mL de RNA

later e armazenadas em temperaturoa de -80ºC até serem processadas (Borsanelli et al. 2018a).

Coleta de líquido ruminal. Após contenção física, coletou-se no período da manhã aproximadamente 15mL de conteúdo ruminal utilizando tubo estomacal oral (OST) conectado a bomba de vácuo e inserido no saco ventral do rúmen (Borsanelli et al. 2022a). Foram coletadas um total de 20 amostras de conteúdo ruminal: 10 amostras no início do experimento (5 amostras/grupo) e 10 no término do experimento aos 60 dias (5 amostras/grupo). Após a coleta, as amostras permanceram refrigeradas e foram armazenadas em temperatura de -80ºC até processamento.

Sequenciamento: O sequenciamento e as bibliotecas das amostras foram feitos no Environmental Sample Preparation and Sequecing Facility (ESPSF) no Argonne National Laboratory, em Lemont, Estados Unidos da América, usando um conjunto de *primers* e código de barras adaptado para a plataforma Illumina HiSeq2000 e MiSEq que tem como alvo a região V4 do rRNA 16S gene (517F-806R) (Caporaso et al. 2011). 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).

Processamento das sequências. As leituras foram analisadas e pareadas utilizando-se o USEARCH versão 8.0.1623 (taxa de erro máxima esperada 1,5). Nenhuma base ambígua foi permitida e as sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) usando as seguintes configurações: *uparse_maxdball 1200,* apenas de novo verificação de quimera, *usearch_global* com -*maxaccepts 8 – maxrejects 64 -maxhits 1*. A taxonomia de cada OTU foi realizada utilizando-se o QIIME versão 1.8.0, classificador RDP (min confiança 0,8) e o Silva v.132 (Cole et al. 2009; Caporaso et al. 2010; Quast et al. 2013). As sequências com o alinhamento mínimo de 97% foram cortadas na região V4 e usadas para treinar o classificador RDP. As pesquisas de bioinformática foram realizadas no Academic Centre for Dentistry Amsterdam, na University of Amsterdam e na VU University

Amsterdam, Amsterdam, Holanda.

Análise estatística. A tabela final de OTU foi subamostrada aleatoriamente no microbioma bucal e ruminal de acordo com a profundidade de leitura das amostras de cada microbioma. Todas as OTUs agrupadas com menos de 5 leituras em cada grupo foram removidos manualmente. Estas OTUs foram aplicadas nos cálculos de diversidades alfa e beta entre as amostras. Os índices de diversidade alfa foram estimados para determinar a riqueza com a contagem de OTUs por amostra, e a riqueza e uniformidade de OTUs foram calculados com o índice de Shannon pelo Pacote R “vegan” (Dixon, 2003). Após a normalização do sequenciamento, profundidade, a saída de diversidade alfa foi comparada usando analise de variância (ANOVA) no software R (v. 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Austria) (R Core Team 2019). A diversidade beta foi calculada para comparar a composição microbioma entre os grupos, usando dissimilaridade de Bray-Curtis e análise de coordenadas principais (PCoA). As diferenças entre os perfis microbianos dos dois grupos foram realizadas com análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) da função adonis no pacote R “vegan”. O tamanho do efeito da análise discriminante linear (LEfSe) foi usado para determinar quais OTUs e táxons foram significativamente abundantes entre os grupos. As subamostras foram usadas para normalizar as leituras das amostras em cada microbioma. Análise de diversidade (Índice de Diversidade de Shannon e a riqueza total de espécies), um gráfico de análise de componentes principais (PCoA) e diferenças entre perfis microbianos dos grupos por Análise de variância molecular (AMOVA) com distância de similaridade de Bray-Curtis foram calculados em Mothur (versão 1.41.3). Diferenças significativas na saída de diversidade foram testadas com o Wilcoxon-Mann-Whitneytest no software R (versão 3.4). A análise dos táxons diferencialmente abundantes dentro dos grupos foi estimada pelo linear discriminant analysis effect size (LEfSe; Segata et al., 2011). As redes de coocorrência foram inferidas baseadas nas correlações

entre os Filos, somadas a partir das OTUs identificadas cada grupo. A matriz de correlação e valor p foram gerados com o algoritmo SparCC (Friedman e Alm, 2012) implementado no Mothur. As matrizes filtradas com um valor absoluto correlação de 0,5 e $p<0,05$ foram calculadas usando R e o pacote Cytoscape versão 3.8.0 (Csárdi e Nepusz, 2006) foi utilizado para gerar a imagem.

Resultados

Saída de sequenciamento. O sequenciamento do gene 16S rRNA de alto rendimento gerou um total de 2.344.021 reads de 40 amostras (20 de biofilme dental e 20 de conteúdo ruminal). Após remoção de erros de sequenciamento e sequências indesejáveis, restaram 84,7% das sequências (1.986.713), deste total, foram identificados e removidos 151.233 (7,6%) sequências consideradas “chimeras” restando 1.835.480, os quais após alinhamento contra o banco do Silva foram atribuídos a 3.211 unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Para normalização dos dados nas contagens de OTUs por amostras, realizou-se uma subsample com as 20 amostras de biofilme dental em 5170 reads nos dados processados (462 OTUs) e a remoção das OTUs com contagem inferior a 10 restando 184 OTUs. A subsamble das 20 amostras de conteúdo ruminal foram feitas com 15.660 reads dos dados processados (2801 OTUs), a remoção das OTUs com contagem inferior a 10 chegou a 1616 OTUs.

Gêneros comuns e únicos. Após a normalização e filtragem de OTUs com contagem inferior a 10, as 40 amostras apresentam 1800 OTUs: 26 OTUs compartilhadas entre si, 158 OTUs únicas de biofilme dental e 1590 OTUs únicas no conteúdo ruminal (diagrama Venn – Figura 1). As 26 OTUs compartilhadas estão distribuídas em 6 Filos: Proteobacteria (13 OTUs), Bacteroidetes (5), Fusobacteria (3), Firmicutes (2), Actinobacteria (2) e Tenericutes (1).

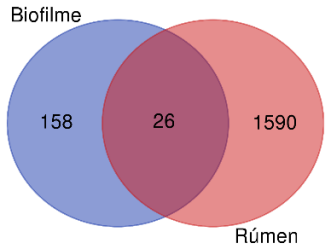


Figura 1- Distribuição de gêneros bacterianos identificados no biofilme dental e ruminal de bovinos representados pelo Diagrama de Venn

Abundância relativa de Filos no microbioma dental e de conteúdo ruminal. Um total de 16 Filos foram identificados no microbioma dental dos bezerros. Sete Filos apresentaram abundância relativa superior a 1% nos microbiomas dentais (Figura 2A), sendo três Filos compartilhados entre ambos os grupos. O Filo Proteobacteria é o mais representativo de todos sendo superior a 60% em todos os grupos, porém os animais submetidos a dieta feno sofreram um aumento ao longo do tempo de 65,3% para 74,5% enquanto na dieta suplementar proteica foi reduzido de 84,8% para 67,5%. Já Actinobacteria aumentou ao longo do tempo nas duas dietas, na dieta feno de 18,7% foi para 21,2% e na dieta suplementar proteica de 2,8% para 17,7%. Enquanto Firmicutes na dieta feno sofreu redução de 7,8% para 2,6%, e na dieta suplementar proteica aumentou de 1,4% para 11,1%. Na dieta feno o momento inicial apresentou 6 Filos que reduziu para 3 Filos no momento final, sendo os mesmo que são compartilhados entre todos. Ambos os momentos da dieta suplementar proteica (início e final do experimento) compartilhavam o Filo Fusobacteria (1,7% e 2,3%).

No microbioma do conteúdo ruminal dos bezerros um total de 20 Filos foram identificados. Nove Filos apresentaram uma abundância relativa superior a 1% nos microbiomas de conteúdo ruminal (Figura 2B), sendo seis Filos compartilhados entre ambos os grupos. O Filo Bacteroidetes é o mais representativo de todos sendo superior a 50% em todos os grupos, porém os animais submetidos a dieta feno sofreram

uma redução ao longo do tempo de 65,3% para 54,7% enquanto na dieta suplementar proteica foi mantido em 60%. Já Fibrobacteres apareceu nas duas dietas, contudo no momento final das dietas estava superior a 1%. Na dieta suplementar proteica, Spirochaetes esteva superior a 1% e Patescibacteria apareceu como superior somente no momento final da dieta feno.

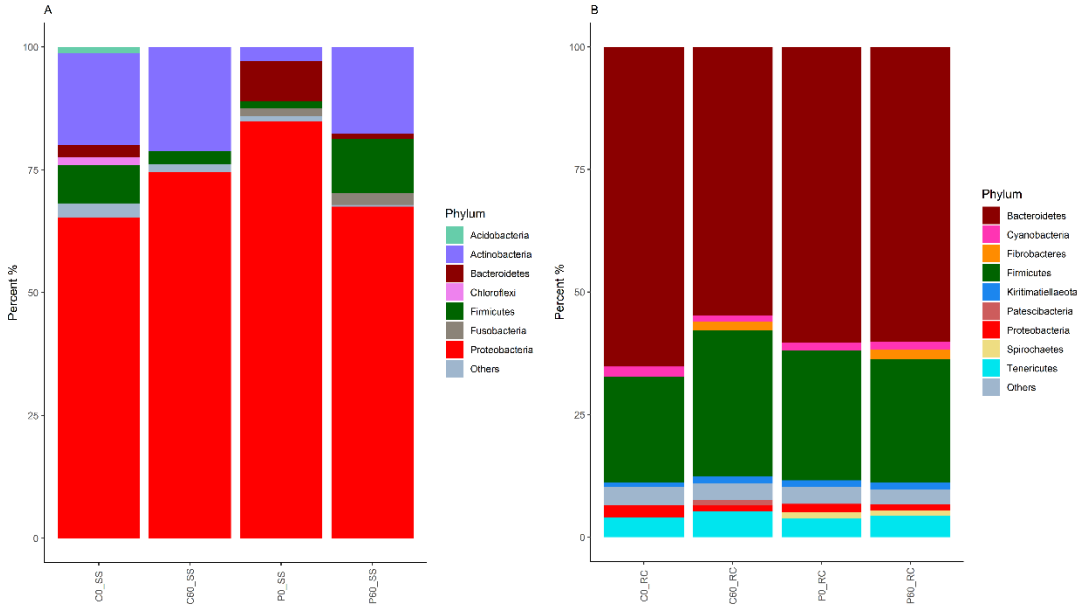


Figura 2- Abundância relativa (>1%) das comunidades bacterianas (Filos). **A-** Identificadas no biofilme dental de 5 bovinos submetidos a dieta feno no tempo inicial (C0) e no tempo final (C60) e 5 bovinos submetidos a dieta suplementar proteica no tempo inicial (P0) e no tempo final (P60). **B-** Identificadas no conteúdo ruminal de 5 bovinos submetidos a dieta feno no tempo inicial (C0) e no tempo final (C60) e 5 bovinos submetidos a dieta suplementar proteica no tempo inicial (P0) e no tempo final (P60).

Abundância de gêneros. Foram identificados um total de 80 gêneros no microbioma dental, mas apenas 17 gêneros apresentaram abundância

relativa superior a 1% (Figura 3A). Nos cinco animais submetidos da dieta feno no momento inicial foram identificados 12 gêneros (>1%), enquanto no tempo 3, sete gêneros foram encontrados. No grupo dieta suplementar proteica (n=5) em ambos os momentos (inicial e final), sete gêneros foram identificados. Nas duas dietas e nos dois momentos três gêneros apareceram: *Moraxella*, *Neisseria* e *Lautropia*. Na dieta feno, o gênero *Lautropia* é o mais prevalente nos dois momentos (inicial e final) com 21,8% e 20,7%, respectivamente. Enquanto na dieta suplementar proteica o gênero mais prevalente foi *Moraxella* no momento inicial com 31,5% enquanto no momento final essa porcentagem foi reduzida para 5,3%. No momento final da dieta suplementar proteica, o gênero mais prevalente foi *Neisseria* (22,3%), que manteve a porcentagem semelhante ao momento inicial (21,2%).

No microbioma de conteúdo ruminal foram identificados 139 gêneros, mas apenas 20 gêneros apresentaram abundância relativa superior a 1% (15 OTUs não foram classificadas ou não foram identificadas) (Figura 3B). No grupo de animais da dieta feno (n=5) no momento inicial foram detectados 8 gêneros (> 1%), enquanto que no final do experimento 14 gêneros apareceram. Já no grupo de animais da dieta suplementar proteica (n=5) no momento inicial foram identificados 12 gêneros (> 1%), e no final 13 gêneros foram encontrados. Nas duas dietas e em ambos os tempos avaliados, sete gêneros apareceram: *Prevotella 1, Ruminococcaceae UCG-014, Pseudobutyrivibrio, Prevotellaceae UCG-003, Lachnospiraceae XPB1014 group, Rikenellaceae RC9 gut group* e *Prevotellaceae UCG-001*. O gênero *Prevotella 1* é o mais presente em todos os grupos, o mesmo diminuiu de 33,8% (grupo feno momento inicial) para 23,6% (grupo feno momento final) entre os tempos da dieta feno. Os gêneros *Fibrobacter* e *Saccharofermentans* sofreram aumento no momento final (3) em ambas dietas.

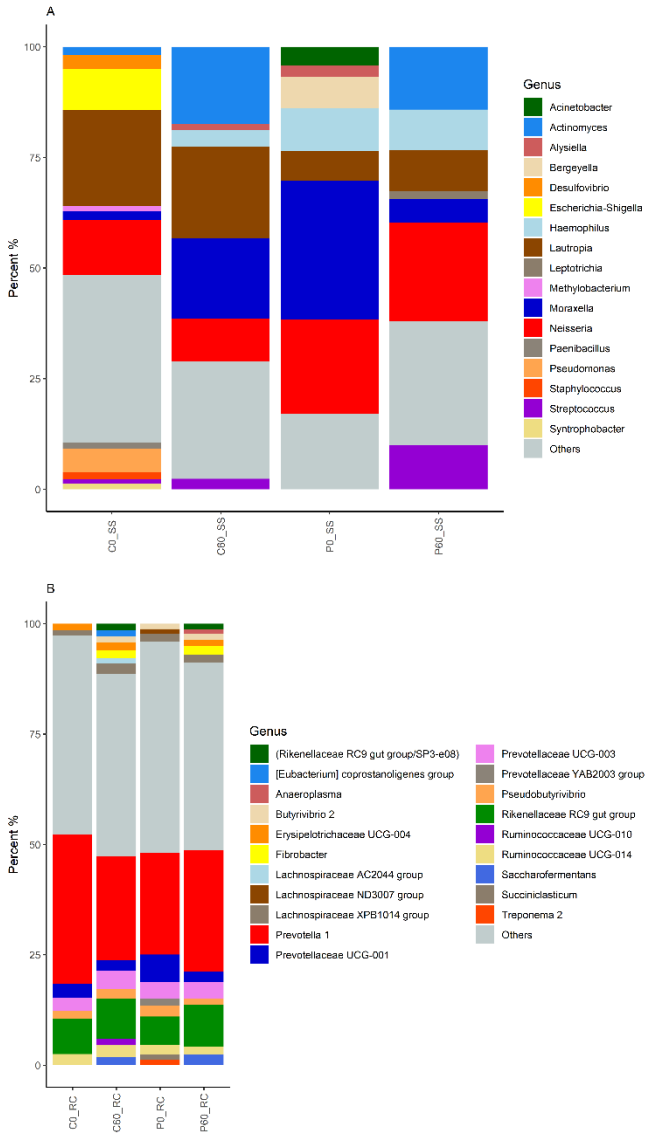


Figura 3- Abundância relativa (>1%) das comunidades bacterianas (gêneros). **A-** Identificadas no biofilme dental de 5 bovinos submetidos a dieta feno no tempo inicial (C0) e no tempo final (C60) e 5 bovinos submetidos a dieta suplementar proteica no tempo inicial (P0) e no tempo final (P60). **B-** Identificadas no conteúdo ruminal de 5 bovinos submetidos a dieta feno no tempo inicial (C0) e no tempo final (C60) e 5 bovinos submetidos a dieta suplementar proteica no tempo inicial (P0) e no tempo final (P60).

Diversidade alfa. A riqueza média na microbiota dental do grupo que recebeu a dieta feno no momento inicial teve 47 OTUs. No final, a riqueza média caiu para 42 OTUs. No grupo que recebeu dieta suplementar proteica, a riqueza média no momento inicial foi de de 48 OTUs, no final a média foi de 49 OTUs. O índice de Shannon teve médias de 2,3 e 2,0 nos respectivos momentos (inicial e final da dieta feno); e a média de 2,1 foi verificada nos dois tempos avaliados (inicial e final) da dieta suplementar proteica. Considerando-se os dois momentos e as duas dietas no biofilme dental, a média foi de 46 OTUs com o animal com menor riqueza tendo 22 OTUs enquanto o com maior chegou a 71 OTUs. O índice de Shannon apresentou média geral de 2,1 com mínimo de 1,1 e máximo de 3,2. Não foram observadas diferenças significativas entre os momentos e as dietas (Figura 4A e B)

A microbiota do conteúdo ruminal na dieta feno no momento inicial teve uma riqueza média de 896 OTUs. Ao término do experimento essa riqueza média aumentou para 1009 OTUs. No grupo dieta suplementa proteica, a riqueza média no momento inicial teve média de 968 OTUs, e no final a média foi de 958 OTUs. O índice de Shannon teve todas as médias de 5 em ambos os tempos e dietas. Considerando-se ambos os momentos e ambas as dietas para o conteúdo ruminal, a média foi de 958 OTUs com o animal com menor riqueza de 766 enquanto o animal com maior riqueza chegou a 1150 OTUs. O índice de Shannon teve média geral de 5,2 com mínimo de 4,4 e máximo de 5,9. Não foram observadas diferenças significativas entre os momentos e as dietas (Figura 4C e D).

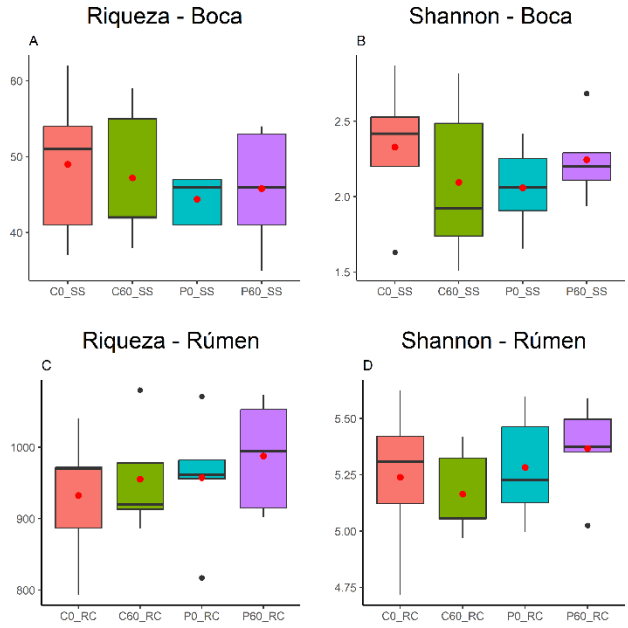


Figura 4- Diversidade alfa entre os tempos e as dietas, riqueza e índice de Shannon. **A-** Riqueza de espécies observadas na boca. **B-** Índice de diversidade de Shannon na boca. **C-** Riqueza de espécies observadas no rúmen. **D-** Índice de diversidade de Shannon no rúmen.

Diversidade beta (Composição do microbioma). A composição dos microbiomas foi analisada com a construção da matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis (composição igual próximo de 0 e composição diferente próximo de 1). No biofilme dental foi demostrado uma média de 73% (0,73) de dissimilaridade entre os grupos de dieta feno e dieta suplementar proteica com o desvio padrão de 0,19 (19%). Na dieta feno momento inicial (C0) e final (C60) observou-se uma média de 81% (0,81) de dissimilaridade, enquanto a média de dissimilaridade na dieta suplementar proteica entre o tempo inicial (P0) e tempo final (P60) foi menor com 69% (0,69). A análise de variância molecular (AMOVA) da matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis resultou em um valor de p significativo com p = 0,007 (correção de Bonferroni) na comparação entre os momentos da dieta feno (Figura 5A).

No conteúdo ruminal foi demostrado uma média de 59% (0,59) de dissimilaridade entre os grupos de dieta feno e suplementar proteica com

o desvio padrão de 0,04 (4%). Na dieta feno o tempo inicial (C0) e final (C60) teve uma média de 63% (0,63) de dissimilaridade, enquanto a média de dissimilaridade na dieta entre o tempo inicial (P0) e tempo final (P60) foi menor com 59% (0,59). A análise de variância molecular (AMOVA) da matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis resultou em um valor de p significativo com p= 0,002 (correção de Bonferroni) na comparação entre os tempos da dieta feno. Também foi observada diferença significativa entre os tempos na dieta suplementar proteica (p= 0.004) (Figura 5B).

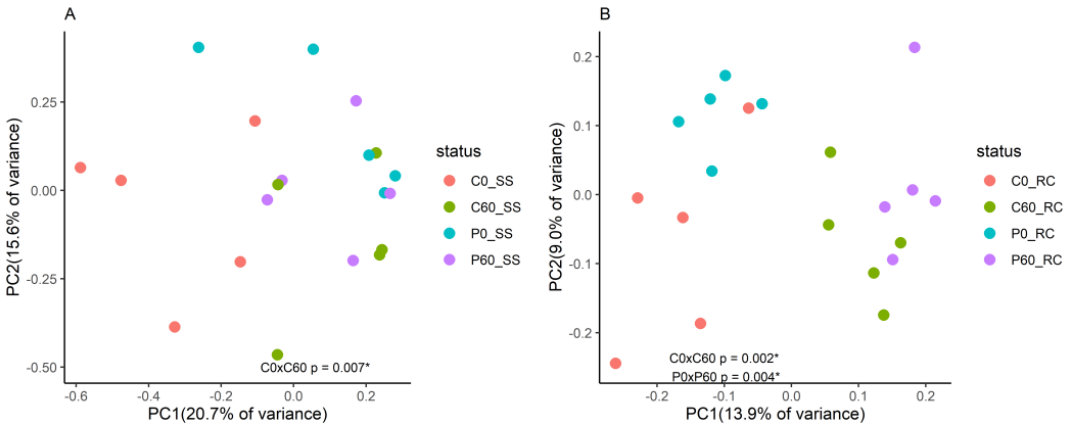


Figura 5- Diversidade beta, composição microbiana entre os tempos e as dietas pela dissimilaridade de Bray-Curtis. **A-** Microbiota dental. **B-** Microbiota ruminal

Comparação das OTUs (LEfSe). Ao analisar a diferença das 184 OTUs do biofilme dental entre os tempos e as dietas observou que na dieta feno ao decorrer do tempo (C0-C60) 17 OTUs tiveram diferenças estatisticamente significativas, as quais, estão distribuídas em 5 Filos com Proteobacteria sendo Filo que mais aparece em 8 OTUs. No tempo inicial do grupo feno (C0) ainda aparecem mais 3 OTUs do Filo Firmicutes, enquanto no momento final (C60) aparecem os Filos

Bacteroidetes (4OTUs), Fusobacteria (1 OTU) e Actinobanteria (1OTU) (Figura 6).

Para a dieta suplementar proteica nos momentos inicial e final (P0-P60) 14 OTUs foram diferentes estatisticamente e estão classificadas em 7 Filos, sendo Proteobacteria com 6 OTUs e Bacteriodetes com 3 OTUs presentes em ambos os tempos. No momento final (P60) aparecem 4 Filos únicos, com Actinobacteria (2 OTUs), Firmicutes (1 OTU), Fusobacteria (1OTU) e Patescibacteria (1 OTU) (Figura 6).

O biofilme dental do tempo inicial entre a dieta feno e suplementar proteica apresentou 14 OTUs com diferença entre as dietas, as quais estão distribuídas em 4 Filos com Proteobacteria representada por 7 OTUs em ambas as dietas. No momento inicial da dieta feno (C0) ainda tem 2 OTUs de Firmicutes, enquanto a dieta suplementar proteica no momento inicial (P0) possui como singularidade Bacteriodetes e Patescibacteria com 4 e 1 OTU, respectivamente (Figura 7). Já o tempo final entre as dietas (C60 e P60) diminuiu a diferença para 6 OTUs classificadas em 4 Filos. No tempo final da dieta feno (C60) aparece somente os Filos Actinobacteria e Bacterioidetes com 1 OTU em cada, enquanto o tempo final da dieta suplementar proteica (P60) obervou-se 4 OTUs distribuídas igualmente em dois Filos: Protebacteria e Fusobacteria (Figura 7).

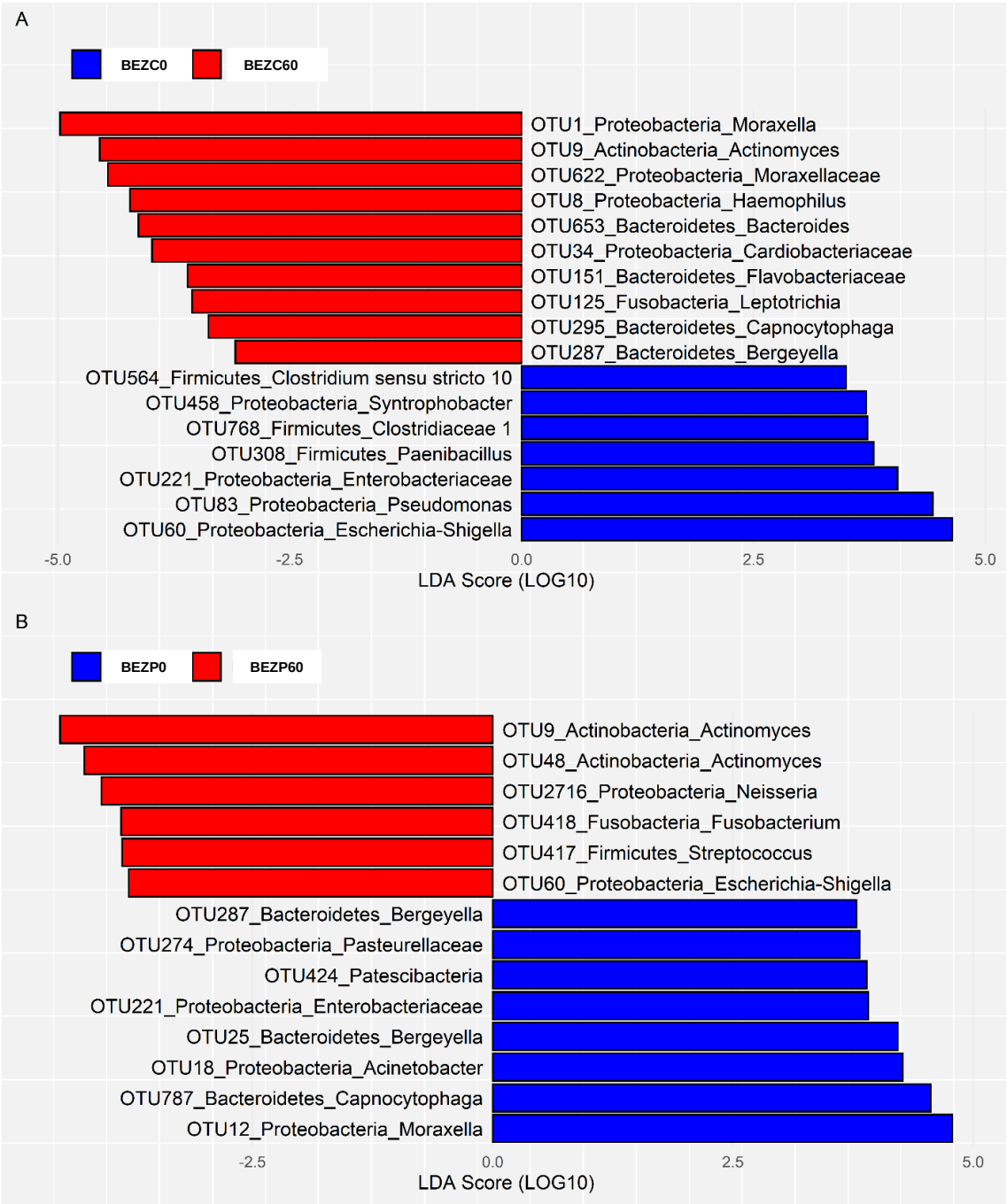


Figura 6- LefSe entre as OTUs mostrando Filo e a classificação mais específica da OTU (LDA > 2). **A-** Diferença entre a dieta feno no dia 0 e 60 (C0-C60). **B-** Diferença entre a dieta com suplemento proteico no dia 0 e 60 (P0-P60).

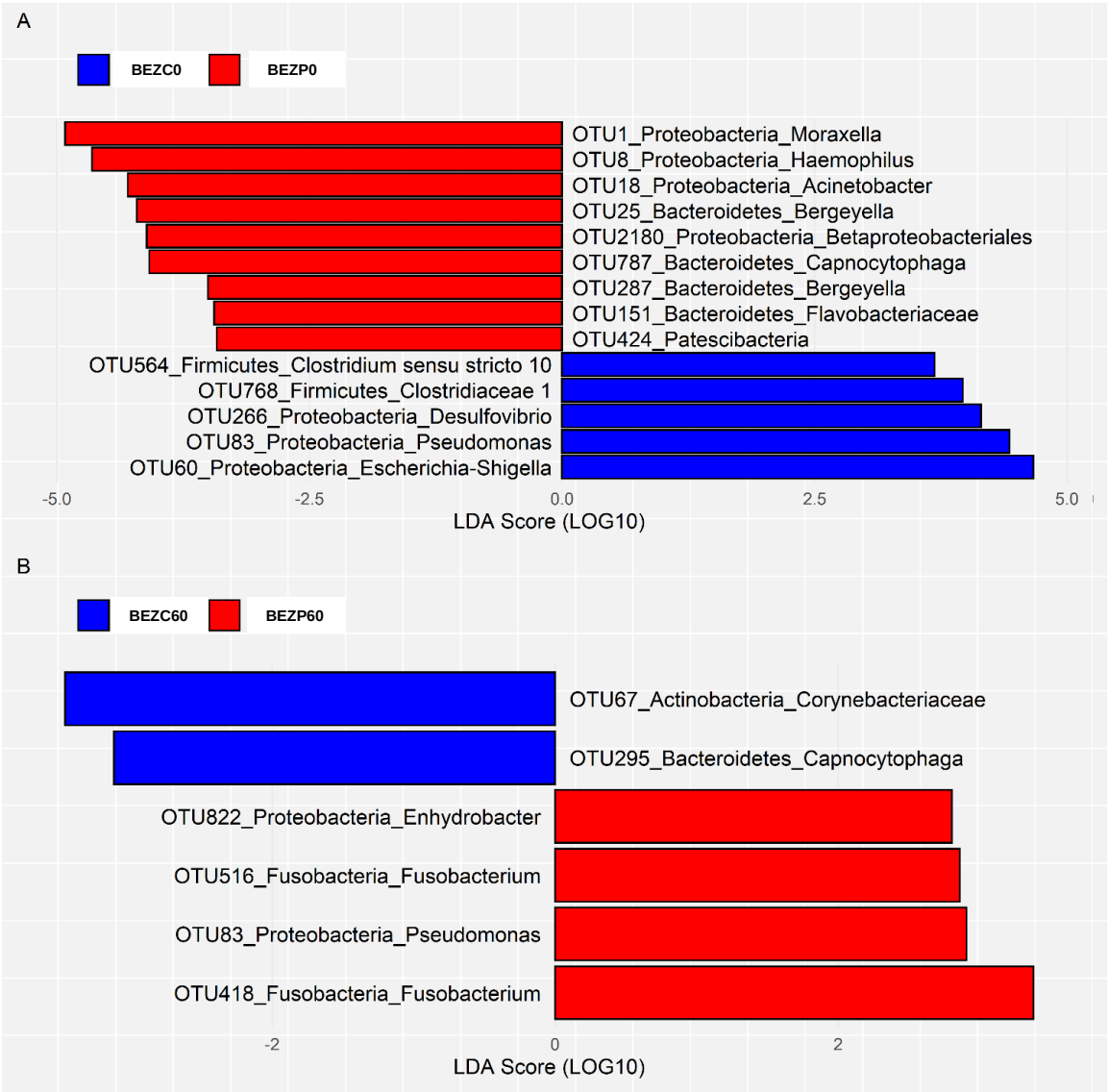


Figura 7- LefSe entre as OTUs mostrando Filo e a classificação mais específica da OTU (LDA > 2). **A-** Diferença no dia 0 entre as dietas. **B-** Diferença no dia 60 entre as dietas feno e suplementar proteica.

No conteúdo ruminal foram analisadas 1616 OTUs entre os tempos e as dietas, na dieta feno ao decorrer do tempo (C0-C60), 174 OTUs tiveram diferenças estatisticamente significantes com LDA superior a 2. As 31 OTUs com LDA maior que 3 estão distribuídas em 5 Filos, com Bacteroidetes e Firmicutes sendo os Filos que mais apareceram em

ambos momentos da dieta feno com 15 e 12 OTUs, respectivamente. No tempo inicial da dieta feno (C0) ainda aparecem 2 OTUs do Filo Proteobacteria, enquanto no momento final (C3) aparecem os Filos Fibrobacteres (1 OTU) e Lentisphaerae (1 OTU) (Figura 8A).

No grupo que recebeu a dieta suplementar proteica (P0-P60) 150 OTUs foram diferentes estatisticamente com LDA acima de 2. Do total de 18 OTUs com LDA maior que 3 e classificadas em 3 Filos, Bacteriodetes (10 OTUs) e Firmicutes (7 OTUs) estiveram presentes em ambos os momentos avaliados. Enquanto no tempo inicial (P0) observou-se presença do Filo Proteobacteria (1 OTU) (Figura 8B).

O tempo inicial entre a dieta feno e suplementar proteica do conteúdo ruminal mostrou 61 OTUs (LDA>2) com diferença entre as dietas. Dezenove OTUs com LDA superior a 2.5 estiveram distribuídas em 4 Filos, dos quais, 2 Filos aparecem em ambas as dietas: Bacteroidetes (5OTUs) e Tenericutes (3OTUs). O Filo mais presente foi Firmicutes (10 OTUs) identificado somente no tempo inicial da dieta suplementar proteica (P0), enquanto o tempo inicial da dieta feno (C0) teve como peculiaridade uma única OTU de Proteobacteria (Fig 9A).

No momento final entre as dietas (C60 e P60) com 70 OTUs (LDA>2), verificou-se a ocorrência de 34 OTUs com LDA superior a 2.5 classificadas em 9 Filos e maior OTUs nos Filos Bacteroidetes (12 OTUs), Firmicutes (12 OTUs) e Tenericutes (4 OTUs) presente entre as duas dietas. Os outros 6 Filos foram compostos por uma única OTU de cada Filo, contudo o tempo final da dieta feno (C60) apresentou Proteobacteria, Kiritimatiellaeota, Fusobacteria e Verrucomicrobia, enquanto o momento final do grupo dieta suplementar proteica (P60) ficou com a singularidade de Spirochaetes e Chloroflexi (Figura 9B).

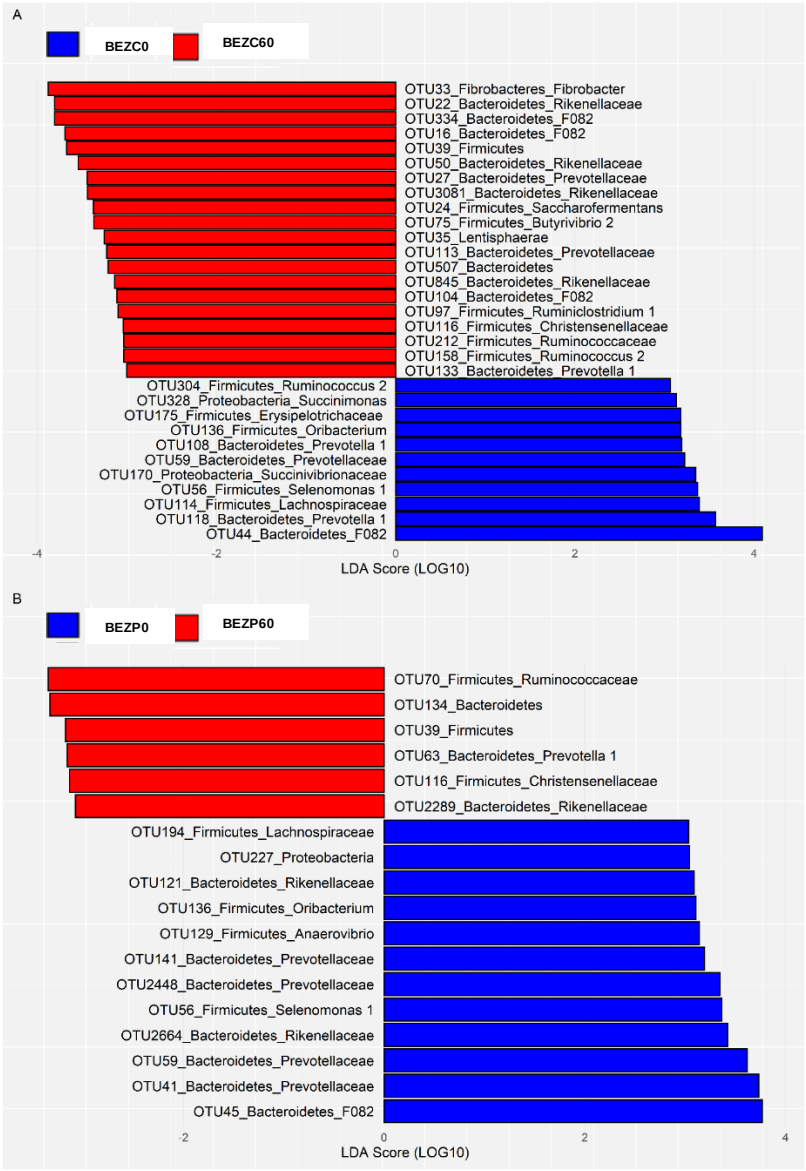


Figura 8- LefSe entre as OTUs mostrando Filo e a classificação mais específica da OTU (LDA > 3). **A-** Diferença entre a dieta feno no tempo inicial e final (C0-C60) **B-** Diferença entre a dieta com suplemento proteico nos momentos inicial e final (P0-P60)

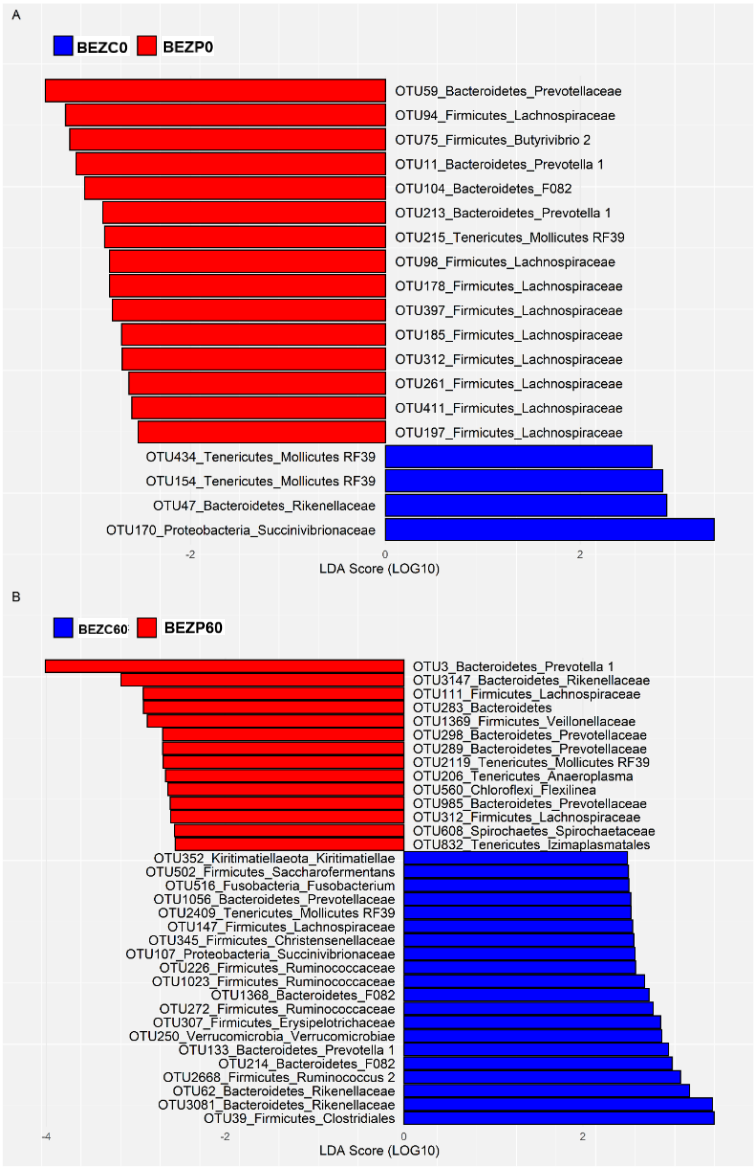


Figura 9- LefSe entre as OTUs mostrando Filo e a classificação mais específica da OTU (LDA > 2.5). **A-** Diferença no tempo inicial entre as dietas (C0-P0). **B-** Diferença no tempo final entre as dietas (C60-P60)

Redes de coocorrência entre Filos. No biofilme dental as 184 OTUs foram classificadas em 17 Filos, os quais, foram usados na construção das redes de coocorrência. No tempo inicial da dieta feno um total de 13 Filos (nodes) tiveram 12 interações (edges), das quais 66,7% foram positivas e 33.3% negativas. Os Bacteroidetes (5) e Tenericutes (3) são os Filos com mais interações nesse início da dieta feno (C0) (Figura

10A). Ao final do tempo da dieta feno (C60), o número de Filos cai para 8 com 6 interações, sendo 83.3% positivas e 16.7% negativas, e os Filos com mais interações nessa fase são Atribacteria (4) e Firmicutes (2) (Figura 10B). O Filo Atribacteria aparece em ambos os tempos da dieta feno e apresenta interação com Acidobacteria em ambos, assim como Firmicutes que interage com Bacteroidetes em C0 e C60.

A dieta com suplemento proteico no tempo inicial teve 10 Filos (nodes) com 8 interações (edges), sendo 87.5% positivas e 12.5% negativas. No tempo inicial da dieta com suplemento proteico (P0) Atribacteria (6) e Patescibacteria (2) foram os Filos com mais interações (Figura 10C). Enquanto que no tempo final (P60), o número de Filos foi reduzido a 5 Filos (nodes) com 4 interações (edges) sendo todas positivas. Os Filos com mais interações são Choroflexi (2), Euryarchaeota (2) e Synergistes (2) (Figura 10D). O Filo Patescibacteria aparece em ambos os tempos da dieta com suplemento proteico interagindo com Firmicutes, no tempo inicial tendo uma correlação negativa e no final uma correlação positiva (Figura 10).

No conteúdo ruminal os 1616 OTUs foram agrupados em 21 Filos, usados para analise de coocorrêcia. Nas duas dietas e em ambos os tempos a contagem de Filos não classificados aparecem em interações indicando que o compartimento ruminal possui Filos desconhecidos com contagens expressivas. No tempo inicial da dieta feno (C0), os Filos com mais interações são Verrucomicrobia (5), Fibrobacteres (4) e Firmicutes (4); no tempo final (C60) os Filos são Armatimonadetes(4), Fibrobacteres (3) e Synergistetes (3). O Filo Fibrobacteres que aparecem em ambos os tempos da dieta feno mantem interação com os Filos Spirochaetes e Kiritimatiellaeota (Figura 11)

O tempo inicial da dieta com suplemento proteico (P0) possui 17 Filos (nodes) interagindo 14 vezes (edges) em 71.4% positivamente e 28.6% negativamente. Os Filos com mais interações são Epsilonbacteraeota (3) e Spirochaetes (3). No tempo final, a dieta com suplemento proteico (P60) chega a 20 Filos (nodes) em 16 interações

(edges), sendo 81.3% positivas e 18.7% negativas destacando-se o Filo Elusimicrobia com 3 interações. O Filo Armatimonadetes aparece em ambos os tempos, mas correlacionados a bacterias diferentes (Figura 11)

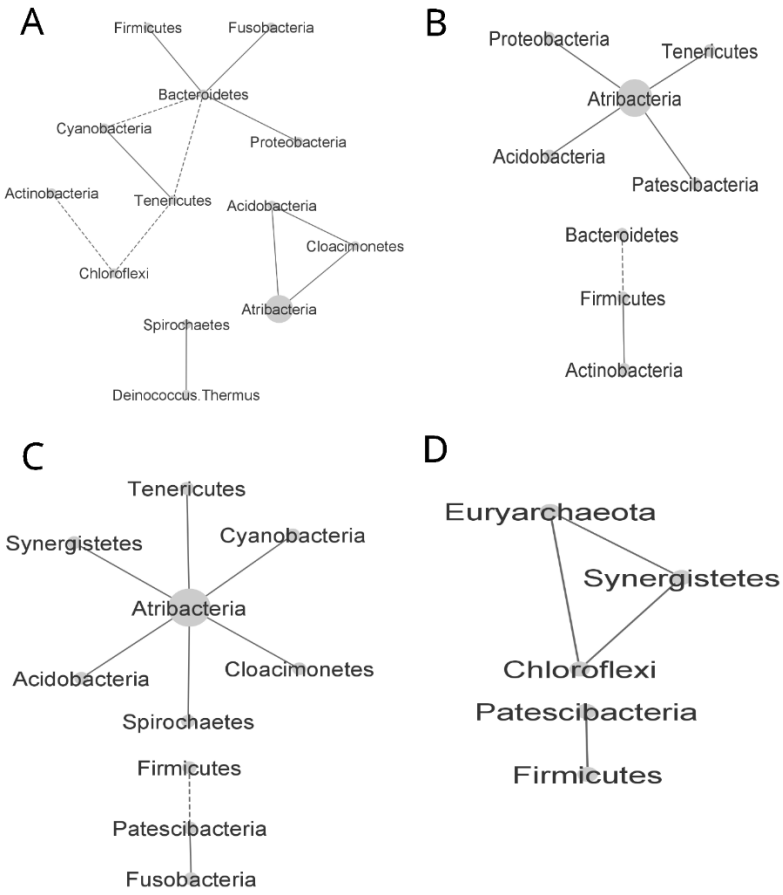


Figura 10- Rede de coocorrência entre os 17 Filos da 184 OTUs (|r| => 0.5 e p= 0.05). **A**- Dieta feno no tempo inicial (C0). **B-** Dieta feno no tempo final (C60). **C-** Dieta com suplemento proteico no tempo inicial (P0). **D**- Dieta com suplemento proteico no tempo final (P60).

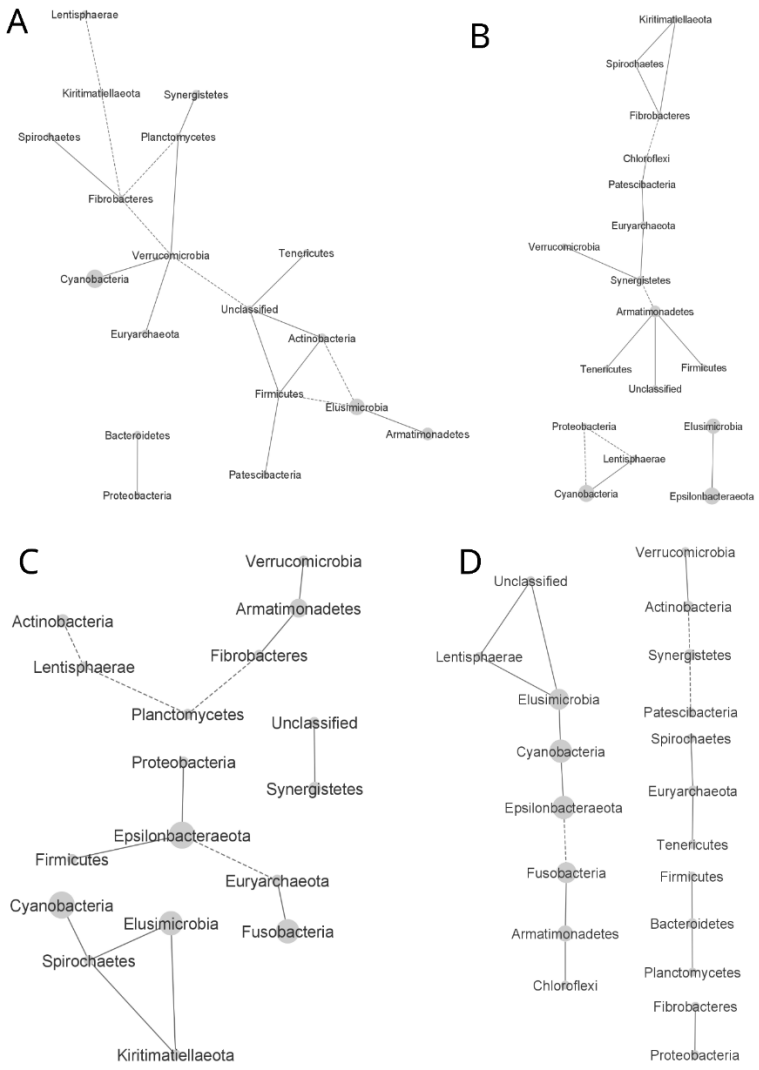


Figura 11- Rede de coocorrência entre os 21 Filos da 1616 OTUs (|r| => 0.5 e p = 0.05). **A-** Dieta feno no tempo inicial (C0). **B-** Dieta feno no tempo final (C60). **C-** Dieta com suplemento proteico no tempo inicial (P0). **D-** Dieta com suplemento proteico no tempo final (P60).

Discussão

Investigações sobre a composição do microbioma gastrointestinal de herbívoros têm sido amplamente desenvolvidas, principalmente na pecuária moderna que vem buscando uma produção ecologicamente

sustentável com animais criados em condições adequadas de saúde e bem-estar. Contudo, somente recentemente o sequenciamento genético tem sido utilizado como ferramenta investigativa de processos de natureza infecciosa que acometem a cavidade bucal de ruminantes (Riggio et al. 2013; Borsanelli et al. 2018; Borsanelli et al. 2021; Borsanelli et al. 2022a; Borsanelli et al. 2022b). No presente estudo, foi possível verificar que as comunidades bacterianas do biofilme dental de bovinos alimentados com dieta suplementar proteica são marcadas pela abundância de Filos já reconhecidos no microbioma dental da espécie, como Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobateria e Firmicutes (Borsanelli et al. 2018a; Borsanelli et al. 2022).

Os gêneros *Moraxella*, *Neisseria* e *Lautropia* foram identificadas no biofilme dental dos animais em ambos os momentos (início e ao término do experimento) e em ambas as dietas. Porém, diferenças foram observadas, por exemplo pela redução da abundância de *Moraxella* no grupo dieta suplementar proteica de 31,5% no início do experimento para 5,3% ao término do confinamento. Essa mudança provavelmente ocorreu devido a uma modulação da microbiota frente o desafio alimentar ao qual os animais foram expostos.

Em bovinos e caprinos, *Moraxella* representa um dos gêneros mais abundantes no microbioma dental de animais clinicamente saudáveis (Borsanelli et al. 2022a; Borsanelli et al. 2022b). Embora afecções bucais não tenham sido objeto do presente estudo, o gênero *Moraxella* esteve presente mesmo em animais com diferentes dietas e a redução de sua abundância poderia representar (ao longo do tempo) possível relação com processos infecciosos, como observado na microbiota de cães com doenças periodontais (Braga et al. 2005).

No rúmen, Filos considerados centrais dentro desse ambiente como Bacteroidetes e Firmicutes foram os mais representativos em ambos os grupos e momentos avaliados. Achados semelhantes são descritos por Deusch et al. (2017) com mudanças de arranjo nas

comunidades bacterianas de acordo com a dieta e fração ruminal coletada.

O Filo Fibrobacteres foi descrito no momento final do experimento em ambas as dietas, assim como o gênero Fibrobacter, reconhecido como importante degradador celulolítico (Punya et al. 2015), que também foi identificado no momento final de ambas dietas do presente estudo (Figura 3B). Além disso, nas redes de microbiota ruminal, Fibrobacteres esteve entre os Filos com maiores interações com outros Filos, principalmente no grupo que recebeu dieta base feno (Figura 11A e 11B).

Animais alimentados com dietas a base de silagem de capim e feno apresentam maior abundância do Filo Fibrobacteres quando comparada as mesmas frações de coleta de amostras de animais mantidos em dietas à base de silagem de milho (Deush et al. 2017). Outro achado interessante descrito por Fernando et al. (2010), refere-se ao aumento significativo de bibliotecas de genes 16S rRNA de bactérias pertencentes ao Filo Fibrobacteres em animais alimentados com feno, em semelhança ao que encontramos no presente estudo, uma vez que ambos os grupos receberam feno como dieta base.

O Filo Proteobacteria esteve presente em ambas dietas e períodos avaliados, entretanto não foram observadas mudanças expressivas na sua ocorrência. As Proteobacterias são encontradas no microbioma dental de bovinos clinicamente saudáveis em diferentes regiões geográficas e condições epidemiológicas (Borsanelli et al. 2018; Borsanelli et al. 2022a), e foram encontradas no microbioma dental dos animais do presente estudo. Proteínas proteobacterianas são mais abundantes no rúmen de animais que recebem silagem a base de milho (Deush et al., 2017) e dietas ricas em concentrados (Fernando et al. 2010). A dinâmica de população microbiana ruminal altera-se em estrutura e diversidade (Fernando et al. 2010), entretanto deve-se

considerar que no presente estudo o período de adaptação às dietas não foi avaliado devido a inviabilidade das amostras.

O gênero *Prevotella* representa um dos gêneros mais abundantes no ambiente ruminal (Kim et al. 2010; Rey et al. 2013), e no presente estudo também se destacou por sua abundância em ambas dietas e períodos avaliados, com redução de porcentagem do período final (23,6%) quando comparado o período inicial (33,8%) dos animais que receberam dieta a base de feno (Figura 2B). Essas flutuações assemelham-se aos achados de Fernando et al. (2010) que mostraram número significativamente maior de bactérias do Filo Bacteroidetes (compostas em sua maioria por bactérias do gênero Prevotella), em animais alimentados com feno de pradaria e em animais alimentados com grãos. Na boca, bactérias do gênero Prevotella estão associadas a sítios gengivais e doenças periodontais de ruminantes (Borsanelli et al. 2015; Borsanelli et al. 2017; Campello et al. 2019; Ramos et al. 2019).

Em ovinos, é possível observar perfis diferentes de diversidade e riqueza no microbioma de animais saudáveis e com periodontite (Borsanelli et al. 2021), provavelmente decorrente da disbiose relacionada ao desencadeamento das doenças periodontais. No enfoque do presente estudo e considerando-se os momentos e as dietas, não foram observadas diferenças significativas de riqueza e diversidade do microbioma bucal e ruminal dos animais. Apesar da comunicação bidirecional que ocorre entre esses ambientes (Borsanelli et al. 2022), é razoável considerar que o presente estudo acrescenta na compreensão da ecologia clássica do microbioma de bovinos mantidos em dietas distintas, mas não revela possíveis mudanças funcionais que provavelmente ocorreram nessas populações microbianas.

Em adição, diferenças estatisticamente significantes foram observadas na composição do microbioma bucal dos bovinos que receberam dieta base feno entre período inicial e final ($p=0.007$) com média de 81% de dissimilaridade (Figura 5A). Das 17 OTUs que

apresentaram diferenças significativas entre os momentos avaliados no microbioma dental dos bovinos, 5 Filos foram predominantes: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria e Firmicutes (Figura 6A), esses mesmos Filos estão frequentemente associados a microbiota dental de cães saudáveis (Sturgeon et al., 2013; Holcombe et al., 2014), e detectados nos incisivos de bovinos com periodontite (Borsanelli et al. 2022a).

O Fusobacterium pode ser considerado um micro-organismo “ponte” que atua na co-agregação de micro-organismos dos biofilmes dentários (Borsanelli et al. 2022b), e no rúmen, estão entre as bactérias anaeróbias presentes desse ambiente (Nagaraja 2016; Deusch et al. 2017). A redução das populações de Fusobacterium está associada a um melhor aproveitamento nutricional de novilhos (Clemmons et al. 2019), e no presente estudo, das 4 OTUs distribuídas igualmente no microbiobioma dental de bovinos, Fusobacteria esteve presente aos 60 dias somente no grupo que recebeu dieta suplementar proteica, possivelmente indicando que, com o passar do tempo, essas dietas possam contribuir com a seleção desses micro-organismos na microbiota dental de bovinos.

Ao avaliar a microbiota ruminal, além de diferenças estatísticas significantes no grupo dieta base feno ($p= 0.004$), também foram observadas diferenças nos bovinos do grupo dieta suplementar proteica (comparações entre os períodos inicial e final, $p= 0.004$ e dissimilaridade de 59%), bem como entre as duas dietas no momento final ($p= 0.005$), comprovando que o tipo de alimentação fornecido aos animais provoca alterações das populações do microbioma, mesmo quando a base de volumoso é a mesma.

A comunidade bacteriana ruminal de bovinos começa ser moldada antes da ingestão de alimentos sólidos (Matthews et al. 2019). Ao término do experimento, os Filos identificados em comum aos dois grupos e com maiores OTUs no microbioma ruminal foram Bacteroidetes

(12 OTUs), Firmicutes (12 OTUs) e Tenericutes (4OTUs), em semelhança aos achados de diversos autores (Borsanelli et al. 2022; Kim et al. 2011; Deush et al. 2017).

Ao avaliar as redes de co-ocorrência da boca e do rúmen de ambos os grupos e períodos avaliados, mais interações positivas que negativas foram encontradas (Figuras 10 e 11). No grupo feno ao término do experimento, os Filos Atribacteria e Firmicutes foram os que apresentaram mais interações sendo 83,3% delas positivas (Figura 10B). Enquanto que no grupo alimentado com dieta suplementar proteica os Filos Choroflexi, Euryarchaeota e Synergistes com 100% de interações positivas no microbioma dental dos animais aos 60 dias (Figura 10D). Essas conexões positivas encontradas no presente estudo podem indicar que as comunidades bacterianas estão interconectadas e isso provavelmente decorre da cooperação entre os micro-organismos.

Um contraponto interessante que deve ser considerado refere-se a possível interferência de outros fatores modificadores nas interações dos microbiomas do hospedeiro e que não foram investigadas, como distúrbios metabólicos, resposta imune e inflamatória. Apesar da complexidade do presente estudo, os dados preliminares indicam que o microbioma ruminal e bucal de bovinos alimentados com feno de pasto reformado e suplemento proteico podem ser remodelados segundo os desafios aos quais os animais são expostos, e, ainda, protocolos alimentares aplicados na bovinocultura com finalidade de se obter altos indíces zootécnicos carecem investigações mais aprofundadas sobre a real eficiência que podem refletir do ponto de vista nutritivo e de produção animal.

Conclusão

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

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

Financiamento

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

Declaração de conflito de interesse

Todos os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Referências

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

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

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

Borsanelli A.C., Gaetti-Jardim Jr E., Schweitzer C.M., Viora L., Busin V., Riggio M.P., Dutra I.S. 2017. Black-pigmented anaerobic bacteria associated with ovine periodontitis. *Vet. Microbiol.* 203:271–274. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.03.032

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

A composição da dieta reflete na composição proteica da saliva de bovinos e nas comunidades microbianas do rúmen, mas investigações sobre o microbioma bucal de ruminantes são relativamente recentes, principalmente quando consideramos a complexidade envolvida na elucidação dos fenômenos relacionados à doenças de etiologias multifatoriais, como as doenças periodontais e outras enfermidades bucais que acometem bovinos.

A diversidade e a composição microbiana dos ecossistemas bucal e ruminal estão associadas ao estado fisiológico do hospedeiro, e, adicionalmente, a disbiose dessas comunidades acarretam não somente em comprometimento da saúde e bem-estar dos animais, mas também em perdas produtivas. Nesse caso, a dieta é um fator importante na modulação dos microbiomas nos ruminantes, especialmente devido a comunicação bidirecional que ocorre entre a boca e o rúmen nesses animais.

Acrescenta-se nesse contexto, o papel da saliva como um fluido que se adapta rapidamente às mudanças dietéticas as quais os animais são expostos, e que reflete possíveis processos patológicos do hospedeiro. Investigações sobre o proteoma salivar de bovinos são relativamentes limitadas, e nesse contexto, o presente estudo contribui na compreensão preliminar do que ocorre na saliva de bovinos jovens quando são mantidos em condições controladas de manejo, principalmente pela expressão de proteínas com diversas funções de forma diferencial entre os grupos, destacando-se àquelas de função antimicrobiana e anti-inflamatória.

De um modo geral, nos resultados preliminares do microbioma dental e ruminal desses animais, destaca-se a dissimilaridade dessas microbiotas nos grupos feno (microbiota dental) e no grupo que recebeu suplemento proteico (microbiota dental e ruminal), indicando que aparentemente essas dietas refletem na modução microbiana da boca e do rúmen de bovinos jovens.

As doenças periodontais são enfermidades multifatoriais e há indícios que em ruminantes, a dieta possa atuar como um dos fatores relacionados a sua etiologia, principalmente quando os animais são submetidos ao pastejo em áreas reformadas. No presente estudo, o feno de *Panicum* utilizado como base de volumoso para todos os bovinos foi produzido em área reformada. Assim, fatores mais complexos relacionados ao microbioma do solo e das plantas utilizadas na alimentação de bovinos precisam ser melhor investigados, pois também poderiam de alguma forma refletir na estruturação das comunidades microbianas.

Na maioria das vezes, o uso de dietas que visam obter alto desempenho com baixo custo são aplicadas na bovinocultura como uma forma de se obter ganhos na atividade produtiva. No entanto, os efeitos associados a esses protocolos alimentares na saúde bucal e sistêmica dos animais acabam sendo negligenciados, refletindo de forma inversa ao que se deseja para uma produção efetiva e ecologicamente sustentável.

Sendo assim, o presente estudo contribui de forma inédita na compreensão inicial associada a complexidade envolvida na elucidação de fatores associados a etiopatogênese das doenças periodontais; na composição do microbioma dental e ruminal, bem como na composição proteica da saliva de bovinos mantidos sob dietas controladas. A partir disso, investigações sobre eficiência e nutrição proporcionadas por manejos alimentares atualmente utilizados na produção animal devem ser consideradas na bovinocultura moderna.